

# **Revue récente en biophysique moléculaire des protéines. Etude comparative des techniques.**

**Joseph Parello**

UMR 5074 CNRS, UM1, Montpellier

Sans doute les progrès les plus marquants de la biologie structurale sont-ils dus à la radiocristallographie par diffraction des rayons X. La myoglobine et l'hémoglobine s'inscrivent ainsi, à partir des années 50, comme les deux exemples initiaux ayant conduit à une définition du vocabulaire structural des protéines (hélices-alpha, feuillets beta, coudes, ..) qui s'est précisé par la détermination d'une grande variété de structures cristallographiques de protéines, pendant les 40-50 ans qui ont suivi, mais également d'acides nucléiques (ADN, ARN), d'édifices protéiques multimériques et de complexes nucléoprotéiques de taille de plus en plus élevée (ribosome, nucléosome), en notant, ces dernières années, les premières déterminations de protéines membranaires dans un environnement de type lipidique (bactériorhodopsine, rhodopsine, cytochrome, ATPase). Les progrès spectaculaires ainsi accomplis ont bénéficié d'apports multiples (amélioration des sources de rayons X: rayonnement synchrotron; cristallogénèse des biomacromolécules; avancées dans la problématique de la détermination des phases cristallographiques et du traitement des cartes de densité électronique). La qualité des cristaux, diffractant avec une résolution atomique intrinsèque, jointe à l'utilisation de conditions de cryo-cristallographie (basse température: 100-120 K) a permis, dans des cas précis (enzymes, calciprotéines), d'accéder à la visualisation d'une grande variété de sous-états conformationnels qui sont certainement une manifestation de la dynamique moléculaire de ces édifices protéiques (voir ci-dessous).

Même si le premier spectre de RMN protonique (40 MHz), en solution, d'une protéine (ribonucléase) remonte également à la fin des années 50, il aura fallu attendre les années 70 pour que le concept de corrélation entre spins nucléaires (technique de double résonance, formulée initialement par Bloch), prenne toute son ampleur avec les travaux de Jeener et Ernst dans le cadre de spectroscopies à deux dimensions en RMN protonique (COSY, NOESY). La détermination *ab initio*, dans les années 80, de la première structure tertiaire en solution d'une petite protéine, le BPTI, avec une soixantaine d'acides aminés, par Wuthrich et collaborateurs, suivie par celle d'une calciprotéine globulaire de 109 acides aminés dans notre laboratoire de Montpellier, avait ainsi démontré la validité de l'approche RMN protonique bidimensionnelle en biologie structurale. L'extension spectaculaire des méthodes de corrélation, faisant appel à la substitution isotopique (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) et donnant lieu à des spectroscopies à 3 et 4 dimensions, associée à l'utilisation de protéines deutériées (totalement; régio- et stéréosélectivement), a permis d'aborder la détermination de structures 3D de protéines avec des poids moléculaires croissants (200-300 acides aminés). Des techniques récentes (laboratoire Wuthrich), faisant appel à la relaxation par anisotropie de déplacement chimique à très haut champ magnétique (résonance protonique à 800-900 MHz), ouvrent la voie actuellement vers les hauts poids moléculaires qui apparaissaient interdits à la RMN.

Bien que les structures tertiaires de protéines globulaires montrent un fort degré d'empaquetement de leurs acides aminés, avec un coeur protéique ayant peu ou pas de contacts directs avec le milieu extérieur (environnement ionique et aqueux), différentes méthodes en spectroscopie optique (dichroïsme circulaire, fluorescence résolue dans le temps), ainsi que la RMN protonique (dépendance de la forme de raie vis-à-vis des processus moléculaires dépendant du temps), avaient permis d'établir, dans les années 70, l'existence d'une grande variété de mouvements internes couvrant une échelle de temps allant des ns aux ms. Les premiers apports des simulations théoriques (Gelin et Karplus, 1975) avaient permis de rationaliser l'existence de mouvements de grande amplitude, comme ceux de retournement des cycles aromatiques de Phe et Tyr, sur la base de mouvements corrélés entre divers éléments structuraux. Ces différentes approches avaient ainsi conduit au concept d'un édifice protéique compact se caractérisant par une dynamique interne complexe.

La RMN multidimensionnelle avec les apports de la substitution isotopique,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , a permis d'analyser de façon détaillée, site par site, des mouvements internes à l'échelle de temps de la ns, en utilisant les propriétés de relaxation dipolaire pour des noyaux de spin 1/2, dans le cas des motifs  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  analysables dans une protéine substituée par ces deux isotopes. Des mouvements plus lents peuvent être caractérisés dans les protéines en faisant appel à d'autres processus de la relaxation nucléaire (référentiel tournant). Les méthodes de la diffusion incohérente des neutrons (voir exposé de Jacques Schweizer), dans le régime quasi-élastique et inélastique, associées aux méthodes de simulation théorique de la dynamique moléculaire et du calcul de modes normaux, permettent de mettre en évidence des mouvements de nature diffusive et collective, dans l'échelle de temps ps-ns. Dans ce contexte, l'utilisation de protéines en poudre lyophilisée, à un degré d'hydratation contrôlé, a permis une mise en évidence directe d'un couplage entre la dynamique interne d'une protéine et de son environnement aqueux immédiat. La RMN  $^{13}\text{C}$  en milieu solide, avec les mêmes échantillons de protéine en poudre lyophilisée, permet d'accéder également à la caractérisation de la dynamique interne, de façon directe, en l'absence de mouvements de diffusion rotationnelle de la protéine dans son ensemble, comme c'est le cas en milieu liquide.

Par suite de ses potentialités multinoyaux, la RMN permet d'analyser les interactions des protéines avec leur environnement ionique et aqueux. C'est ainsi que la RMN des noyaux  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{113}\text{Cd}$ , pour prendre quelques exemples représentatifs, a permis d'analyser les caractéristiques structurales, dynamiques et cinétiques d'interaction protéine-ion. On remarquera qu'une telle analyse cinétique est réalisée à l'équilibre thermodynamique, contrairement aux méthodes de cinétique rapide par brusque perturbation de l'équilibre. Dans ce même contexte, la relaxation nucléaire induite par une espèce paramagnétique (cas des cations  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Gd}^{3+}$ , utilisés comme sondes paramagnétiques par suite de leur moment magnétique élevé) permet d'accéder à des caractéristiques structurales précises, comme des distances interatomiques, ainsi que la coordination d'hydratation en termes du nombre de molécules d'eau présentes et des propriétés dynamiques et cinétiques de ces molécules d'eau.

Finalement, les méthodes de simulation théorique utilisant le concept de cycle thermodynamique (transformations dites alchimiques), couplées aux méthodes de la dynamique moléculaire, permettent de simuler des transitions structurales d'une protéine, associées aux différents états fonctionnels de la protéine dans un contexte physiologique. La validation de ces simulations requiert une étroite confrontation avec des données expérimentales de haute qualité (structures cristallographiques et/ou RMN avec une bonne résolution).

Ces différentes approches seront considérées dans le cas de quelques protéines (calciprotéines; facteur de transcription) qui ont fait l'objet d'une étude détaillée dans notre laboratoire, tant d'un point de vue structural que dynamique.