

Éléments de Biocristallographie

Thématique actuelle "biophysique"

Gerald Kneller

Université d'Orléans

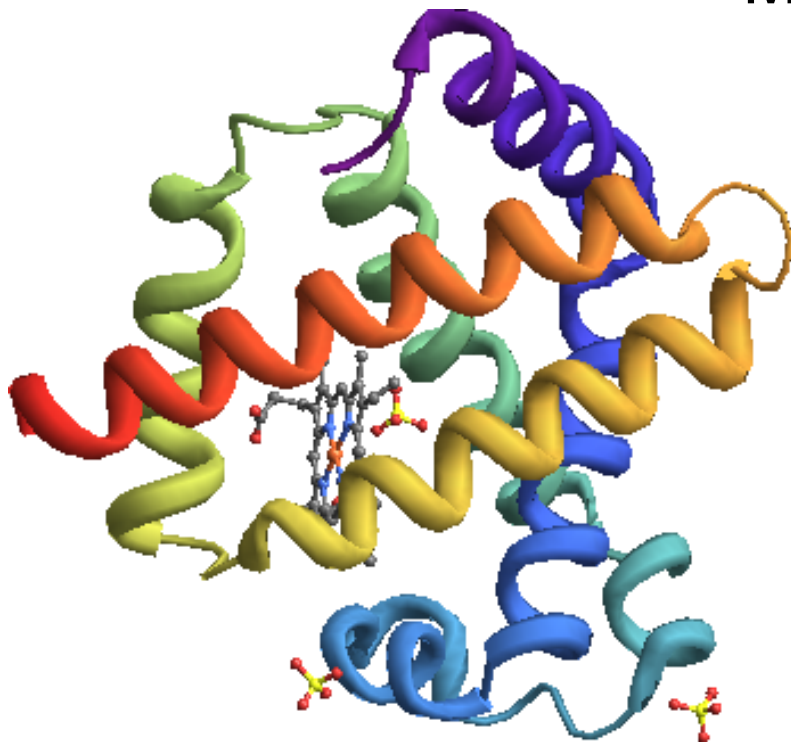
Remerciements :

Beatriz Guimarães & Pierre Legrand, Synchrotron SOLEIL

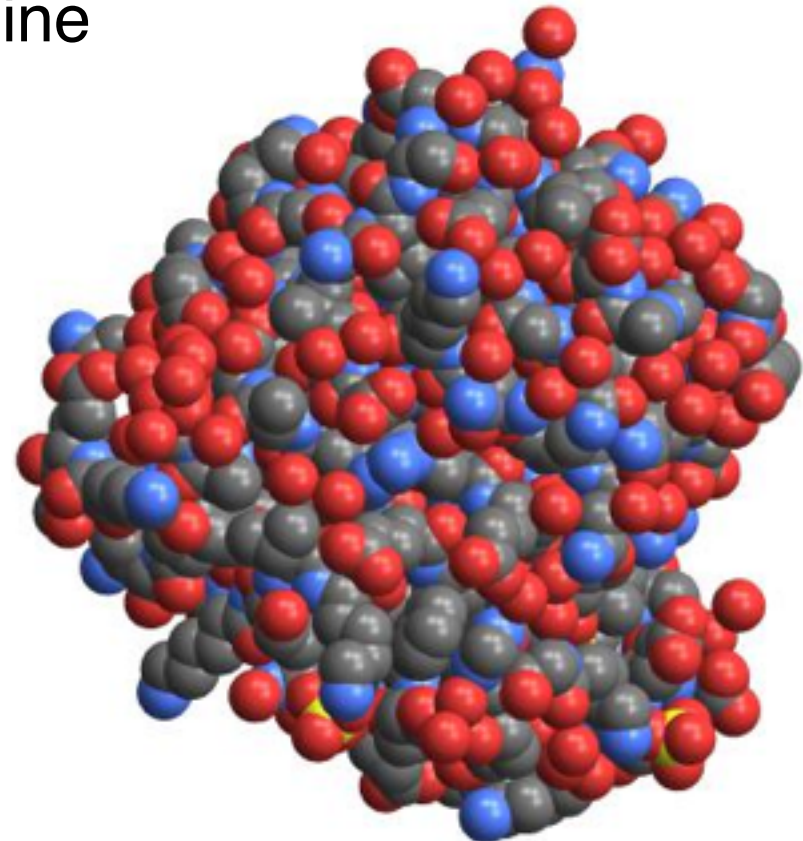
La Bio-cristallographie

La bio-cristallographie renseigne sur la structure 3D d'une protéine. La structure 3D d'une protéine et la structure quaternaire des complexes peuvent fournir d'importantes informations sur la fonction d'une protéine et ses interactions avec d'autres molécules. Cette connaissance est par exemple essentielle pour le développement de médicaments.

Myoglobine

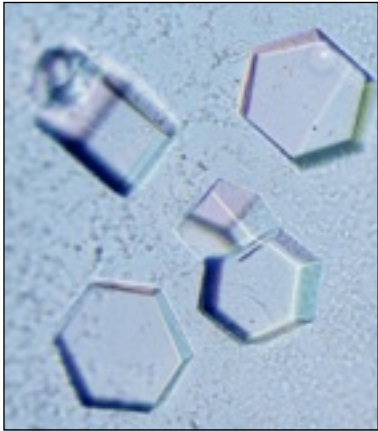


Chaîne principale

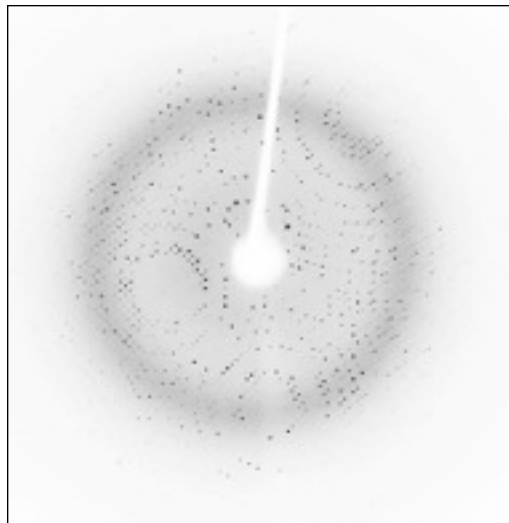
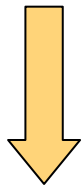


