

III.0.Méthodes physico-chimiques pour caractériser la fixation des complexes sur des protéines - Introduction

Les résultats des affinements du mode de fixation des complexes sur les protéines ne permettent pas, dans le cas général, de prévoir la fixation ou non d'un complexe sur une nouvelle protéine. C'est pourquoi nous avons cherché une méthode physico-chimique, alternative à la cristallographie, qui permettrait de caractériser l'interaction des complexes avec des protéines, en solution ou dans le cristal. On pourrait ainsi déterminer parmi les complexes le meilleur candidat pour se fixer sur la protéine avant d'éventuelles expériences cristallographiques. Le but est donc de trouver une méthode relativement simple et facile à mettre en œuvre pour déterminer la constante de dissociation caractérisant l'interaction du complexe avec la protéine. L'ordre de grandeur attendu pour cette constante est déterminé à partir des taux d'occupations observés lors de études cristallographiques (voir chapitre I.5.4). Elle est de l'ordre de 100 mM.

Boggon & Shapiro (2000) et Lott *et al.* (2003) recommandent d'utiliser l'électrophorèse de gels de polyacrylamide natifs pour cribler des potentiels dérivés d'atomes lourds. L'analyse de la migration du mélange protéine avec le composé lourd permettrait de détecter d'éventuelles incompatibilités qui provoqueraient la dénaturation de la protéine et seraient révélées sur le gel. En outre, la fixation d'un composant chargé sur la protéine pourrait modifier sa migration, ce qui permettrait de détecter la fixation du complexe lourd sur la protéine. Ils recommandent également l'utilisation de la spectrométrie de masse pour détecter l'éventuelle fixation du composant sur la protéine. Des expériences de spectrométrie de masse en utilisant des dérivés de protéine obtenus avec nos complexes ont montré qu'il était possible de détecter l'association non covalente des complexes avec différentes protéines. En revanche, il semble difficile d'établir par cette méthode la spécificité de l'interaction et de comparer les différents complexes entre eux (Eric Girard, communication personnelle).

Le choix de la méthode de détection de la fixation du composant va dépendre des propriétés physico-chimiques de l'atome lourd utilisé. Pour la recherche d'une telle méthode, nous nous sommes appuyés sur les propriétés physico-chimiques particulières des lanthanides qui permettraient leur détection.

La forte fluorescence des lanthanides dans leur seuil d'absorption L_{III} les rend facilement détectables par spectroscopie des rayons X. Cependant, cette méthode ne semble pas bien adaptée pour détecter la fixation d'un de nos complexes sur une protéine. Comme nous travaillons à des concentrations de complexe élevée, il y a une grande quantité de molécules de complexe non-liées dans les canaux de solvant et il serait difficile de distinguer ces dernières des molécules liées. En effet, la fluorescence des lanthanides ne varie que peu en fonction de l'environnement. D'éventuels changements de l'environnement de l'ion lors de la fixation ne modifieraient pas le signal détecté.

III.0.1. Difficultés liées aux caractéristiques des complexes utilisés

Pour détecter la fixation de nos complexes, il faut tenir compte des particularités des complexes et de leur interaction avec les protéines.

Premièrement, la faible affinité des complexes pour les protéines fait qu'ils doivent être utilisés avec une concentration élevée. Il semble difficile de distinguer les molécules non-liées, présentes en grande quantité dans les canaux de solvant du cristal des molécules liées à la protéine dans des sites spécifiques. Un trempage dans une solution ne contenant pas de complexe de gadolinium afin d'enlever le complexe des canaux de solvant (back-soak) risque de provoquer la dissociation des sites de fixation des molécules de complexe liées.

Pour des méthodes de détection qui se servent des ions de lanthanides comme sondes pour détecter la fixation du complexe, un problème est que la fixation des complexes à la protéine n'entraîne pas de forts changements de l'environnement de l'ion, car la sphère de coordination de l'ion est presque saturée par les atomes du ligand.

III.0.2. Considérations expérimentales

La plupart des méthodes ont été testées en utilisant le lysozyme de blanc d'œuf de poule comme protéine modèle, car elle est disponible en grandes quantités et pas chère.

Comme nous ne connaissions pas l'influence des conditions physico-chimiques sur la fixation des complexes sur les protéines et afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par différentes méthodes avec les résultats obtenus par cristallographie, nous avons travaillé dans des conditions physico-chimiques proches des conditions de cristallisation, si possible.

III.1. Calorimétrie de titrage isotherme

III.1.1. Introduction

Une expérience de calorimétrie de titrage isotherme (ITC : Isothermal Titration Calorimetry) permet l'étude de l'interaction d'un ligand avec une macromolécule biologique. Elle permet de déterminer l'enthalpie de la liaison du ligand avec la macromolécule (ΔH_b), ainsi que la constante d'association (K_a) et la stœchiométrie de la réaction (n).

Dans une expérience de titrage ITC, le "ligand", contenu dans une seringue, est titré dans une solution de la "macromolécule", contenue dans une cellule (ou *vice versa*). L'expérience est réalisée à température constante. Après chaque ajout d'une petite quantité de ligand, la chaleur libérée ou absorbée est mesurée par rapport à une cellule de référence remplie de solution tampon. La différence de chaleur est exprimée comme la puissance électrique requise pour maintenir une température constante entre la cellule contenant l'échantillon et la cellule de référence, qui sont toutes deux placées dans un récipient adiabatique. Quand la macromolécule est saturée par le ligand, le signal de chaleur diminue et il ne reste plus que la chaleur de dilution.

La figure 3.1.1 montre le schéma du montage d'une expérience ITC.

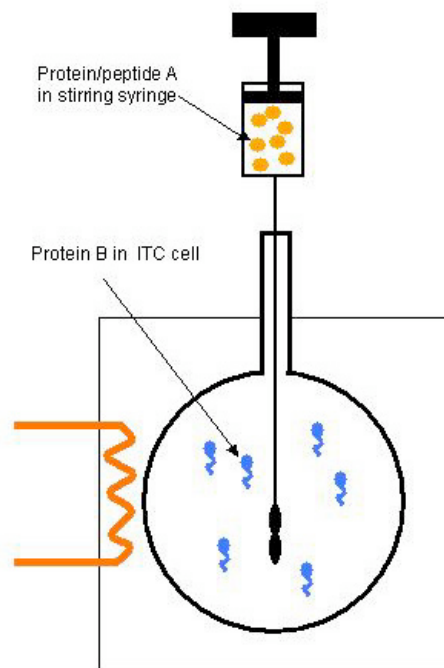


Figure 3.1.1 : Diagramme d'une cellule ITC et seringue. La cellule contenant l'échantillon et la cellule de référence (qui n'est pas montrée ici) sont placées dans un récipient adiabatique, dont la température est contrôlée par le calorimètre (McMahon, 2005).

Le domaine de constantes d'association directement mesurables est de 10^2 à 10^9 M^{-1} (Pierce *et al.*, 1999). Les constantes d'affinité typiques, que nous avons déterminées pour nos complexes à partir des expériences de cristallographie sont de l'ordre de 10 M^{-1} .

La figure 3.1.2 montre des courbes de mesures typiques pour une réaction endothermique. La pente au point d'inflexion de la courbe de chaleur intégrée augmente avec la constante d'association.

