

Cristallographie à haute résolution des macromolécules biologiques.

Principe et applications

Trois notions clefs :

- 1 - Cristallographie
- 2 - Notion de résolution en cristallographie
- 3 - Cristallographie des macromolécules biologiques (protéines)

Application :

Exemple de l'élucidation du mode de fixation du phosphate dans les protéines DING

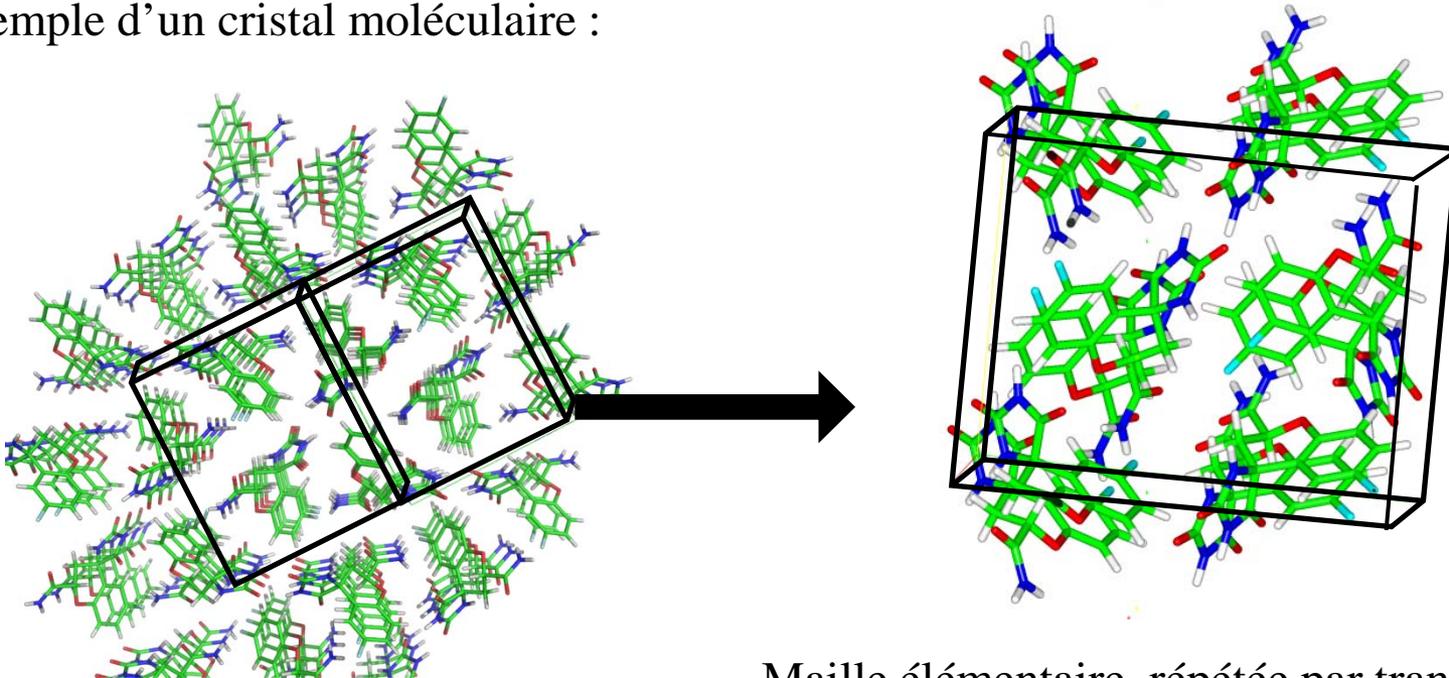
1 - Cristallographie

« L'étude de la matière cristalline à l'échelle de l'atome »

Matière cristalline

→ Caractérisé par une structure régulière et périodique de l'arrangement des atomes ou des molécules (réseau 3D).

Exemple d'un cristal moléculaire :

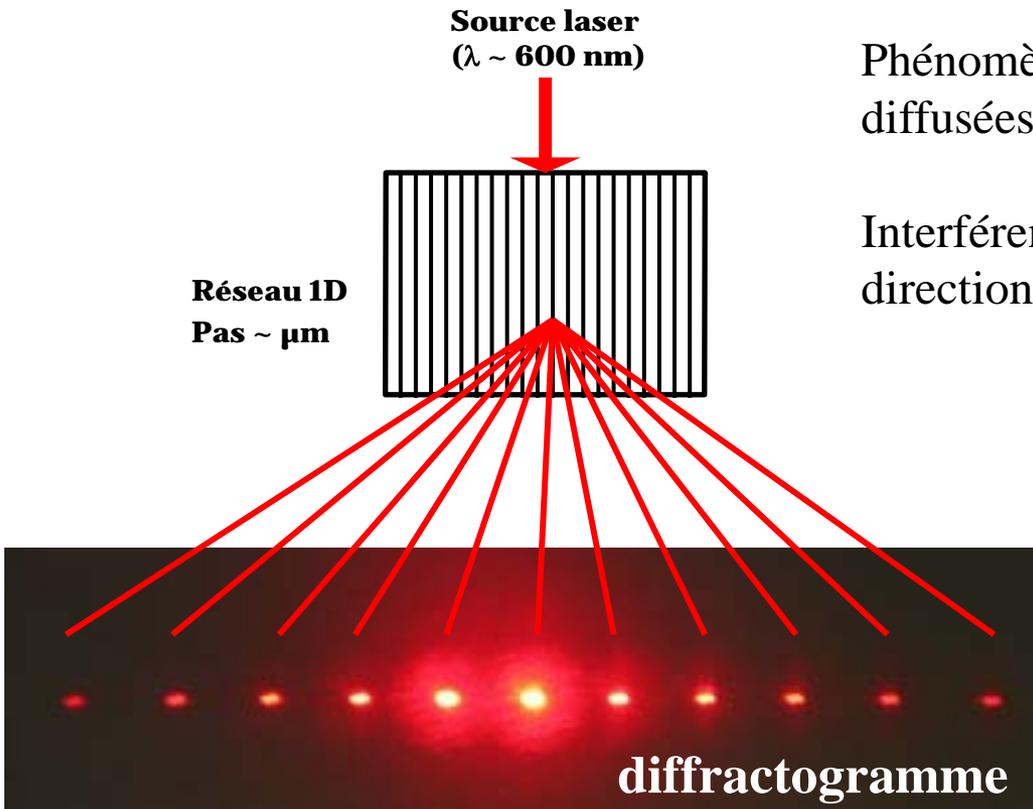


Maille élémentaire, répétée par translation 3D

Matière cristalline

→ Propriétés de diffraction de la lumière.

Analogie avec une expérience classique : diffraction par un réseau 1D



Phénomène d'interférences entre les ondes diffusées par les fentes du réseau.

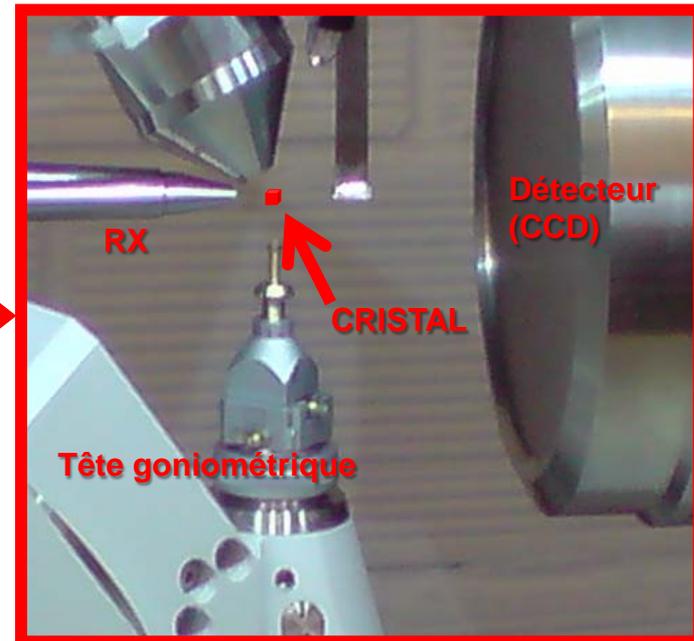
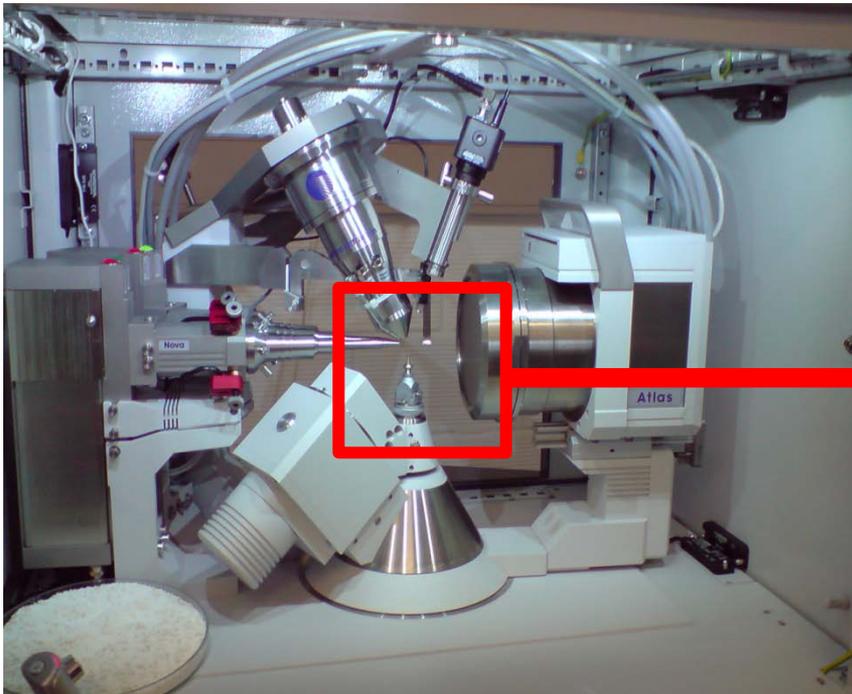
Interférences constructives dans certaines directions de propagation : intensités diffractées

Les propriétés *géométriques* du diffractogramme renseignent sur la structure périodique de l'objet diffractant (le pas du réseau)

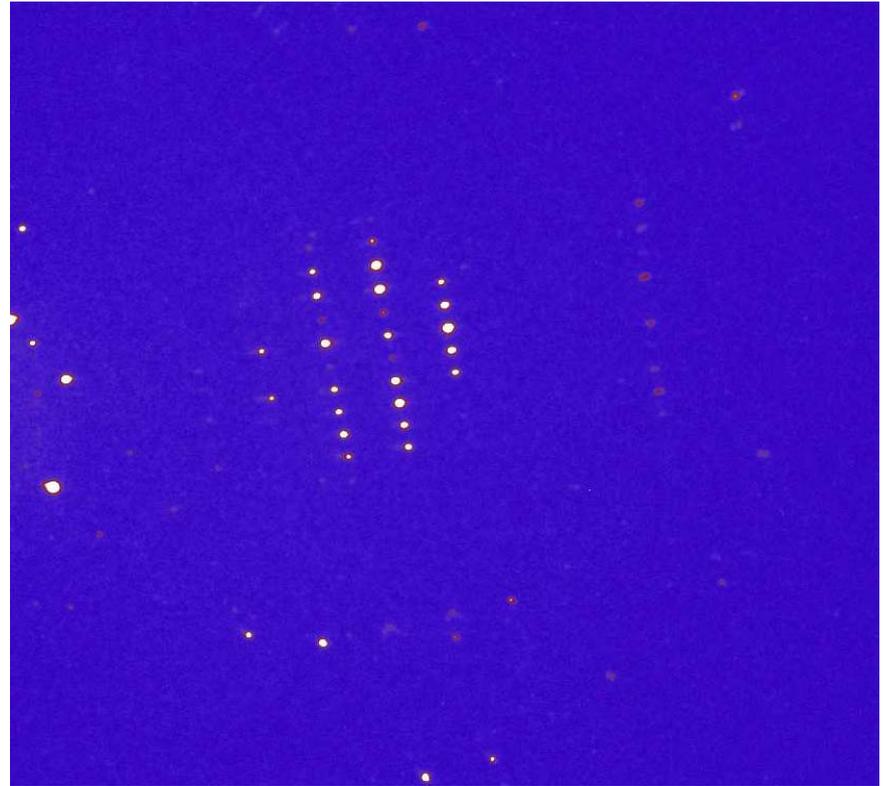
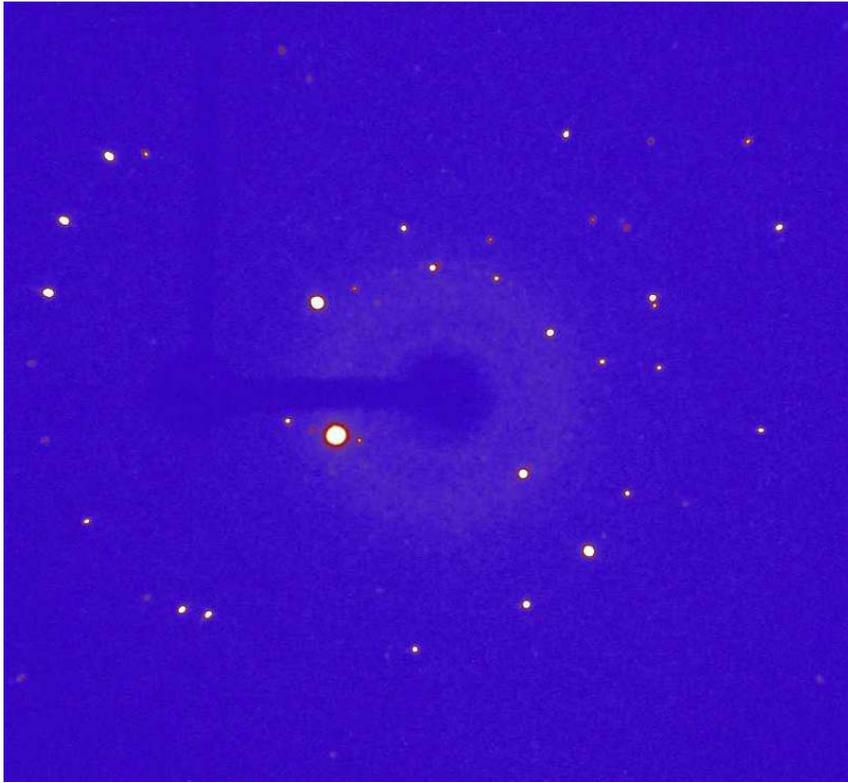
Un cristal est un réseau 3D.