Tous les atomes C,N,O

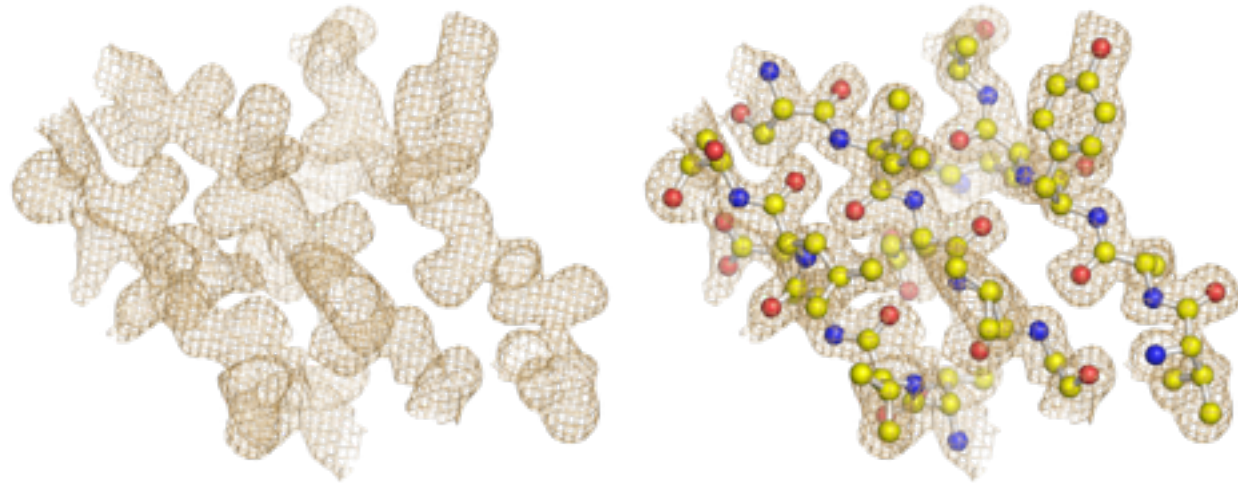
La Bio-cristallographie



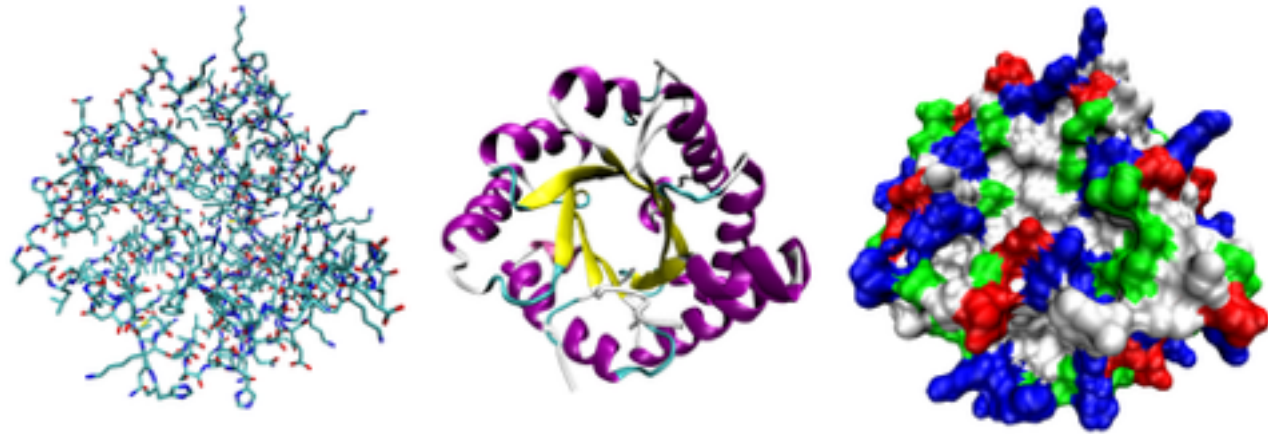
Cristaux de protéine



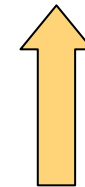
Diffraction des rayons X



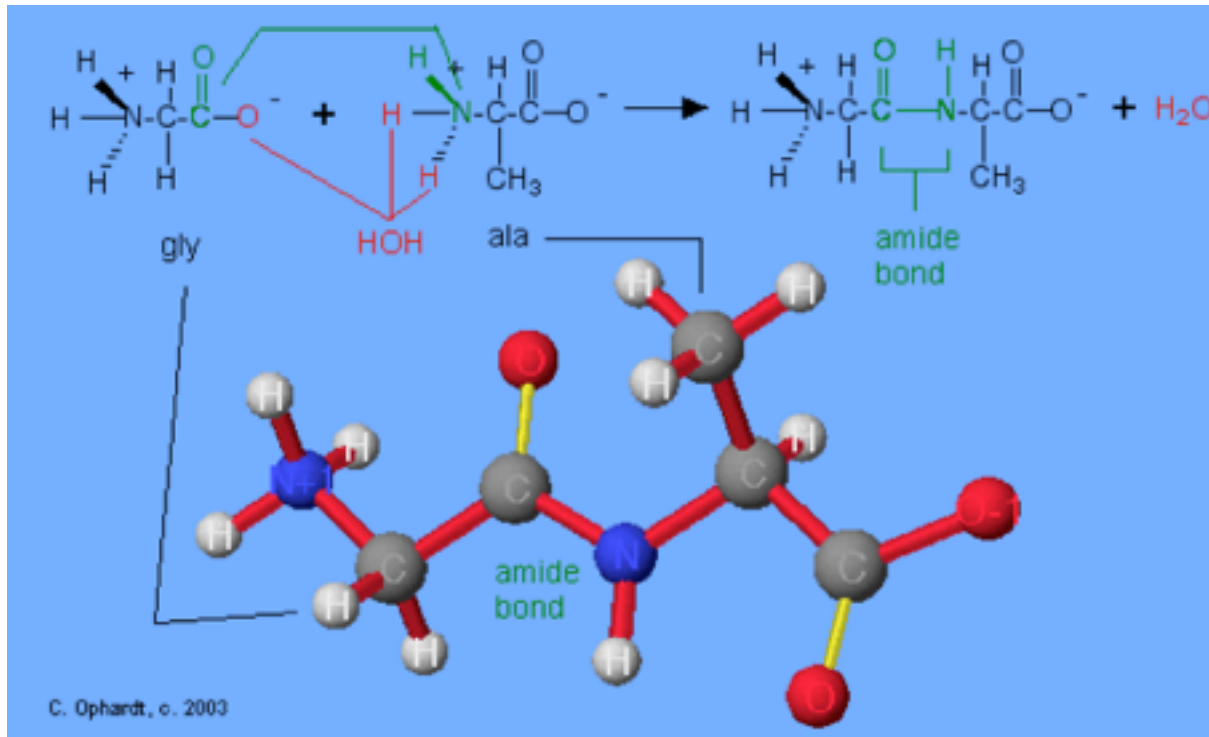
Détermination de la structure, modélisation, affinement



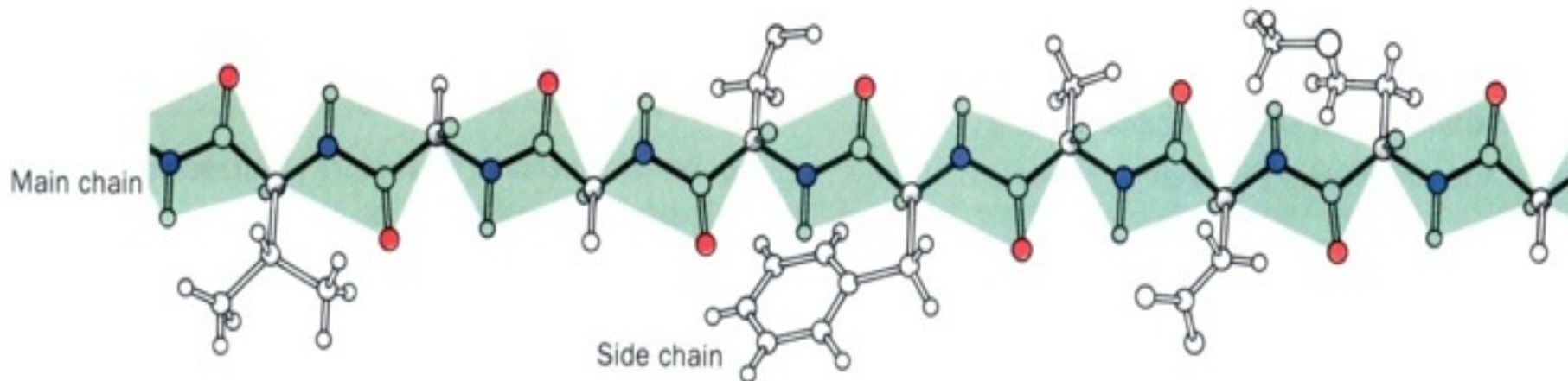
Analyse de la structure



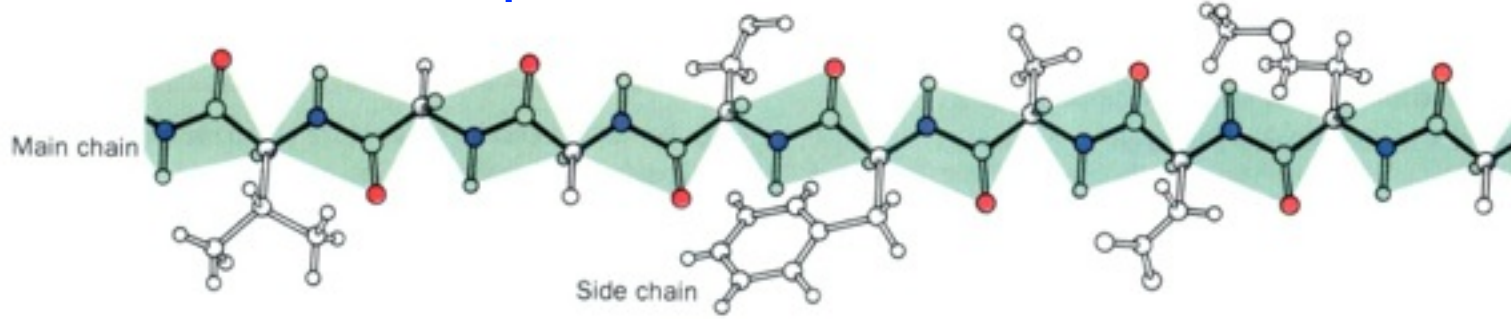
Une protéine est un bio-polymère composé d'acides aminés



Liaison peptidique

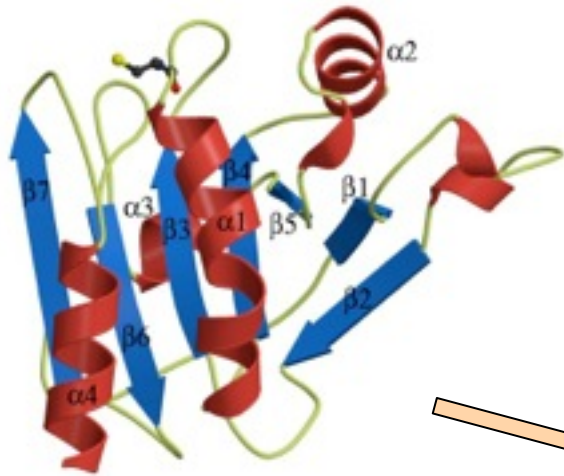


Structure des protéines

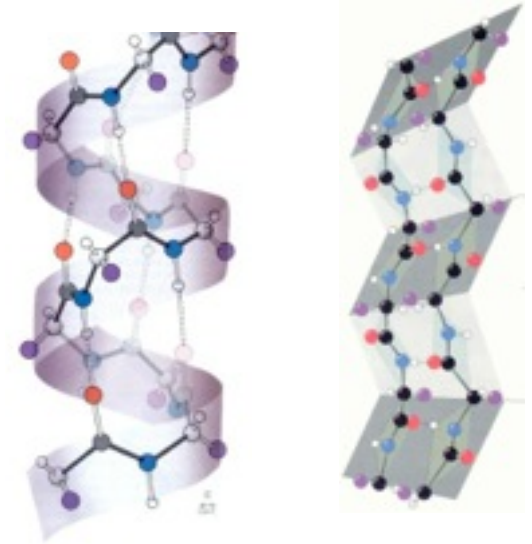


Structure primaire

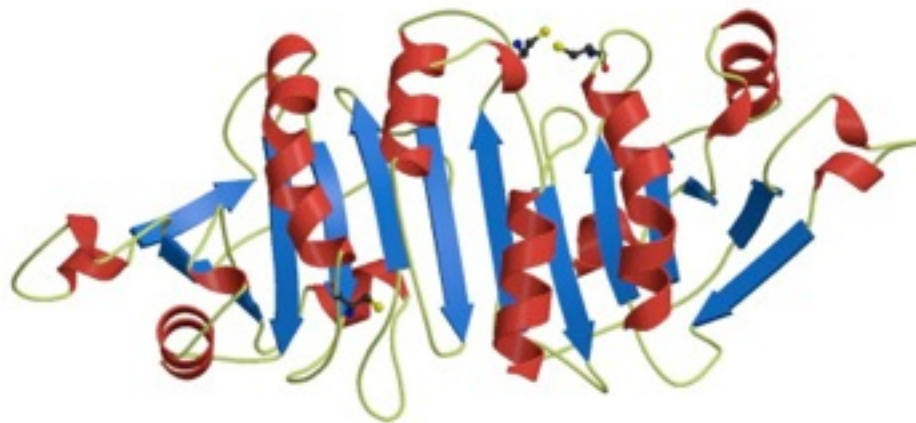
Structure tertiaire



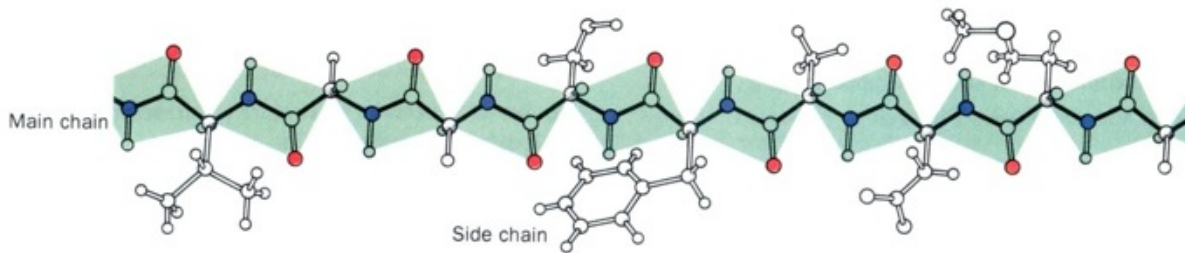
Structure secondaire



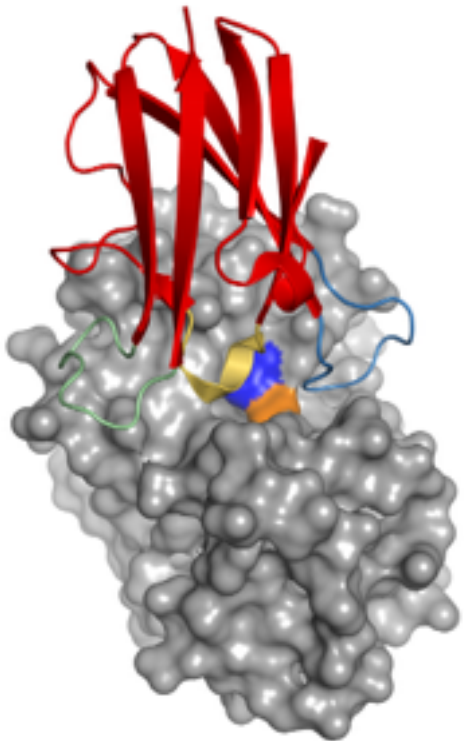
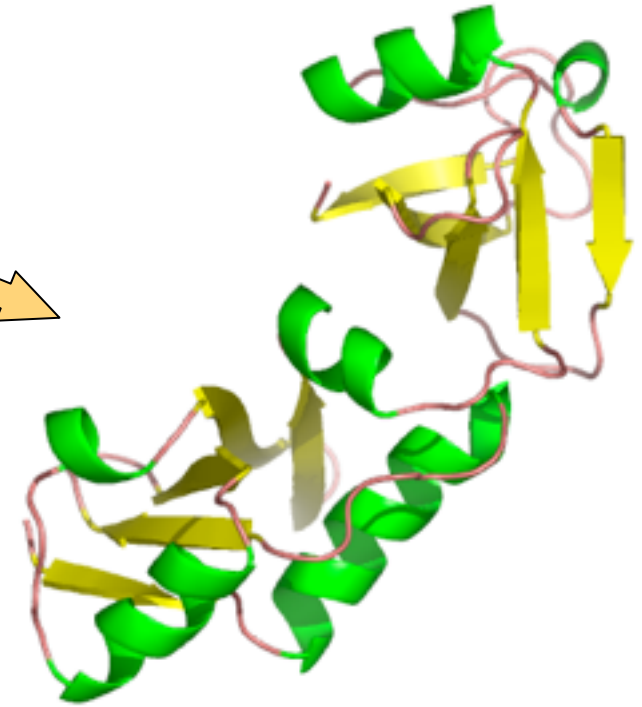
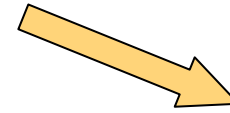
Structure quaternaire