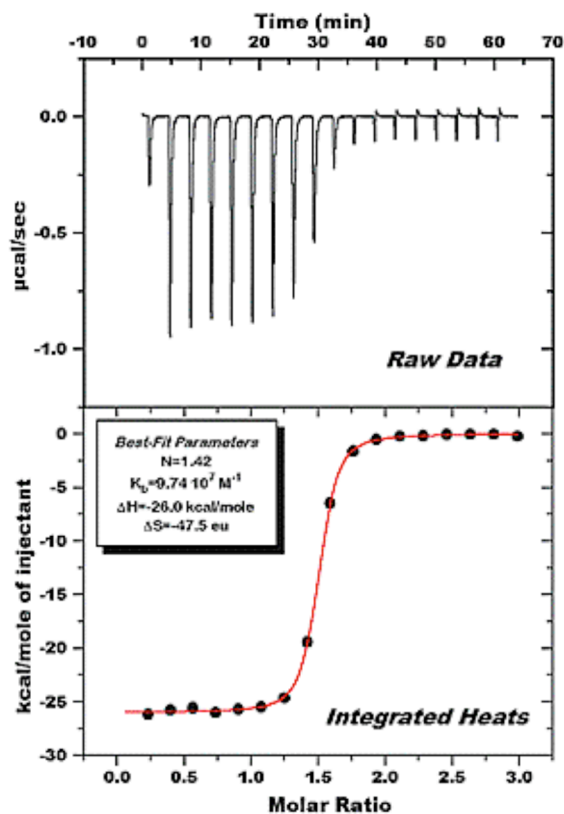


Figure 3.1.2 : Courbes de mesure typiques pour une réaction endothermique. La figure du haut montre la chaleur absorbée à chaque ajout de ligand. La figure du bas montre la chaleur absorbée intégrée par mole de ligand ajouté (<http://www.microcalorimetry.com>).

La figure 3.1.3 montre les isothermes de liaison simulées pour des valeurs différentes du paramètre c , qui caractérise l'isotherme expérimentale, avec : $c = K_a[M]n$, où $[M]$ est la concentration de la macromolécule dans la cellule et où n caractérise la stœchiométrie $n : 1$ de l'association entre le ligand et la macromolécule.

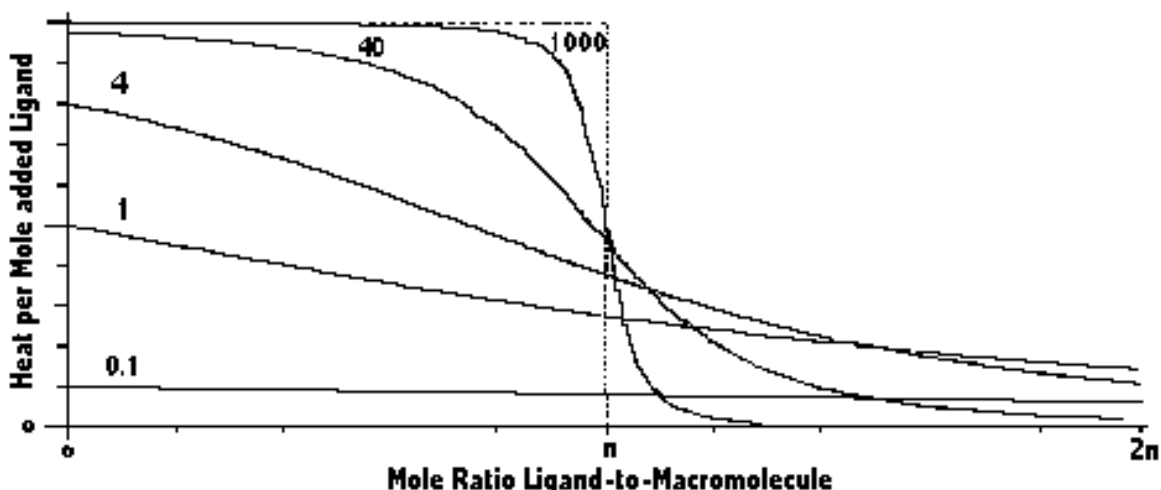


Figure 3.1.3 : Isothermes de liaison simulées pour différentes valeurs du paramètre "c" (Wiseman *et al.* 1989).

Pour que la courbe expérimentale puisse être interprétée, il est nécessaire que la valeur de c soit comprise entre 1 et 1000. Pour des faibles valeurs de c , la forme caractéristique sigmoïdale du graphe est perdue : la transition devient très large, s'approchant d'une relation

linéaire. Le point d'équivalence, correspondant au rapport molaire n entre ligand et protéine, ne peut pas être déterminé.

Dans nos conditions expérimentales, avec une constante d'association de 10 M^{-1} et une concentration de protéine de $1,5 \text{ mM}$, nous obtenons une valeur approximative de $c = K_a[M]n = 10 \text{ M}^{-1} * 1,5 * 10^{-3} \text{ M} * 2 = 0,03$.

III.1.1.a. Détermination des paramètres thermodynamiques

Pour un système avec une stœchiométrie 1 :1, la chaleur absorbée ou libérée lors de l'ajout du ligand est de

$$Q = \frac{V_0 \Delta H_b [M]_t K_a [L]}{1 + K_a [L]} \quad (\text{I})$$

Avec : V_0 : volume de la cellule, $[M]_t$: concentration de la macromolécule totale (incluant molécules libres et liées), $[L]$: concentration de ligand libre.

Avant l'intégration des pics des données brutes, les chaleurs de liaison sont normalisées en fonction de la concentration du ligand et corrigées de l'effet de dilution.

En exprimant le relation (I) en fonction de la concentration totale de ligand $[L]$, les valeurs de K_a et ΔH_b sont déterminées en ajustant les paramètres à déterminer de façon à faire concorder la courbe calculée à la courbe expérimentale.

Avant l'expérience, titrant et macromolécule devraient être dialysés, de préférence dans un même récipient, afin de minimiser les artefacts dus à des différences de tampon.

III.1.2. Étude de l'association d'une solution de lysozyme avec le complexe Gd-HPDO3A par calorimétrie de titrage isotherme

Des expériences calorimétriques de titrage isotherme ont été réalisées en collaboration avec Pierre le Parlouër (Thermal Consulting) avec la protéine lysozyme de blanc d'œuf de poule et le complexe Gd-HPDO3A.

III.1.2.a. Appareillage

Les expérimentations ont été réalisées avec le calorimètre de titrage isotherme ITC CSC 4200, à l'entreprise Sétaram à Caluire. Le calorimètre assure les fonctions suivantes dans une gamme de température de 0 à $110 \text{ }^\circ\text{C}$: programmation et régulation de la température du calorimètre, acquisition et numérisation des signaux de température et de chaleur.

III.1.3. Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales ont été choisies de manière à être proche des conditions de cristallisation (tampon, pH, concentration du complexe de gadolinium). Il était cependant nécessaire de travailler avec une concentration de NaCl plus basse que pour la cristallisation, afin d'éviter la formation de cristaux de lysozyme lors de l'expérience de titrage. La concentration de la protéine doit être élevée pour obtenir une valeur élevée du coefficient c .

Nous avons choisi de réaliser les deux expérimentations suivantes :

Expérience 1

Pour la première expérience, le titrant est une solution très concentrée de la protéine, est c'est la solution de complexe qui est placée dans la cellule (à l'inverse des conditions habituelles, où c'est la protéine qui est placée dans la cellule). Les deux agents sont préparés dans le même tampon.

Solution de titrage 250 μL	200 g/L lysozyme 50 mM acétate de sodium pH = 4,6
Solution de la cellule 1300 μL	110 mM Gd-HPDO3A 0,55 M NaCl 50 mM acétate de sodium pH = 4,6

Expérience 2

Pour la deuxième expérience, le titrant est une solution concentrée du complexe Gd-HPDO3A. La cellule contient la solution protéique.

