

Chapitre I : Protéomique structurale

I. Introduction à la protéomique

I.1. Les différentes visions de la protéomique

I.1.1. Protéomique structurale

I.1.2. Protéomique analytique

I.1.3. Protéomique fonctionnelle

Chapitre I : Protéomique structurale

I. Rappels sur la structure spatiale des protéines

II. La cristallographie rayons x

II.1. Qu'est ce qu'un cristal ??

II.2. Découverte des rayons x

II.3. Diffraction des rayons x par les cristaux

II.3.1. Diffraction par des structures simples

II.3.2. Diffraction par des structures plus complexes

II.3.3. Diffraction par des structures très complexes

II.4. Principe de diffraction des rayons x

II.4.1. Qu'est ce qu'un rayon ??

II.4.2. La diffusion de Thomson

III. La cristallographie rayon x appliquée aux protéines

III.1. Méthodes de cristallisation des protéines

III.1.1. Paramètres de solubilité

III.1.2. Equipement

III.1.3. Méthode de la diffusion de vapeur (La goutte pendante)

III.1.4. Les agents cristallisants

III.1.5. Optimisation de la qualité des cristaux (mise au point)

III.2. Le diagramme de phase

III.3. Caractéristiques des cristaux de protéines

III.4. Détermination de la structure d'une protéine par rayons X

III.5. Etapes de la détermination de la structure d'une protéine par rayons X

III.6. Exploitation d'un profil de diffraction par un cristal de protéine

III.6.1. La phase (ϕ)

III.6.2. La loi de Bragg.

I. Introduction à la protéomique

- ⇒ Le génome est l'ensemble des gènes d'un organisme, ou d'une espèce
- ⇒ Le protéome définit le jeu complet des protéines codées par un génome d'une cellule, ou d'une organelle.

La protéomique est la science qui étudie le protéome, son but c'est l'identification et la quantification de l'ensemble des protéines synthétisées (protéome) dans un tissu, cellules ou compartiment cellulaire.

La complexité d'un organisme n'est pas nécessairement liée au nombre de gènes de son génome. Le séquençage a révélé que la relation entre gène et produit génique est souvent complexe. Il est estimé que 40-60% des gènes humains produisent plus d'une protéine.

- Les gènes peuvent avoir de multiples sites d'initiation de la transcription, ceci peut produire différents transcrits.
- L'épissage alternatif et l'édition de molécules pré-ARNm peuvent produire aussi des dizaines de protéines différentes à partir d'un même gène.
- Les modifications post-traductionnelles: de nombreuses protéines sont modifiées par coupure de groupements terminaux (tels que les séquences signal, les propeptides ou les résidus méthionine d'initiation), par addition de groupements chimiques (méthyle, acétyle, phosphoryle), par liaison à des sucres ou des lipides.

L'analyse de la fonction protéique est compliquée par le fait que beaucoup de protéines agissent via des interactions protéines-protéines ou font partie d'un complexe moléculaire plus grand. Ainsi, le génome humain qui possède 25000-30000 gènes, a la capacité de produire plusieurs centaines de milliers de protéines différentes.

La protéomique apporte des informations sur

- ✓ La fonction,
- ✓ La structure,
- ✓ Les modifications post-traductionnelles,
- ✓ Les interactions protéine-protéine,
- ✓ La localisation cellulaire,

Pour chacune des protéines codées par le génome.

I.1. Les différentes visions de la protéomique

I.1.1. Protéomique structurale

Structure tridimensionnelle des protéines (cristallographie, RMN...).

I.1.2. Protéomique analytique

Isolement et identification des protéines dans un support biologique.

I.1.3. Protéomique fonctionnelle

Etudes des interactions protéine-protéine.

Chapitre 1 : La protéomique structurale

I. Rappels sur la structure spatiale des protéines

La liaison peptidique : deux acides aminés interagissent via une interaction entre la fonction carboxyle de l'un et la fonction amine de l'autre. Cette interaction entraîne la libération d'une molécule d'H₂O (**figure 1**).

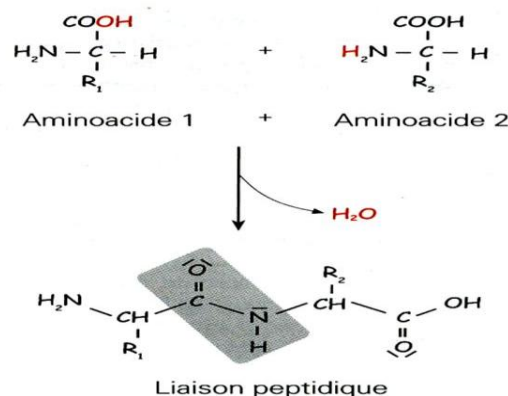


Figure 1 : la liaison peptidique.

- a. **Le repliement des protéines :** une protéine se replie en hélice α et feuillet β via des interactions hydrogènes, on appelle ceci la structure secondaire (**figure 2**). Les hélices et les feuillets interagissent pour donner la structure tertiaire, cette structure est stable grâce aux ponts disulfure (liaison covalente) établis entre les fonctions thiols des acides aminés soufrés en particulier la Cys: $\text{R-SH} + \text{SH-R}' \rightarrow \text{R-S-S-R}' + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ (**figure 3**). Dans certains cas (protéines à plusieurs sous unités) les structure tertiaires interagissent pour donner la structure quaternaire. La dénaturation d'une protéine correspond à la rupture de toutes ces liaisons pour obtenir un enchainement linéaire d'acides aminés, on appelle cette structure, primaire.

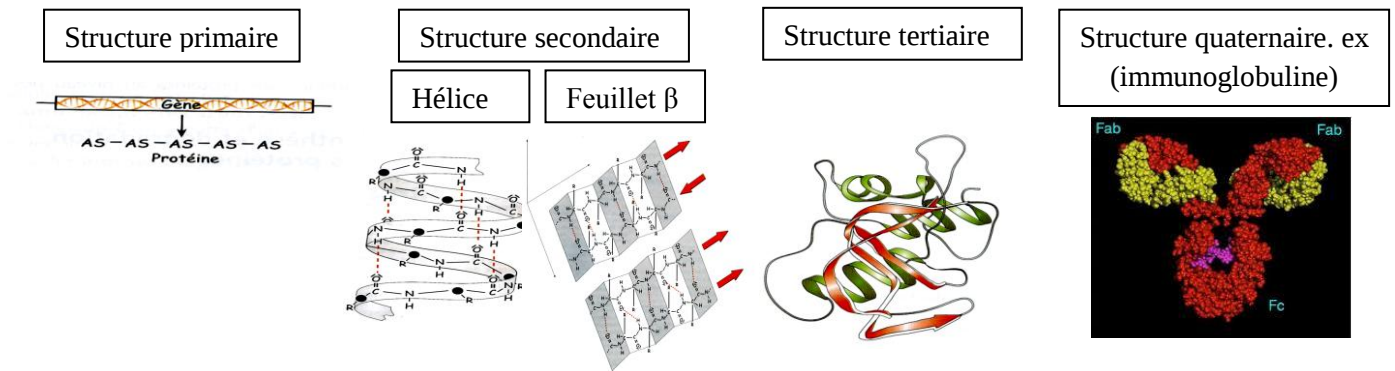


Figure 2 : les structures spatiales des protéines.

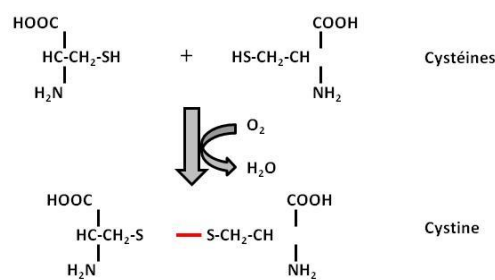


Figure 3 : oxydation de la cystéine et formation d'une cystine.

II. La cristallographie rayons x

Avant d'entamer l'étude de la cristallographie rayon x des protéines, il faut d'abord comprendre ce qu'est un cristal, des rayonnements x, leurs mode de fonctionnement et ce qu'est un rayon d'une manière générale.

II.1. Qu'est ce qu'un cristal???

- ✓ La cristallisation est le passage de la molécule d'un état **soluble désorganisé** à un état **solide organisé** appelé **cristal**.
- ✓ Un cristal est une structure tridimensionnelle formée d'un empilement **infini** et **régulier** d'un grand nombre **d'éléments de base** ordonnés dans un **réseau périodique** et qui possède des propriétés de **symétrie**.

L'exemple le plus simple est celui du **cristal monoatomique**, qui est un empilement **infini** et **régulier** d'atomes identiques.

- ⇒ **Infini** : la distance entre deux atomes est de quelques Å (1Å = 10⁻¹⁰m). Donc, un cristal de 1micron cube contient environ 10¹² atomes soit 10000 milliard atomes.
- ⇒ **Régulier** : les atomes sont empilés de manière ordonnée selon un schéma répétitif appelé **réseau**.

✓ Le cristal est donc l'empilement infini et régulier de **motifs** identiques

Mais qu'est ce qu'un motif ?

Le motif peut être :

- Un atome
- Plusieurs atomes
- Une molécule telle que... **une protéine !**

Ex : le carrelage d'une maison. Les carreaux sont des motifs. Leur empilement constituent les nœuds d'un réseau (**figure 4**).

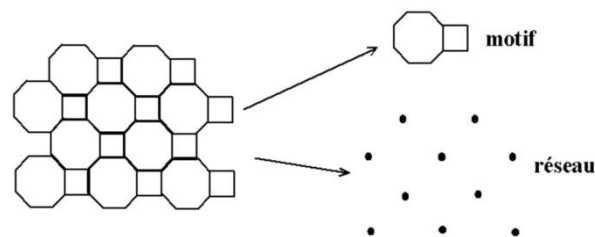


Figure 4: motif, nœuds et réseau d'un cristal.

