

Annexe 1

Calcul de la carte de Patterson des atomes lourds (Patterson, 1935)

A1.1. La fonction de Patterson

La fonction de Patterson est définie comme le développement en série de Fourier des intensités $I = |F(\mathbf{h})|^2$, qui sont connues expérimentalement.

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V_c} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})|^2 \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{u})$$

avec $\mathbf{u} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}$

Dans le cas où la diffusion anormale est faible, et, par conséquent, la loi de Friedel est respectée, la fonction de Patterson devient la fonction d'autocorrélation de la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$:

$$P(\mathbf{u}) = \rho(\mathbf{r}) * \rho(-\mathbf{r}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{u} + \mathbf{r}) d^3 \mathbf{r}$$

Pour des densités électroniques décrites avec des atomes ponctuels, la densité s'écrit :

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_j Z_j \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j)$$

où Z_j est le nombre d'électrons de l'atome j situé en \mathbf{r}_j . Dans ce modèle, la fonction de Patterson s'écrit alors

$$\begin{aligned} P(\mathbf{u}) &= \int_V \sum_j Z_j \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) \sum_{j'} Z_{j'} \delta(\mathbf{u} + \mathbf{r} - \mathbf{r}_{j'}) d^3 \mathbf{r} = \sum_j \sum_{j'} Z_j Z_{j'} \int_V \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) \delta(\mathbf{u} + \mathbf{r} - \mathbf{r}_{j'}) d^3 \mathbf{r} \\ &= \sum_j \sum_{j'} Z_j Z_{j'} \delta(\mathbf{u} + \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_{j'}) \end{aligned}$$

et la fonction de Patterson devient :

$$P(\mathbf{u}) = \sum_j \sum_{j'} Z_j Z_{j'} \delta(\mathbf{u} - \mathbf{u}_{jj'})$$

avec les vecteurs interatomiques de la maille $\mathbf{u}_{jj'} = \mathbf{r}_{j'} - \mathbf{r}_j$

La fonction de Patterson est réduite à des pics de hauteur $Z_j Z_{j'}$ situés aux extrémités des vecteurs interatomiques.

A1.2. La fonction de Patterson "anormale"

Dans le cas où la diffusion anormale n'est pas négligeable, on peut calculer la fonction de Patterson anormale avec les coefficients $(D'_{ANO})^2 = \left\{ \frac{(|F(+)| - |F(-)|) f^o}{2 f''} \right\}^2$ à la place du carré des modules des facteurs de structure :

$$P_{ANO}(\mathbf{u}) = \frac{1}{V_c} \sum_{\mathbf{h}} |D'_{ANO}(\mathbf{h})|^2 \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{u})$$

Si on écrit le facteur de structure de la molécule

$$F = F_p + F_H \text{ où :}$$

F_p est le facteur de structure de la protéine native,

F_H le facteur de structure des atomes lourds.

On peut montrer (*) que la fonction $P_{ANO}(\mathbf{u})$ correspond, à un bruit près, à une fonction de Patterson dont les coefficients sont les carrés des modules des facteurs de structure des atomes lourds :

$$P_H = \frac{1}{V_c} \sum_{\mathbf{h}} |F_H(\mathbf{h})|^2 \exp(-i2\pi\mathbf{h} \cdot \mathbf{u}) \approx P_{ANO}$$

La fonction de Patterson anormale représente alors la carte des vecteurs interatomiques des atomes lourds. De la même manière la carte de Patterson peut être calculé avec comme coefficients les carrés des différences isomorphes $D_{iso}^2 \propto \|F_{PH} - F_P\|^2$ ou des différences dispersives $D_{dis}^2 \propto \| |F|^{\lambda_i} - |F|^{\lambda_j} \|^2$.