Solution de titrage 250 μL	1,0 M Gd-HPDO3A 0,5 M NaCl 50 mM acétate de sodium pH = 4,6
Solution de la cellule 1300 μL	22 g/L lysozyme 0,55 M NaCl 50 mM acétate de sodium pH = 4,6

Le calorimètre régule la température à 20°C.

Pour les deux expériences, la cellule de référence, servant à mesurer la chaleur de dilution du titrant lors des injections, est remplie d'une solution contenant 0,55 M de NaCl et tamponnée avec 50 mM d'acétate de sodium à pH 4,6.

Pour chacune des deux expériences, 16 injections de 10 μL sont réalisées. L'intervalle de temps séparant 2 injections successives est de 5 minutes.

III.1.4. Résultats

Le tableau 3.1.1 résume les valeurs de chaleur mesurées à chaque injection de ligand pour l'expérience 1 et 2. Les courbes correspondantes sont montrées dans les figures 3.1.4 et 3.1.5.

Expérience 1			Expérience 2	
Chaleur (μ J)	Vinj (μ L)		Chaleur (μ J)	Vinj (μ L)
44,01693	10		32863,33	10
-287,579	10		22479,15	10
-362,934	10		22008,67	10
-419,445	10		20797,67	10
-432,448	10		19612,49	10
-469,076	10		18678,75	10
-489,097	10		17771,14	10
-470,921	10		17165,28	10
-501,129	10		16536,61	10
-530,293	10		15940,74	10
-544,488	10		15348,6	10
-609,12	10		14749,4	10
-633,114	10		14164,71	10
-649,918	10		13509,32	10
-698,847	10		12991,81	10
-701,745	10		12132,76	10

Tableau 3.1.1 : Valeurs de chaleur mesurées pour l'expérience 1 et 2.

Expérience 1

La figure 3.1.4 montre la différence de chaleur pour les 16 injections de la solution protéique dans la cellule contenant le complexe. Le premier pic est endothermique et les 15 suivants sont exothermiques. La chaleur de dilution de la protéine dans le tampon a été soustraite.

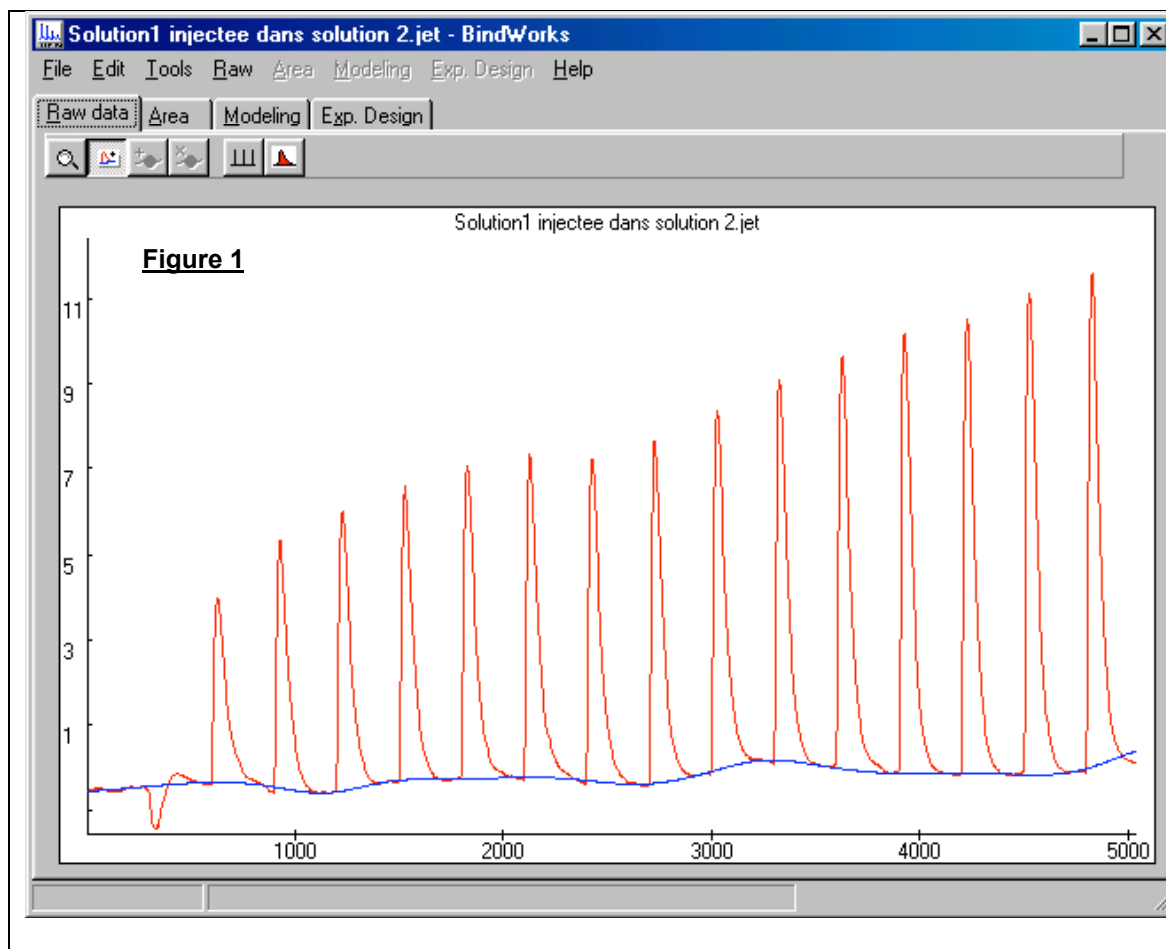


Figure 3.1.4 : Chaleur dissipée (absorbée) en fonction du temps. Chaque pic correspond à l'injection de 10 μL de solution protéique dans la cellule contenant le complexe. L'unité en abscisses est en secondes, l'unité en ordonnées est arbitraire.

Expérience 2

La figure 3.1.5 montre la différence de chaleur pour les 16 injections de la solution de complexe dans la cellule contenant la protéine. Tous les pics sont endothermiques. La chaleur de dilution du complexe dans le tampon a été soustraite.

