

Relation entre Dynamique Moléculaire et Fonction Biologique étudiée par diffusion de neutrons

Joseph Zaccai, Institut de Biologie Structurale, CEA-CNRS

Schéma du cours

Nous rappelons que *La Dynamique* représente l'étude des *Forces*.

Nous rappelons également que les macromolécules biologiques ont évoluées pendant des milliards d'années pour accomplir des *structures dynamiques* adaptées à leur fonction.

Ces forces déterminent aussi bien les positions moyennes des atomes dans la structure, que leurs mouvements autour des ces positions.

Les structures biologiques sont stables dans une gamme restreinte de température autour de 37°C pour les organismes *mésophiles*, avec des déplacements des courbes de stabilité vers des températures plus basses pour les organismes *psychrophiles* et plus élevées pour les organismes *thermophiles*.

Les énergies impliquées sont donc proches de l'énergie thermique à ces températures, c'est-à-dire (à 300 K, 27°C) ≈ 2.5 kJ/mol, ou ≈ 25 meV, correspondant à des fréquences $\approx 6 \cdot 10^{12} \text{s}^{-1}$ et des temps de l'ordre de la picoseconde.

Les neutrons peuvent contribuer de façon significative à la compréhension des forces moléculaires qui maintiennent les structures actives des protéines et des membranes biologiques.

La longueur d'onde de neutrons d'énergie correspondante est très proche de 1Å .

Comme les amplitudes des fluctuations sont aussi de l'ordre de l'Ångström, la diffusion neutronique constitue un outil parfaitement adapté à l'étude simultanée des énergies *et* des amplitudes de mouvements (et donc des forces) dans les macromolécules biologiques.

Dans une expérience de diffusion, l'amplitude d'un mouvement est mesurée à partir de ce qu'on appelle le transfert de *vecteur d'onde* (qu'on obtient en pratique de la déviation angulaire du neutron par rapport à son parcours initial).

L'énergie du mouvement est obtenue à partir de la différence de *vitesse* ou de *longueur d'onde* du neutron diffusé par rapport aux valeurs du faisceau incident.

Parce que c'est la diffusion la plus intense, on mesure principalement ce qu'on appelle la diffusion *incohérente* des atomes d'hydrogène. Les hydrogènes sont bien distribués dans les structures des protéines. Dans la gamme de temps de la ps à la ns, les mouvements des hydrogènes sont ceux des groupements aux quels ils sont liés (chaînes latérales des acides aminés). Ils reflètent bien, donc, la dynamique moléculaire.

Les expériences s'effectuent dans différents régimes de gamme d'énergie en fonction des différents types de mouvement.

Le régime inélastique (≈ 10 meV, et des temps ≈ 10 ps) correspond aux vibrations des atomes. On l'explore par des spectromètres utilisant la méthode du *temps-de-vol*, pour mesurer la vitesse des neutrons.

Le régime quasi-élastique et élastique (≈ 1 meV, et des temps ≈ 10 ps) correspond à des mouvements plus lents et de plus grande amplitude que les vibrations (comme par exemple, la rotation d'une chaîne latérale d'acide aminé entre deux positions dans une structure de protéine). On explore ce régime par des mesures très précises de longueur d'onde dans des spectromètres de *rérodiffusion*.

Il existe un troisième régime de transfert d'énergie encore plus faible, correspondant à la diffusion (hydrodynamique) globale de la macromolécule ou à des mouvements diffusifs de ses domaines, qu'on étudie par la méthode de *l'écho de spin*.

Le modèle des *sous-états-conformationnels* (CS, de l'anglais Conformational Substates) est un modèle physique actuel (affiné à partir d'expériences spectroscopiques et de diffusion de neutrons) qui décrit la dynamique d'une protéine.

On considère qu'une protéine possède un repliement et une structure uniques. Cependant, pour une population d'une même protéine, il existe de petites différences de conformation entre les molécules (correspondant, par exemple, à des positions différentes d'une ou deux chaînes latérales). Ce sont les CS.

Du point de vue de la physique, le diagramme de potentiel d'énergie libre de la protéine présente plusieurs minima, les CS. A basse température, chaque molécule se trouve piégée dans un des CS. A une certaine température (qu'on appelle température de la *transition dynamique*) l'énergie est suffisante pour qu'une même molécule puisse "sauter" d'un puits à un autre, c.a.d. bouger entre différentes conformations. Il a été proposé que l'activité

biologique est associée à cette capacité de la protéine d'échantillonner différents CS, en dessus de la transition dynamique.

