# Traquer la structure d'une protéine jusque dans l'espace réciproque !

# **Catherine Vénien-Bryan**

Responsable "Structure et dynamique des protéines" IMPMC

Certains scientifiques cherchent à obtenir des informations sur la structure des protéines à haute résolution. L'information ainsi recueillie est primordiale pour comprendre plus finement la fonction et la façon dont ces protéines agissent et interagissent avec leur substrat à un niveau moléculaire. Pour obtenir des informations structurales au niveau atomique, la méthode traditionnelle est de cristalliser dans les trois dimensions les protéines étudiées et d'analyser le cristal par rayons X.

Les protéines membranaires, à la différence des protéines solubles, sont enfouies dans la membrane qui sépare le milieu extérieur du milieu intérieur des cellules. Ceci leur confère des propriétés particulières ; entres autres, elles sont insolubles dans un milieu aqueux, ce qui les rend très difficiles à cristalliser dans les trois dimensions. Par contre il est plus aisé de les cristalliser dans deux dimensions. Dans ce cas, les cristaux sont organisés en une seule couche cristalline contrairement aux cristaux 3D qui forment des arrangements dans les trois dimensions de l'espace. Ensuite ces cristaux 2D sont observés par microscopie électronique, cette technique est appelée la cristallographie électronique (Figure *1A* et *1B*).

#### Comprenons d'abord le phénomène de diffraction

Si un faisceau parallèle d'électrons est envoyé sur un atome isolé, il y a diffusion du faisceau par l'atome. C'est-à-dire qu'après l'interaction avec l'atome, les électrons voyagent dans toutes les directions de l'espace et que, dans une direction donnée, l'amplitude du faisceau dépend de l'angle de déflection (angle entre la direction du faisceau incident et la direction sélectionnée) et de la nature de l'élément cible. Lorsque l'on introduit un deuxième atome cible à proximité du premier, l'amplitude diffusée selon une direction de l'espace est la somme des amplitudes diffusées par chacun de ces deux atomes dans cette même direction. Si bien qu'il y a des directions dans l'espace où cette somme d'amplitudes est constructive et correspond à un renforcement d'intensités diffusées et d'autres, au contraire, où la somme est destructive et conduit à une atténuation de l'intensité. Il y a donc renforcement de l'information selon la direction du faisceau diffusé dans l'espace.

#### *Figure 1A* : Cristal 3D Les protéines s'organisent régulièrement dans les trois dimensions de

l'espace. Le cliché de diffraction de ces cristaux 3D sera composé de taches de diffraction.



#### Figure 1B: Cristal 2D

Les protéines s'organisent dans les deux dimensions et forment des plaques cristallines. Le cliché de diffraction ou transformée de Fourier à partir d'un feuillet cristallin montre des lignes ou *bâtonnets de Bragg* s'étendant perpendiculairement au plan du cristal.

(Figure inspirée de H. Stahlberg).

Si maintenant la cible n'est plus un ou deux atomes, mais une multitude d'atomes strictement organisés de façon périodique c'est-à-dire formant un cristal parfait, il ne subsiste qu'un ensemble discret de directions de l'espace pour lesquelles l'intensité du faisceau est non nulle. La *loi de Bragg* nous rappelle en effet que, pour tout faisceau incident de longueur d'onde donnée, celui-ci est diffracté (et sera d'intensité non nulle) s'il interagit avec le cristal ou certains composés du cristal à certains angles. Ce sont les direc-



tions de diffraction. Nous avons là un phénomène d'interférences de type ondulatoire et création d'un cliché de diffraction dans l'espace réciproque (l'espace réciproque est un espace abstrait utilisé pour caractériser certains phénomènes).

Ce phénomène de diffraction est un moyen de filtrer les informations périodiques intrinsèques au cristal et d'ignorer les informations non périodiques. Ces informations se concrétisent par des taches de diffraction dans l'espace de Fourier ou *l'espace réciproque*. Ces taches de diffraction seront analysées et permettront de calculer par synthèse de Fourier la structure d'une unité asymétrique, la plus petite information répétée à l'infini dans le cristal.

Les interactions électron-matière sont de type électrostatique. Il est aussi important de rappeler que dans un microscope électronique, les interactions entre les électrons incidents et la matière sont de type électrostatique. En effet, la cible avec laquelle interagissent les électrons est formée de noyaux chargés positivement, et d'électrons négatifs des nuages électroniques des atomes, ceux-ci engendrent un champ électrostatique local qui défléchit les trajectoires des électrons du faisceau incident. Les électrons offrent une *vue* du cristal, à travers son potentiel électrostatique qui peut être pris en première approximation comme la somme des potentiels des atomes supposés isolés.