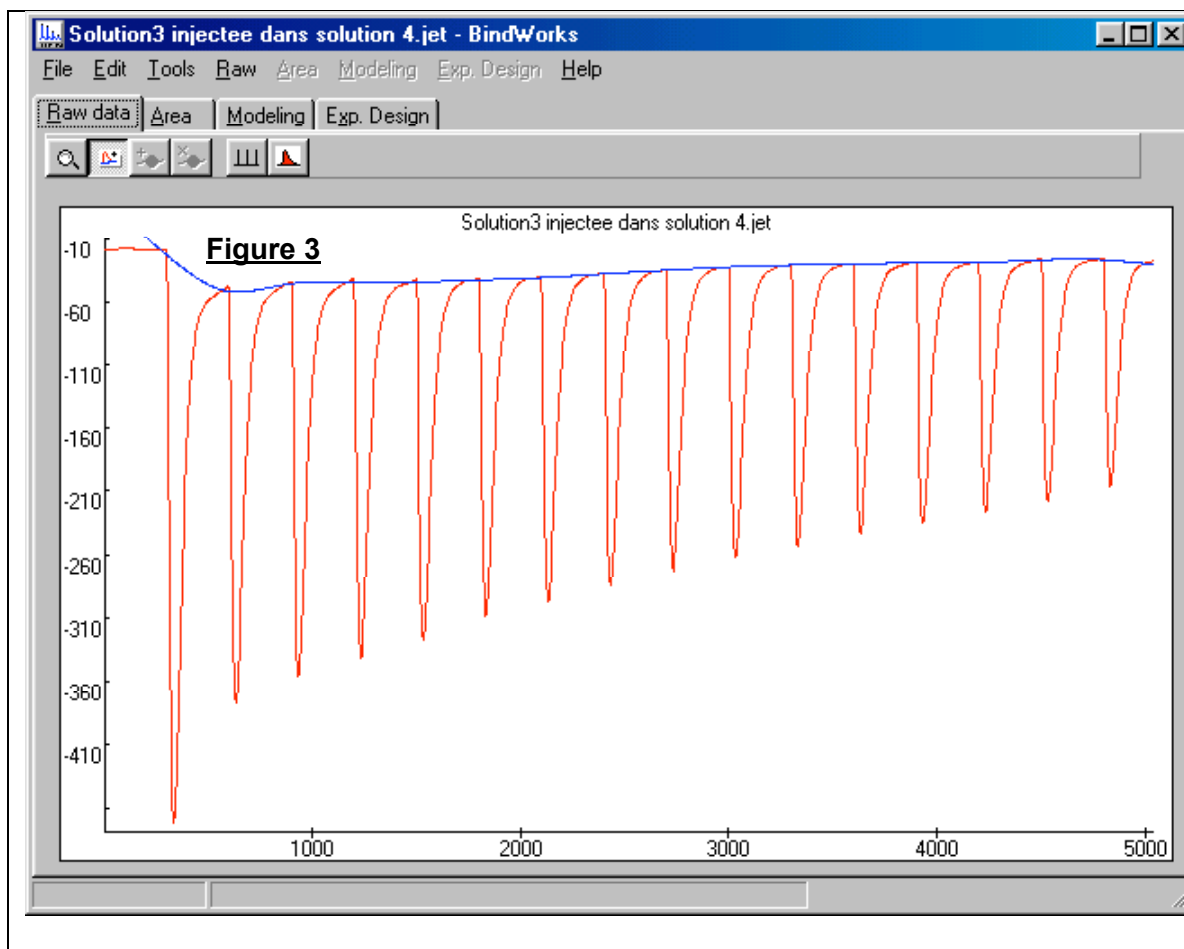


Figure 3.1.5 : Chaleur absorbée en fonction du temps. Chaque pic correspond à l'injection de 10 μL de solution de complexe dans la cellule contenant la protéine. L'unité en abscisses est en secondes, l'unité en ordonnées est arbitraire.

L'allure des courbes obtenues (figure 3.1.4 et 3.1.5) ne correspond pas à l'allure des courbes qui est habituellement observée, et qui tend vers une valeur constante quand le point d'équivalence (rapport molaire [titrant / agent dans la cellule] = n) est atteint.

Un calcul des rapports molaires atteints dans nos conditions en montre la raison.

Expérience 1 : le rapport molaire protéine / ligand atteint lors de la dernière injection est de $2,24 \mu\text{M}/143 \mu\text{M} = 0,02$.

Expérience 2 : le rapport molaire ligand / protéine atteint lors de la première injection est de $160 \mu\text{M}/2 \mu\text{M} = 5$.

Pour l'expérience 1, le point d'équivalence (n : rapport molaire protéine / ligand = 0,5) n'est jamais atteint, alors que pour l'expérience 2, il est dépassé dès la première injection (n : rapport molaire ligand / protéine = 2).

Pour obtenir de meilleures conditions expérimentales, nous sommes limités d'un côté par la solubilité de la protéine (expérience 1) et de l'autre côté, en travaillant avec une concentration de complexe plus faible, ou en injectant des volumes plus faibles (expérience 2), il est

probable que les différences de chaleur dues à l'association spécifique des deux molécules deviennent négligeables devant les effets parasites de l'expérience.

Le résultat obtenu n'est pas surprenant, puisque, pour l'expérience 2, la valeur $c = K_a [M]n = 10M^{-1} * 1,5 * 10^{-3} M * 2 = 0,03$ est significativement plus faible que les valeurs recommandées.

En outre, nous avons négligé de dialyser les différentes solutions dans un même tampon, ce qui peut engendrer des chaleurs parasites dues à d'éventuelles différences de pH et de concentration.

III.1.5. Conclusion

L'affinité du complexe Gd-HPDO3A, qui se fixe avec des populations élevées sur la protéine lysozyme lors de la cristallisation, est trop faible pour pouvoir caractériser la fixation par des expériences de calorimétrie. Cette méthode ne semble donc pas permettre de détecter la fixation d'un de nos complexes sur une protéine en solution.

III.2. Expériences de résonance plasmonique de surface pour caractériser l'interaction de la protéine lysozyme avec le complexe Gd-HPDO3A

La résonance plasmonique de surface (RPS) est une méthode de caractérisation de la liaison d'un "ligand" sur un "récepteur" adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système détecte la faible variation de l'indice de réfraction de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. Le signal mesuré est le changement de l'angle de résonance.

Nous avons réalisé des expériences de RPS (Biacore) avec la protéine lysozyme et le complexe Gd-HPDO3A. Les courbes obtenues n'ont pas indiqué d'interaction spécifique entre la protéine et le complexe. Il est probable que la constante de dissociation de l'ensemble protéine et complexe de gadolinium soit trop faible pour que l'interaction puisse être caractérisée par RPS. En effet, le domaine de constantes de dissociation typique pour des expériences de RPS est compris entre $K_d = 10 \text{ mM}$ et $K_d = 1 \text{ pM}$ (McDonnell, 2001).

III.3.Électrophorèse de gels d'acrylamide natifs

L'électrophorèse de gels natifs permet la séparation des protéines en fonction de leur charge et de leur taille hydrodynamique.

Nous aimerions voir si la fixation des complexes sur une protéine modifie la vitesse de migration de la protéine. Pour des complexes chargés, leur charge ajoutée à la charge de la protéine pourrait modifier la vitesse de migration de l'ensemble constitué de la protéine et du complexe. Pour une migration en sens direct, de l'anode vers la cathode, la fixation d'un complexe chargé négativement devrait augmenter la vitesse de migration ; la migration en sens inverse devrait être freinée par la fixation. Que les complexes soient chargés ou non, la fixation du complexe pourrait freiner la migration en augmentant la taille de la molécule. La masse approximative des complexes est de 650 g/mol ; la protéine la plus petite que nous avons étudiée, le lysozyme, a une masse de 14 kDa. Pour deux sites de fixation par molécule de protéine, la différence relative de masse entre une molécule avec et sans complexe fixé serait de $\Delta m/m \sim 10\%$. Si le complexe se fixe dans une cavité de la protéine, l'influence sur la taille hydrodynamique pourra être moindre.

Nous nous sommes posé la question suivante : pour être proche des conditions de cristallisation, quelle concentration de complexe faut-il ajouter à la protéine ? Dans la solution déposée dans les puits du gel, la concentration de la protéine est d'environ 1 mg/mL, alors que dans la solution de cristallisation, la concentration protéique est de 40 mg/mL (lysozyme). Faut-il choisir une concentration de complexe proche de la concentration utilisée pour la cocrystallisation ($C_{\text{complexe}} = 100 \text{ mM}$) ou faut-il garder un rapport molaire protéine / complexe similaire à celui des conditions de cristallisation ($C_{\text{complexe}} = 2,5 \text{ mM}$) ? Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler avec une concentration de complexe élevée, pour voir si l'ajout du complexe pouvait modifier la vitesse de migration.