Les cristaux peuvent avoir des formes et des couleurs très variées, mais ses constituants sont toujours assemblés de manière régulière. Pour comprendre le mode de cet assemblage il est très important d'identifier l'**unité minimale reproduite par translation**, on l'appelle : **la maille**. L'exemple du papier peint nous aide à mieux visualiser le phénomène (**figure 5-A**).

- ⇒ la maille, sous forme de rectangle ici, est constituée de deux motifs : un brin et un jaune. Chaque rectangle contient exactement la même information. En faisant glisser le rectangle (maille) on dessine un réseau grâce auquel on va reproduire l'intégralité du papier peint.
- ⇒ Il est également possible de dessiner d'autres types de rectangle ou carré qui permettent aussi de reproduire le papier peint par glissement (**figure 5-B**).

La même règle s'applique au réseau cristallin de la **figure 5-C**.

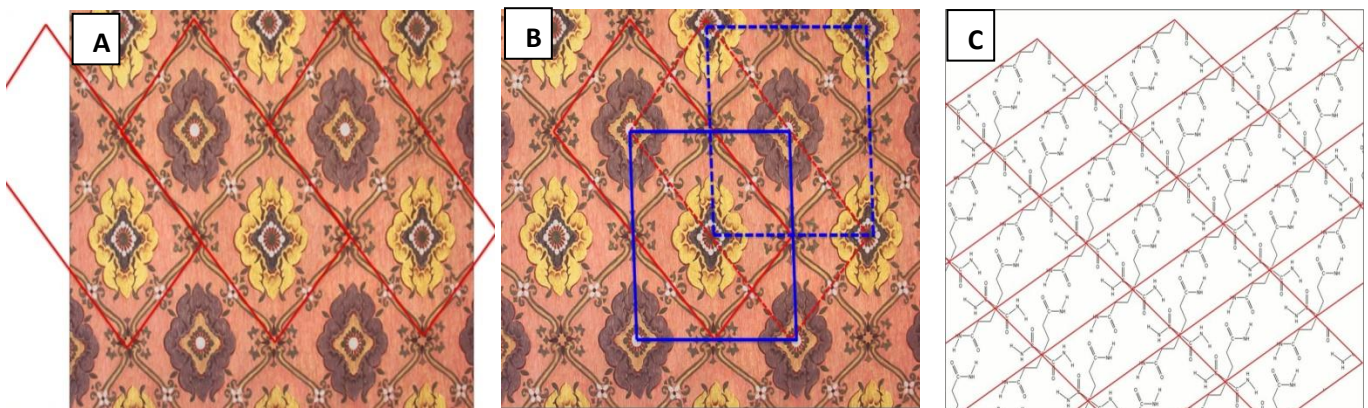


Figure 5 : identification du motif et de la maille dans un réseau cristallin.

- ✓ les cristaux les plus connus sont: la neige, le sucre, les sels...et les pierres précieuses (figure 6).



Figure 6 : les cristaux les plus connus de la nature.

II.2. Découverte des rayons x

- ⇒ Découverts, par hasard, par le physicien allemand **Rontgen** en 1895 (figure 7-A).
- ⇒ Rontgen a utilisé un **tube à décharge** (tube à vide) dans lequel il a inséré une cathode et une anode entre lesquelles il applique une haute tension (figure 7-B).
- ⇒ Il voit alors apparaître des rayons colorés, on les appelle : **rayons cathodiques** engendrés par le déplacement des électrons de la cathode vers l'anode (figure 7-C). Quelle est la nature de ces rayonnements?! à l'époque on ne connaissait pas encore les électrons.
- ⇒ Il masque la lumière avec une boîte noire en carton, mets le tube sous tension (figure 7-D), en éteignant la lumière, il voit scintiller un écran fluorescent posé par hasard à proximité (figure 7-E)
- ⇒ Des objets métalliques masquent la propagation de ces rayons mais pas le papier ! (figure 7-F)
- ⇒ Il met la main de son épouse et voit alors apparaître la première radiographie à rayon x d'une main humaine de l'histoire (la radiographie de **Bertha Rontgen**) (figure 7-G).
- ⇒ Il baptise ces rayonnements **très pénétrant** : **rayons x** en référence à l'inconnu x en mathématiques.
- ⇒ Il obtient le prix Nobel de physique en 1901 (figure 7-H).

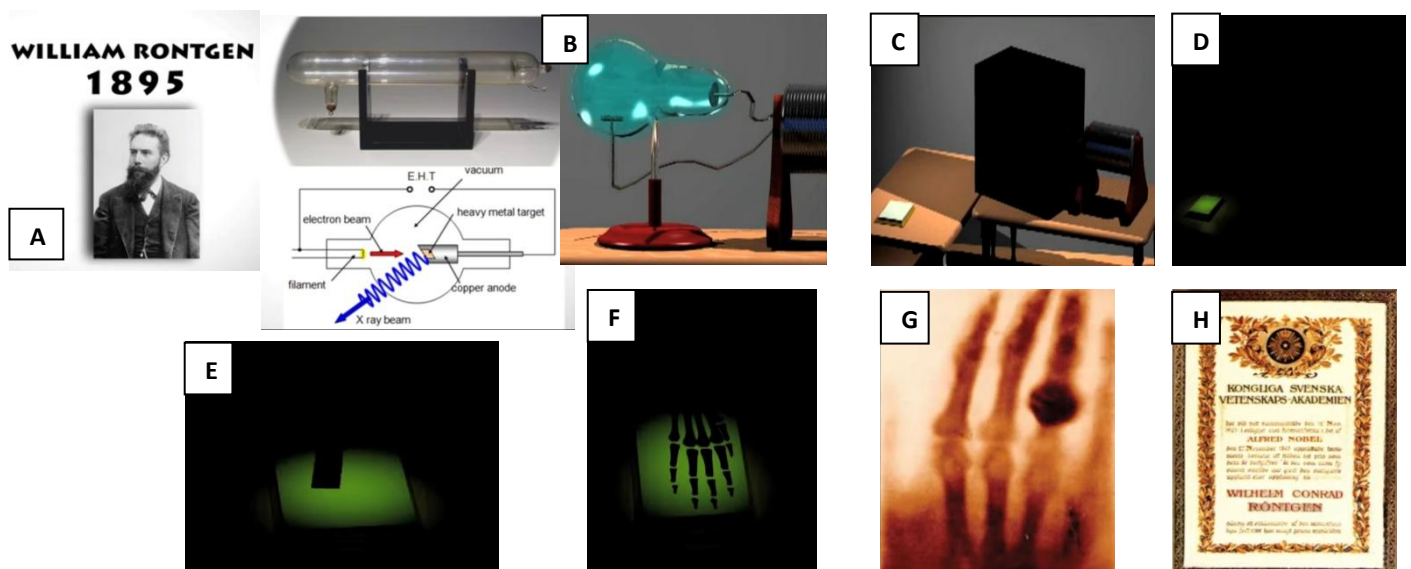


Figure 7: découverte des rayons x par **Rontgen** 1895.

- ⇒ Il conclut après ces expériences que les rayons x traversent la matière en fonction de sa densité. C'est le principe de base des radiographies médicales d'aujourd'hui. Les rayons x ne traversent pas les os de la même manière qu'ils ne traversent pas les dents à cause de leur forte densité. Sur le film radiographique, ils apparaissent en blanc. Par contre, les rayons traversent les organes mous (cœur, poumons, muscle, peau...) et ces derniers apparaissent en noir sur le film (**figure 8-A**). En d'autres termes, en traversant la matière, le rayonnement « brûle » le film radiographique (**figure 8-B**).

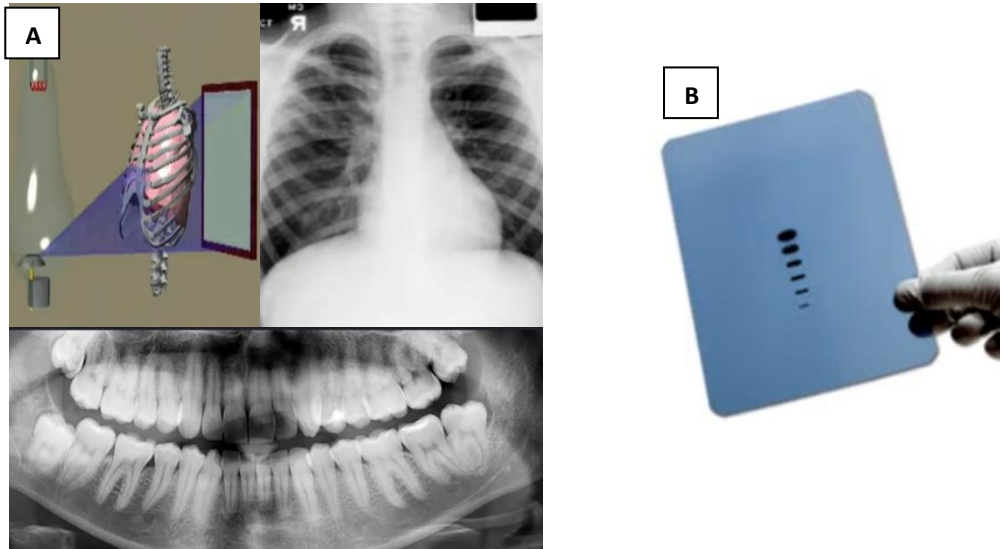


Figure 8: fonctionnement des rayons x dans le corps humain.

II.3. Diffraction des rayons x par des cristaux

II.3.1. Diffraction par des structures simples

La première expérience a été faite par **Max Laue (figure 9-A)** en 1912 sur un cristal de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Il voit apparaître des tâches de diffraction n'ayant **pas la même intensité** et reproduisant la **symétrie carré du cristal**. On appellera ces tâches, **tâches de Bragg (figure 9-B)**.

Lawrence Bragg comprend qu'il est possible de déterminer la structure cristalline en analysant le positionnement et l'intensité des tâches. Les années qui ont suivi, les scientifiques ont étudié des centaines de structures cristallines simples constituées d'un petit nombre de types d'atomes tels que l' NaCl , ZnS ... (**figure 9-C**).