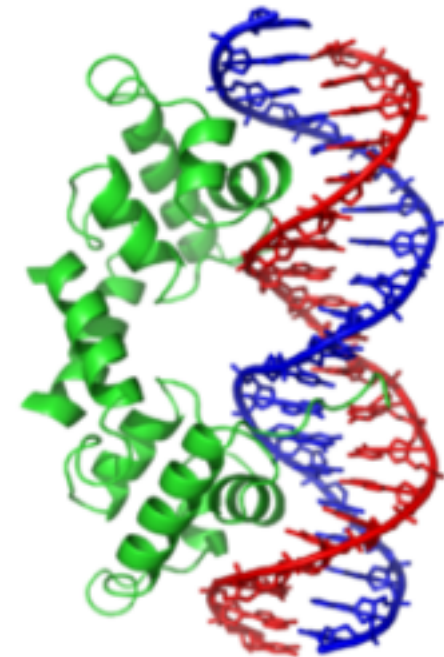
Structure des protéines



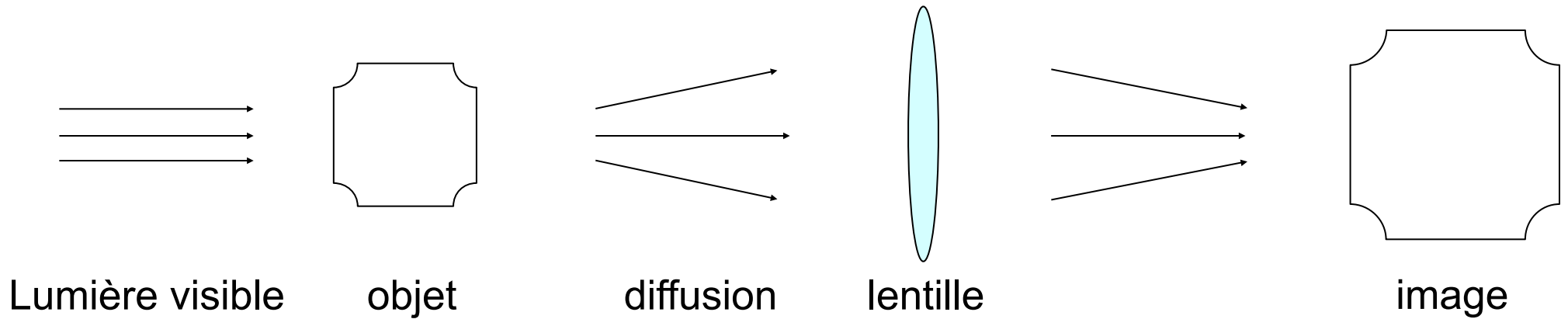
La plupart des protéines adoptent une structure tridimensionnelle (plus ou moins) unique



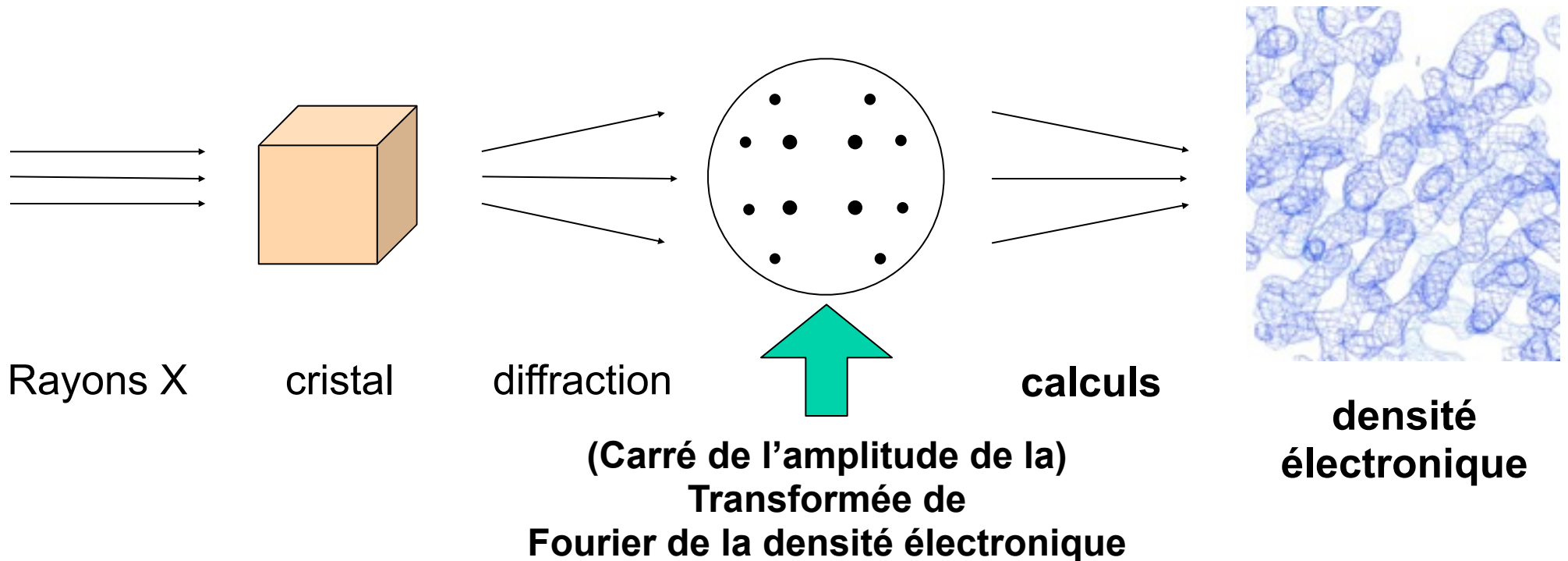
Les protéines peuvent interagir avec d'autres protéines, ADN, ARN, carbohydrates, lipides, ...



Microscopie optique



Cristallographie de rayons X



Densité électronique construite par à partir de
la TF inverse du «cliché»