A1.3. Interprétation de la fonction de Patterson

Compte tenu du grand nombre de pics interatomiques, dans le cas d'un cristal de protéine, la fonction de Patterson n'est, en général, pas interprétable. La carte de Patterson anormale présente des pics beaucoup moins nombreux et qui correspondent aux vecteurs interatomiques des atomes diffusant anormalement. À partir de cette carte, on cherche à trouver les positions des atomes lourds dans la maille. La présence de pics marqués dans la carte de Patterson anormale indique la fixation de diffuseurs anormaux sur la protéine.

Les éléments de symétrie, imposés par le groupe d'espace, mènent à des concentrations de pics dans certaines régions de la carte de Patterson, appelées " sections de Harker ". Les pics trouvés dans ces sections indiquent les extrémités de vecteurs interatomiques d'atomes anormaux occupant des positions équivalentes. Les pics apparaissant en dehors des sections de Harker sont relatifs à des diffuseurs anormaux ne se trouvant pas dans des positions équivalentes, ce sont des pics croisés de différents sites. Connaissant les relations qui relient les positions équivalentes, les coordonnées x,y,z des diffuseurs anormaux peuvent être déduites de coordonnées u,v,w des pics des sections de Harker. La cohérence du résultat est vérifiée par inspection des pics croisés.

Alors que pour un faible nombre de sites anormaux, l'interprétation de la fonction de Patterson peut se faire "à la main", on utilise généralement des programmes de détection des sites des atomes lourds.

Le programme SHELXD (Sheldrick, 1998; Schneider & Sheldrick, 2002) alterne la recherche des sites lourds dans l'espace direct et le calcul et l'affinement des phases dans l'espace réciproque et utilisent les méthodes de Patterson et les méthodes directes.

* Le facteur de structure de la molécule s'écrit $F = F_p + F_H$, où $F = F(\mathbf{h}) = F(+)$.

Avec $F_H = \sum_j f_H \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j)$, $f_H = f^o + f' + if''$ et $F_H^o = \sum_j f^o \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j)$,

on obtient, dans le cas d'un seul type de diffuseur anormal

$$F = F_p + F_H^o \frac{f_H}{f^o} = F_p + F_H^o + F_H^o \left(\frac{f'}{f^o} + \frac{if''}{f^o} \right) = F^o + F_H^o \left(\frac{f'}{f^o} + \frac{if''}{f^o} \right)$$

avec $F^o = F_p + F_H^o = |F^o| \exp(i\phi^o)$, $F_H^o = |F_H^o| \exp(i\phi_H)$ et

$$F(-) = F(-\mathbf{h}) = |F^o| \exp(-i\phi^o) + |F_H^o| \exp(-i\phi_H) \left(\frac{f'}{f^o} + \frac{if''}{f^o} \right) \text{ et avec } I(+) = F(\mathbf{h})F^*(\mathbf{h}) \text{ on}$$

obtient :

$$I(\pm) = |F^o|^2 + |F_H^o|^2 \left(\left(\frac{f'}{f^o} \right)^2 + \left(\frac{f''}{f^o} \right)^2 \right) + 2 \frac{f'}{f^o} |F^o| |F_H^o| \cos(\phi^o - \phi_H) \pm 2 \frac{f''}{f^o} |F^o| |F_H^o| \sin(\phi^o - \phi_H)$$

On en déduit $I(+)-I(-) = 4 \frac{f''}{f^o} |F^o| |F_H^o| \sin(\phi^o - \phi_H)$

avec la différence anormale

$$D_{ANO} = |F(+)| - |F(-)| \text{ on a}$$

$$I(+)-I(-) = D_{ANO} (|F(+)| + |F(-)|)$$

$$\Rightarrow D_{ANO} = \frac{I(+)-I(-)}{|F(+)|+|F(-)|} \approx \frac{I(+)-I(-)}{2|F^o|} \approx 2 \frac{f''}{f^o} |F_H^o| \sin(\phi^o - \phi_H)$$

$$\Rightarrow (D_{ANO})^2 = 4 \left(\frac{f''}{f^o} \right)^2 |F_H^o|^2 \sin^2(\phi^o - \phi_H) = 2 \left(\frac{f''}{f^o} \right)^2 |F_H^o|^2 (1 - \cos(2(\phi^o - \phi_H)))$$