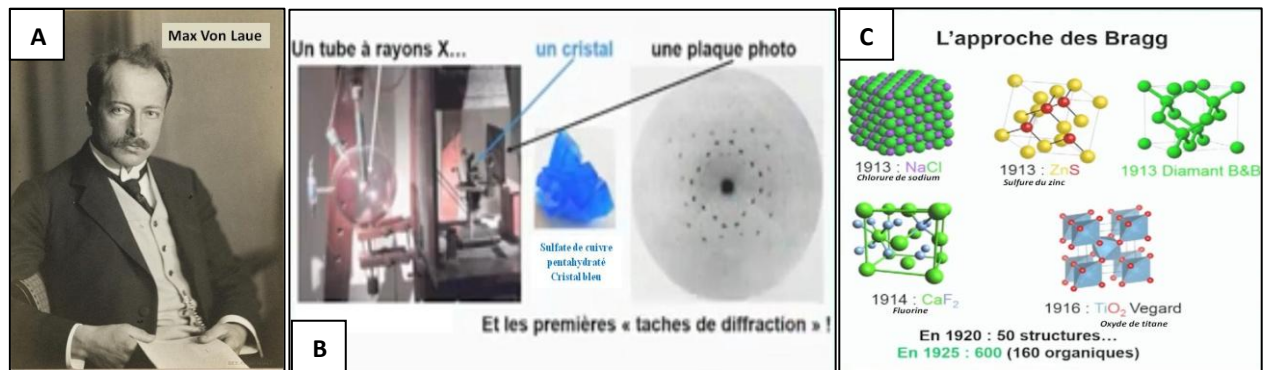


Figure 9 : A) photographie de Max Von Laue. B) première expérience de diffraction des rayons x par un cristal de sulfate de cuivre pentahydraté (Max Laue, 1912). C) découverte de la structure cristalline de plusieurs molécules simple grâce à l'approche de Bragg.

II.3.2. Diffraction par des structures plus complexes

On a voulu par la suite déterminer la structure cristalline d'une molécule plus complexe qui est la pénicilline. **Bragg** a alors compris que les rayons x n'étaient pas des particules mais des rayons à courte longueur d'onde. En **1915**, **Henri Bragg** (père de **Lowrence Bragg**) établie le lien entre les **mathématiques de Fourier** et la diffraction. Ceci a mené les scientifiques de l'époque à déterminer la structure cristalline de plusieurs molécules plus complexe (**figure 10**).

La diffraction des rayons x réalise une **transformée de Fourier** de la **densité électronique** d'un cristal

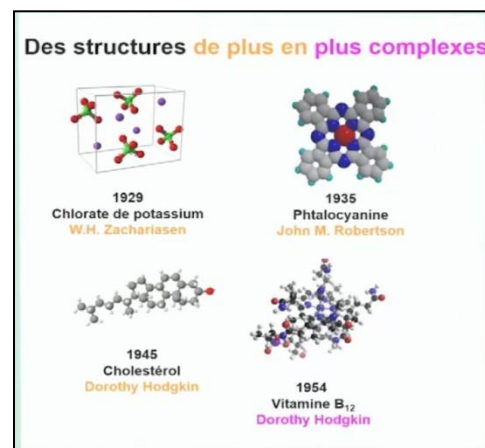


Figure 10: détermination de structures cristallines plus complexes grâce à la transformation de fourrier

II.3.3. Diffraction par des structures très complexes

L'arrivée des biologistes dans le domaine de la cristallographie passe d'abord par l'obtention de cristaux. L'assemblage de macromolécules telles que les protéines ou virus s'avère être beaucoup plus aléatoire que celui des petites molécules chimiques étudiées jusque là.

En **1946**, **Summer, Northrop et Stanley** obtiennent le prix Nobel de chimie pour avoir découvert que les protéines pouvaient cristalliser (**figure 11-A**). La structure 3D de **l'hémoglobine**, qui contient plusieurs milliers d'atomes, fut la première à être déterminée en **1959** par **Perutz**. Il faudra attendre les années 2000 pour découvrir la structure 3D du **ribosome** qui contient plus de 100000 atomes (**figure 11-B**).

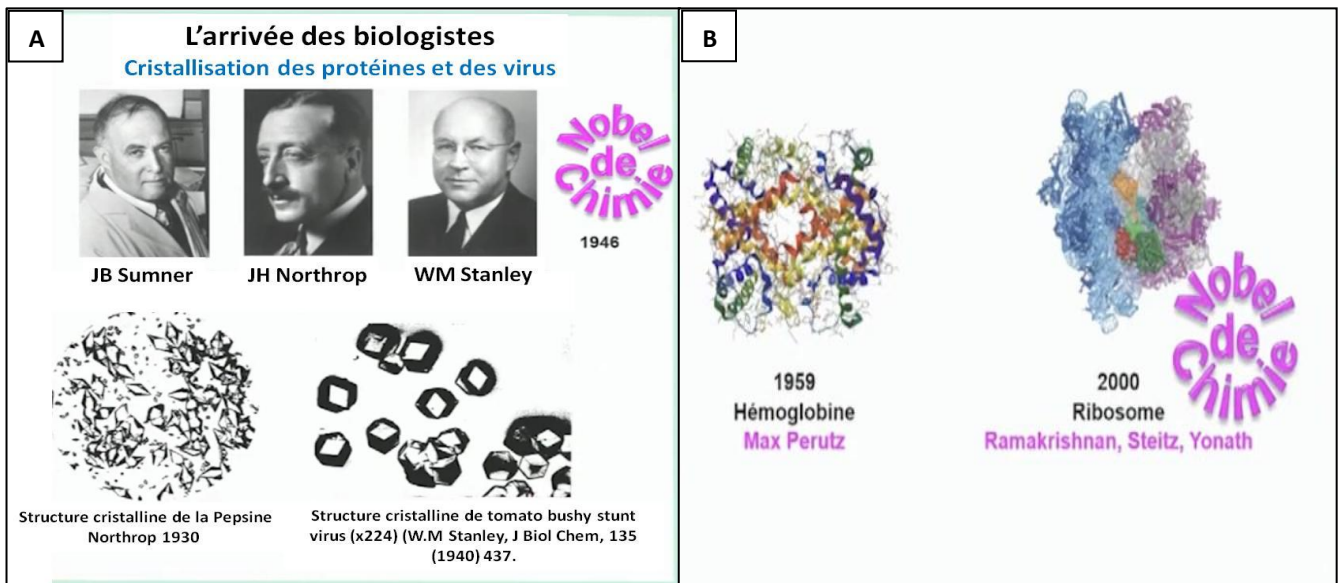


Figure 11: **A)** découverte de la cristallisation des protéines par Summer, Northrop et Stanley. **B)** premières applications de diffraction des rayons x par des cristaux de protéines.

II.4. Principe de diffraction des rayons x

II.4.1. Qu'est ce qu'un rayon ??

La lumière visible, les rayonnements infrarouge (IR), ultraviolets (UV), x, γ , les ondes radio et les microondes sont des rayonnements électromagnétiques qui proviennent du soleil, ils se déplacent dans le vide à la vitesse de la lumière $c=299792458$ m/s soit environ 300000 km/h (**figure 14-A**) grâce à la propagation d'un champ électrique et un champ magnétique sous forme d'ondes qui **oscillent** à la **même fréquence** de manière **perpendiculaire** (**figure 14-B**).

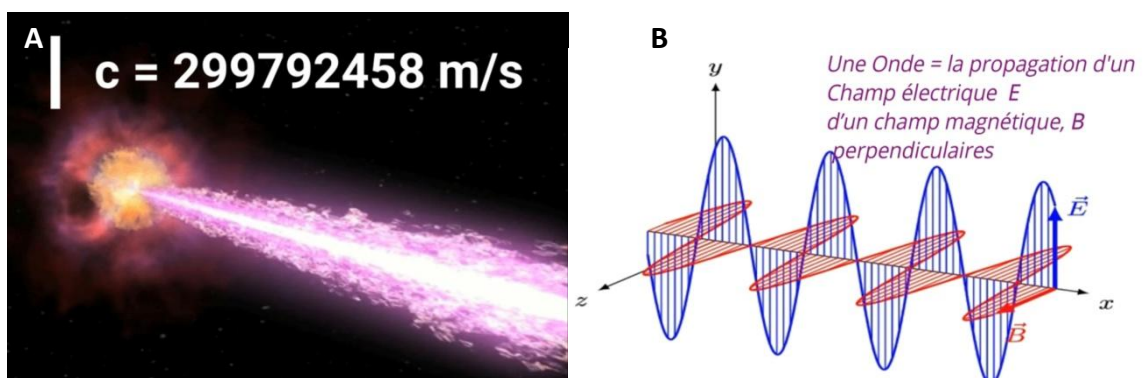


Figure 14: **A)** vitesse et déplacement des rayonnements solaire. **B)** composantes d'un champ électromagnétique.

Le spectre électromagnétique se compose de plusieurs types de rayonnements qui diffèrent entre eux par leurs grandeurs physiques caractéristiques, à savoir : la longueur d'onde (λ), la période (T) et la fréquence (f) (**figure 15-A**).

- ⇒ **La longueur d'onde (λ)** : c'est la longueur d'un cycle d'une onde, qui n'est autre que la distance séparant deux crêtes successives. Elle est mesurée en :
 Nanomètre → $1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$
 Micromètre → $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{ m}$
 Centimètre → $1\text{cm} = 10^{-2}\text{ m}$
- ⇒ **La période (T)**: elle représente le temps nécessaire pour que l'onde effectue un cycle, mesurée en secondes (s).
- ⇒ **La fréquence (f)** : c'est l'inverse de la période, elle traduit le nombre de cycle que fait une onde en 1 seconde.
 S'exprime en Hertz (Hz)

La longueur d'onde et la fréquence sont inversement proportionnelles :

$$\lambda = c / f \text{ (v : vitesse de la lumière).}$$

Plus la longueur d'onde est petite, plus grande est la fréquence et plus grande est l'énergie du rayon (**figure 15-B**).