Spécificités :

- Distances caractéristiques = distances inter-atomiques (Angström 10^{-10} m)
Choix d'une longueur d'onde adaptée : **les Rayons X** ($\lambda \sim 1 \text{ \AA}$)
- Réseau 3D donc « diffractogramme 3D »
Nécessité de désorienter (faire tourner) le cristal pour explorer l'espace de diffraction (*espace réciproque*) et collecter de nombreuses images de diffraction



Images de diffraction (monocristal, molécule organique)



Propriétés *géométriques* du diffractogramme

→ Connaissance de la structure périodique de l'objet diffractant

Ici le « pas » du réseau 3D = **géométrie et symétrie de la maille élémentaire**

Mesure des intensités diffractées (par intégration des pics)

→ Connaissance du motif = **contenu (moléculaire ou atomique) du cristal**

Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

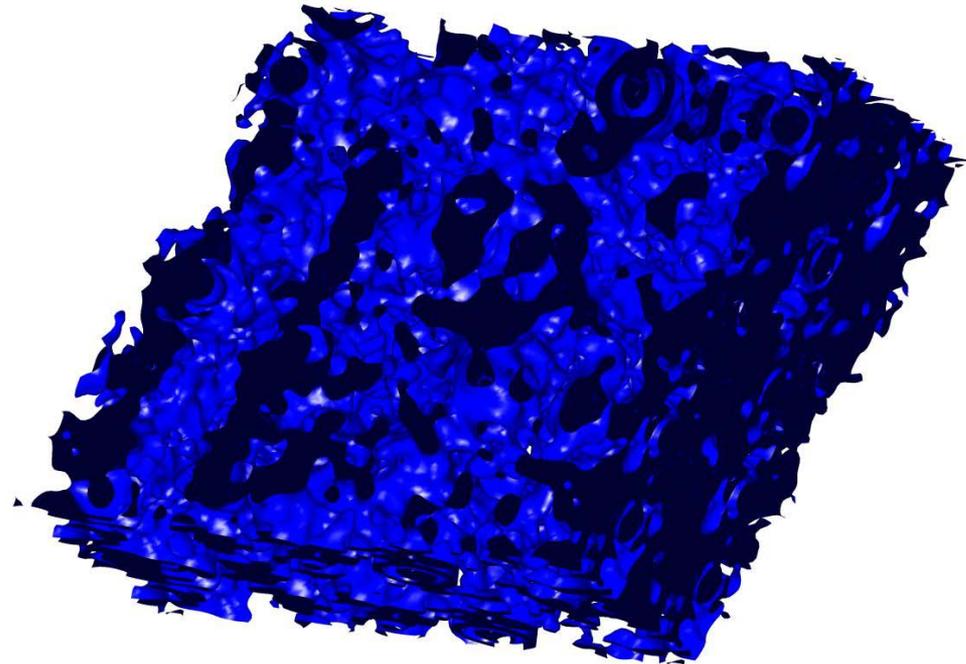
La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 0.1 \text{ e}/\text{\AA}^3$

Niveau du bruit expérimental



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

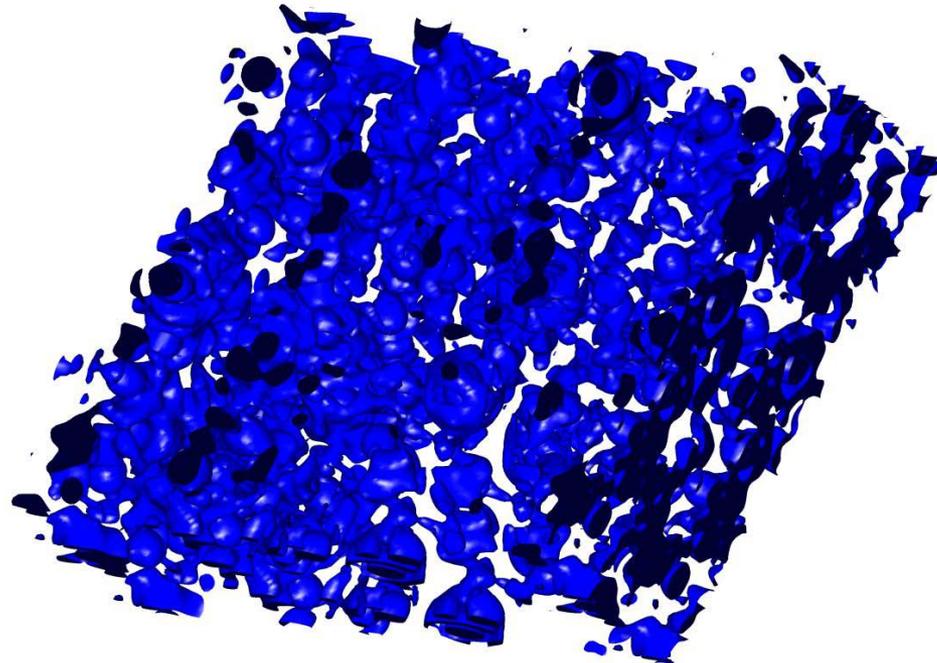
La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 1 \text{ e}/\text{Å}^3$



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

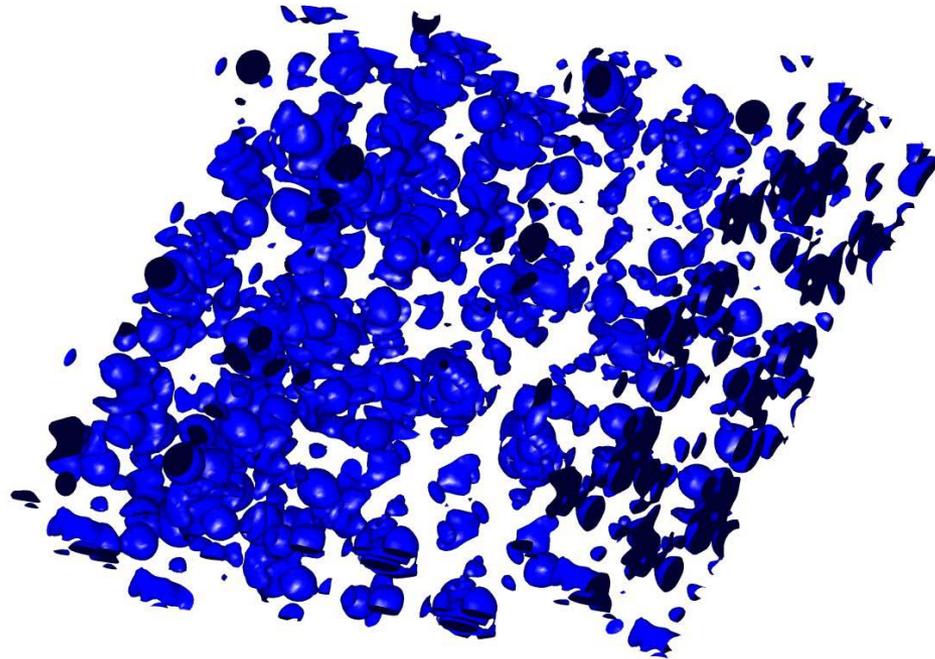
La distribution des électrons (densité électronique) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 1.5 \text{ e}/\text{Å}^3$



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

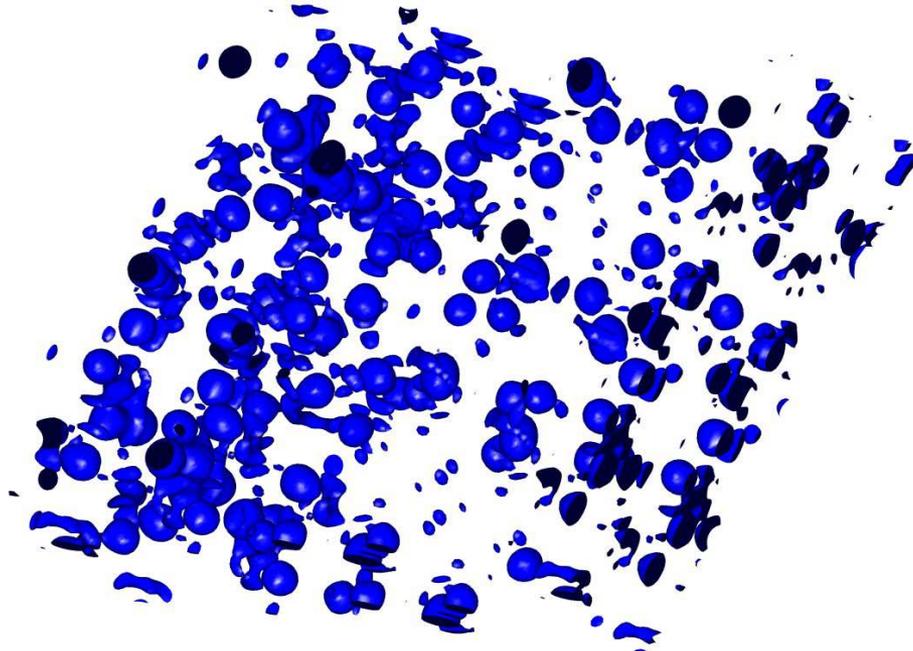
La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 2 \text{ e}/\text{Å}^3$



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

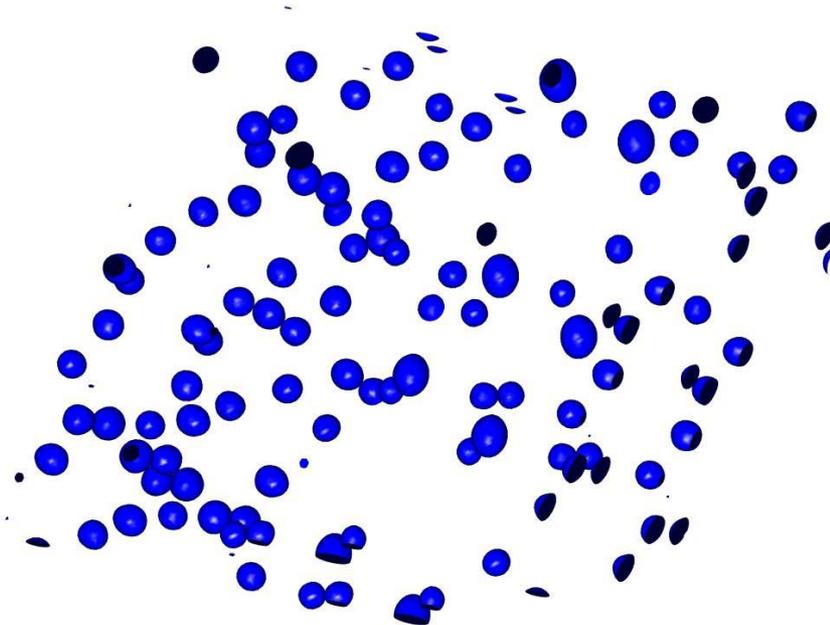
La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 5 \text{ e}/\text{\AA}^3$

Position des atomes non-H



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

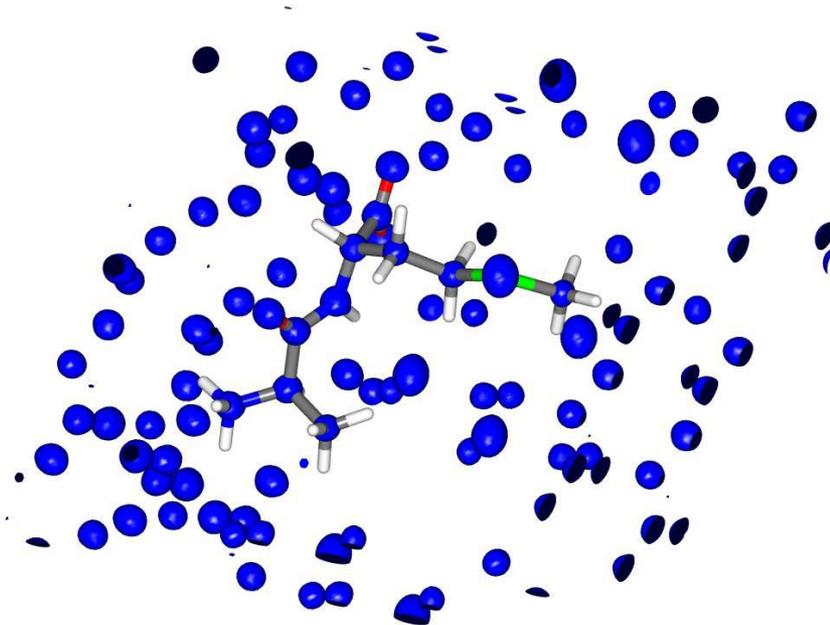
La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 5 \text{ e}/\text{\AA}^3$

Position des atomes non-H



Les rayons X sont sensibles aux *électrons* des atomes formant le cristal

La distribution des électrons (**densité électronique**) dans la maille élémentaire module les intensités des ondes diffractées

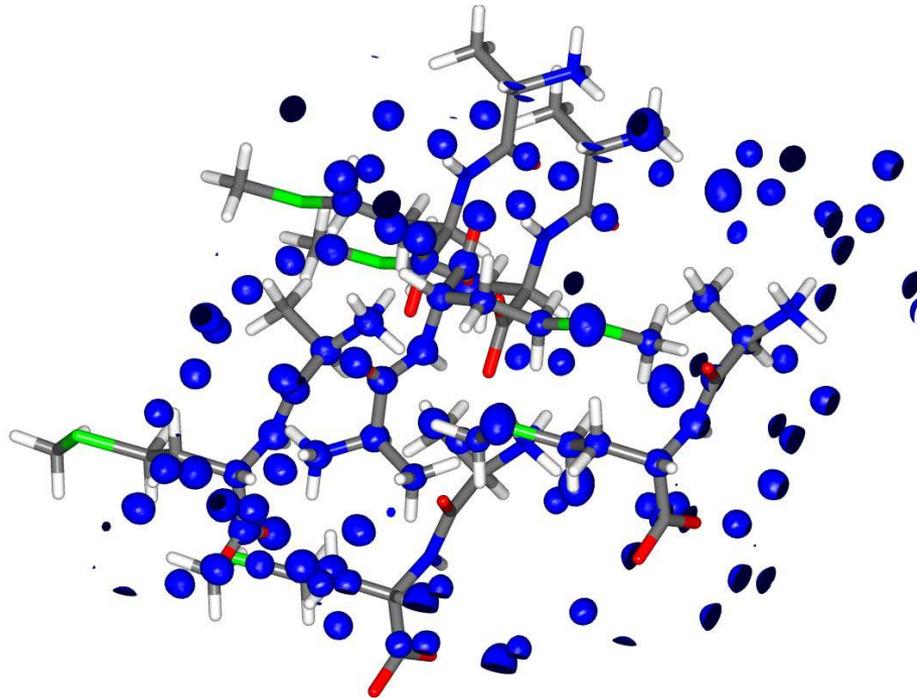
La mesure des intensités diffractées renseigne sur la densité d'électrons $\rho(x,y,z)$ dans la maille élémentaire.