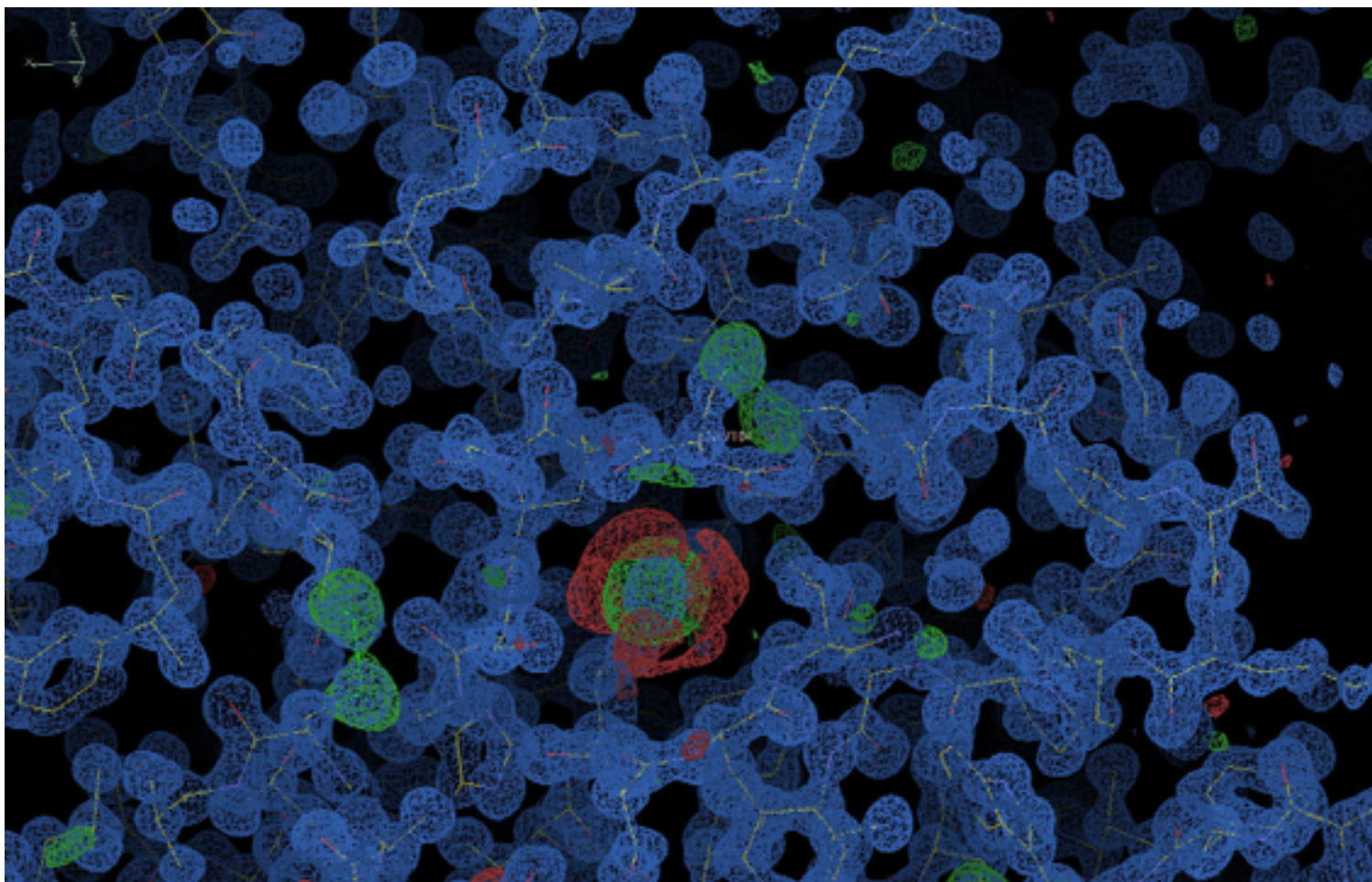
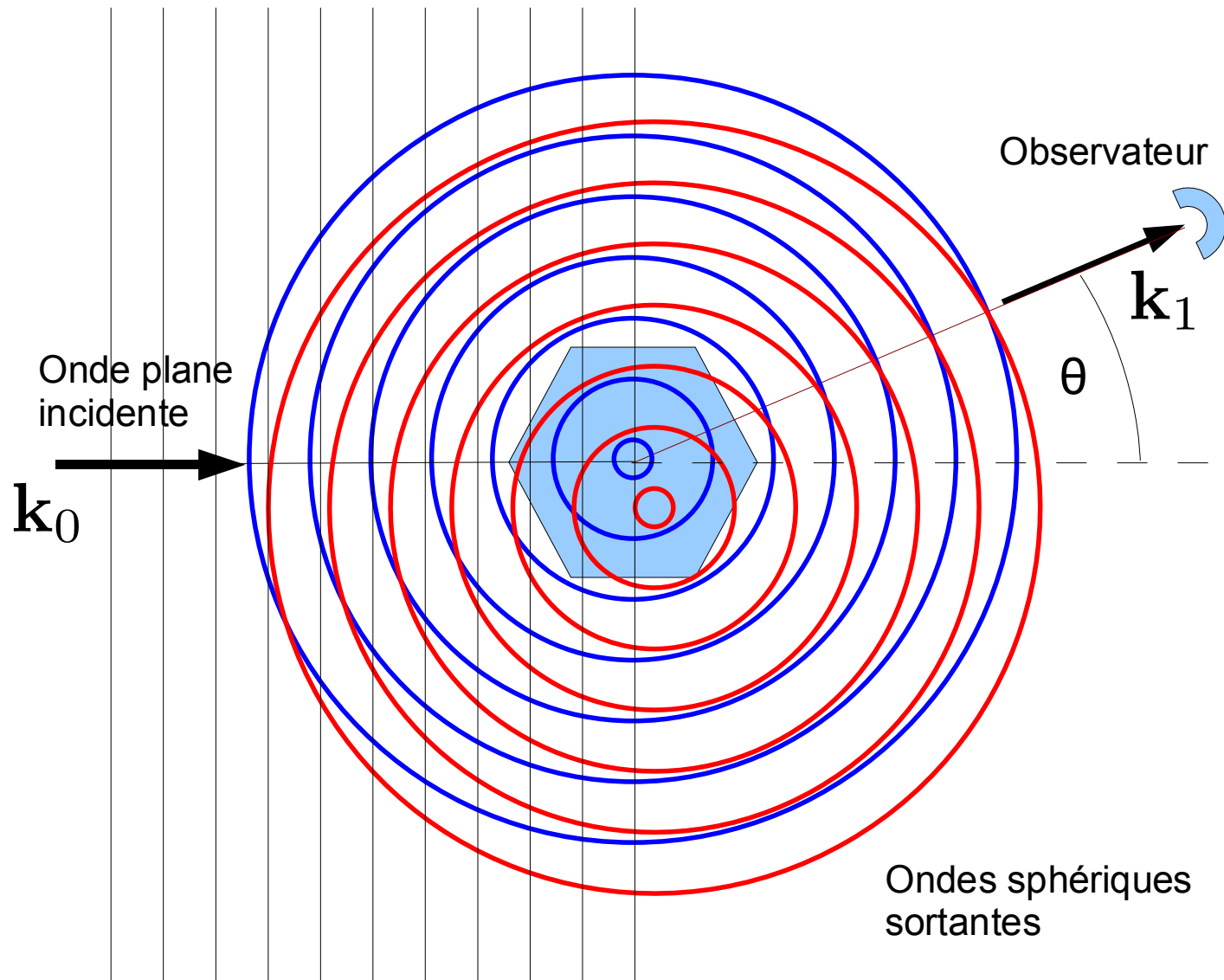
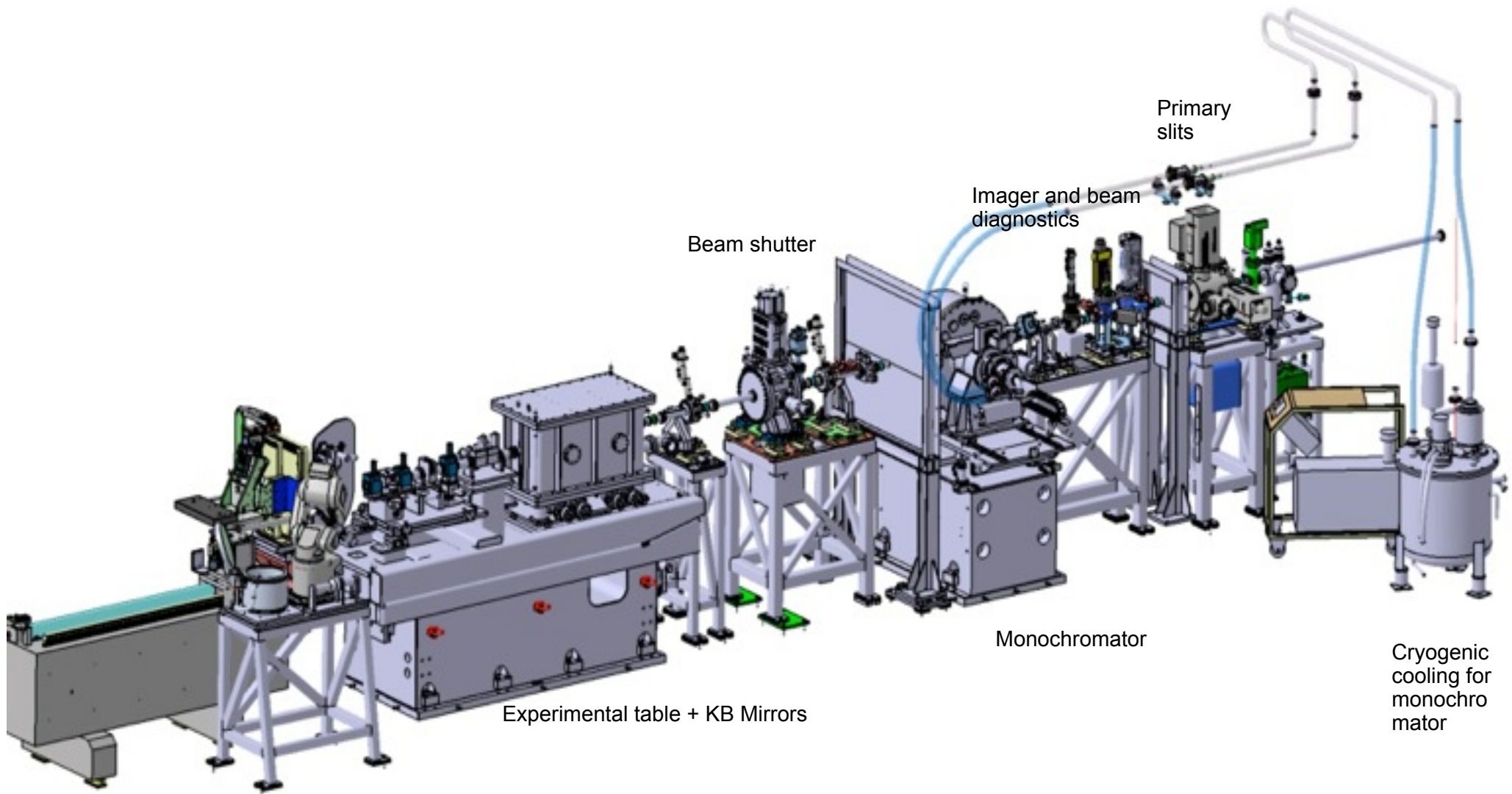


Schéma d'une expérience de diffraction

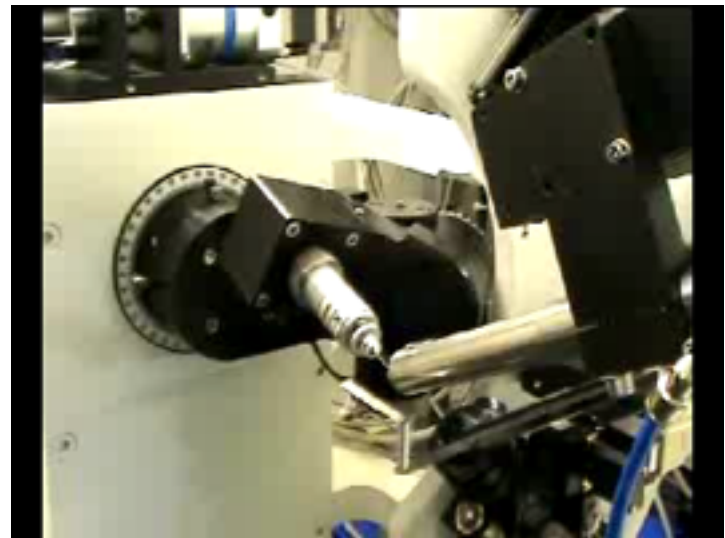


Ligne de lumière PROXIMA 1 à SOLEIL

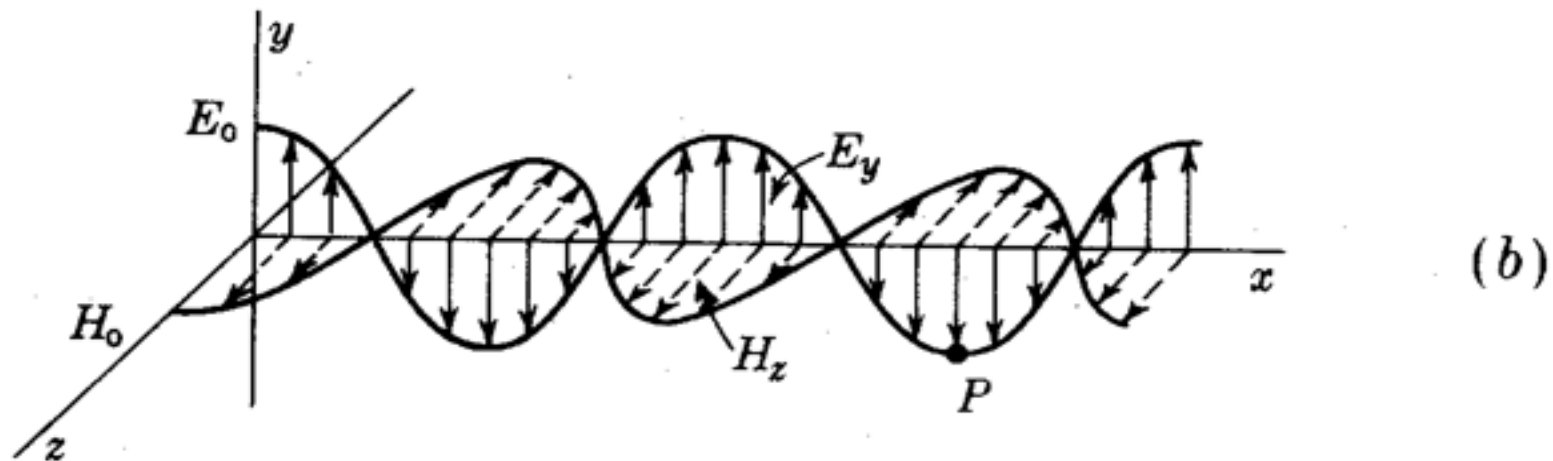
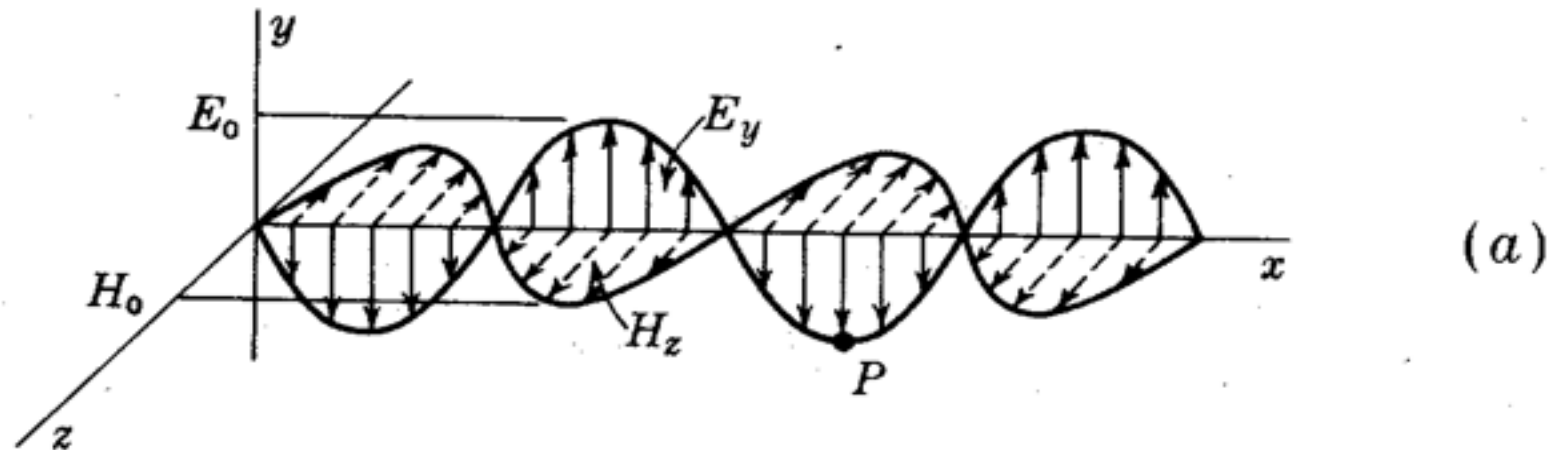