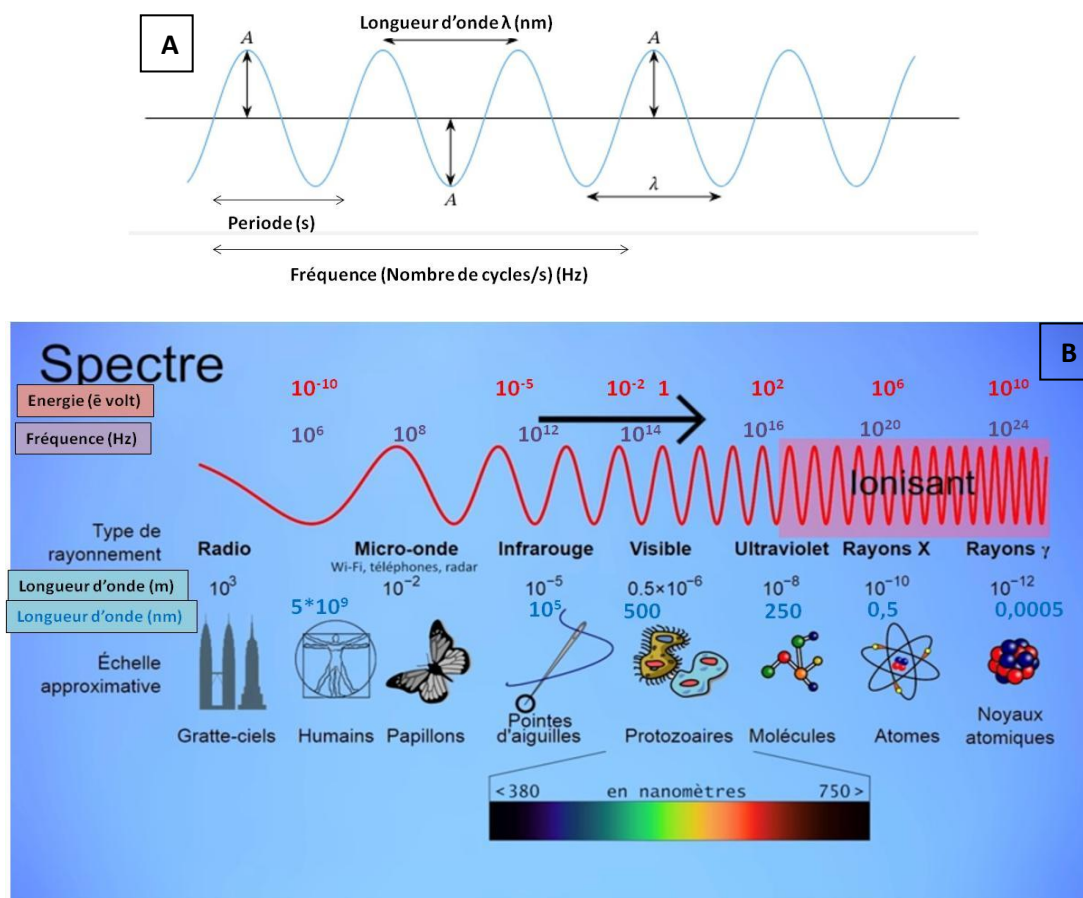


Figure 15: A) grandeurs caractéristiques d'une onde. B) caractéristiques physiques des ondes composant le spectre électromagnétiques.

II.4.2. La diffusion de Thomson

En **1907**, **Thomson** a donné une base théorique à la diffusion des rayons x par les électrons. Cette théorie a été à l'origine de l'explication de la diffraction des rayons x par les cristaux.

Le champ électrique E du rayonnement x oscille perpendiculairement à la direction de propagation de l'onde, à la fréquence μ de l'onde. Un électron placé sur le chemin de l'onde va subir la force de ce champ électrique et va osciller à la même fréquence que l'onde et va émettre à son tour une onde électromagnétique de la même fréquence que l'onde incidente (**figure 12**).

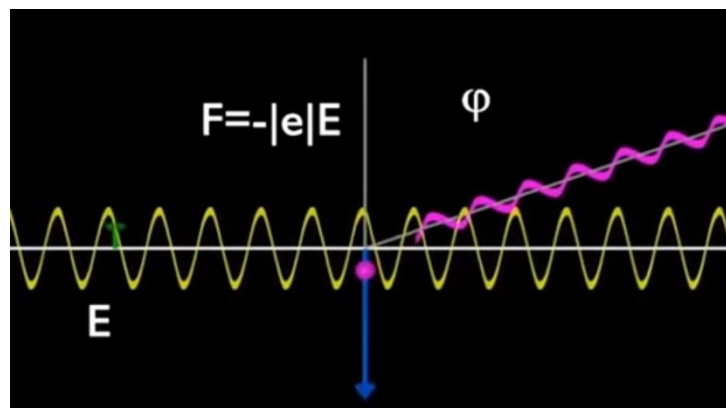


Figure 12 : diffusion de **Thomson** d'un rayonnement x incident par un électron.

Si on place un atome devant une onde incidente, le noyau de cet atome étant très lourd par rapport aux électrons, il n'oscille pas et donc ne diffuse pas. Ainsi seuls les électrons de l'atome diffusent les rayons x incidents. Chaque atome contient plusieurs électrons, les ondes diffusées par les électrons interfèrent pour donner l'onde diffusée par l'atome.

- ⇒ L'amplitude de cette onde est maximal lorsque l'angle $\theta = 0$ (**figure 13-A**). ,
- ⇒ Elle décroît lorsque θ augmente. Ceci est fonction du nombre d'électron dans l'atome (**figure 13-B**). .
- ⇒ Chaque atome a ainsi sa signature caractéristique sur le profil de diffraction (dépendant principalement de son nombre d'électrons).

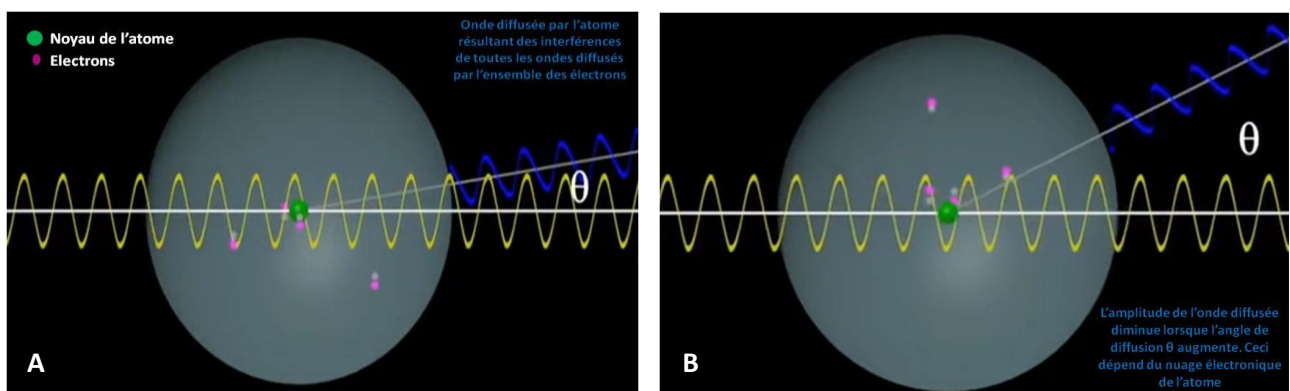


Figure 13: interférence des ondes diffusées par le nuage électronique de l'atome.

III. La cristallographie rayons x appliquée aux protéines

La cristallographie est la science qui étudie les substances cristallines à l'échelle atomique.

La cristallographie appliquée aux protéines consiste à la compréhension détaillée de la structure des protéines au niveau atomique. En d'autres termes, cette technique fournit des informations sur la position relative des atomes dans la molécule: on appelle cela les **coordonnées atomiques**.

Elle permet d'étudier **la conformation tridimensionnelle** des protéines et de pouvoir ainsi mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leurs liaisons avec d'autres molécules présentes dans la cellule ou administrées comme médicaments (**figure 16**).

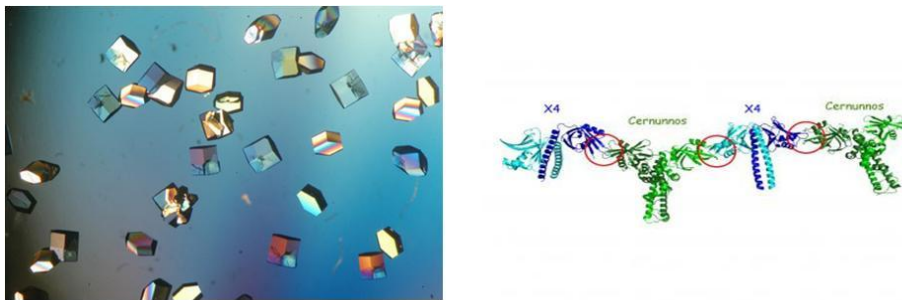


Figure 16 : cristaux de protéines observés au microscope optique.

III.1. Méthodes de cristallisation des protéines

Comment peut-on obtenir un cristal à partir d'une structure aussi complexe qu'une protéine?

Rappelons que : la cristallisation est une transition de phase ; la molécule passe d'une phase liquide désorganisée à une phase solide organisée, le cristal.

Pour arriver à une structure cristalline à partir de protéines dissoutes dans de l'eau, il faut réduire leur solubilité. La réduction de la solubilité entraîne la formation d'un **précipité amorphe**.

En partant d'une solution de protéines, la formation d'un cristal va avoir un coût **énergétique** et va prendre du **temps**.

Il faut commencer avec une solution protéique assez **pure** et **concentrée** pour que les premières protéines puissent interagir facilement. Les interactions se font au hasard, deux types d'interactions peuvent avoir lieu :

- 1- **Des interactions non spécifiques** donnant des agrégats protéiques → **précipitation** de la protéine,
- 2- **Des interactions spécifiques** donnant des agrégats ordonnés → **germes cristallin**.