→ Les grandes valeurs de $\rho(x,y,z)$ indiquent les positions des atomes

Représentation en iso-surfaces de $\rho(x,y,z)$ dans une portion d'un cristal moléculaire.

Iso surface $\rho = 5 \text{ e}/\text{\AA}^3$

Position des atomes non-H



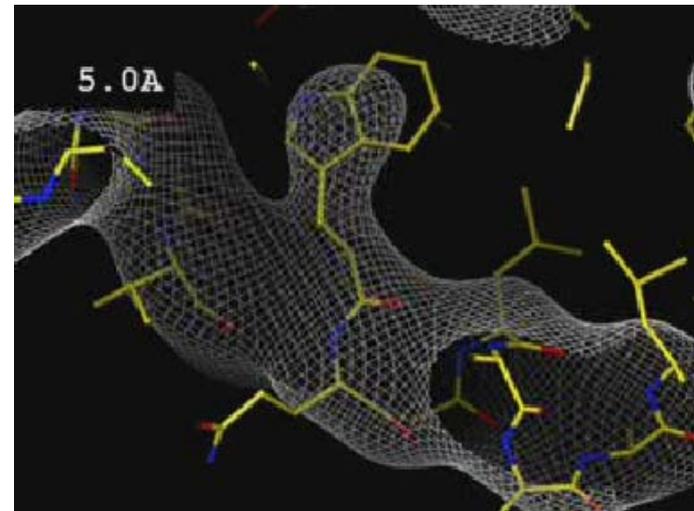
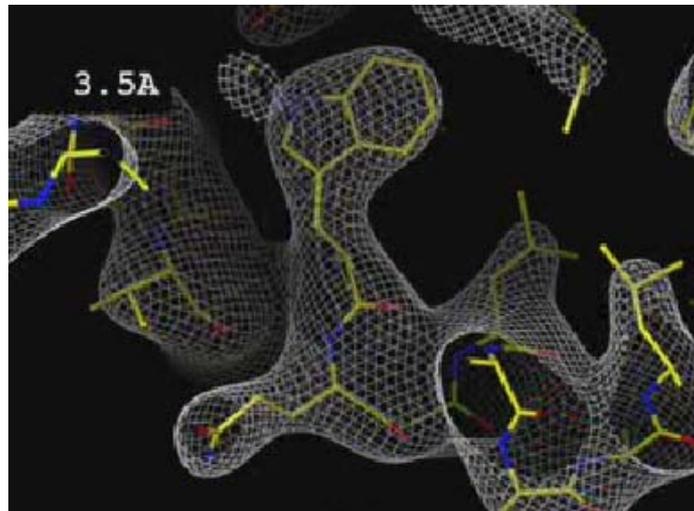
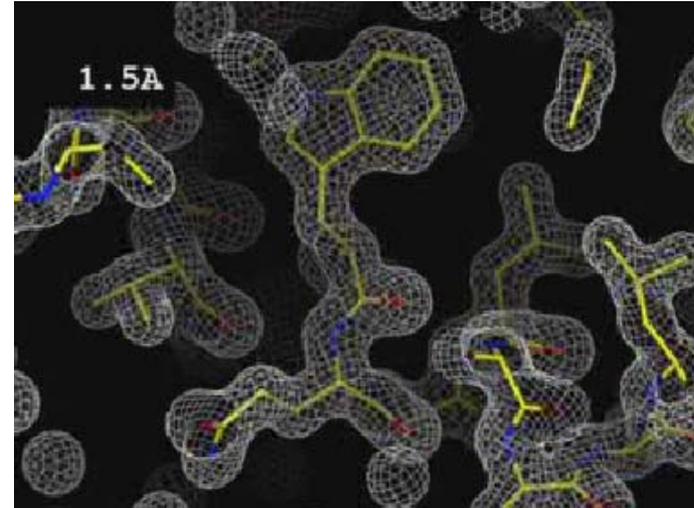
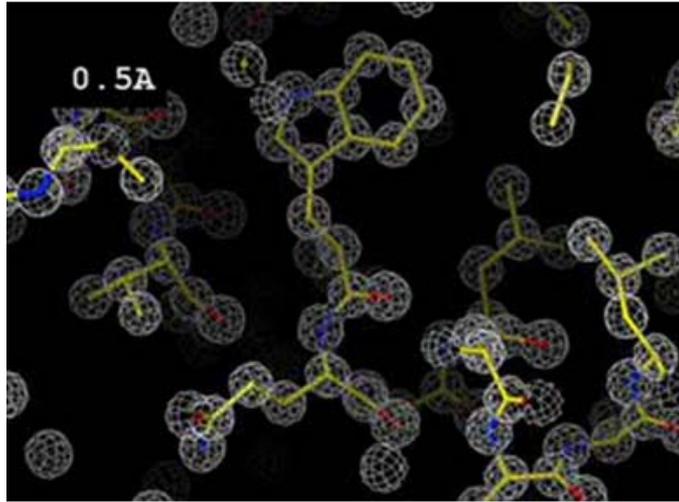
Notion de résolution

Chaque cristal présente un pouvoir diffractant intrinsèque qui détermine la **résolution maximale** (d , en Å) des données issues de l'expérience de diffraction.

Résolution max	Informations dans $\rho(x,y,z)$
Basse $d > 4 \text{ \AA}$	Pas de détails : enveloppes moléculaires
Moyenne $d \sim 2.5 \text{ \AA}$	Peu de détails : enveloppes de fragments Atomes d'hydrogène invisibles Atomes lourds distincts
Haute (atomique) $d \sim 1 \text{ \AA}$	Structure atomique détaillée Atomes individuels (et quelques hydrogènes)
Ultra haute (subatomique) $d < 0.8 \text{ \AA}$	Tous les atomes distincts Déformation de la densité électronique Électrons de liaisons, paires libres..

Notion de résolution

Densité électronique d'une région de protéine à diverses résolutions
Iso surface de forte valeur de ρ

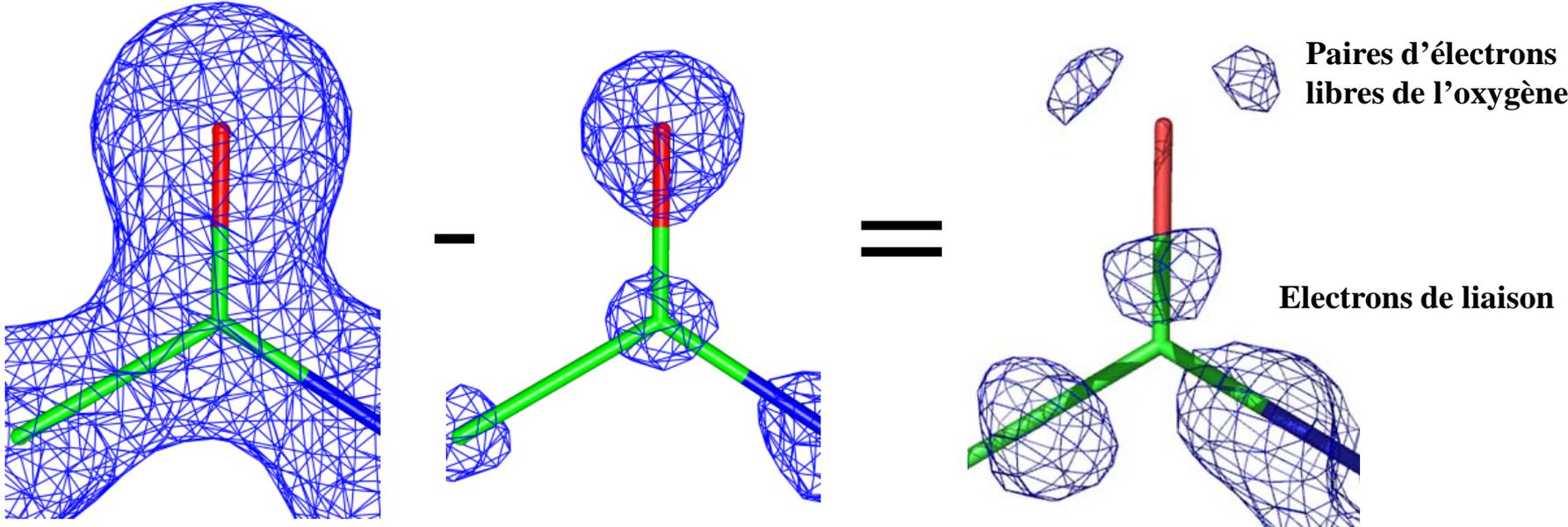


Cas de la résolution sub-atomique

Permet de « visualiser » la déformation de la densité électronique des atomes, due à la formation des liaisons chimiques

- Électrons partagés dans les liaisons covalentes
- Transferts d'électrons (charges atomiques)
- Doublets d'électrons non liants

→ Écart à la symétrie sphérique du nuage électronique



Densité électronique totale

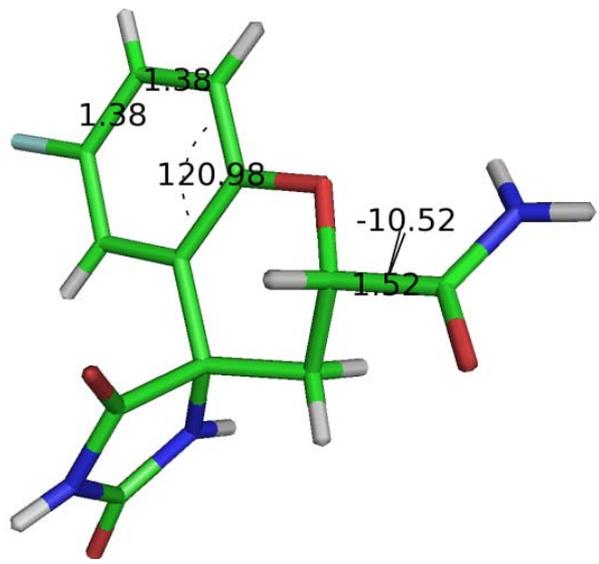
Contribution sphérique

Densité électronique de déformation

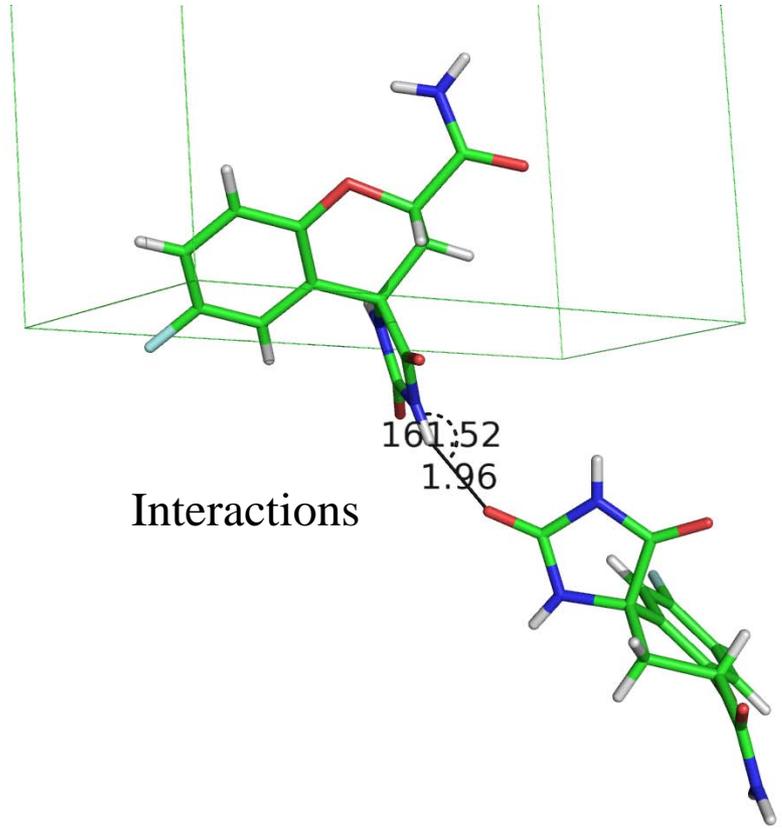
Expérience de diffraction des rayons X sur monocristal :

→ Résolution de la structure, à l'échelle de l'atome, des molécules formant le cristal, sur la base de la détermination de la densité électronique.