Robot sample changer, goniostat and detector support.

Goniometer and Detector



Rayons-X: ondes électromagnétiques



Champ électrique interagit avec les **électrons** des atomes de la protéine dans le cristal

L'image de diffraction est le résultat de l'interférence des ondes diffusées

Dualisme particule – onde

1. Relation de De Broglie

$$\mathbf{p} = \hbar \mathbf{k}, \quad \mathbf{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{n}.$$

Ici \mathbf{p} est la quantité de mouvement d'une particule, λ la longueur d'onde associé, $\mathbf{n} = \mathbf{p}/|\mathbf{p}|$ et $\hbar = h/(2\pi)$, où $h \approx 6,6260755 \times 10^{-34} Js$ est la constante de Planck.

2. Pour un photon

$$E = c|\mathbf{p}|, \quad c = 3 \cdot 10^8 m/s.$$

Pour $E = 12.4 keV$ (rayons X) on a $\lambda = 1 \text{ \AA}$.

Principe de Huygens pour rayons X

1. Champ électromagnétique à l'endroit \mathbf{R} de l'observateur produit par l'élément de volume d^3r de l'échantillon qui est situé à \mathbf{r}

$$dA(\mathbf{R}, t) = \underbrace{A_0 \exp(i\{\mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r} - \omega_0 t\})}_{\text{onde plane incidente}} \underbrace{\frac{\exp(i|\mathbf{k}_1||\mathbf{R} - \mathbf{r}|)}{|\mathbf{R} - \mathbf{r}|}}_{\text{onde sphérique sortante}} \rho(\mathbf{r}) d^3r.$$

ρ est la densité de de charges.

2. Pour $|\mathbf{R}| \gg |\mathbf{r}|$ on a

$$\begin{aligned} \frac{\exp(i|\mathbf{k}_1||\mathbf{R} - \mathbf{r}|)}{|\mathbf{R} - \mathbf{r}|} &\approx \frac{\exp(i|\mathbf{k}_1|\{|\mathbf{R}| - |\mathbf{r}| \cos \phi\})}{|\mathbf{R}|} \\ &= \frac{\exp(i|\mathbf{k}_1||\mathbf{R}|)}{|\mathbf{R}|} \exp(-i\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r}). \end{aligned}$$

Ici ϕ est l'angle entre \mathbf{r} et \mathbf{R} et donc aussi l'angle entre \mathbf{r} et \mathbf{k}_1 , car $\mathbf{k}_1 \parallel \mathbf{R}$.

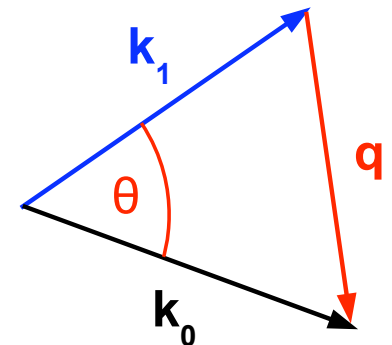
3. Amplitude totale produite par l'échantillon

$$A(\mathbf{R}, t) = A_0 \frac{\exp(i|\mathbf{k}_1||\mathbf{R}| - \omega_0 t)}{|\mathbf{R}|} \underbrace{\iiint_V d^3r \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) \rho(\mathbf{r})}_{F(\mathbf{q})}$$

Ici $\mathbf{q} = \mathbf{k}_0 - \mathbf{k}_1$ et $F(\mathbf{q})$ est le *facteur de structure*. La diffraction est élastique, tel que $E_1 = E_0$, ou bien $|\mathbf{k}_1| = |\mathbf{k}_0|$. Par conséquent

$$|\mathbf{q}| = 2|\mathbf{k}_0| \sin(\theta/2),$$

où $\theta \in (-\pi/2, +\pi/2)$ est l'angle de diffusion.



Facteur de structure

4. $F(\mathbf{q})$ est lié à la transformé de Fourier de $\rho(\mathbf{r})$. Avec la paire de transformations (définition habituelle en physique),

$$\tilde{\rho}(\mathbf{q}) = \iiint_V d^3r \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})\rho(\mathbf{r}),$$

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{(2\pi)^3} \iiint_V d^3q \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})\tilde{\rho}(\mathbf{q}),$$

il suit que

$$\boxed{F(\mathbf{q}) = \rho^*(\mathbf{q})}$$

Facteur de structure du cristal – diffraction

1. Dans un cristal la densité électronique est une fonction périodique dans l'espace. Si $\rho_0(\mathbf{r})$ est la densité électronique de la maille – *le motif* –, celle du cristal est donnée par

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{m,n,p} \rho_0(\mathbf{r} - \mathbf{R}_{m,n,p}), \quad \text{où } \mathbf{R}_{m,n,p} = m\mathbf{a} + n\mathbf{b} + p\mathbf{c}.$$

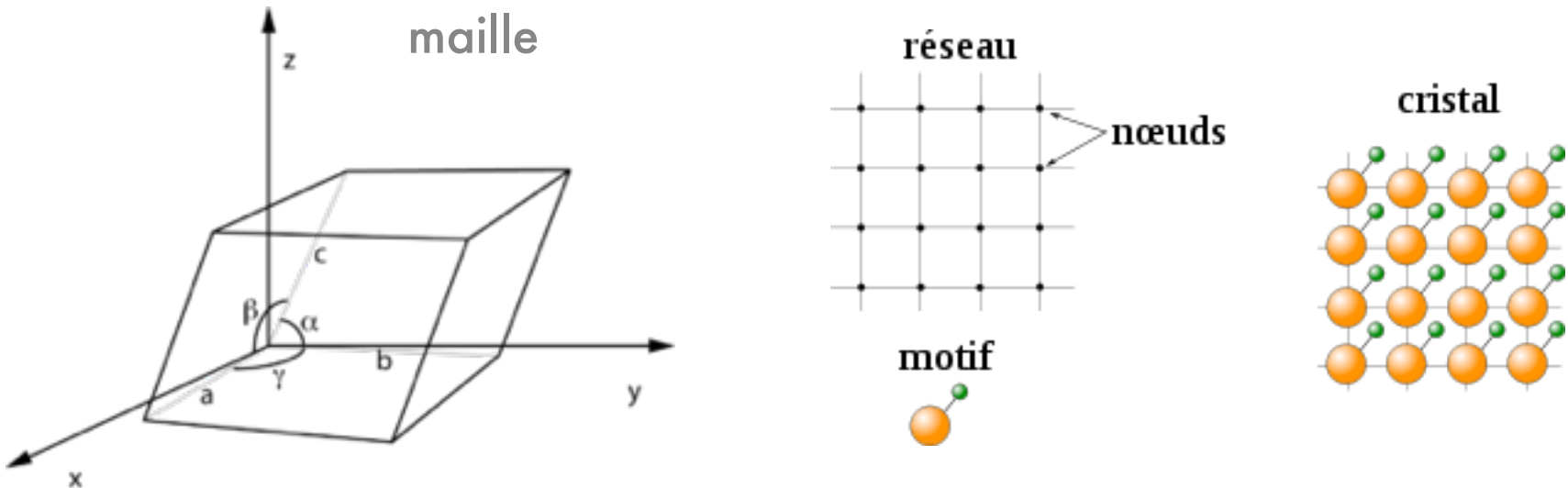
Ici $m, n, p \in \mathbb{Z}$ et $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ engendrent la maille du cristal. L'ensemble des vecteurs $\{\mathbf{R}_{m,n,p}\}$ constitue le *réseau du cristal* et chaque vecteur $\{\mathbf{R}_{m,n,p}\}$ correspond à un *noeud* du réseau. La maille détermine la périodicité des champs physiques du cristal dans l'espace. Introduisant le peigne de Dirac

$$\Delta_{a,b,c}(\mathbf{r}) = \sum_{m,n,p} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_{m,n,p})$$

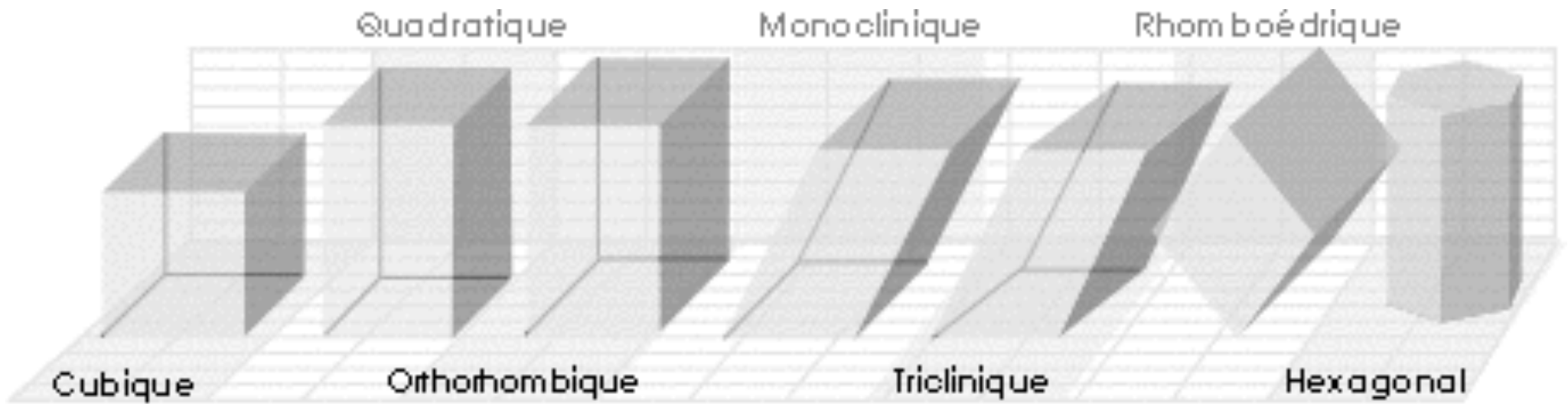
on peut écrire

$$\rho(\mathbf{r}) = (\Delta_{a,b,c} * \rho_0)(\mathbf{r}),$$

où $(f * g)(\mathbf{r}) = \iiint d^3r' f(\mathbf{r} - \mathbf{r}')g(\mathbf{r}')$ est la convolution de deux fonctions (champs scalaires) f et g .