Lorsque la barrière énergétique associée aux germes cristallins est franchie, la croissance cristalline commence jusqu'à la taille maximale du cristal (**figure 17**).

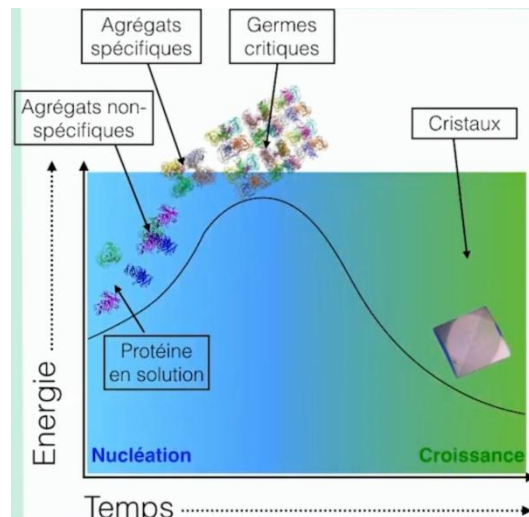


Figure 17: le coût énergétique des interactions spécifiques entre les protéines

Chaque protéine a une composition unique et donc des propriétés spécifiques. La cristallographie doit trouver les conditions spécifiques à la cristallisation de chaque protéine. En sélectionnant des **conditions spécifiques** pour que les surfaces complémentaires de protéines adjacentes se trouvent face à face, des interactions attractives peuvent avoir lieu. Si ces interactions sont géométriquement favorables, elles peuvent donner lieu à une cristallisation.

Pour cela il faut connaître les paramètres affectant la solubilité d'une protéine.

III.1.1. Paramètres de solubilité

1. La charge :

Les protéines sont des polyélectrolytes dont la surface est recouverte de charges + et – qui interagissent avec les molécules de solvant. Ainsi : le pH, la force ionique et la température ont un effet sur la solubilité (figure 18-A).

2. Les sites d'interactions spécifiques :

Les protéines peuvent avoir un site d'interaction spécifique d'un ligand donné. Ainsi la présence de ce ligand dans la solution pourra améliorer la stabilité de la protéine (figure 18-B).

3. La conformité structurale :

La flexibilité d'une protéine, qui liée à la présence ou non de boucles mobiles, affecte sa conformation et donc l'homogénéité de l'échantillon. Or, pour obtenir un cristal solide, ordonné et homogène, il faut non seulement que la protéine soit pure (au sens chimique), présence d'une seule espèce dans la solution, mais il faut également respecter la conformité structurale. Ainsi, si la protéine contient une ou des boucles mobiles, il faut les couper à l'aide de protéases (figure 18-C).

4. La polarité de surface

Exemple des protéines membranaires : ces protéines interagissent avec la membrane avec des liaisons hydrophobes donc ce genre de protéines exposent à leur surface des domaines hydrophobe, ceci affecte leur solubilité. Dans ce cas l'utilisation de détergents est incontournable (figure 18-D).

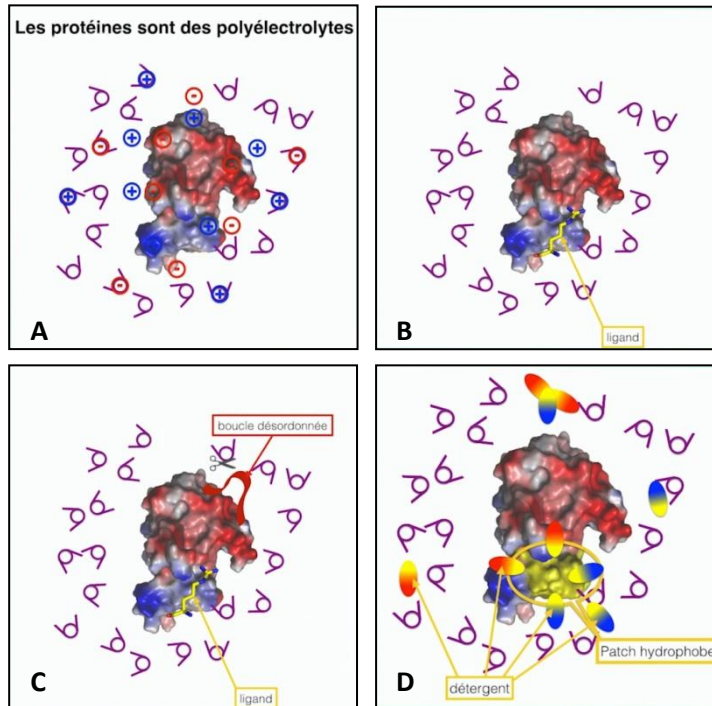


Figure 18 : paramètres affectant la polarité des protéines. **A)** la charge, **B)** les sites d'interactions spécifiques, **C)** la conformité structurale, **D)** la polarité de surface.

III.1.2. Equipement

- ⇒ **Une salle** à température contrôlée : la température étant un paramètre qui modifie la solubilité de la protéine.
- ⇒ **Un microscope** : pour observer les cristaux
- ⇒ **Un échantillon de protéine pure** (>95%) et très concentrée ($\approx 10\text{mg/ml}$), pour avoir un maximum de pureté on emploie l'une des procédures suivantes :
 - Dialyse contre un tampon de faible force ionique
 - Filtration ou centrifugation à grande vitesse
- ⇒ **Composés chimiques** à haut grade de pureté (agents cristallissants/précipitant).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la cristallisation des protéines, certaines sont robotisées et d'autres pas ; on distingue :

- **La diffusion de vapeur** : comporte deux méthodes :
 - La goutte pendante
 - La goutte assise
- **La diffusion liquide**
- **La dialyse**

La méthode de **diffusion de vapeur (goutte pendante)** est actuellement la plus utilisée pour la cristallisation des protéines (**figure 19**).

III.1.3. Méthode de la diffusion de vapeur (La goutte pendante)

- Une goutte (1 à 5 μL) d'un mélange de la protéine + agent précipitant est placée sur la face inférieure d'une lamelle au-dessus d'un réservoir ($\approx 1\text{ ml}$) contenant une solution dont la concentration en précipitant est supérieure mais ne contenant pas de protéine.
- L'enceinte est hermétiquement scellée.
- L'équilibration se fait par évaporation des composés volatils (l'eau) de la goutte vers le réservoir, jusqu'à ce que les tensions de vapeur à la surface des deux compartiments soient identiques.
- Cela va entraîner une augmentation de la concentration de la protéine et du précipitant dans la goutte.
- Si des conditions appropriées ont été choisies, cela va amener la protéine à cristalliser.

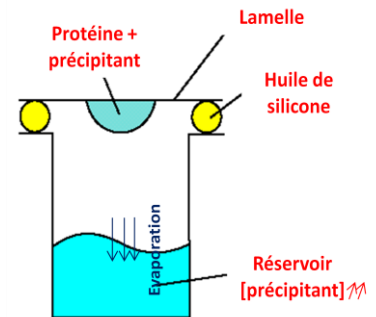


Figure 19 : méthode de la goutte pendante.

III.1.4. Les agents cristallisants (précipitant)

1. **Sels:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium sulfate), NaCl (chlorure de sodium), LiCl (lithium chloride), KH_2PO_4 (monopotassium phosphate), jouent sur la force ionique du milieu,
2. **Solvants organiques :** alcool, éthers, diminuent l'activité chimique de l'eau et affectent la densité la viscosité et la vitesse de diffusion dans la solution.
3. **Polymères :** Polyéthylène glycol (PEG), Produisent une déshydratation, affectent la densité, la viscosité et la vitesse de diffusion dans la solution de cristallisation

III.1.5. Optimisation de la qualité des cristaux (mise au point)

Il est impossible de prédire à l'avance les conditions exactes de cristallisation d'une protéine donnée. Pour chaque échantillon, il faudra faire varier ces paramètres un à un pour trouver ses conditions propres de cristallisation.

Dans une plaque à 48 puits, il est possible de faire varier les concentrations d'agents précipitant par exemple le PEG, et les conditions de cristallisation tels que le pH (**figure 20-A**). Dans une direction de la plaque, on varie les concentrations de l'agent précipitant et dans l'autre le pH.

A

	Conditions	Conditions	Conditions	Conditions	Conditions	Conditions
A	PEG3350 5%	PEG3350 10%	PEG3350 15%	PEG3350 20%	PEG3350 25%	PEG3350 30%
	pH 7,2	pH 7,2	pH 7,2	pH 7,2	pH 7,2	pH 7,2
B	PEG3350 5%	PEG3350 10%	PEG3350 15%	PEG3350 20%	PEG3350 25%	PEG3350 30%
	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4
C	PEG3350 5%	PEG3350 10%	PEG3350 15%	PEG3350 20%	PEG3350 25%	PEG3350 30%
	pH 7,6	pH 7,6	pH 7,6	pH 7,6	pH 7,6	pH 7,6
D	PEG3350 5%	PEG3350 10%	PEG3350 15%	PEG3350 20%	PEG3350 25%	PEG3350 30%
	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,8

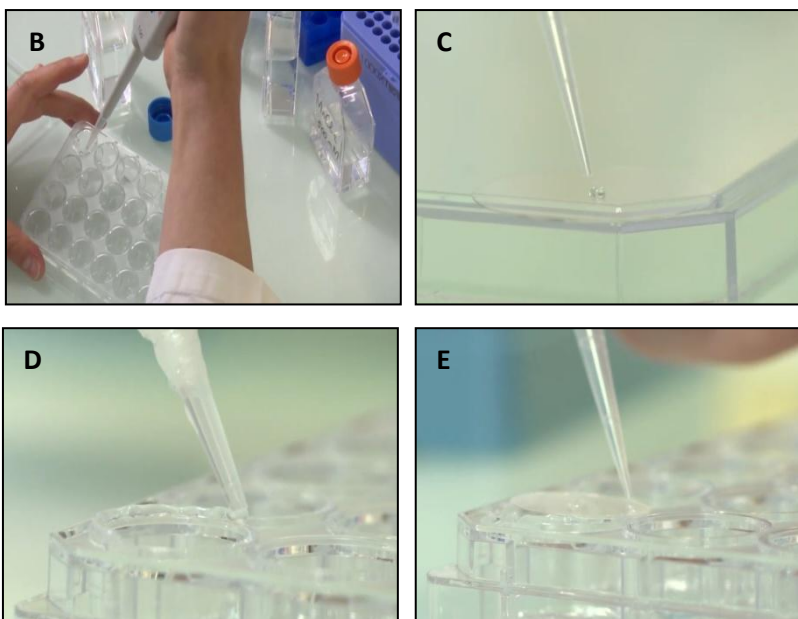


Figure 20 : Mise au point de l'agent précipitant. **A)** tableau des conditions de précipitation variant la concentration en PEG et le pH. **B)** préparation d'une plaque 48 puits avec les conditions de cristallisation du tableau. **C)** dépôt de la goutte contenant la protéine sur une lamelle. **D)** dépôt d'une fine couche de graisse sur les bords de chaque puits. **E)** renversement de la lamelle sur le puits en appuyant légèrement avec le cône.