→ Coordonnées des atomes → Élaboration d'un **modèle**



Conformation, Stéréochimie



Interactions

Cas de la résolution sub-atomique

Utilisation d'un **modèle d'atome** adapté, capable de modéliser la densité de déformation mesurée lors de l'expérience de diffraction des RX

→ Atomes non-sphériques et non-neutres

→ Formalisme multipolaire :

$$\rho_{\text{atome}}(\mathbf{r}) = \rho_{\text{coeur}}(r) + P_{\text{val}}\rho_{\text{val}}(r) + \rho_{\text{déformation}}(\mathbf{r}, \dots)$$

Ajustement des paramètres du modèle ($P_{\text{val}} \dots$) contre les données de diffraction

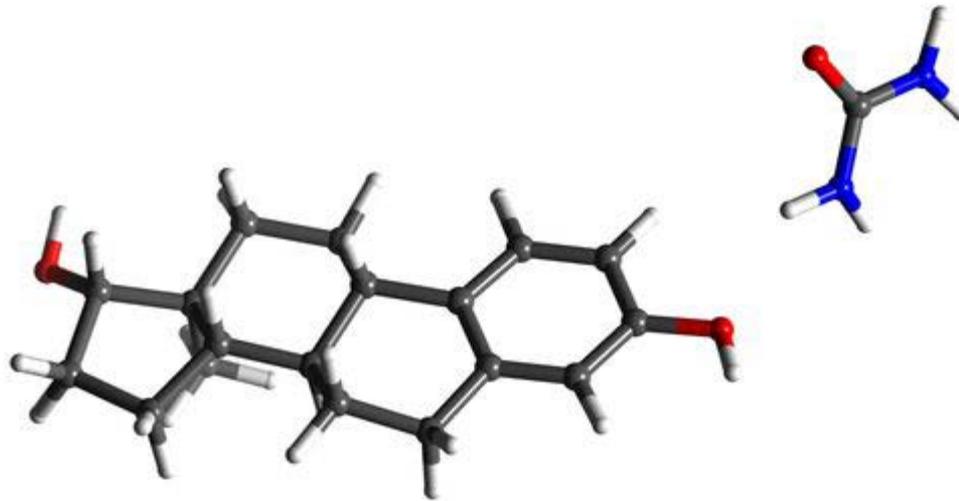
→ Expression analytique pour $\rho(\mathbf{r})$

→ **Calcul de propriétés dérivées :**

- Charges atomiques (Populations de valence)
- Potentiel électrostatique
- Champ électrique

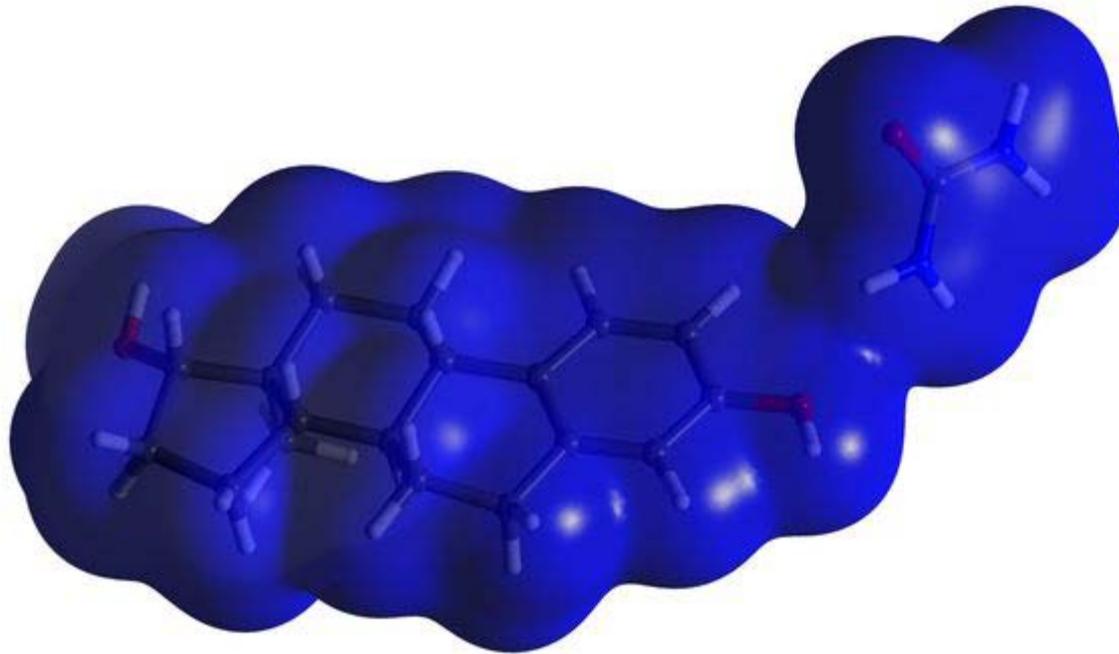
Exemple :

Structure cristalline d'un complexe Urée – Estradiol.
Données de diffraction $d = 0.45\text{\AA}$



Exemple :

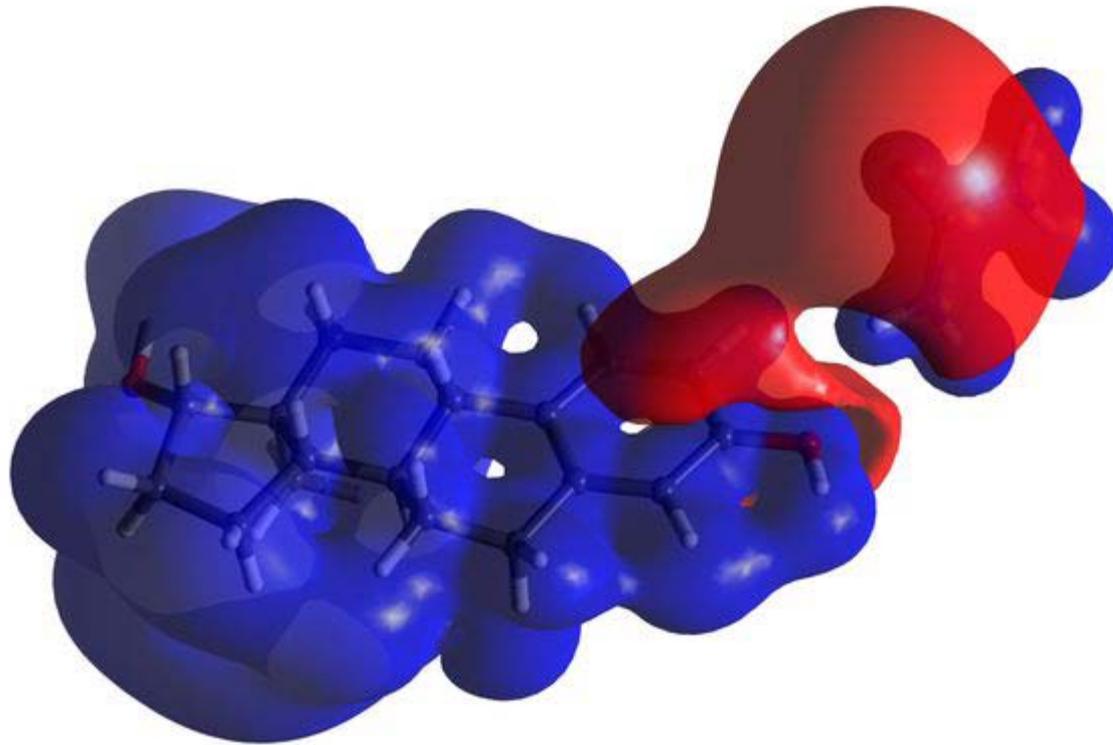
Structure cristalline d'un complexe Urée – Estradiol.
Données de diffraction $d = 0.45\text{\AA}$



Iso-surface $0.013\text{ e}/\text{\AA}^3$ de densité électronique

Exemple :

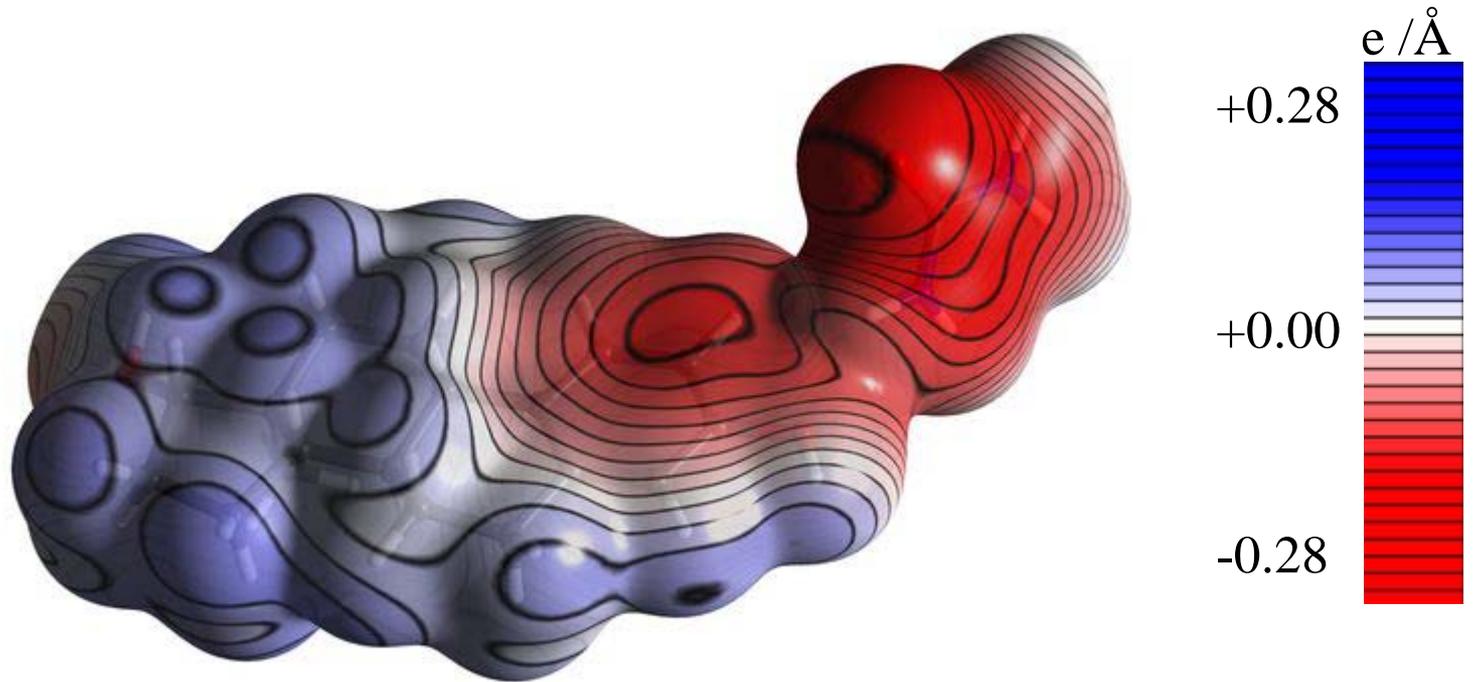
Structure cristalline d'un complexe Urée – Estradiol.
Données de diffraction $d = 0.45 \text{ \AA}$



Surfaces iso-potentielles $\pm 0.2 \text{ e / \AA}$

Exemple :

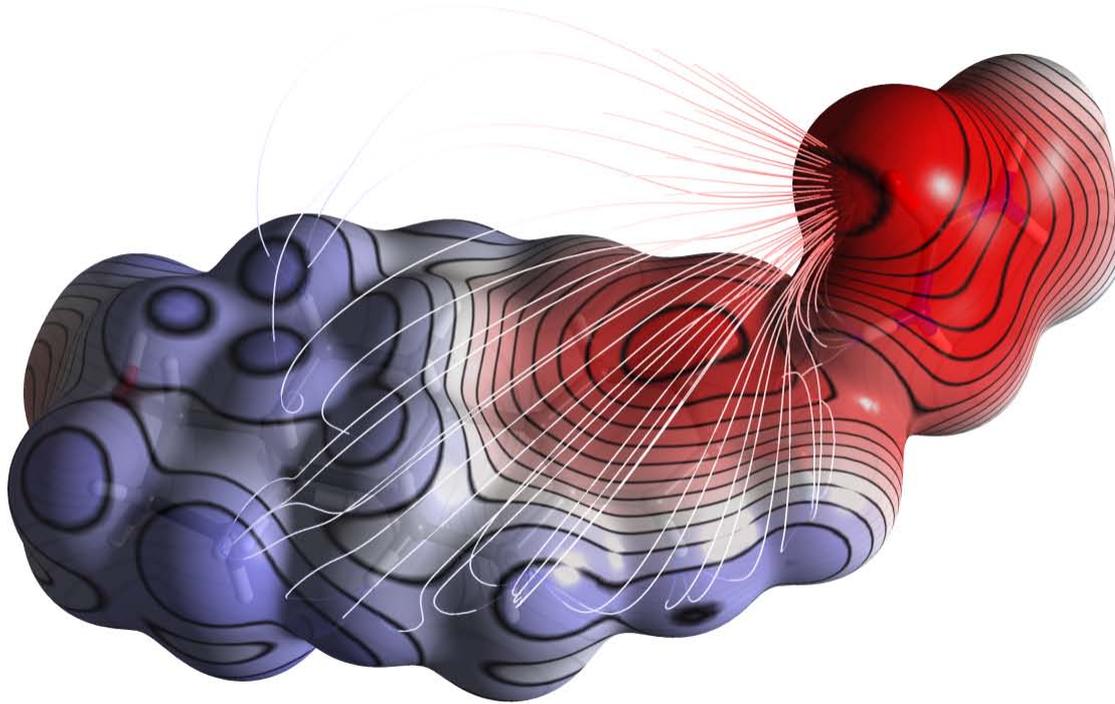
Structure cristalline d'un complexe Urée – Estradiol.
Données de diffraction $d = 0.45 \text{ \AA}$



Iso surface de densité électronique colorée en fonction
des valeurs du potentiel électrostatique

Exemple :

Structure cristalline d'un complexe Urée – Estradiol.
Données de diffraction $d = 0.45 \text{ \AA}$



Lignes de champ électrique

Cristallographie à résolution subatomique :

→ propriétés moléculaires qui sont à l'origine de la réactivité chimique

Bio – cristallographie

Cristallographie des molécules du vivant

- Petites molécules : cofacteurs, hormones, médicaments
- Macro molécules : protéines, acides nucléiques

Bio – cristallographie

Cristallographie des molécules du vivant

- Petites molécules : cofacteurs, hormones, médicaments
- Macro molécules : **protéines**, acides nucléiques

Bio – cristallographie

Les protéines sont de grandes molécules ubiquitaires dans le monde du vivant

Exemples:

- Catalyse de réactions (enzymes)
- Transports d'ions, de petites molécules
- protéines structurelles (cheveux, muscles..)
- transcription du code génétique, synthèse des protéines
- réparation, découpage de l'ADN ou d'autres protéines
- etc ...