Systemes cristallins



2. La *base réciproque* du cristal est définie par

$$\mathbf{a}^* = \frac{\mathbf{b} \wedge \mathbf{c}}{V}, \quad \mathbf{b}^* = \frac{\mathbf{c} \wedge \mathbf{a}}{V}, \quad \mathbf{c}^* = \frac{\mathbf{a} \wedge \mathbf{b}}{V},$$

où $V = \mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} \wedge \mathbf{c})$ est le volume de la maille. On voit que

$$\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a} = \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{b} = \mathbf{c}^* \cdot \mathbf{c} = 1,$$

$$\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b} = \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{c} = \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{c} = 0.$$

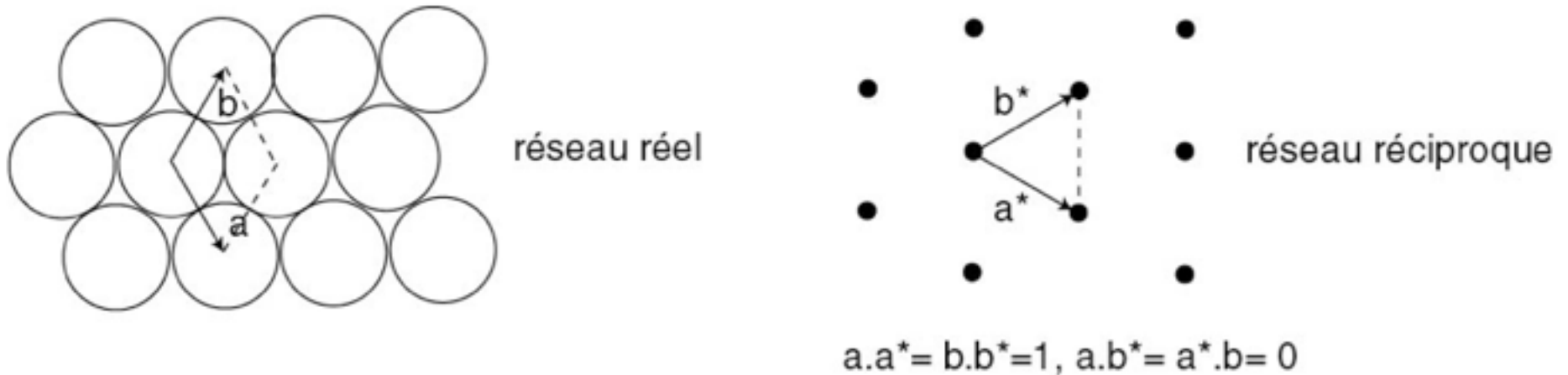


Illustration base réciproque 2d

3. Utilisant le théorème de convolution de la transformée de Fourier,

$$(f * g)(\mathbf{r}) \leftrightarrow \tilde{f}(\mathbf{q})\tilde{g}(\mathbf{q}),$$

ainsi que

$$\tilde{\Delta}_{a,b,c}(\mathbf{q}) = \frac{(2\pi)^3}{V} \sum_{h,k,l} \delta(\mathbf{q} - \mathbf{Q}^{hkl}), \quad \text{où} \quad \mathbf{Q}^{hkl} = 2\pi\{h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*\},$$

le facteur de structure d'un cristal est donné par

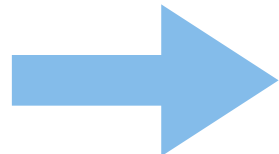
$$F(\mathbf{q}) = \tilde{\Delta}_{a,b,c}(\mathbf{q})\tilde{F}_0(\mathbf{q}) = \frac{(2\pi)^3}{V} \sum_{h,k,l} \delta(\mathbf{q} - \mathbf{Q}^{hkl})F_0(\mathbf{Q}^{hkl})$$

Ici $h, k, l \in \mathbb{Z}$ et $F_0(\mathbf{Q}^{hkl}) = \tilde{\rho}_0^*(\mathbf{Q}^{hkl})$.

On appelle

$$\tilde{\Delta}_{a,b,c}(\mathbf{q}) = \frac{(2\pi)^3}{V} \sum_{h,k,l} \delta(\mathbf{q} - \mathbf{Q}^{hkl})$$

le *facteur de structure du réseau du cristal*. Il est important de noter que $F(\mathbf{q}) \neq 0$ uniquement si la *condition de diffraction*


$$\mathbf{q} = \mathbf{Q}^{hkl}$$

est vérifiée et qui est le résultat de la forme de $\tilde{\Delta}_{a,b,c}(\mathbf{q})$. Partant de $\tilde{\rho}(\mathbf{q}) = F^*(\mathbf{q})$, on trouve par transformation de Fourier inverse

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} \exp(i\mathbf{Q}^{hkl} \cdot \mathbf{r}) F_0^*(\mathbf{Q}^{hkl}).$$

On voit que $\rho(\mathbf{r})$ est périodique,

$$\rho(\mathbf{r} + \mathbf{R}_{m,n,p}) = \rho(\mathbf{r}),$$

car $\exp(i\mathbf{Q}^{hkl} \cdot \mathbf{R}_{m,n,p}) = \exp(2\pi i\{hm + kn + lp\}) = 1$.

Peigne de Dirac 1d

On considère la fonction

$$\Delta_{a,N}(x) = \sum_{n=-N}^{+N} \delta(x - na).$$

La transformée de Fourier est

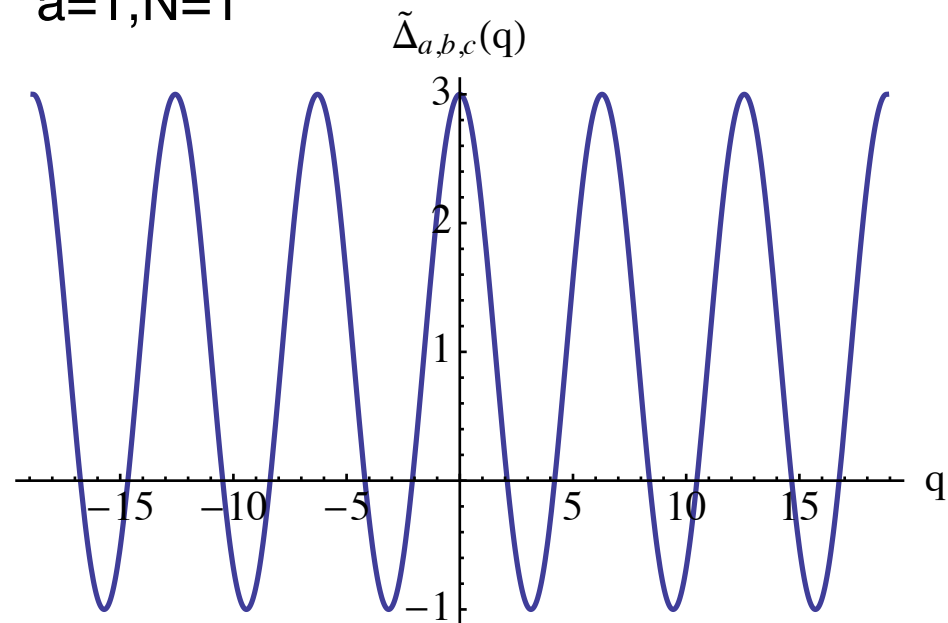
$$\tilde{\Delta}_{a,N}(q) = \sum_{n=-N}^{+N} \exp(iqna) = 1 + 2 \sum_{n=1}^N \cos(qna).$$

Les figures montrent que

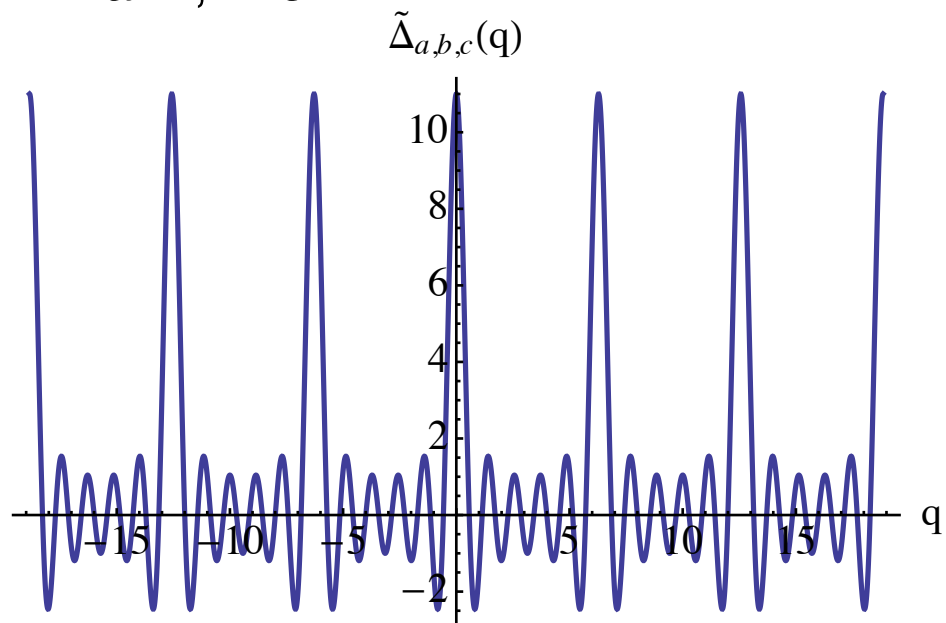
$$\lim_{N \rightarrow \infty} \tilde{\Delta}_{a,N}(q) = \Delta_{2\pi/a}(q) = \frac{2\pi}{a} \sum_k \delta(q - Q_k), \quad Q_k = k \frac{2\pi}{a}.$$

$$\tilde{\Delta}_{a,N}(q) = \sum_{n=-N}^{+N} \exp(iqna) = 1 + 2 \sum_{n=1}^N \cos(qna).$$