III.2. Le diagramme de phase

Le comportement d'une molécule en fonction des variations de son environnement peut être décrit sous la forme d'un diagramme de phases (**figure 21**).

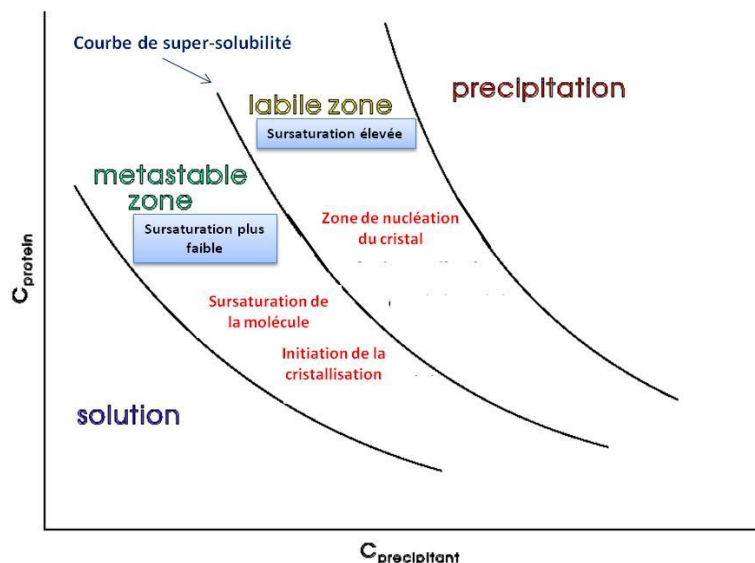


Figure 21 : Le diagramme de phase.

- ⇒ Nous voulons amener la protéine à son seuil de solubilité, donc sa concentration doit être suffisamment élevée pour favoriser les interactions spécifiques.
- ⇒ La courbe de solubilité définit la limite entre phase soluble et phase solide.
- ⇒ Au niveau de la courbe, états soluble et solide sont en équilibre dynamique.
- ⇒ Pour qu'une macromolécule cristallise, elle doit dépasser cette courbe et entrer dans une zone hors équilibre thermodynamique.
- ⇒ Elle se trouve alors dans un état de sursaturation qui lui permet d'initier sa cristallisation.
- ⇒ Cette initiation ou nucléation, ne s'opère que si la sursaturation est suffisante. Il existe, de ce fait, une seconde courbe, dite courbe de super-solubilité, qui sépare deux zones sursaturées du diagramme :
 - zone métastable où la sursaturation plus faible est juste suffisante pour qu'un cristal existe et croisse.
 - la zone de nucléation ou zone labile, où la sursaturation élevée conduit à la nucléation du cristal.
- ⇒ Pour atteindre une solution super-saturée, on fait varier les concentrations en protéine et/ou en précipitant. Le mécanisme physique responsable du changement de concentration est la diffusion de vapeur.
- ⇒ La nucléation ou germination est le phénomène suivant lequel apparaissent les premiers germes cristallins d'une phase solide.
- ⇒ La taille d'un noyau est de l'ordre de 100 à 1000 atomes. Les noyaux ont un temps de vie extrêmement court et se déplacent librement à travers la solution, diminuant les chances d'examiner leur formation.
- ⇒ La germination tient un rôle crucial dans le contrôle des propriétés microscopiques (taille, pureté, morphologie et structure cristalline) qui affectent directement les

propriétés physiques et chimiques du matériau cristallin généré à l'échelle macroscopique.

III.3. Caractéristiques des cristaux de protéines

- Les cristaux de protéines sont « mous » et contiennent en général entre 30% et 70% d'eau, dont la plus grande partie est désordonnée dans le cristal.
- L'intégrité des cristaux de protéines est maintenue principalement par des interactions existant entre les molécules de protéines.
- La structure native (le repliement approprié de la molécule de protéine qui lui confère sa fonction et son activité) est conservée. Cela peut être démontré par la réalisation de tests enzymatiques sur la forme cristalline de la protéine.

III.4. Détermination de la structure d'une protéine par rayon X

Pour voir un objet, nous utilisons de la lumière, cette dernière interagit avec les atomes qui constituent cet objet (**figure 22**). Les atomes de la molécule peuvent régir de différentes manières :

- ⇒ Absorption/émission : cas de la microscopie électronique à transmission
- ⇒ Diffusion/diffraction : cas de la cristallographie rayons x.

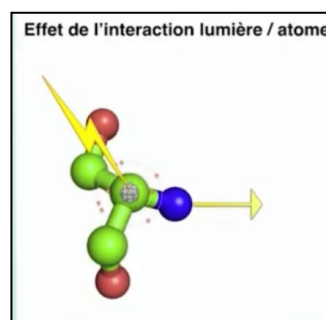


Figure 22 : interaction de la lumière avec les atomes.

Une des méthodes d'interaction entre la lumière et un atome est le phénomène de **diffusion** et de **diffraction** de la lumière (**figure 23**). La résolution de ce qu'on peut observer est dictée par la longueur d'onde (λ) de la lumière utilisée. Ainsi, pour distinguer des distances interatomiques nous utilisons une lumière dont la longueur d'onde λ est de l'ordre de l'Å, ce sont les rayons x. la méthode associée est la cristallographie à rayon x.

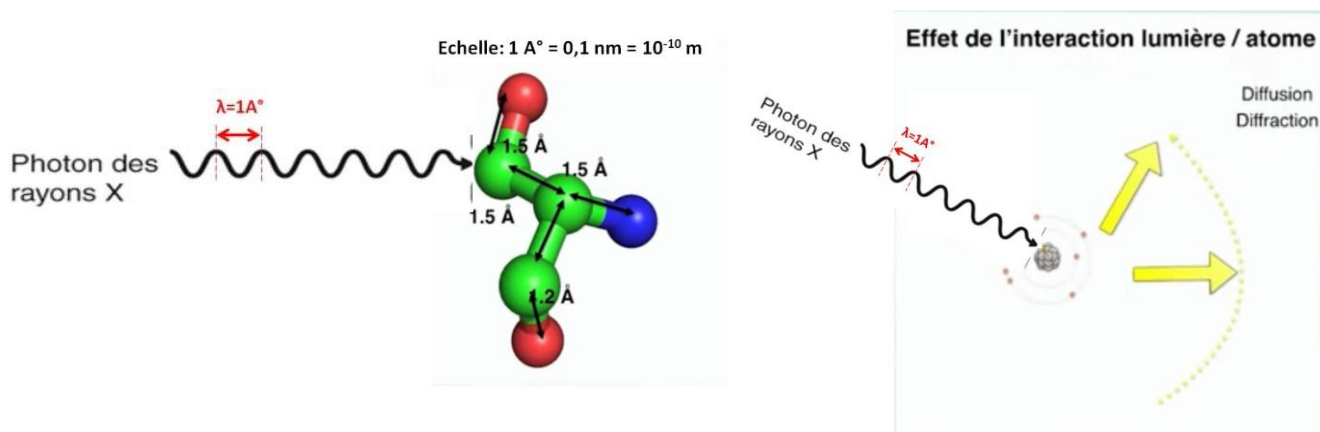


Figure 23: interaction des rayons x avec la matière à l'échelle atomique.

La méthode est fondée sur le fait que les rayons interagissent avec les électrons des atomes présent dans le cristal, ce dernier agit comme un amplificateur de signal, les rayons x vont être diffractés par les nuages électroniques les atomes du cristal (**figure 24**).

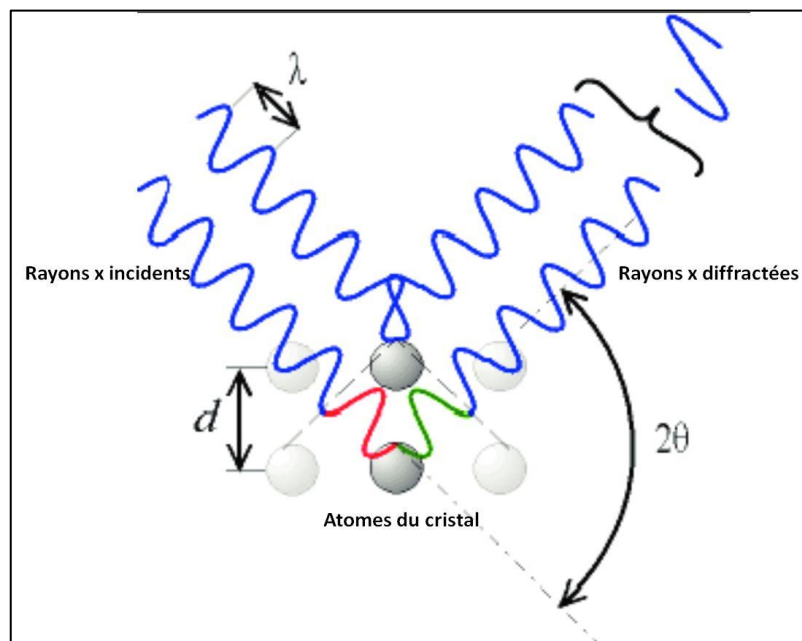


Figure 24: diffraction des rayons x par les atomes du cristal.