Humain ~ 50 000 protéines différentes

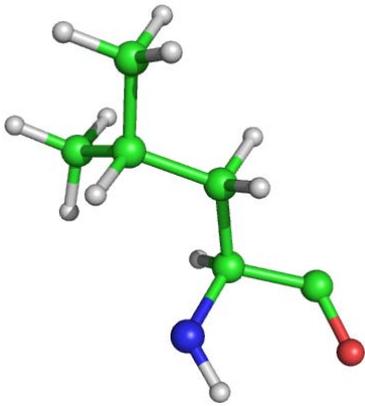
Composées d'une séquence d'acides aminés (codée dans l'ADN)

La fonction d'une protéine est liée à sa **structure tridimensionnelle** et à sa **séquence**

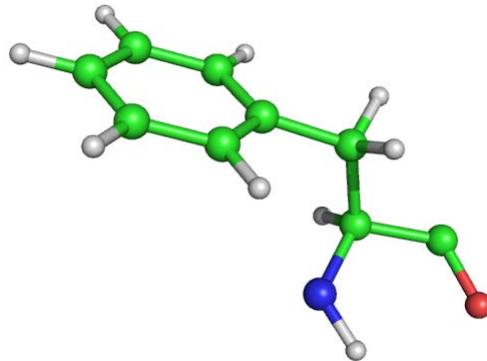
Structure des protéines

Une protéine est une chaîne d'acides aminés (polypeptide), repliée sur elle-même pour former une structure tridimensionnelle