Dans la synthèse de Fourier le terme en cosinus, du côté droit de l'expression correspond à du bruit. La fonction de Patterson calculée avec les coefficients

$$\frac{1}{2} (D_{ANO})^2 \left(\frac{f^o}{f''} \right)^2 = 2 (D'_{ANO})^2 \text{ correspond alors à la fonction de Patterson calculée avec les}$$

coefficients $|F_H^o|^2$, la fonction de Patterson des atomes lourds.

Annexe 2

Comparaison de la fixation des complexes pour des cristaux dérivés de glucose isomérase (GI) obtenus en présence de différents agents précipitants (MPD, PEG, sulfate d'ammonium (AS))

Nous avons procédé à des tests d'obtention de dérivés avec des cristaux de GI obtenus dans différentes conditions de cristallisation. La comparaison de la fixation est cependant rendue difficile par des difficultés de congélation des cristaux. La qualité de diffraction des cristaux obtenus dans les conditions alternatives est largement moins bonne que celle des cristaux obtenus en MPD. De plus, les conditions d'enregistrement des données sont différentes (longueurs d'onde). L'affinement de l'occupation des sites de fixation avec les différents jeux permettrait une comparaison quantitative, mais, faute de temps, nous n'avons pas effectué l'affinement des structures. Voici une comparaison qualitative effectuée à l'aide des cartes de Patterson anormales des différents jeux de données. Toutes les cartes sont calculées avec des données coupées à une résolution de 2,7 Å.

Tous les dérivés appartiennent au groupe d'espace I222 avec des paramètres de maille très proches de $a = 93 \text{ \AA}$, $b = 99 \text{ \AA}$ et $c = 103 \text{ \AA}$.

	Précipitant	Complexe	λ [Å]	Source RX	R_{fac}	R_{ano}
1)	PEG	Gd-DTPA-BMA	1,28	FIP	0,081	0,036
2)	PEG	Gd-DOTMA	0,98	FIP	0,057	0,033
3)	MPD	Gd-DO3A	1,711	FIP	0,034	0,082
4)	PEG	Gd-DO3A	1,54	labo	0,062	0,038
5)	AS	Gd-DO3A	0,98	FIP	0,045	0,022
6)	MPD	Gd-DTPA	1,711	FIP	0,034	0,039
7)	PEG	Gd-DTPA	1,28	FIP	0,117	0,093

Tableau A2.1. : Indicateurs statistiques, longueur d'onde d'enregistrement, complexe et précipitant utilisé pour sept dérivés de la glucose isomérase.

Dérivés avec les complexes Gd-DTPA-BMA et Gd-DOTMA

Pour les dérivés 1 et 2, aucune fixation notable des complexes n'a pu être détectée (figure A2.1.).