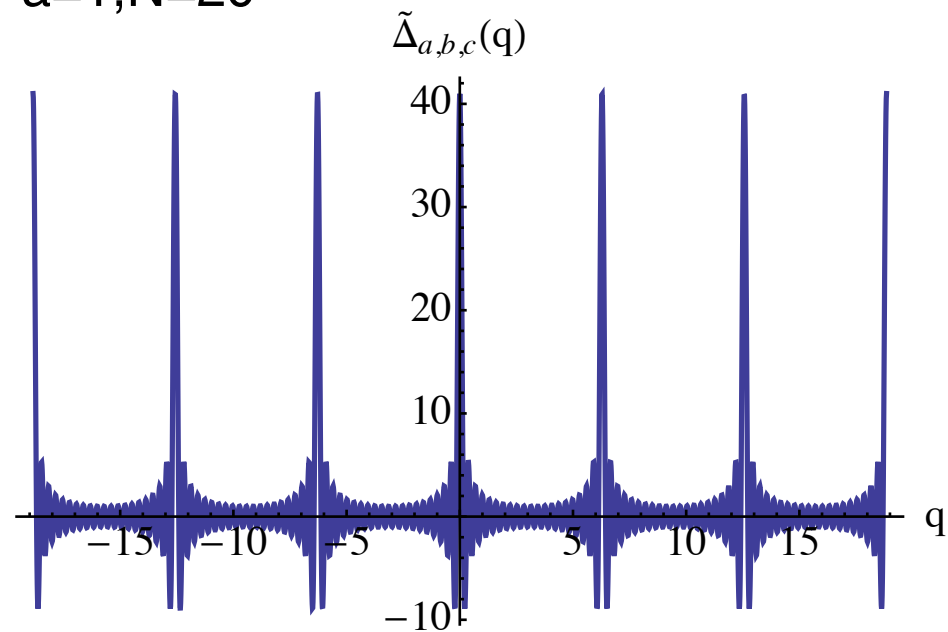
$a=1, N=1$

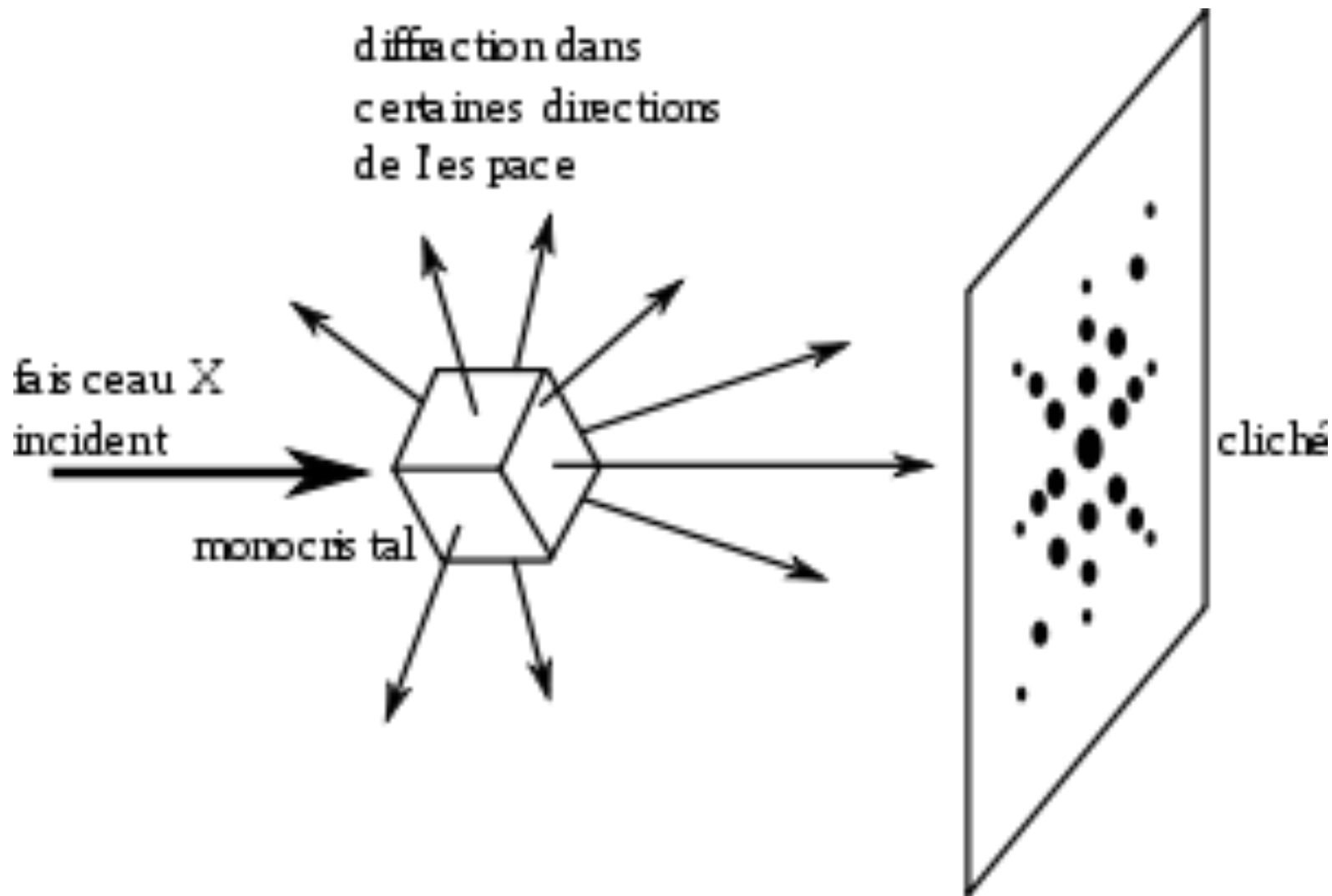


$a=1, N=5$



$a=1, N=20$





Facteur de structure de la maille

1. La densité électronique non-périodique de la maille est donnée par

$$\rho_0(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha} \rho_{\alpha}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\alpha}),$$

où $\rho_{\alpha}(\mathbf{r})$ est la densité atomique de l'atome α et \mathbf{R}_{α} sa position. On appelle le facteur de structure d'un seul atome *facteur de forme*,

$$\boxed{f_{\alpha}(\mathbf{q}) = \tilde{\rho}_{\alpha}^*(\mathbf{q})}$$

et par conséquent

$$F_0(\mathbf{q}) = \sum_{\alpha} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_{\alpha}) f_{\alpha}(\mathbf{q}).$$

2. L'agitation thermique des atomes peut être prise en compte par une densité de probabilité gaussienne de trouver l'atome α à sa position d'équilibre, \mathbf{R}_α ,

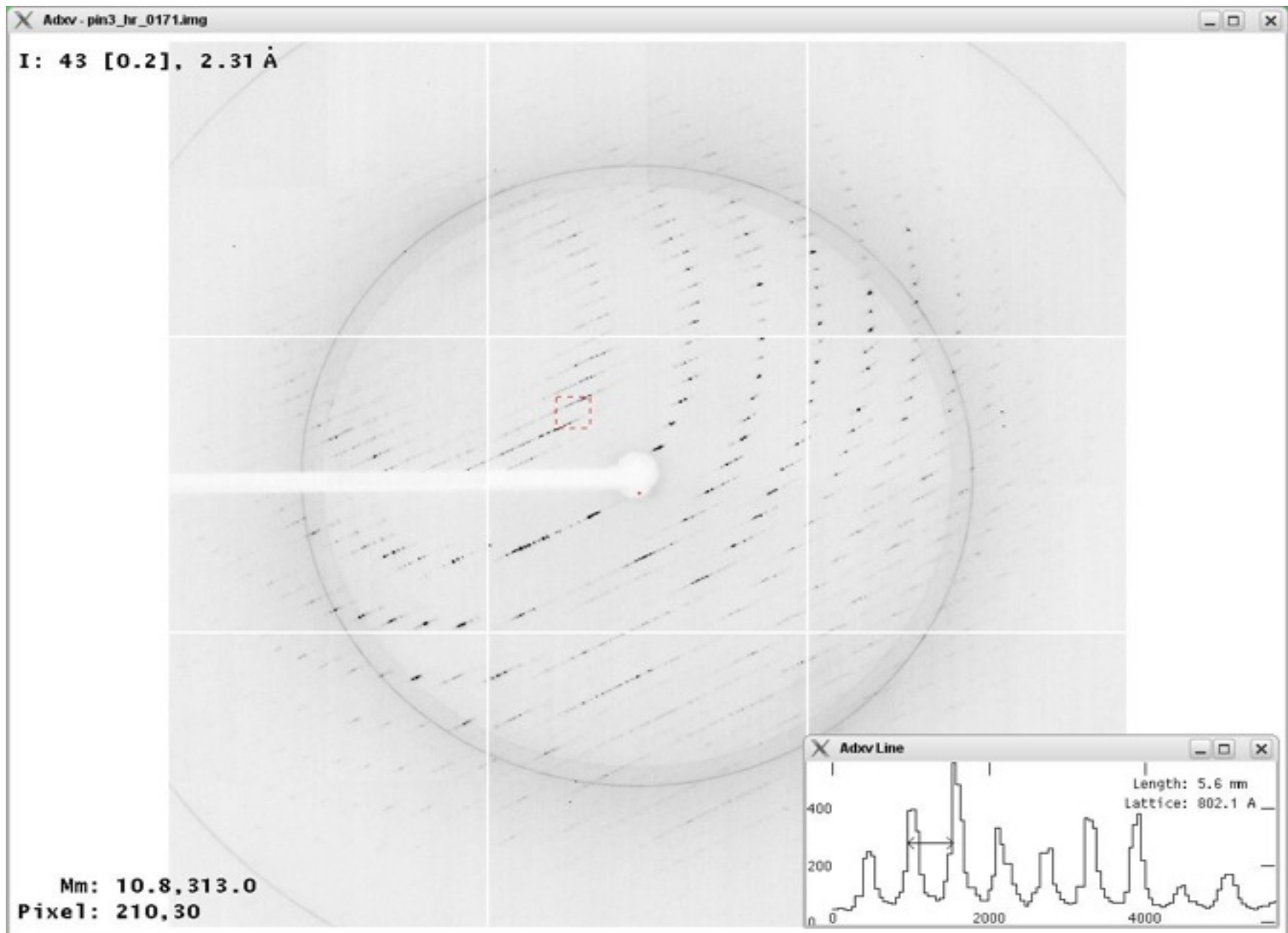
$$g_\alpha(\mathbf{r}) = \frac{1}{(\sqrt{2\pi}\sigma_\alpha)^3} \exp\left(-\frac{|\mathbf{r}|^2}{2\sigma_\alpha^2}\right),$$

tel que $\rho_{0,\alpha}^{th}(\mathbf{r}) = (\rho_{0,\alpha} * g_\alpha)(\mathbf{r})$. Par conséquent

$$F_0(\mathbf{q}) = \sum_{\alpha} \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_\alpha) f_\alpha(\mathbf{q}) \exp\left(-\frac{1}{2}\sigma_\alpha^2|\mathbf{q}|^2\right)$$

Dans un modèle, où les atomes sont retenus à leur position d'équilibre par une force harmonique on a $\sigma_\alpha^2 = k_B T / K_\alpha$, où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue et K_α la constante élastique pour l'atome α .

Le «cliché» pour une protéine



Problème de phases

1. En diffraction de rayons X ou de neutrons on mesure une intensité de diffraction qui est donnée par $|F(\mathbf{q})|^2$ et non par $F(\mathbf{q})$ même,

$$I(\mathbf{q}) \propto \sum_{h,k,l} |F_0(\mathbf{Q}^{hkl})|^2 \delta(\mathbf{q} - \mathbf{Q}^{hkl})$$

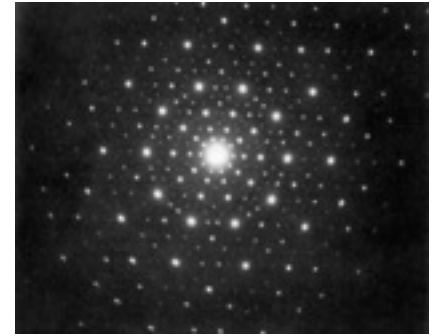
2. Utilisant le théorème de corrélation, l'intensité $|F_0(\mathbf{q})|^2$ peut être exprimée par

$$|F_0(\mathbf{q})|^2 = \iiint d^3r p(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r})$$

où $p(\mathbf{r})$ est la fonction de Patterson

$$p(\mathbf{r}) = \iiint d^3r' \rho_0(\mathbf{r} + \mathbf{r}') \rho_0^*(\mathbf{r}').$$

On mesure donc la transformé de Fourier de la fonction de corrélation de $\rho_0(\mathbf{r})$ pour $\mathbf{q} = \mathbf{Q}^{hkl}$.