Une transition dynamique à environ 180K (-93°C), après avoir été observée pour les atomes de fer de la myoglobine par spectroscopie Mössbauer, a été révélée pour les mouvements moyens de tous les atomes de la protéine par diffusion de neutrons.

Les différentes techniques de la diffusion neutronique pour l'étude de la dynamique moléculaire en biologie seront décrites et illustrées en utilisant comme exemple les études de la membrane pourpre.

La membrane pourpre de *Halobacterium salinarum* est constituée de lipides et d'une protéine membranaire, la bactériorhodopsine, qui présente une activité de pompe à protons activée par la lumière. On pourrait bien considérer cette protéine comme une nano-machine moléculaire. Elle traverse la membrane de part en part par sept hélices alpha, avec son N-terminal du côté extra-cellulaire et son C-terminal du côté cytoplasmique. Le chromophore est une molécule de rétinol liée à la chaîne latérale d'une lysine proche du centre de la membrane sur la septième hélice. La longueur d'onde d'absorption maximale du rétinol dépend fortement de son environnement. Ainsi le rétinol libre absorbe à environ 400nm et présente une couleur jaune. Le rétinol associé à la protéine absorbe à 565nm dans l'obscurité et donne à la membrane sa couleur violette ("purple" en anglais, mal traduit en "pourpre"). Après absorption d'un photon par le rétinol, l'activité de pompe à protons de la bactériorhodopsine est associée à un photocycle de changements de couleur de l'ordre de quelques millisecondes. Le bilan énergétique est extrêmement favorable avec un proton relâché du côté extracellulaire et un proton lié du côté cytoplasmique (contre le gradient de potentiel chimique) pour chaque photon absorbé. Les mécanismes de cette nano-machine ne sont pas encore complètement cernés. En bref, une partie de l'énergie d'excitation du chromophore est convertie en énergie mécanique qui exploite les mouvements thermiques du système pour transférer les protons. L'ambition de l'approche biophysique au problème est d'interpréter les données spectroscopiques dans le cadre d'une connaissance aussi complète que possible de la structure et de la dynamique de tous les éléments de la membrane (la protéine mais aussi les lipides et les molécules d'eau qui y sont associés).

Les expériences de diffraction/diffusion de neutrons ont apporté des informations précieuses que l'on ne pouvait pas obtenir par d'autres méthodes sur la structure et la dynamique de la membrane pourpre [1-4]. Elles ont permis de définir la distribution des molécules d'eau et les mouvements moléculaires internes en fonction du degré d'hydratation. Une hypothèse que l'hydratation des lipides participait à la souplesse de la dynamique a été confortée. En comparant avec les effets de l'hydratation sur le photocycle,

une forte corrélation a été établie entre type de dynamique et activité. Des expériences de marquage hydrogène-deutérium *in vivo* ont mis en évidence et quantifié par des constantes de force des parties plus ou moins résilientes de la structure de la bactériorhodopsine—notamment, un corps globalement souple pour participer au transfert du proton et un centre actif plus résilient autour du cœur de la protéine, où est lié le rétinol, qui contrôlerait une fonction de valve pour assurer la translocation vectorielle des protons. Différents mutants de la bactériorhodopsine dont l'activité est affectée ont également été étudiés et des expériences de reconstitution avec protéines ou lipides marqués au deutérium ont permis de mesurer la dynamique *in situ* de chacun de ces éléments [3].

[1] Zaccai G. (2000). How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*. 288:1604-1607.

[2] Zaccai G. (2000). Moist and soft, dry and stiff: A review of neutron experiments on hydration-dynamics-activity relations in the purple membrane of *Halobacterium salinarum*. *Biophys. Chem.* 86:249-257.

[3] Lehnert U. (2002). Effet de l'hydratation sur les mouvements thermiques locaux de la membrane pourpre étudié par diffusion neutronique et marquage isotopique. *Thèse de l'Université Joseph Fourier de Grenoble*.

[4] Gabel F., Bicout D., Lehnert U., Tehei M., Weik M., Zaccai G. (2002). Protein dynamics studied by neutron scattering. *Quart. Rev. Biophys.* 35(4):327-367.