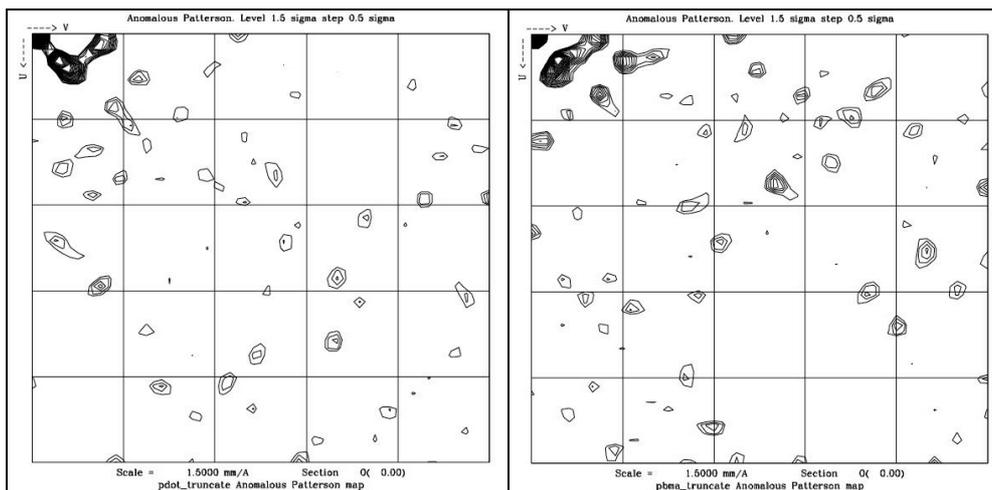


Figure A2.1.: Les sections de Harker $w=0$ pour les cartes de Patterson anormale des dérivés 1 (gauche) et 2 (droite).

Dérivés avec le complexe Gd-DO3A

Les jeux de données 3, 4 et 5 correspondent à des dérivés obtenus avec le complexe Gd-DO3A. Comme le montre la valeur du facteur R_{fac} , la qualité de diffraction est relativement bonne pour les trois cristaux dérivés (tableau A2.1.). La comparaison des cartes de Patterson pour les trois dérivés est difficile, car les longueurs d'onde d'enregistrement sont très différentes (3: $\lambda=1,711 \text{ \AA}$, $f''(\text{Gd}) = 28 e^-$, 4: $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, $f''(\text{Gd}) = 12 e^-$, 5: $\lambda = 0,98 \text{ \AA}$, $f''(\text{Gd}) = 6,7 e^-$). Une comparaison qualitative des sections de Harker ($w=0$ et $u=0$ ou $v=0$) des cartes de Patterson anormales semble indiquer une fixation semblable entre le dérivé obtenu en MDP (figure A2.2.a) et le dérivé obtenu en PEG (figure A2.2.b). Les pics correspondant aux trois sites de fixation (A,B,C) apparaissent dans les deux cartes avec une fixation moins forte, semble-t-il, pour le site B pour le dérivé en PEG. La carte de Patterson du dérivé obtenu en AS (figure A2.2.c) ne présente aucun pic correspondant aux sites A, B ou C. Elle semble cependant indiquer un site de fixation différent (voir section $w=0,11$, $v=0,5$), ce qui pourrait suggérer une influence de l'agent précipitant sur la fixation du complexe.

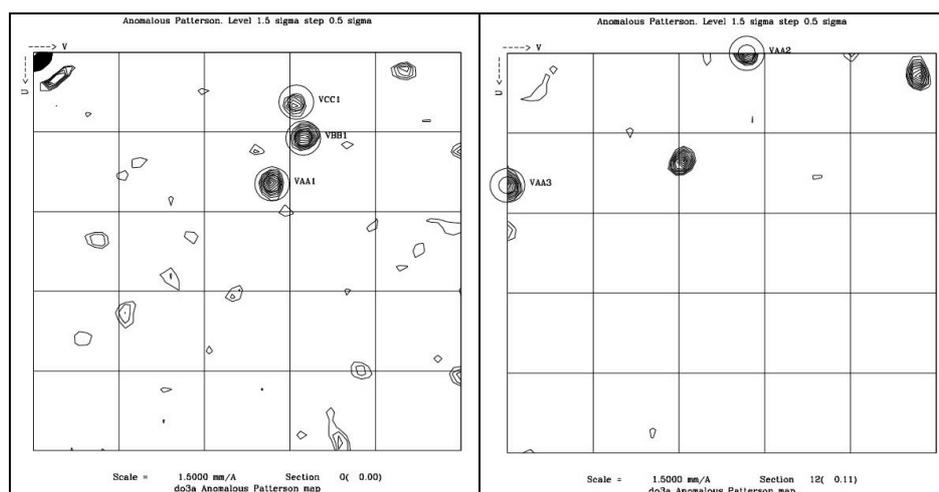


Figure A2.2.a. : Sections $w=0$ et $w=0,11$ de la carte de Patterson anormale du dérivé GI-Gd-DO3A obtenu en MPD.