III.5. Etapes de la Détermination de la structure d'une protéine par rayon X

1. Sélection de la séquence cible dans le génome codant pour la protéine d'intérêt.
2. Amplification du gène par PCR à l'aide d'une construction génétique (plasmide).
3. Transfection des plasmides dans des cellules en suspension après les avoir perméabilisé.
4. Expression de la protéine d'intérêt.
5. Extraction des protéines totales par lyse cellulaire et centrifugation.
6. Purification de la protéine par chromatographie.
7. Cristallisation de la protéine purifiée.
8. Des rayons X viennent bombarder la structure cristalline et sont par conséquent diffractés par les nuages électroniques de ses atomes (**figure 25**).
3. Les rayons diffractés sont capturés sous la forme d'un profil de diffraction sur un détecteur tel un film ou un dispositif électronique,
4. A partir des atomes marqués dans le cristal, des cartes de densité électronique sont calculées par informatique pour les différentes parties du cristal,
5. Un model atomique est construit à partir des cartes de densité électronique,

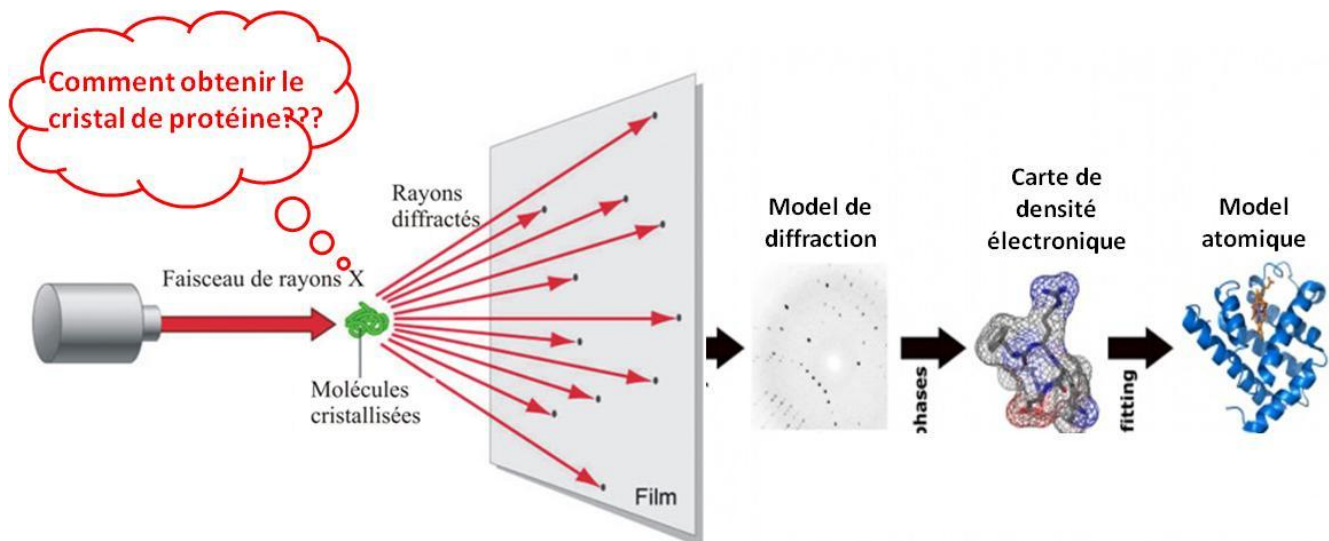
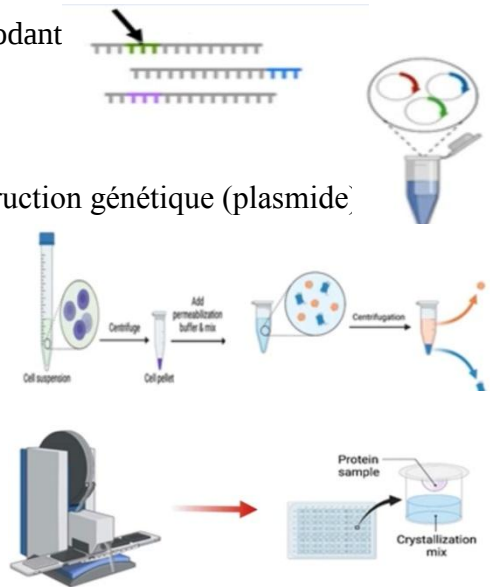


Figure 25 : les étapes de la détermination de la structure spatiale d'une protéine par rayons X.

III.6. Exploitation d'un profil de diffraction par un cristal de protéine

III.6.1. La phase (ϕ)

1. Deux atomes (bleu et rouge) sont éclairés par des rayons x. Deux ondes électromagnétiques arrivent depuis le générateur de manière synchrone et parallèle avec un angle d'incidence θ , chacune vient frapper un atome.

L'atome bleu, plus proche du générateur, diffuse en premier (*cf. diffusion de Thomson*).

2. Lorsque l'onde arrive au niveau de l'atome rouge, il diffuse à son tour, un peu en retard par rapport à l'atome bleu.

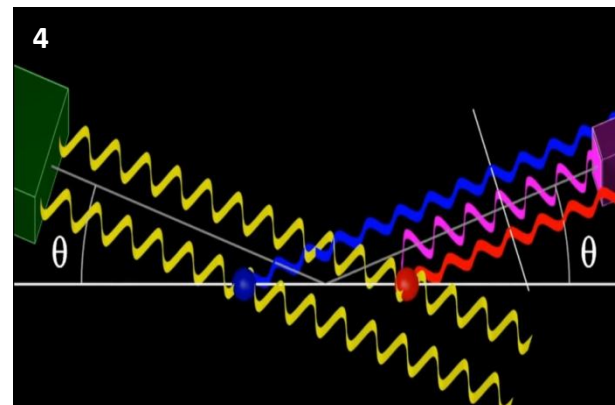
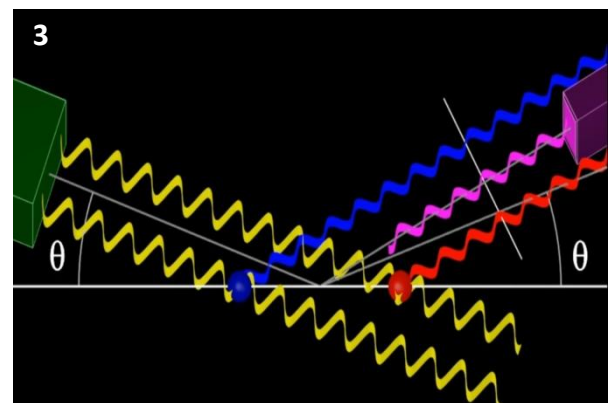
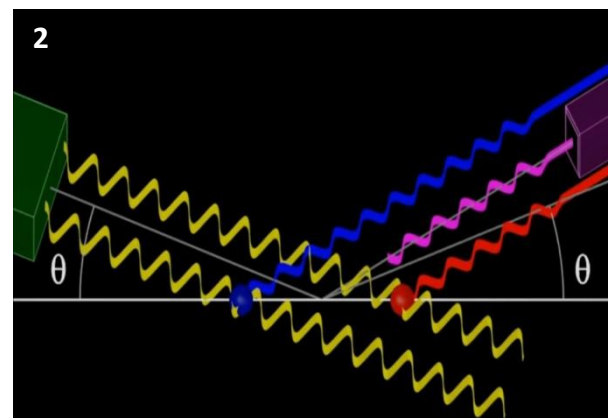
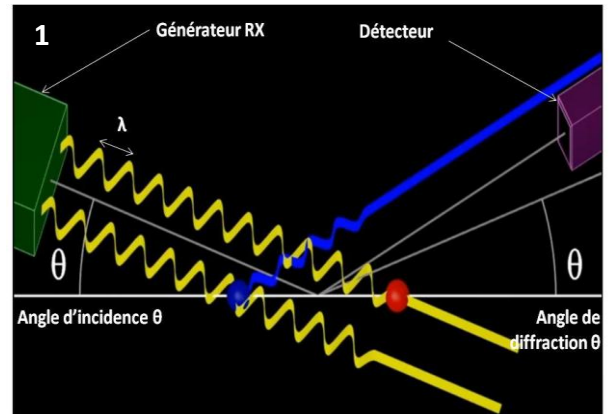
Les deux ondes bleu et rouge interfèrent et donnent une seule onde (rose) en direction du détecteur.

3. En dessinant une ligne perpendiculaire à la direction des ondes diffusées, trois cas de figures sont possibles, les deux ondes sont soit :

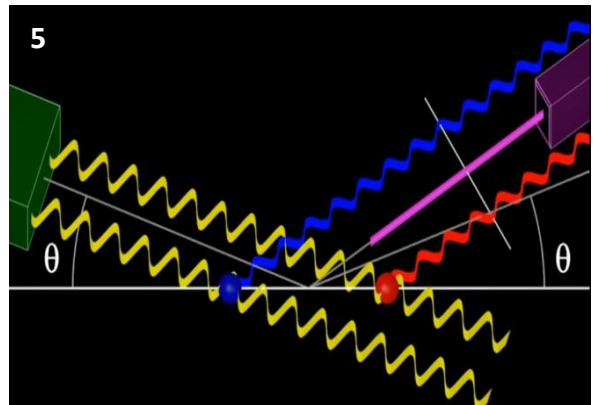
- en phase $\rightarrow$ interférence constructive
- en oppositions de phase $\rightarrow$ interférence destructive.
- Ni l'un ni l'autre $\rightarrow$ interférence partiellement constructive.

Nous constatons qu'ici, les ondes bleue et rouge **ne sont ni en phase ni en opposition de phase**, L'interférence est donc **partiellement constructive** (l'onde rouge est légèrement en retard par rapport à l'onde bleue).