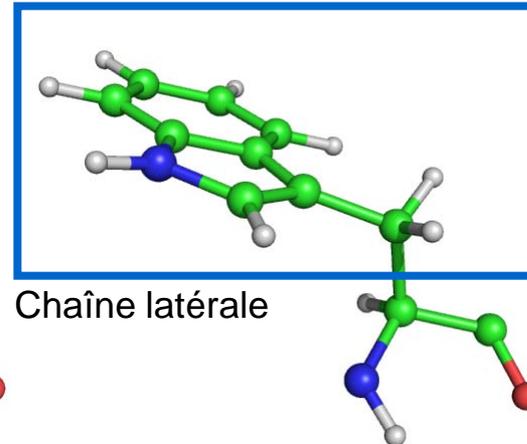
Leucine



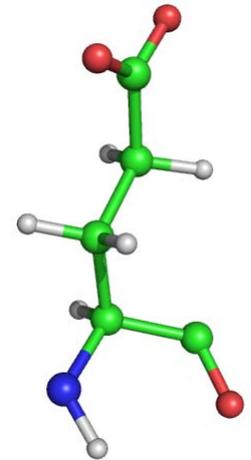
Phénylalanine



Tryptophane

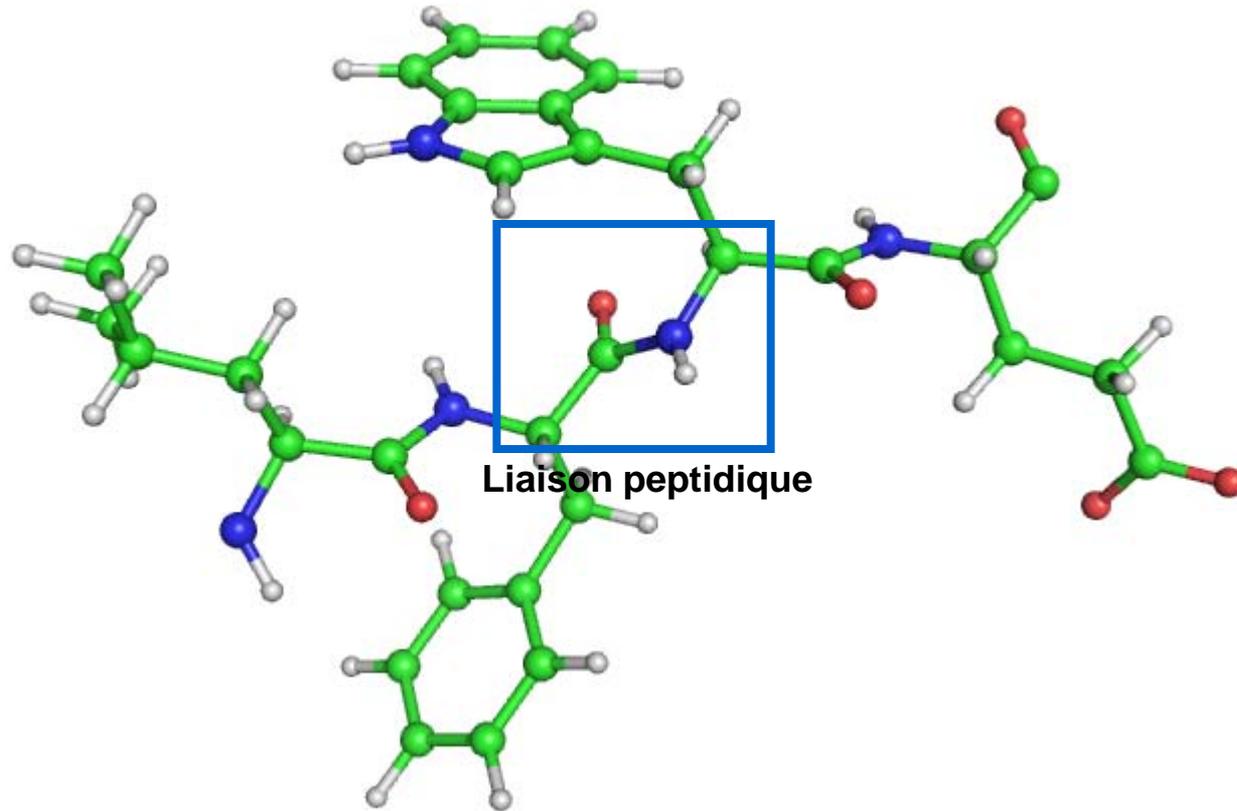


Acide glutamique

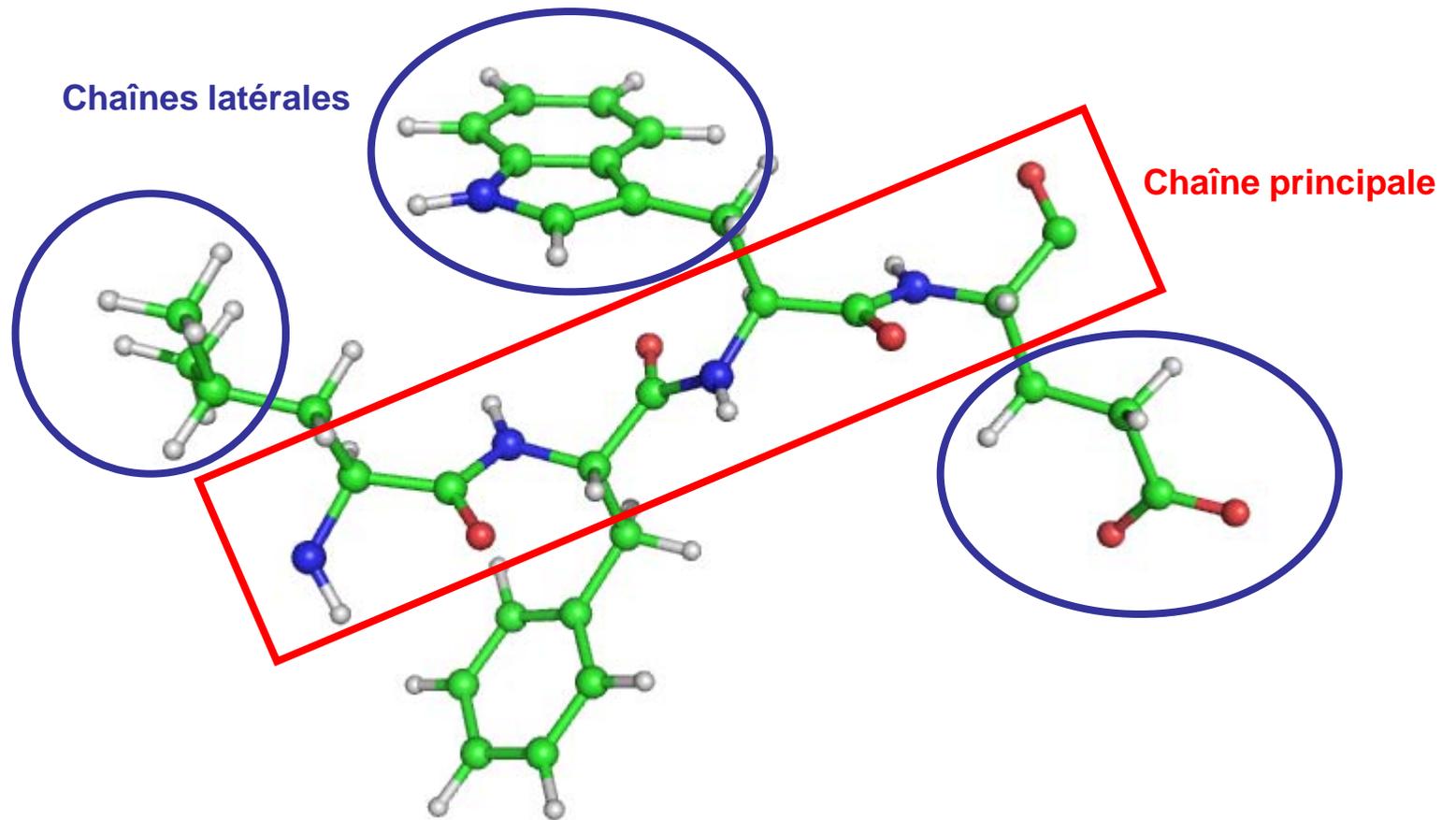


Dans le monde du vivant, il existe 20 acides aminés différents

Ici un 4-peptide de séquence LEU – PHE – TRP - GLU

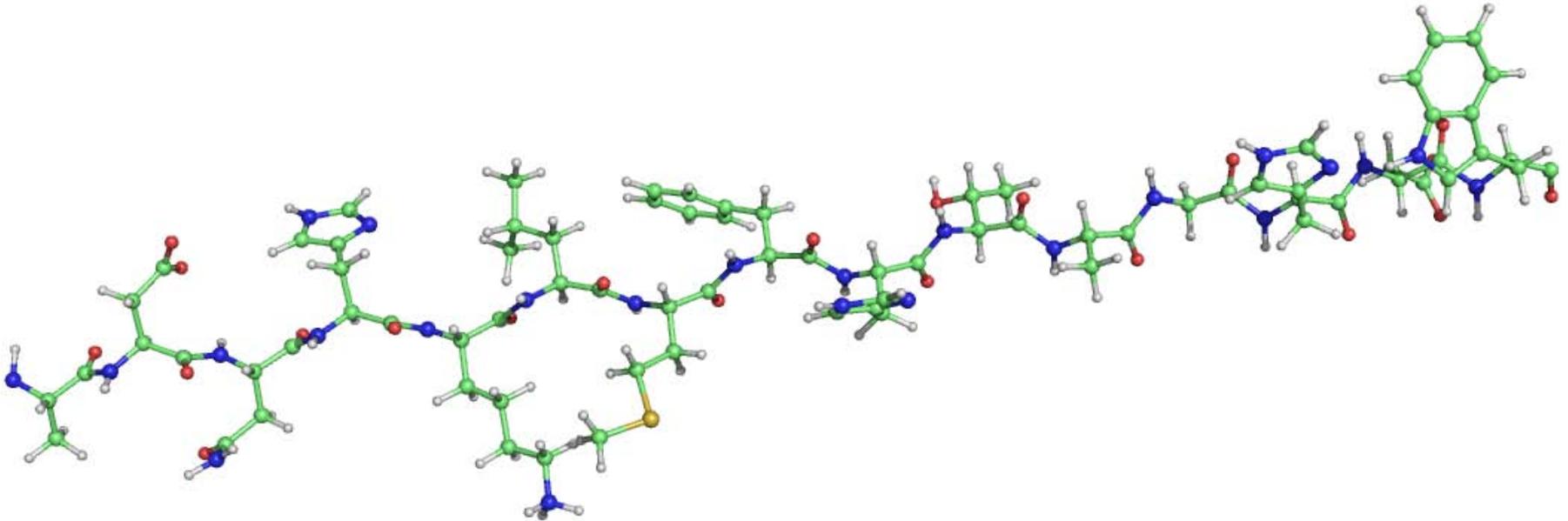


Ici un 4-peptide de séquence LEU – PHE – TRP - GLU



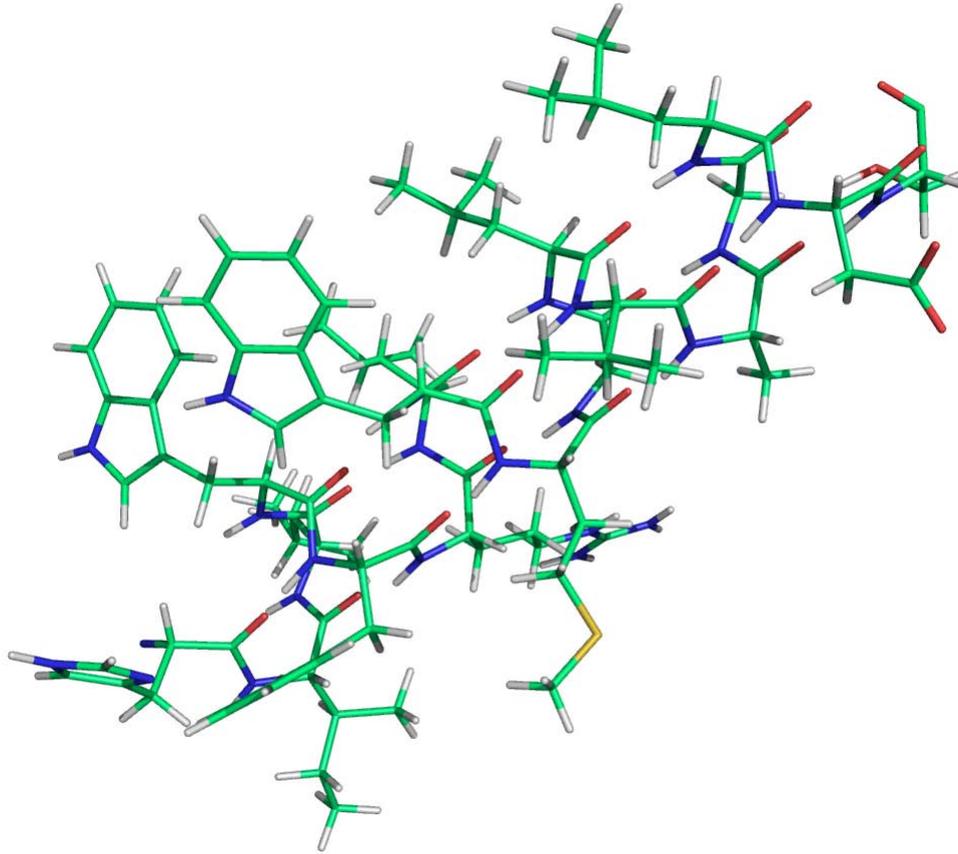
Ici un 15-peptide, de séquence :

ALA-GLU-ASN-HIS-LYS-LEU-MET-PHE-HIS-THR-ALA-GLY-HIS-ASP-TRP



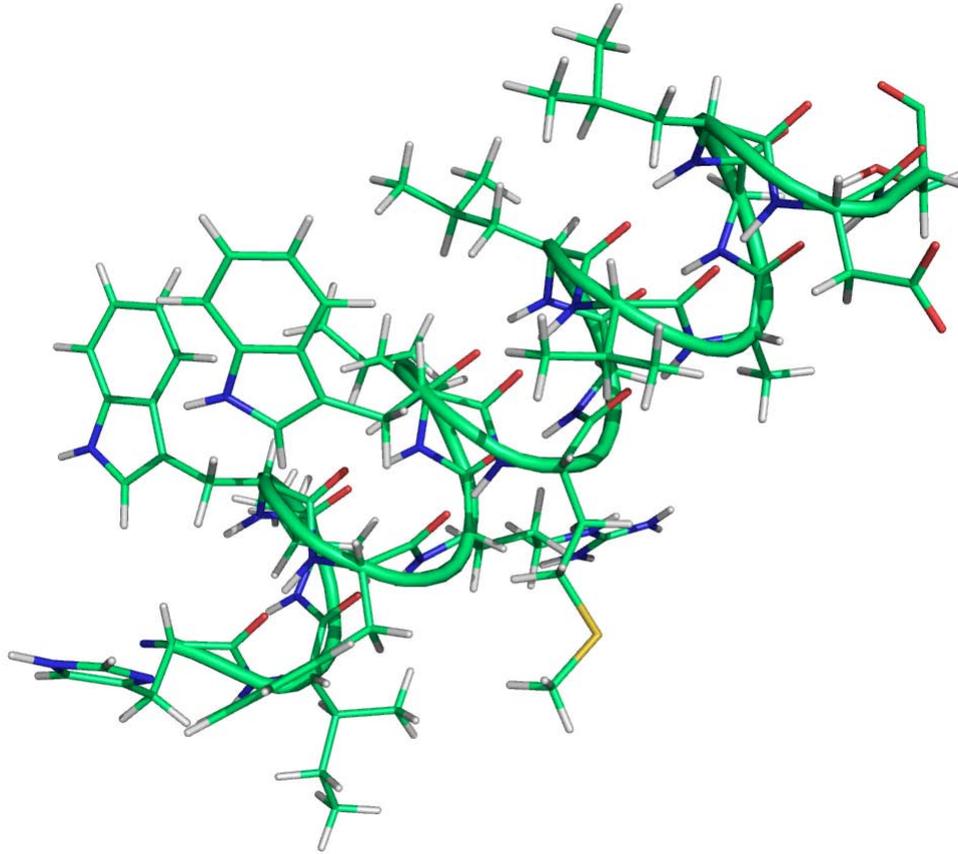
Repléments de la chaîne polypeptidique en motifs particuliers

Les hélices :



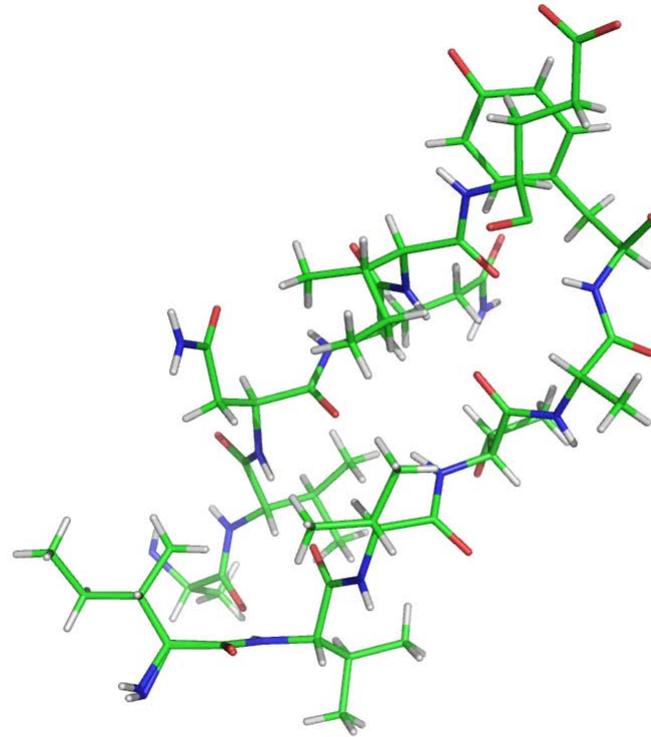
Repléments de la chaîne polypeptidique en motifs particuliers

Les hélices :



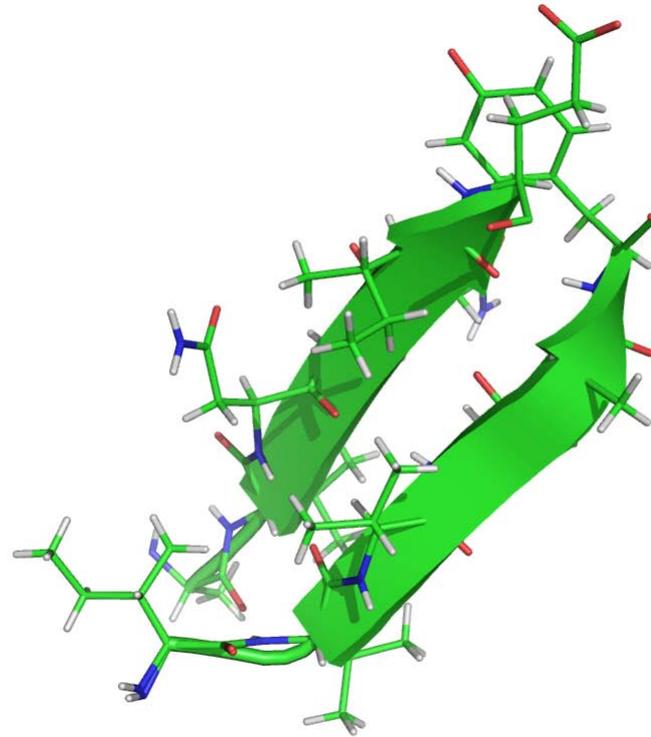
Repléments de la chaîne polypeptidique en motifs particuliers

Les feuillets :

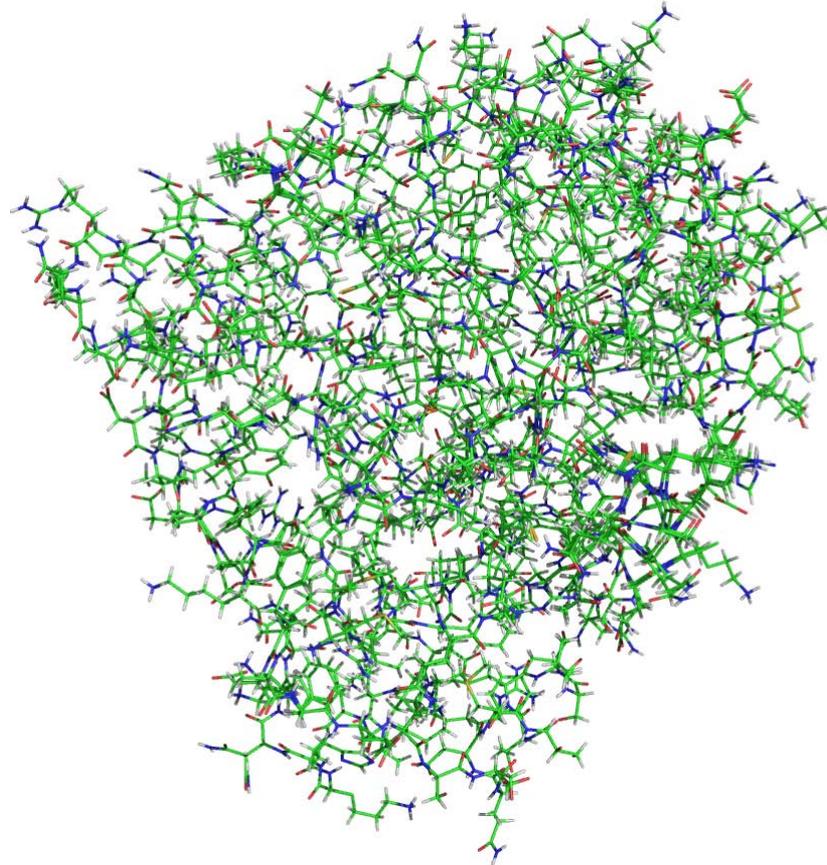


Repléments de la chaîne polypeptidique en motifs particuliers

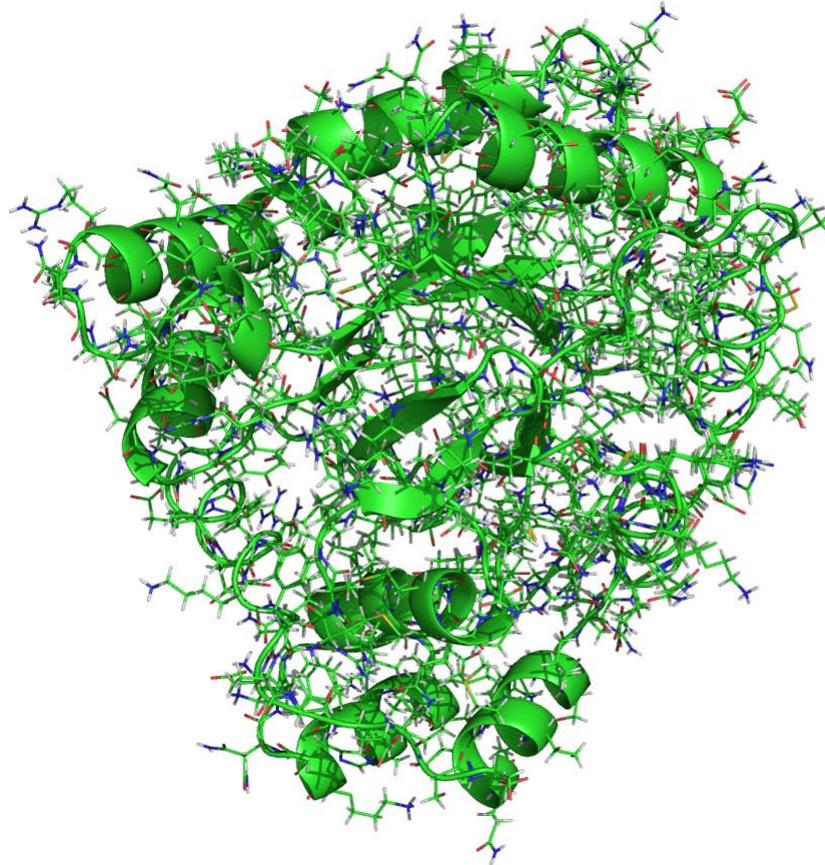
Les feuillets :



Exemple : protéine Aldose Réductase (316 acides aminés = ~7000 atomes)
→ dégrade le glucose en cas d'hyperglycémie



Exemple : protéine Aldose Réductase (316 acides aminés = ~7000 atomes)
→ dégrade le glucose en cas d'hyperglycémie



Exemple : protéine Aldose Réductase (316 acides aminés = ~7000 atomes)
→ dégrade le glucose en cas d'hyperglycémie

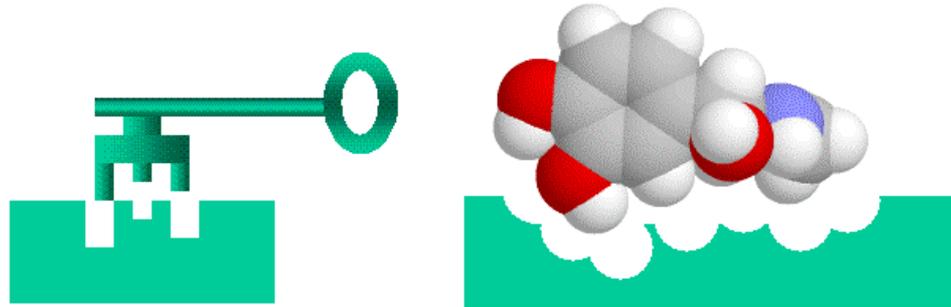


Souvent, les protéines fixent des petites molécules, pour :

- Les transporter
- Les dégrader
- Les transformer

→ Site de fixation spécifique & Reconnaissance moléculaire

Notion de **Clef / Serrure**



La **Serrure** est la **protéine** (le site actif d'une protéine)

La **Clef** est la **petite molécule** (un médicament, un substrat naturel ...)