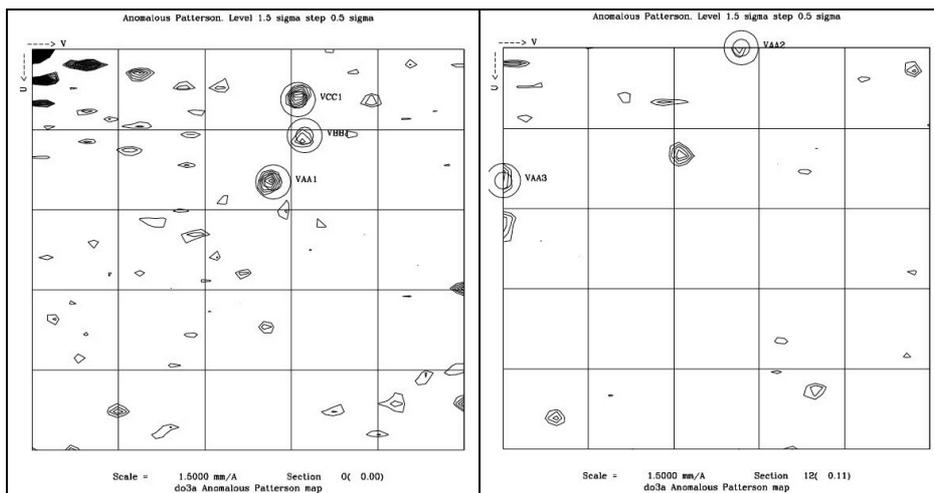


Figure A2.2.b. : Sections $w=0$ et $w=0,11$ de la carte de Patterson anormale du dérivé GI-Gd-DO3A obtenu en PEG.

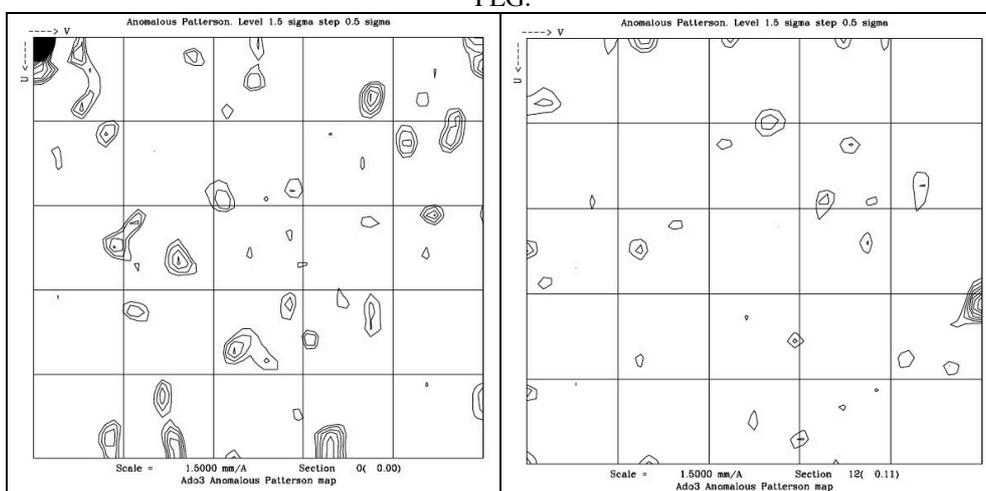


Figure A2.2.c. : Sections $w=0$ et $w=0,11$ de la carte de Patterson anormale du dérivé GI-Gd-DO3A obtenu en AS.