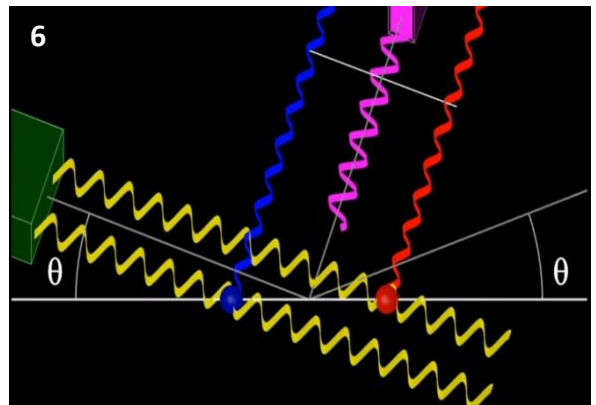
4. Si le détecteur change de position pour se placer à un angle θ égale à l'angle d'incidence des rayons x, ceci amène les deux ondes diffusées à être en phase, l'interférence est donc constructive et l'amplitude de l'onde résultante (rose) est maximale.



5. En augmentant l'angle de diffusion, nous obtenons à un moment donné **une différence de chemin d'une demi-longueur d'onde ($\frac{1}{2} \lambda$)** entre les ondes bleue et rouge. L'interférence dans ce cas est **destructive** et **l'amplitude** mesurée par le détecteur est **nulle**.



6. Ainsi, en changeant la position du détecteur, nous passons de façon alternative d'une interférence constructive (ondes en phase) à une interférence destructive (différence de chemin = $\frac{1}{2} \lambda$ entre les deux ondes).



Donc d'une manière générale:

- ⇒ L'interférence est constructive lorsque la différence de marche entre les deux longueurs d'onde et **un nombre paire de demi longueur d'onde / un nombre entier ($n\lambda$)**.
- ⇒ L'interférence est destructive lorsque la différence de marche entre les deux longueurs d'onde et un **nombre impair de demi longueur d'onde**.

C'est justement ce que **Lawrence Bragg** a compris.

III.6.2. La loi de Bragg

Bragg a résolu le problème de phase en mettant en place une loi qui décrit **l'interaction de la lumière avec un cristal**.

Chaque maille du cristal contient des motifs. La maille est décrite par ses paramètres de mailles qui sont les cotés a, b, c et les angles α, β, γ

Le phénomène de **diffraction** se produit grâce à l'empilement **régulier** des mailles (**figure 26**).

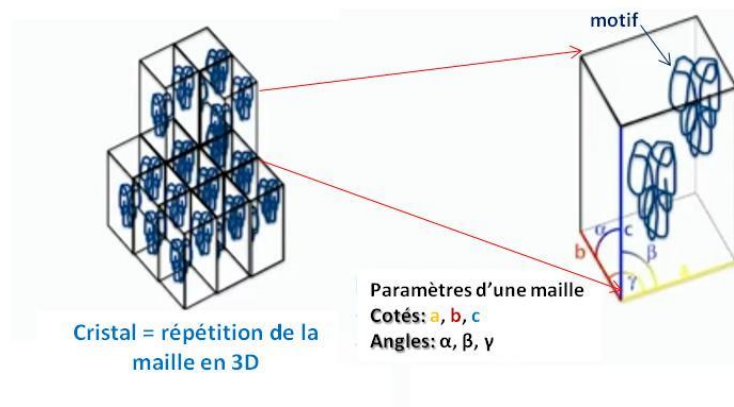


Figure 26: paramètres et empilement des mailles.

Chaque spot sur le cliché de diffraction correspond à un faisceau diffracté. Il est caractérisé par :

- ⇒ **Une position h, k, l** : mesuré à partir à partir des images de diffraction
- ⇒ **Une amplitude F** : décrite par l'intensité du spot, elle est directement enregistrée.
- ⇒ **Une phase ϕ** : on ne sait pas à quel moment l'onde frappe le détecteur → donc **il faut la résoudre le problème de phase** (**figure 27**).

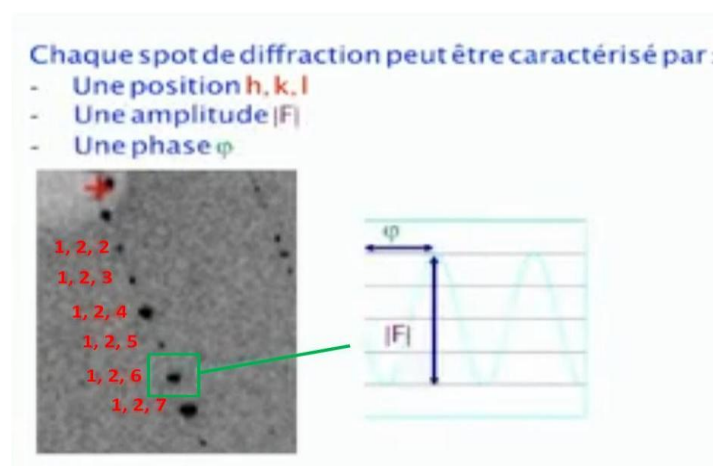


Figure 27: caractéristiques du profil de diffraction les rayons x par un cristal de protéine.

L'empilement des atomes dans le cristal forme des plans (plans cristallins). En **1913**, **William et Henri Bragg** (père et fils) ont démontré que la diffraction provient de la réflexion des rayons x par ces plans cristallins (cf. *diffusion de Thomson*).

- ⇒ Deux plans sont séparés par une distance d .
- ⇒ Le faisceau des rayons x de longueur l'onde λ frappe le plan avec un angle θ (faisceau incident) (**figure 28-A**).
- ⇒ Selon l'angle d'entrée θ et la distance d qui sépare les plans, il y a une différence de chemin entre les ondes incidentes et les ondes diffusées (**figure 28-B**).

Bragg a calculé cette distance de chemin

$$\text{La différence de chemin} = 2d\sin\theta$$

Le but c'est d'avoir des **interférences constructives**, mais le problème rencontré est que cette **différence de chemin** peut entraîner **des décalages** dans le profil de diffraction

Pour éviter cela, la différence de chemin, doit être égale à la longueur d'onde ou a un multiple (n) de longueur d'onde, c'est-à-dire un nombre pair de $\frac{1}{2} \lambda$.

- ⇒ De là est née la loi fondamentale de **Bragg** :

On observe une interférence constructive si et seulement si :

$$n\lambda = 2 d \sin\theta$$

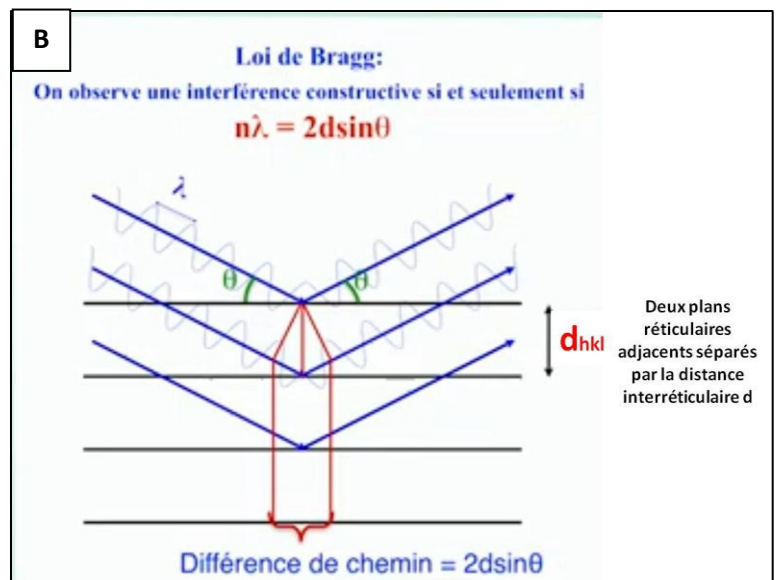
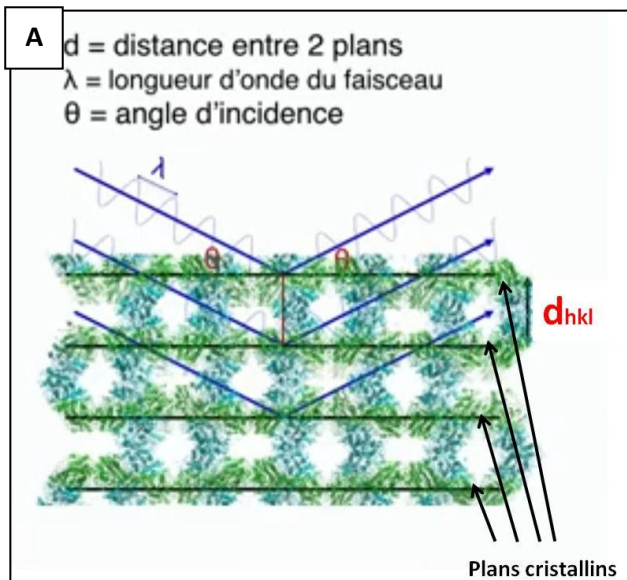


Figure 28: interprétation du profil de diffraction par la loi de **Bragg**.

Références :

- Carmen Palii. L'approche protéomique et ses applications. Sectiunea genetica si biologie moleculara 2007
- JBS Kit d initiation à la cristallisation des protéines. Jena Bioscience, 2009
- Lounis Chekour. Eléments de diffraction des rayons x et travaux pratiques. Université Mentouri de constantine.
- William Clegg. La cristallographie aux rayons x. Université Oxford. EDP sciences. 2015.
- http://youtu.be/14GUDK4o_àM?si=8U8SylbTUe5lwqze
- <http://youtu.be/YjKhznck8f0?si=N0z-Qj4lLCXgKi06>
- <http://youtu.be/CC7m2JM4yu8?si=tDZ-8CrWBBU5WCjX>
- <http://youtu.be/VUwspwldyXc?si=mYU-9OAEM0d-tjD>