III.3.1. Préparation des gels

Habituellement on prépare le gel natif pour la migration de la protéine avec un tampon et un pH choisi en fonction du point isoélectrique (pI) de la protéine. La concentration d'acrylamide est choisie en fonction de la taille de la protéine. Cette concentration détermine la taille du maillage du gel polymérisé. On choisit cette concentration plus faible dans la partie supérieure du gel ("stacking"), qui sert à concentrer la protéine, que dans la partie "running" qui sert à la séparation des bandes. Habituellement, le gel est préparé à un pH supérieur au pI de la protéine. Dans le gel, la protéine sera alors chargée négativement. Le sens habituel de la migration se fait alors de haut en bas, de l'anode, chargée négativement, vers la cathode, chargée positivement. La tension appliquée entre les deux électrodes, et le courant résultant, sont choisis de sorte que la chaleur dissipée dans le gel n'échauffe pas trop l'échantillon (valeurs typiques : 100 V et 30 mA). Pour la composition des gels, je me suis appuyé sur l'article de McLellan (1982).

III.3.2. Préparation du gel pour la migration du lysozyme de blanc d'œuf de poule

Tampon "running"

25 mM histidine

30 mM tampon MOPS [acide 3-(N-Morpholino)propanesulfonique] équilibré à pH 6,6 avec NaOH

Composition du gel

Le gel a été préparé avec le tampon "running" à pH 6,6 et 7,5% d'acrylamide. Je n'ai pas ajouté de partie "stacking".

Pour un volume de 30 mL, le gel se prépare en mélangeant :

21,6 mL tampon "running"

7,5 mL acrylamide (30%)

900 µL APS (1%) (persulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

35 mL TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, catalyseur pour la polymérisation des gels de polyacrylamide)

Préparation des échantillons de protéine à déposer et dépôt des échantillons

Dans chaque puits, j'ai déposé 7 µL de solution contenant 5 ou 10 µg de protéine, 100 mM de complexe de gadolinium et 2 µL de la solution décrite ci-dessous :

Solution de dépôt

20% tampon "running"

80% glycérol

une petite quantité de bleu de bromophénol

Tampon de migration

25 mM de tampon tris pH 8,3

92 mM glycine

Le gel, placé dans le tampon de migration, est relié au générateur de courant. La migration a été réalisée à température ambiante pendant ~2 h à une tension de 100 V, dans des appareils d'électrophorèse de Amersham Biosciences "mighty small II" reliés à un générateur de courant EPS1.

Le pI de la protéine (pI du lysozyme = 11) est supérieur au pH du gel : la protéine sera chargée positivement dans le gel. Pour faire migrer la protéine dans le gel, il faut donc inverser le sens des électrodes par rapport au sens habituel.

Le gel est coloré avec le bleu de Coomassie.

III.3.3. Résultats obtenus avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule

La figure 3.3.1 montre le gel d'électrophorèse natif obtenu avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule et différents complexes de gadolinium.

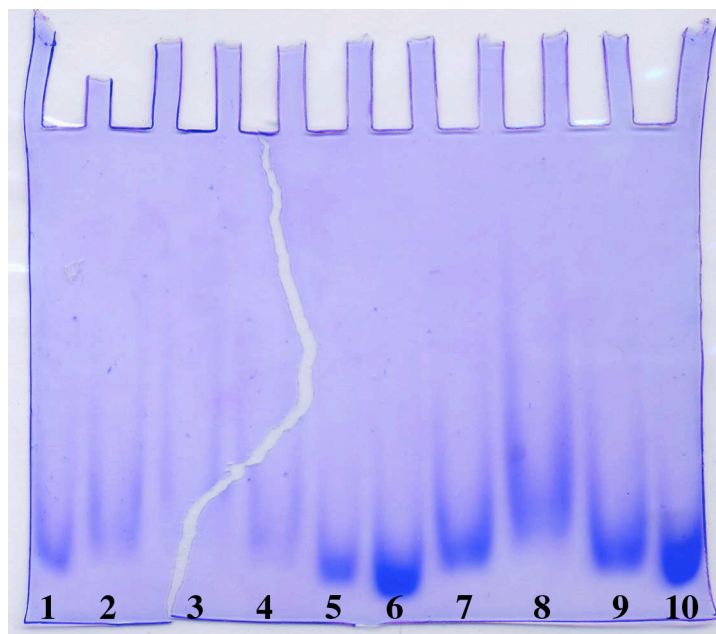


Figure 3.3.1 : Gel d'électrophorèse natif où 7 μ L de solution contenant 5 ou 10 μ g de lysozyme et un des complexes de gadolinium à une concentration de 100 mM ont été déposés dans les puits.

Le tableau 3.3.1 indique les complexes correspondant au numéro de puits. La charge des complexes est indiquée entre parenthèses.

	Sans additif	Gd-DOTA-BOM (-1)	Gd-DOTA (-1)	Gd-DOTMA (-1)	Gd-HPDO3A (0)
Lysozyme 5 μ g	1	2	3	4	5
Lysozyme 10 μ g	6	7	8	9	10

Tableau 3.3.1 : Quantité de protéine déposée dans les puits du gel de la figure 3.3.1 et complexe ajouté.

La figure 3.3.1 montre que la migration de la protéine a été ralentie pour tous les puits contenant des complexes chargés. Parmi les complexes chargés, ce sont les complexes Gd-DOTA-BOM et Gd-DOTA qui se fixent dans les cristaux de lysozyme, le premier avec un site de fixation unique, le deuxième avec deux sites de fixation (chapitre II.4.8). Le complexe Gd-DOTMA ne se fixe pas de manière significative dans les cristaux de lysozyme. Alors que le fort ralentissement de la migration de la protéine dans les puits 3 et 8 est en accord avec la fixation du complexe chargé Gd-DOTA sur deux sites de fixation, les deux complexes Gd-DOTA-BOM et Gd-DOTMA ralentissent la migration de manière comparable, alors que ce n'est que le premier qui se fixe significativement dans les cristaux de la protéine. Pour le complexe non chargé, Gd-HPDO3A, il ne semble pas y avoir de ralentissement significatif de la migration (puits 5 et 10), alors que, dans le cristal, le complexe se fixe fortement.

III.3.4. Essais d'électrophorèse de gels natifs avec d'autres protéines

Des essais d'électrophorèse de gel natif ont été réalisés avec les protéines urate oxydase d'*Aspergillus flavus* et glucose isomérase de *Streptomyces rubiginosus*. Les conditions de préparation des gels sont résumées dans le tableau 3.3.2. Cependant, aucun des gels n'a jamais permis de discerner de différence de vitesse de migration dû à l'ajout des complexes.

	Urate oxydase		Glucose isomérase	
pI	7,3		5	
pH du gel	6,8	8,8	6,8	8,8
sens de migration	inverse	direct	direct	direct

Tableau 3.3.2 : Conditions de préparation de gels d'acrylamide natifs pour la migration des protéines urate oxydase et glucose isomérase.

La figure 3.3.2 montre l'exemple d'un gel d'acrylamide avec la protéine glucose isomérase. Le gel a été préparé avec un tampon TRIS pH 6,8, avec 3,75 % d'acrylamide dans la partie "stacking" et 10% d'acrylamide dans la partie "running". Dans chaque puits, j'ai déposé 30 µg de protéine glucose isomérase avec 100 mM de complexe de Gd^{3+} , sauf dans le puits 9, dans lequel j'ai déposé la protéine mélangée à 10 mM d' $EuCl_3$. Les puits 2 à 8 et 10 correspondent aux huit différents complexes. La migration a été faite en sens direct.