Cliché de diffraction
de rayons X

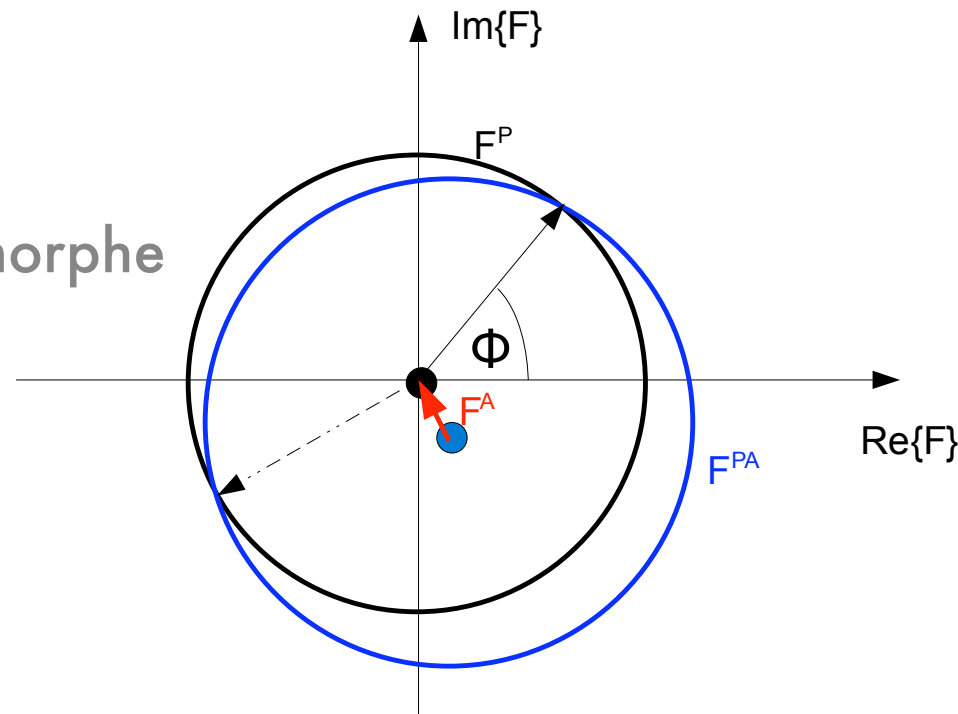
3. Afin de reconstruire la phase du facteur de structure complet pour la diffraction de rayons X on peut utiliser la technique du *remplacement isomorphe*. On ajoute un atome lourd, bien visible, dont on connaît bien $F_0^A(\mathbf{q})$, supposant que la structure de la protéine ne change pas (!). Mesurant $|F_0^P(\mathbf{q})|$ sans l'atome ajouté et $|F_0^{PA}(\mathbf{q})|$ avec l'atome ajouté permet de déterminer la phase de $F_0^P(\mathbf{q})$ en posant

$$\boxed{|F_0^{PA}(\mathbf{q})| = |F_0^P(\mathbf{q}) + F_0^A(\mathbf{q})|}$$

Ici partout $\mathbf{q} = \mathbf{Q}^{hkl}$ et la densité électronique du cristal peut être reconstruite par

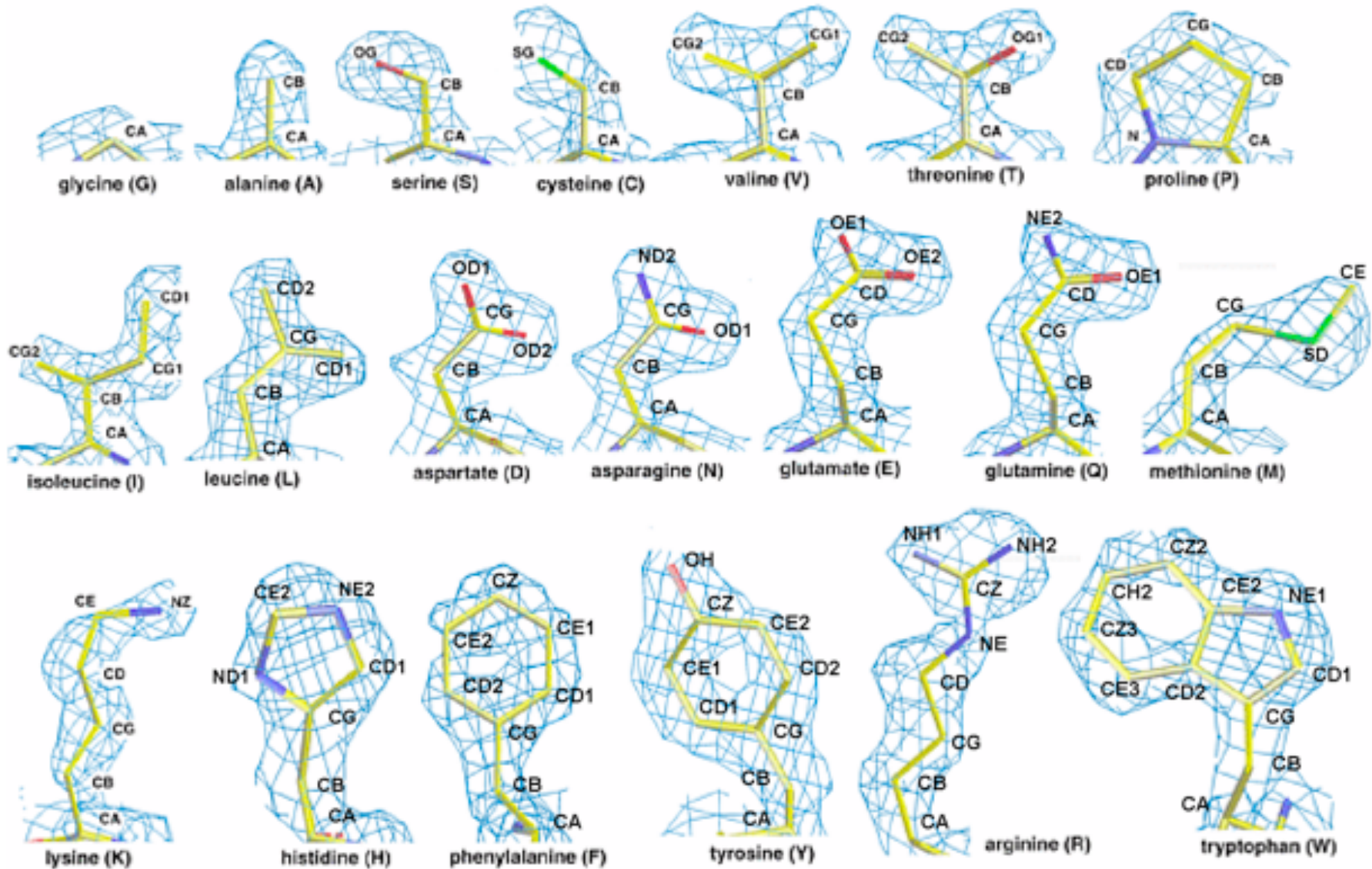
$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} \exp(i\mathbf{Q}^{hkl} \cdot \mathbf{r}) F_0^{P*}(\mathbf{Q}^{hkl}).$$

remplacement isomorphe



Il faut encore «raffiner», c.a.d. accommoder la structure 3D d'une chaîne polypeptidique dans la densité électronique obtenue !

Densité électronique des chaînes latérales



Representative electron density for amino acid side chains arranged in order of increasing size. From an experimental electron density map calculated at 1.5 Angstrom resolution (By. Mike Sawaya, <http://www.doe-mbi.ucla.edu/Legacy/CHEM153BH/info2.htm>)

La bio-cristallographie se pratique aussi avec la diffraction de neutrons !

Diffraction de neutrons et de rayons X

Au contraire au photons, les neutrons ne sont pas diffusés par les électrons, mais par les noyaux atomiques qui sont des objets “ponctuels” par rapport à la longueur d’onde de neutrons thermiques. Ceci correspond à poser $\rho_{0,\alpha}(\mathbf{r}) = f_\alpha \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_\alpha)$ où bien

$$f_\alpha(\mathbf{q}) = f_\alpha = \text{cste}$$

Ici $4\pi|f_\alpha|^2$ est effectivement la section efficace pour la diffraction par l’atome et f_α a la dimension d’une longueur. Pour la diffraction de rayons X $f_\alpha(\mathbf{r})$ a la dimension d’une charge et une comparaison directe avec les f_α des neutron n’a pas de sens. On peut, en revanche, comparer la diffraction relative pour quelques éléments

Dualisme particule – onde

- Relation de De Broglie

$$\mathbf{p} = \hbar \mathbf{k}, \quad \mathbf{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{n}.$$

Ici \mathbf{p} est la quantité de mouvement d'une particule, λ la longueur d'onde associé, $\mathbf{n} = \mathbf{p}/|\mathbf{p}|$ et $\hbar = h/(2\pi)$, où $h \approx 6,6260755 \times 10^{-34} J_s$ est la constante de Planck.

- Pour un photon

$$E = c|\mathbf{p}|, \quad c = 3 \cdot 10^8 m/s.$$

Pour $E = 12.4 keV$ (rayons X) on a $\lambda = 1 \text{ \AA}$.

- Pour un neutron thermique

$$E = \frac{|\mathbf{p}|^2}{2m}, \quad m = 1,6749 \times 10^{-27} kg.$$

Posant $E = k_B T$ (énergie thermique) on a $\lambda = 1.8 \text{ \AA}$. Ici k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue en Kelvin. Pour le calcul de la longueur d'onde un température de $T = 300 K$ a été utilisée.

Pour les neutrons thermiques et les photons correspondant aux rayons X les longueurs d'ondes sont compatibles avec les distances interatomiques dans la matière condensée. Par définition l'énergie des neutrons thermiques ($\approx k_B T$) est également compatible avec l'énergie cinétique des atomes, ce que rend la diffusion de neutrons une technique unique pour l'étude *de la structure et de la dynamique* de la matière condensée.

TAB. 1 – Longueurs de diffusion de neutrons thermiques pour quelques éléments en fm ($10^{-15} m$).

Atome	H	D	C	N	O	S	Au
f_α	-3.7	6.6	6.6	9.4	5.8	2.8	7.6

TAB. 2 – Facteurs de forme pour diffusion de rayons X en charges élémentaires (e). Ici $f_\alpha(\mathbf{0}) = \iiint d^3r \rho_{0,\alpha}(\mathbf{r})$ est la charge totale des électrons de l'atome, donc $f_\alpha(\mathbf{0}) \propto Z$, où Z est le nombre d'ordre de l'atome.

Atome	H	D	C	N	O	S	Au
$f_\alpha(\mathbf{0})$	1	1	6	7	8	16	79

Au contraire au rayons X, où $f_\alpha(\mathbf{0}) \propto Z$, il n'y a pas une telle systématique pour la diffraction de neutrons qui peut être utilisée afin de “voir” les éléments légers, pour lesquels Z est faible.

La diffraction de neutrons rend visible les atomes légers !