Dérivés avec le complexe Gd-DTPA

Pour le complexe Gd-DTPA aucun bon dérivé en AS n'a pu être obtenu. Comme l'indique la valeur relativement élevée du facteur R_{fac} (tableau A2.1.) le dérivé obtenu en PEG diffracte relativement mal, ce qui mène à une carte de Patterson anormale assez bruitée (figure A2.3.b). On y retrouve les pics correspondant au pic principal du dérivé en MPD (figure A2.3.a) cependant très faibles pour le jeu 7. Les cartes de jeux de qualité très différente se prêtent difficilement à interprétation.

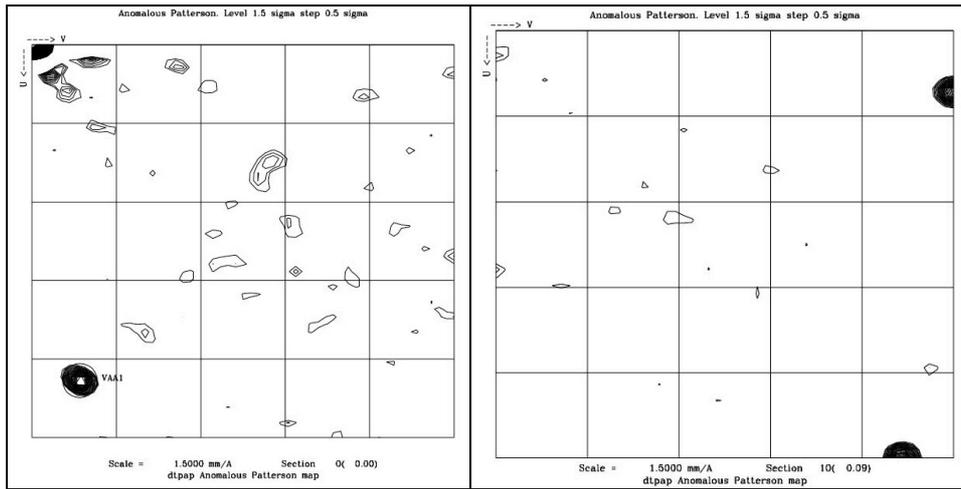


Figure A2.3.a. : Sections $w=0$ et $w=0,09$ de la carte de Patterson anormale du dérivé GI-Gd-DTPA obtenu en MPD.

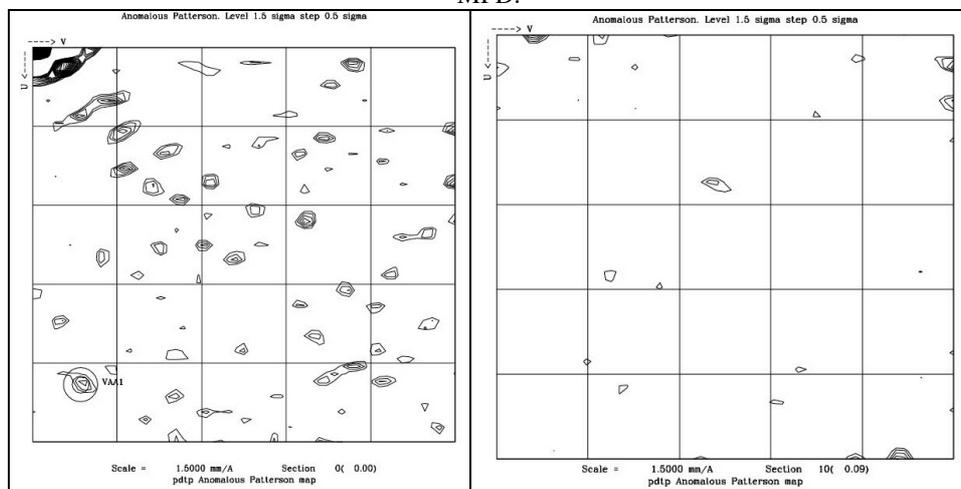


Figure 3b : Sections $w=0$ et $w=0,09$ de la carte de Patterson anormale du dérivé GI-Gd-DTPA obtenu en PEG.