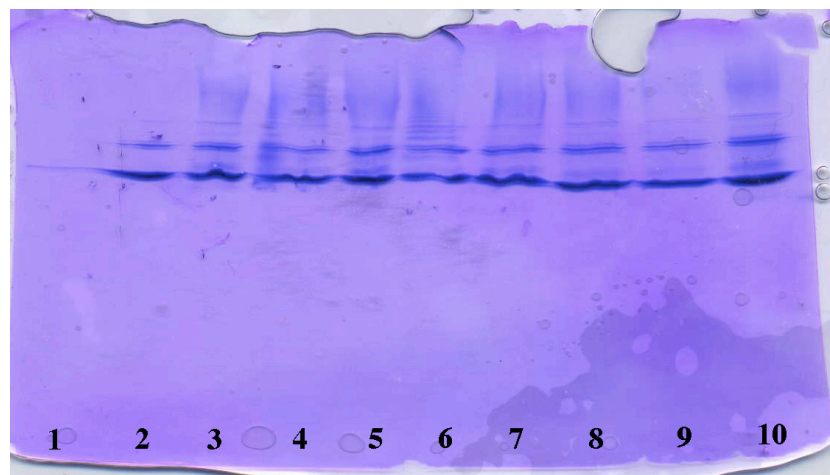


Figure 3.3.2 : Gel d'acrylamide de la protéine glucose isomérase et différents complexes de gadolinium.

Le gel correspond au cas le plus souvent observé avec les gels que j'ai préparés : il n'y a pas de différence de la vitesse de migration significative entre les différents puits. Même l'ajout de l'ion Eu^{3+} , qui se fixe fortement à la glucose isomérase dans deux sites de fixation et qui devrait provoquer une différence de charge de +6, ne ralentit pas de manière significative la migration.

III.3.5. Conclusions

Les résultats du gel de lysozyme montrent que, pour les conditions utilisées ici, la migration est ralentie par l'ajout des complexes chargés, et même par l'ajout de ceux qui ne se fixent pas dans le cristal. Il reste à déterminer, par des expériences supplémentaires, si un rapport peut être trouvé entre le taux de fixation du complexe dans le cristal et la migration, peut-être en travaillant avec des concentrations de complexe plus basses. Pour le lysozyme, la fixation du complexe non chargé ne modifie pas de manière suffisante la taille hydrodynamique de la protéine pour provoquer un ralentissement de la fixation. Ceci veut dire que la méthode n'est probablement pas bien adaptée à la détection de la fixation des complexes non chargés (qui représentent la moitié des complexes étudiés).

Il reste cependant à optimiser les conditions de préparation de gel et de migration pour les gels avec d'autres protéines, afin de pouvoir observer une différence de migration quand on ajoute un complexe chargé. Les conditions à modifier seraient la concentration d'acrylamide

qui détermine la vitesse de migration, le temps de migration, le pH et la concentration de complexe utilisée.

III.4. Expériences de résonance magnétique nucléaire

III.4.1. Introduction

Le noyau de certains atomes possède un moment magnétique (spin) non nul. Dans un champ magnétique externe (B_0) l'alignement du spin des noyaux avec le champ correspond à des niveaux d'énergie discrets. Pour faire passer le spin d'un noyau d'un niveau d'énergie à un autre niveau, d'énergie supérieure, il faut appliquer un rayonnement électromagnétique dont la fréquence correspond exactement à la différence d'énergie entre les deux niveaux. Les fréquences typiques sont de l'ordre du MHz (fréquence radio). Cette fréquence de résonance dépend de l'intensité du champ magnétique B_0 et de l'environnement chimique du noyau. Un spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) unidimensionnel est obtenu en balayant un domaine de fréquences radio et en mesurant l'absorption pour toutes les fréquences. Une fréquence d'absorption particulière correspond à un type de noyau magnétique avec un environnement chimique particulier. Dans les protéines sans marquage isotopique, seuls les protons ont un spin non nul. La fréquence de résonance des différents types de protons est mesurée par rapport à la fréquence de résonance d'un composé de référence, la différence relative par rapport à cette référence est appelée le déplacement chimique du proton et ne dépend pas du champ magnétique appliqué. Le temps de relaxation d'un proton est la durée pendant laquelle le spin reste dans l'état excité. La largeur de la bande d'absorption correspondante est inversement proportionnelle à la durée de vie de l'état excité.

III.4.2. Détection de la fixation d'un complexe sur une protéine

En théorie, il y a deux possibilités de détecter la fixation du complexe sur la protéine :

a) Une première possibilité consiste à utiliser comme sonde les molécules d'eau liées à l'ion Gd^{3+} dans le complexe en solution, molécules qui peuvent être remplacées par des résidus protéiques lors de la fixation à la protéine. En effet, le voisinage du centre paramagnétique Gd^{3+} provoque une forte baisse du taux de relaxation des protons des molécules d'eau (Aime *et al.*, 2000; Huskens *et al.*, 1995). C'est cet effet qui est utilisé pour l'imagerie médicale. Le problème, si nous utilisons cette méthode, serait que, dû à la faible affinité des complexes pour les protéines, nous devrions travailler avec un large excès de complexe non lié, dont le signal couvrirait alors le signal des molécules de complexe liées à la protéine.

b) La deuxième possibilité consiste à utiliser les protons de la protéine proches du site de fixation du complexe comme sonde. En effet, le centre paramagnétique Gd^{3+} provoque une forte baisse du temps de relaxation des protons situés à proximité.

Avec un complexe dans lequel l'ion Gd^{3+} est remplacé par un autre ion de lanthanide non paramagnétique (par exemple le lutétium), la fixation du complexe entraînerait un changement du déplacement chimique des protons de la protéine à proximité du site de fixation. Dans les deux cas, le problème est que, pour avoir une occupation suffisamment

forte des sites de fixation sur la protéine, il faut travailler avec un large excès de complexe. Comme l'effet relaxant du Gd^{3+} est très fort, en travaillant avec une concentration élevée de complexe de Gd^{3+} , on risque d'avoir un élargissement des pics de l'ensemble des protons de la protéine, dû à la présence du complexe dans le solvant.

III.4.3. Expériences de RMN 1D avec le lysozyme de blanc d'œuf de poule et les complexes Gd-HPDO3A et Lu-HPDO3A

Nous avons choisi d'étudier si la deuxième possibilité (méthode b) permettrait de détecter la fixation d'un complexe sur une protéine. Comme, en outre, nous disposions du complexe Lu-HPDO3A, nous avons décidé d'utiliser les complexes Gd-HPDO3A et Lu-HPDO3A, en combinaison avec la protéine lysozyme de blanc d'œuf de poule. En effet, le choix du lysozyme comme protéine test nous a paru préférable à plusieurs égards :

- nous pouvions facilement disposer d'une grande quantité de la protéine pure, qui n'est pas chère,
- nous avons étudié la fixation des complexes avec la protéine : les complexes de lanthanides Ln-HPDO3A se fixent fortement dans les cristaux de la protéine,
- la protéine a également été étudiée en RMN et son spectre est attribué (Redfield & Dobson, 1988).