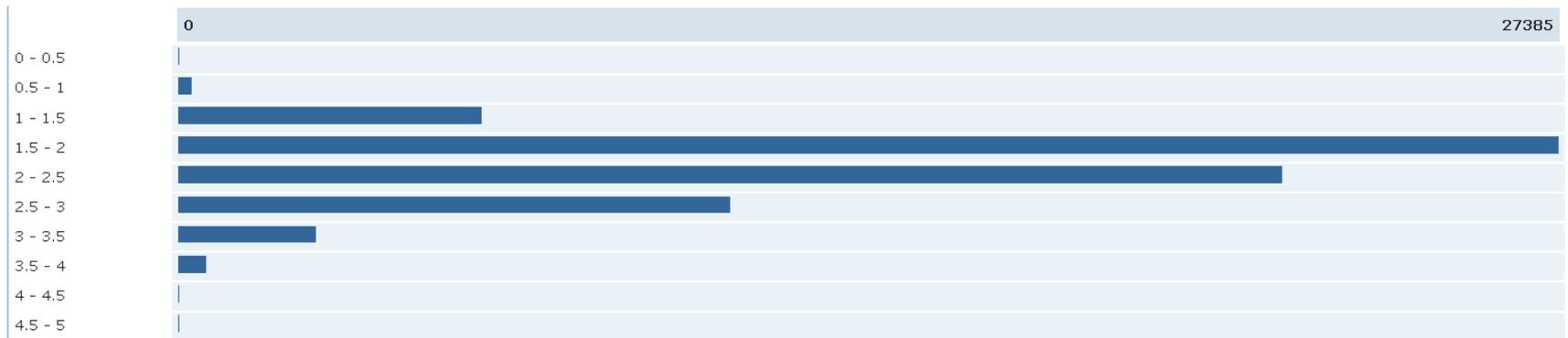
Connaître la serrure (la structure de la cible) permet de la comprendre et la fabrication rationnelle de clefs (médicaments)

Apport de la haute résolution

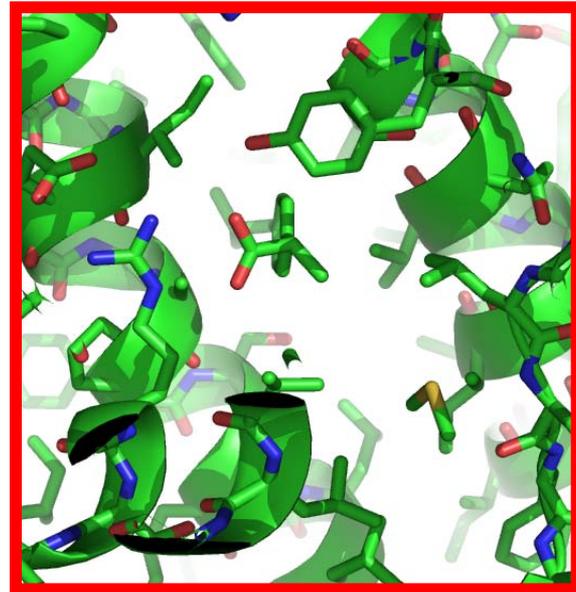
- Meilleure précision du modèle atomique (plus fiable)
- Position des atomes d'hydrogène, très souvent impliqués dans les mécanismes réactionnels
- Accès aux propriétés électrostatiques

Mais :

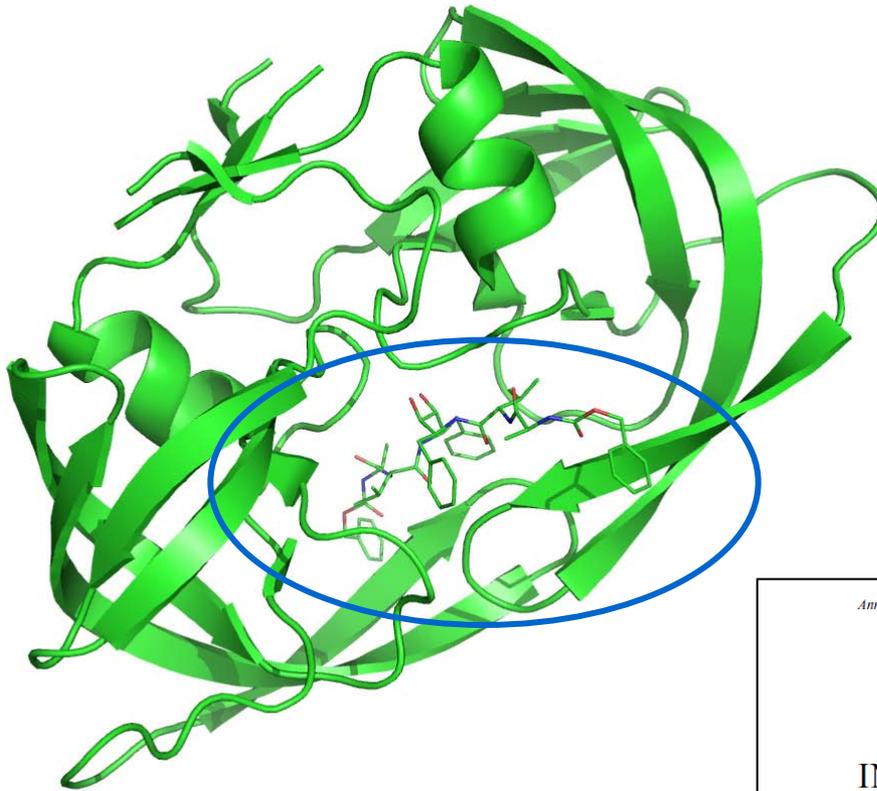
- **Cristallisation d'une protéine toujours difficile**
- **Haute résolution encore rare pour les cristaux de protéines mais en augmentation**



Structure de la protéine COX-1 complexée avec l'Ibuprophène
580 acides aminés – résolution 2Å



Structure de la protéase de HIV-1 complexée avec l'inhibiteur Amprenavir
~100 acides aminés – résolution 1.5Å



Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998, 27:249-84

INHIBITORS OF HIV-1 PROTEASE:
A Major Success of Structure-Assisted
Drug Design¹

*Alexander Wlodawer and Jiri Vondrasek*²
Macromolecular Structure Laboratory, ABL-Basic Research Program, National
Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick,
Maryland 21702; e-mail: wlodawer@ncifcrf.gov

KEY WORDS: AIDS, protease, drug design, inhibitors

Elucidation du mode de fixation du phosphate chez les protéines DING par cristallographie à résolution subatomique

J | A | C | S
A R T I C L E S

Published on Web 05/15/2009

Elucidation of the Phosphate Binding Mode of DING Proteins Revealed by Subangstrom X-ray Crystallography

Dorothee Liebschner,[†] Mikael Elias,[‡] Sébastien Moniot,^{||†} Bertrand Fournier,[†]
Ken Scott,[§] Christian Jelsch,[†] Benoit Guillot,[†] Claude Lecomte,[†] and
Eric Chabrière*[‡]

*Cristallographie Résonance Magnétique et Modelisations, CNRS UMR 7036 Nancy-Université,
54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France, Architecture et Fonction des Macromolécules
Biologiques, CNRS-Université de la Méditerranée, 13288 Marseille, France, and School of
Biological Sciences, The University of Auckland, Auckland, New Zealand*

Received March 11, 2009; E-mail: eric.chabriere@afmb.univ-mrs.fr

La protéine *pfluDING*

- De *Pseudomonas fluorescens*
- Famille des protéines DING (absente des génomes eukaryotes¹)
- 374 acides aminés
- repliement « *venus flytrap* »
- ion Phosphate dans le site actif



¹ Berna, A.; Bernier, F.; Chabrière, E.; Perera, T. & Scott, K. *Int. Journ. of Biochem. & Cell Biol.*, **2008**, *40*, 170 - 175

Cristallisation

Deux cristaux à deux pH différents :

➤ pH 4.5 (H_2PO_4^-) → resolution 0.98 Å

➤ pH 8.5 (HPO_4^{2-}) → resolution 0.88 Å



Résolution
subatomique



Atomes d'hydrogène

Le pH influe sur l'état de
protonation du phosphate

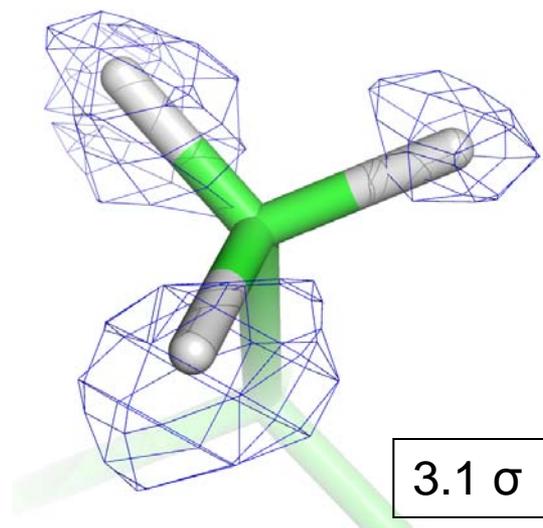
Collecte de données DRX

(synchrotron ESRF, Grenoble)

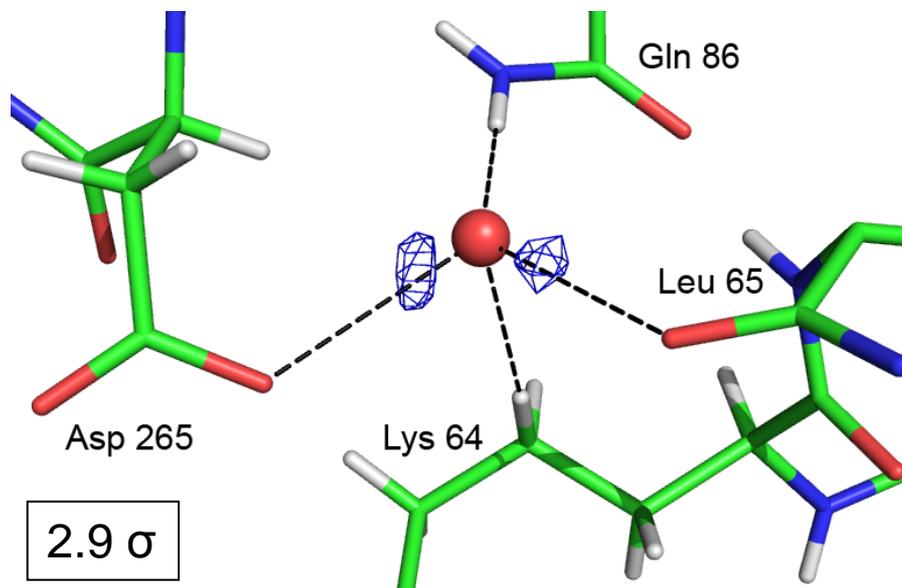
	crystal _{pH4.5}	crystal _{pH8.5}
wavelength (Å)	0.953	0.750
space group	$P2_1$	$P2_1$
unit cell parameters (Å, deg)	$a = 36.97$ $b = 124.39$ $c = 41.02$ $\beta = 116.55$	$a = 36.96$ $b = 124.90$ $c = 40.92$ $\beta = 116.31$
resolution (Å)	50–0.98	50–0.88
no. of unique reflections (last bin)	185 558 (44 846)	253 101 (42 675)
redundancy (last bin)	5.4 (3.1)	6.1 (3.1)
completeness (last bin)	98.1 (94.0)	97.4 (91.8)
R_{merge}^a (last bin)	4.3 (7.5)	5.3 (43.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (last bin)	24.4 (10.4)	16.6 (2.6)
R_{cryst}^b (%)	8.44	12.76
R_{free}^c (%)	10.71	14.81
water molecules	1234	1368
double conformations	95	97
average B factor (Å ²)	6.4	6.7
(only protein atoms)		
rmsd ^d bond length (Å)	0.014	0.014
rmsd ^d bond angle (deg)	2	2
Ramachandran analysis: ^e		
favored regions (%)	98.7	98.5
allowed regions (%)	1.3	1.5
outliers (%)	0	0