#### Théorème de la section centrale

Maintenant il est indispensable d'incliner le spécimen dans le microscope afin d'obtenir des informations le long des bâtonnets de Bragg. Ici nous utilisons le *théorème de la section centrale*. En effet, selon ce théorème, la transformée de Fourier d'une projection dans les deux dimensions d'un objet représente une section centrale de la transformée de Fourier de l'objet. Plus on aura d'informations à différents angles, plus nous aurons de sections centrales qui viendront remplir peu à peu l'espace de Fourier et nous aurons des indications fines quant à la structure de notre protéine. Il est donc important de prendre le plus possible d'images à différents plans d'inclinaison.

Figure 2 : Théorème de la section centrale.		
A 30 specimen	Objet a étudier	
Diferent 20 proceded magos Diferent 20 proceded magos 20 Fourier transforms 20 Fourier transforms 20 transforms are sectors of 30 Fourier transform Fourier inversion 30 map	Projection dans les 2D de cet objet Transformée de fourier de cet objet qui représente une section centrale de l'objet dans les 3D <b>reconstruction</b> <b>dans les 3D de</b> <b>l'objet</b> par synthèse de	<ul> <li>A: Description du traitement d'images.</li> <li>L'objet est ici un canard qui pour- rait être représentatif d'une protéi- ne dans un cristal 2D.</li> <li>Puis sont représentées quelques projections issues de vues diffé- rentes de l'objet enregistrées à différentes inclinaisons dans le microscope.</li> <li>Chaque transformée de Fourier de ces vues représente une section centrale de la transformée de fou- rier de l'objet 3D.</li> <li>En combinant toutes les sections centrales, on arrive a recalculer la structure 3D de l'objet.</li> </ul>
	Fourier B central section	<i>B</i> : <i>Représentation de la section</i> <i>centrale dans l'espace de Fourier.</i> Diagramme représentant la trans- formée de Fourier d'un cristal 2D, ce sont les lignes ou bâton- nets vus figure <i>1B</i> . Chaque micrographe contient une image d'un cristal 2D qui quand elle subit une transformée de Fourier donne les valeurs d'am- plitude et de phase aux points d'intersection entre les bâtonnets et la section centrale.



## **Conformation fermée**

## **Conformation ouverte**

*Figure 3 :* Changements conformationnels d'un canal à potassium étudié par cristallographie électronique.

## Les canaux à potassium et Kir

La plupart des processus biologiques fondamentaux dans le corps humain sont contrôlés par des signaux électriques : battement du coeur, propagation d'un signal neuromusculaire, la pensée... Ces signaux sont générés par des canaux ioniques qui agissent comme des nano-interrupteurs qui contrôlent le mouvement sélectif des ions comme le K<sup>+</sup> et le Na<sup>+</sup>. Un grand nombre de maladies génétiques sont le résultat du fonctionnement défectueux de canaux ioniques. Les canaux à K<sup>+</sup> rectification entrante (Kir) sont exprimés dans presque toutes les cellules du corps et sont spécifiques du potassium. Lorsque le cristal 2D de protéine n'est pas parfait (ce qui hélas est souvent le cas : soit parce qu'il est trop petit, soit parce que les protéines sont mal organisées dans le cristal, ou que celui-ci est déformé ou que parfois, les cristaux 2D ne sont pas monocouches, mais multicouches (allant jusqu'à cinq couches cristallines superposées)), alors les clichés de diffraction deviennent très compliqués, voire impossible à étudier. Afin de restaurer l'image de l'objet la plus proche possible de la réalité, malgré les problèmes liés à un échantillon de mauvaise qualité, des traitements d'images adaptés nous permettent d'exploiter ces données : filtrage des images dans l'espace de Fourier, correction des cristaux déformés dans l'espace réel. Il est cependant encore difficile d'interpréter les clichés de diffraction de multi-couches de cristaux 2D inclinés dans le microscope.

L'étude par microscopie électronique et traitement d'images de cristaux 2D d'une protéine membranaire, un canal à potassium, *Kir channel*, a permis à l'équipe "Structure et dynamique des protéines" de calculer une structure à moyenne résolution d'un canal à potassium dans l'état ouvert et de proposer un modèle d'ouverture du canal (Voir ci-dessous réf. Kuo AL, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Vénien-Bryan C).

Ce travail est toujours d'actualité, en effet l'obtention de cristaux 2D de meilleure qualité que les précédents nous permet de poursuivre ces études afin d'obtenir des informations structurales à plus haute résolution.

## C. V-B

#### Pour en savoir (un peu) plus

**André Marion** *Introduction aux techniques de traitement d'images* Edition Eyrolles 1987

**Kuo AL, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Vénien-Bryan C**: *Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography.* Structure 2005, 13:1463-1472

**Catherine Vénien-Bryan** dernières recherches sur le canal à potassium KirBac3.1 : *http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2010/c-venien.htm*