Le complexe Ln-HPDO3A se lie au lysozyme à proximité de trois tryptophanes (voir chapitre II.4.8.). Dans le spectre RMN 1D 1H du lysozyme, les protons liés aux atomes d'azote des noyaux indole de cinq des six tryptophanes donnent lieu à des raies uniques (Laurents & Baldwin, 1997). Nous voulions donc tester si l'ajout du complexe Ln-HPDO3A (avec Ln = Gd ou Lu) aurait une influence sur la position, l'intensité et la largeur des raies correspondant aux trois tryptophanes à proximité des sites de fixation. Des expériences 1D 1H présentent l'avantage de pouvoir se faire dans un temps expérimental très court (acquisition du spectre en quelques secondes) et d'être facile à interpréter. Elles ne nécessitent pas de marquage isotopique de la protéine.

III.4.4. Préparation des échantillons

Pour être proche des conditions de cristallisation, nous avons travaillé avec le même tampon et au même pH que pour la cristallisation. Nous avons travaillé avec la protéine à la concentration $C_p = 2$ mM et avec les deux différents lanthanides Gd et Lu en faisant varier la concentration de complexe de 2 mM à 100 mM. En supposant une constante de dissociation de 100 mM pour la fixation du complexe sur la protéine, ceci donnerait des taux d'occupation du site de fixation de la protéine de 1,9%, de 8,9% et de 49,8% pour des concentrations respectives de complexe de 2, 10 et 100 mM. Sauf pour la concentration de complexe la plus élevée, le signal de la protéine qu'on aimerait détecter, celui qui résulte de la forme liée au complexe, correspond à la forme largement minoritaire.

Toutes les solutions contiennent 2 mM de lysozyme, 50 mM de tampon acétate de sodium pH 4,6 et 10% de D_2O . Le volume d'échantillon nécessaire est 500 μL .

Les solutions ont été préparées en ajoutant à la solution décrite ci-dessus les agents suivants :

- a) blanc : solution de protéine seule
- b) Gd-HPDO3A 2 mM, c) 10 mM, d) 100 mM
- e) Lu-HPDO3A 2 mM, f) 10 mM, g) 100 mM

III.4.4.a. Spécifications techniques

Les expériences ont été réalisées au Laboratoire de RMN (LRMN) de l'IBS, en collaboration avec Rémy Sounier qui a enregistré pour nous les spectres 1D et 2D.

Tous les spectres ont été enregistrés avec le spectromètre 600 MHz du laboratoire, avec un temps d'acquisition d'une minute et à la température de 25°C.

III.4.5. Spectres 1D ^1H

III.4.5.a. Protéine native

Le spectre RMN 1D ^1H d'une solution native de lysozyme a tout d'abord été enregistré (figures 3.4.1 et 3.4.2).

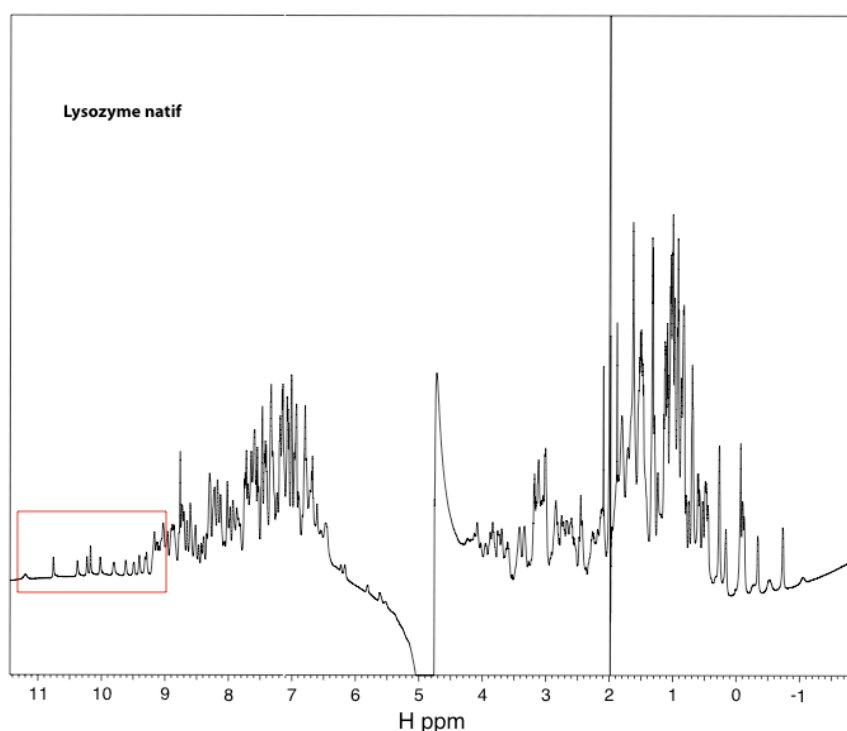


Figure 3.4.1 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme sans ajout de complexe. En rouge : le domaine où apparaissent les pics des tryptophanes. Le pic du H_2O apparaît à 4,7 ppm. Le large pic à 2 ppm correspond au tampon.

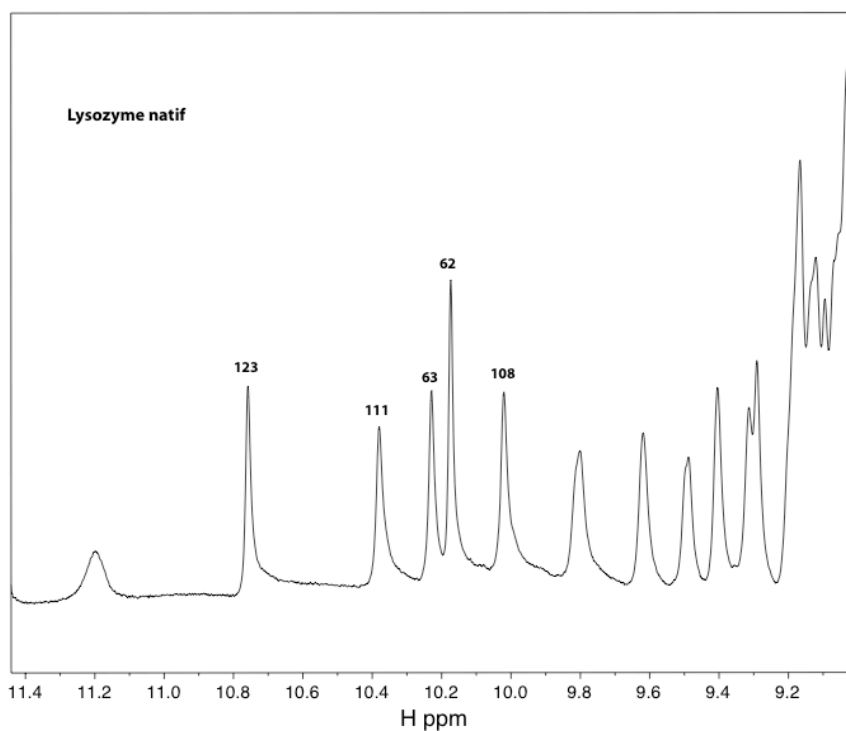


Figure 3.4.2 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme sans ajout de complexe. Aggrandissement du domaine des tryptophanes. Les numéros correspondent aux numéros des tryptophanes dans la séquence du lysozyme.

La figure 3.4.1 montre les pics de résonance des protons de la solution de lysozyme. La figure 3.4.2 correspond à l'agrandissement du domaine où apparaissent les pics des protons liés aux atomes d'azote des noyaux indole de cinq tryptophanes du lysozyme. L'attribution des pics est celle de Laurents & Baldwin (1997). Les positions des pics sont les suivantes : Trp123 : 10,755 ppm ; Trp111 : 10,38 ppm ; Trp63 : 10,225 ppm ; Trp62 : 10,16 ppm ; Trp108 : 10,015 ppm.