Atomes d'hydrogène visibles en densité électronique

Isoleucine, structure pH 8.5

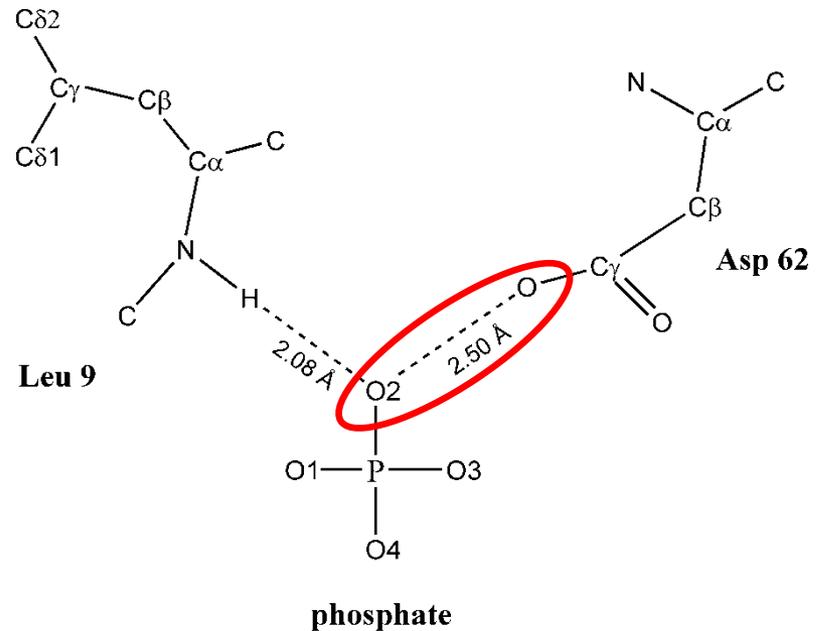
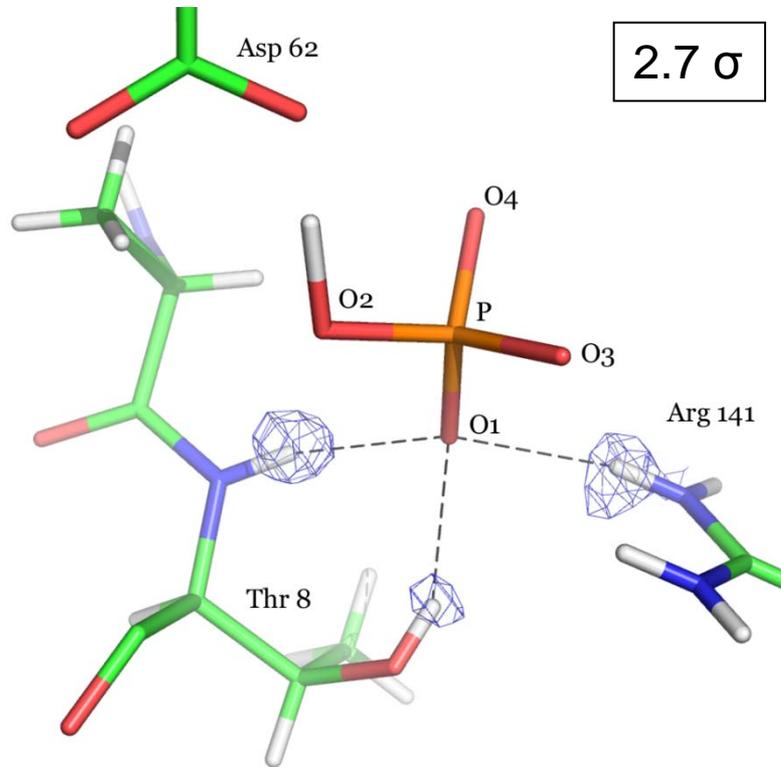


Molécule d'eau, structure pH 4.5



➔ Réseau de liaisons hydrogène
pour lier le phosphate

coordination de l'ion Phosphate



Interaction Phosphate – Asp62
Très courte distance O...O

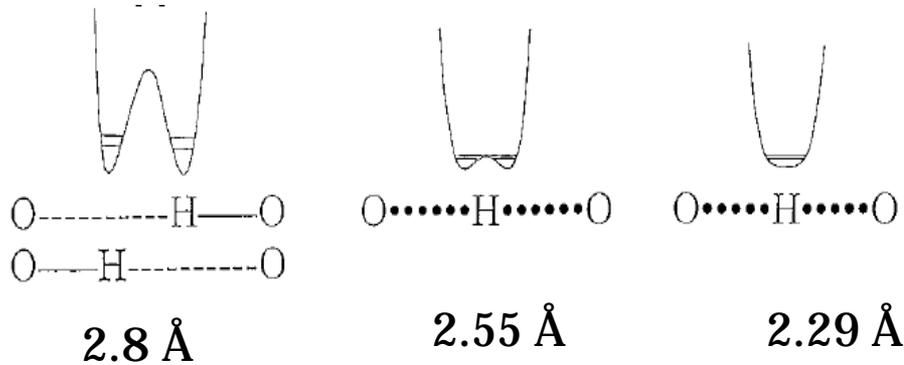
... Mais pas de pic de densité électronique
indiquant un atome d'hydrogène !?!



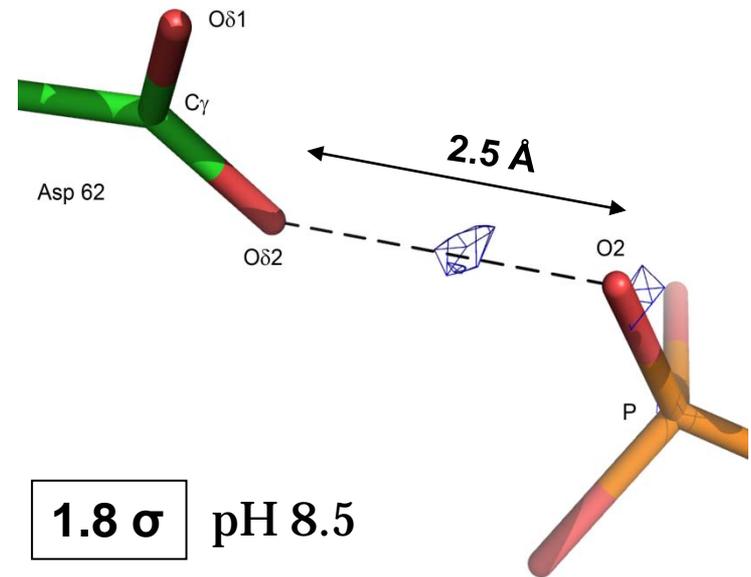
O1 accepte trois liaisons hydrogène
→ Ne peut pas porter de proton (H)

L'idée du « Low barrier H bond »

Potentiel interatomique O...O⁶ :



⁶ Cleland, W. W., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2000**, 382, 1 - 5

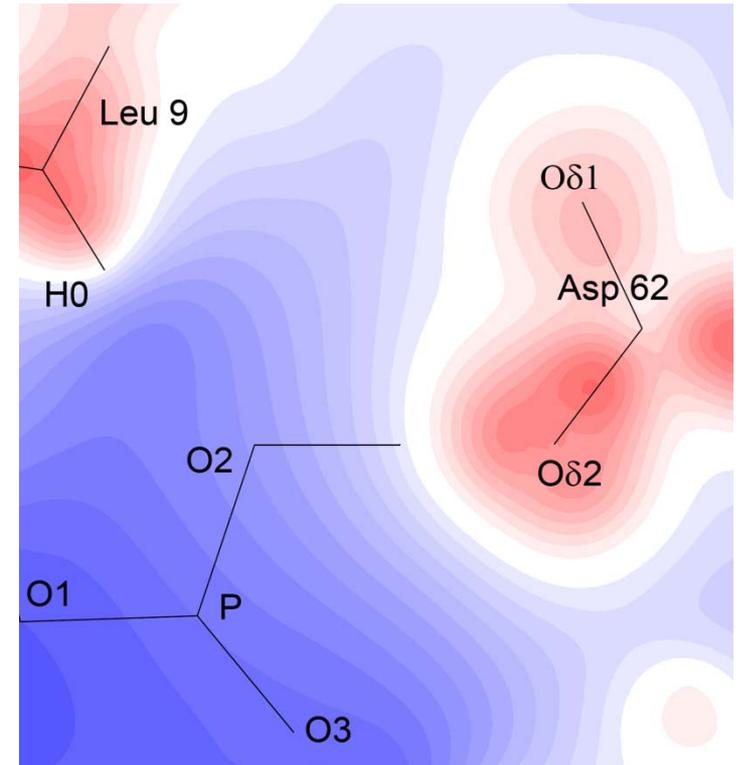
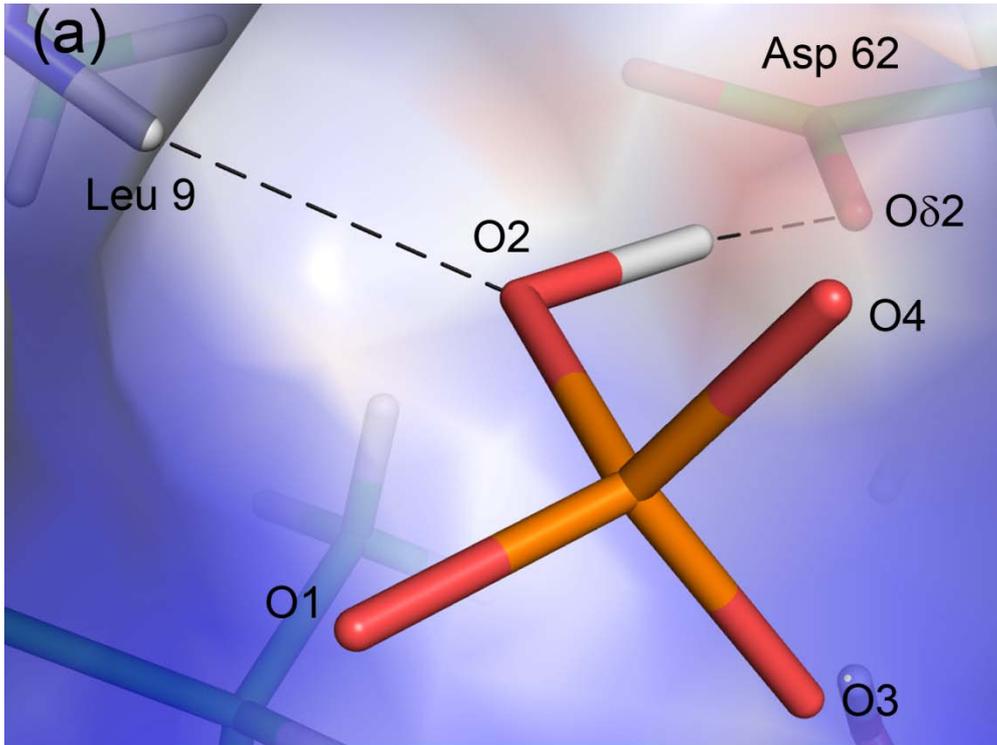


LBHB (« *low barrier hydrogen bond* »)

L'atome d'hydrogène est partagé entre le phosphate et l'acide aspartique (ASP)

Haute résolution → Accès aux propriétés électrostatiques

Potentiel électrique généré dans le site actif par la protéine, phosphate exclu.

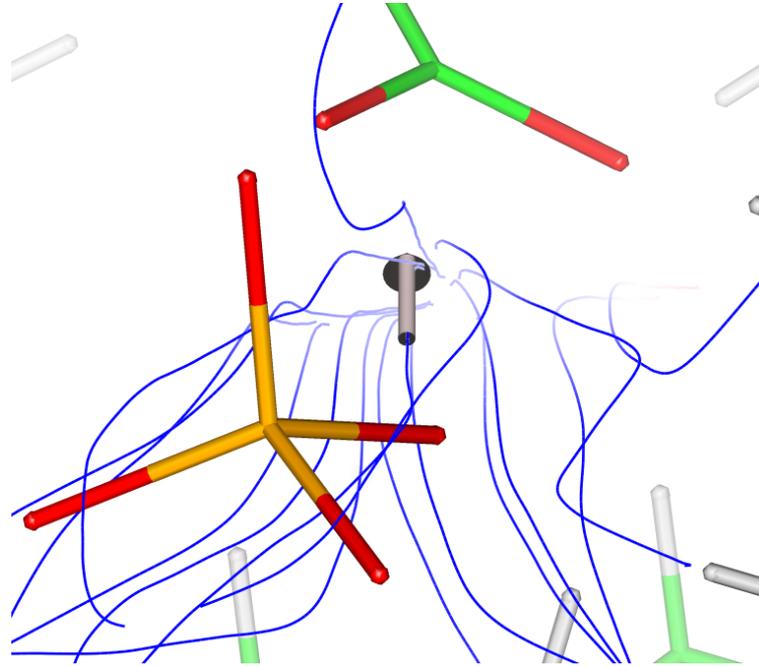


Site actif largement positif → complémentaire de l'ion chargé négativement
Dû au nombreux hydrogènes (δ^+) qui pointent dans le site

Exception proche de O Asp62 → Orientation du groupe OH du phosphate

Haute résolution → Accès aux propriétés électrostatiques

Lignes de champ électrique sur la position “normale” de l’hydrogène du phosphate dibasique



→ Augmente le caractère acide du proton

→ Favorise le partage entre Asp62 et Phosphate

Conclusions

- 12 liaisons H entre le phosphate et les acides aminés du site actif
 - Un “Low Barrier Hydrogen Bond” entre phosphate et Asp62, aux deux pH
 - Modes de fixation identiques à pH 4.5 et 8.5
- ➔
- PfluDING lie sélectivement le phosphate bi-basique (HPO_4^{2-}) à pH 8.5 et aussi à pH 4.5
 - Les propriétés électrostatiques du site actif augmentent l'acidité du proton du phosphate et favorisent la formation du LBHB.