III.4.6. Protéine avec le complexe Gd-HPDO3A

Les figures 3.4.3 et 3.4.4 montrent les pics des protons des tryptophanes pour des solutions supplémentées avec, respectivement, 2 mM et 10 mM de Gd-HPDO3A.

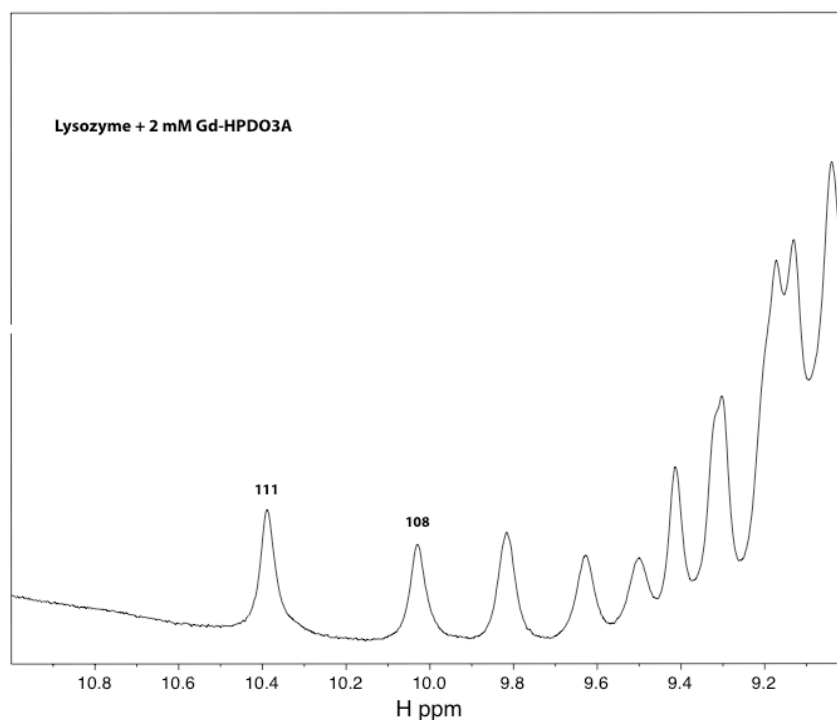


Figure 3.4.3 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme avec 2 mM de Gd-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

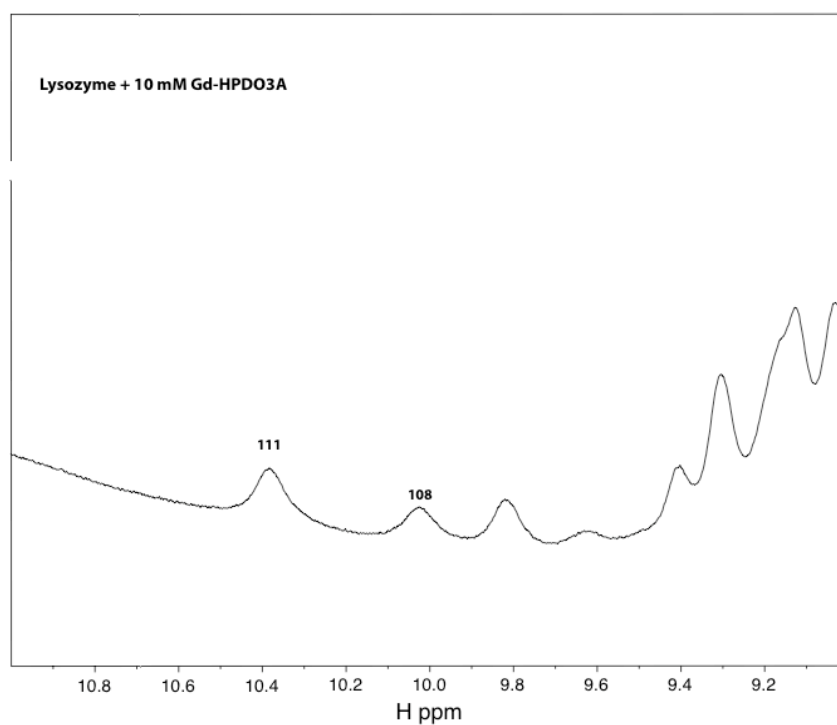


Figure 3.4.4 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme avec 10 mM de Gd-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

Déjà dans la figure 3.4.3, il ne reste plus que les pics des tryptophanes 111 et 108, et les pics encore présents se sont beaucoup affaiblis et se sont élargis. Cet effet est dû à la chute du temps de relaxation provoqué par le Gd^{3+} . Dans la figure 3.4.4, correspondant à une concentration de complexe de 10 mM, l'affaiblissement des pics est encore plus fort. C'est pourquoi nous n'avons pas mesuré de spectre correspondant à 100 mM de complexe, car, déjà à des concentrations plus faibles, la présence du Gd^{3+} entraîne l'affaiblissement de tous les pics de la protéine. C'est ce que montre la comparaison du spectre de la protéine native (figure 3.4.1) au spectre complet de la protéine avec 10 mM de Gd-HPDO3A (figure 3.4.5).

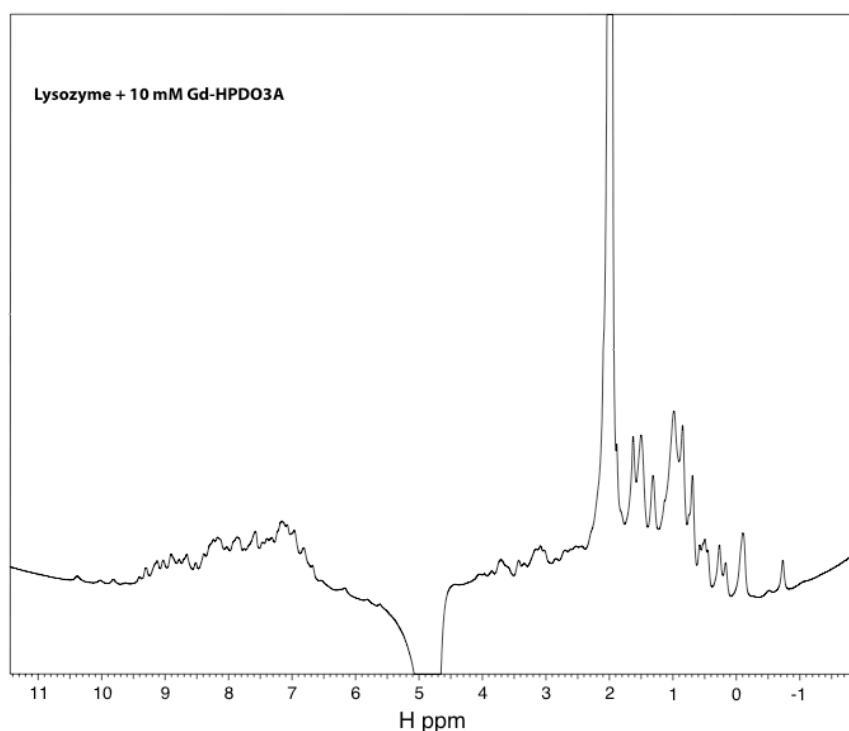


Figure 3.4.5 : Spectre RMN 1D ¹H d'une solution de lysozyme avec 10 mM de Gd-HPDO3A.

III.4.7. Protéine avec le complexe Lu-HPDO3A

Les figures 3.4.6 à 3.4.8 correspondent au spectres enregistrés en ajoutant le complexe Lu-HPDO3A à la solution de lysozyme.

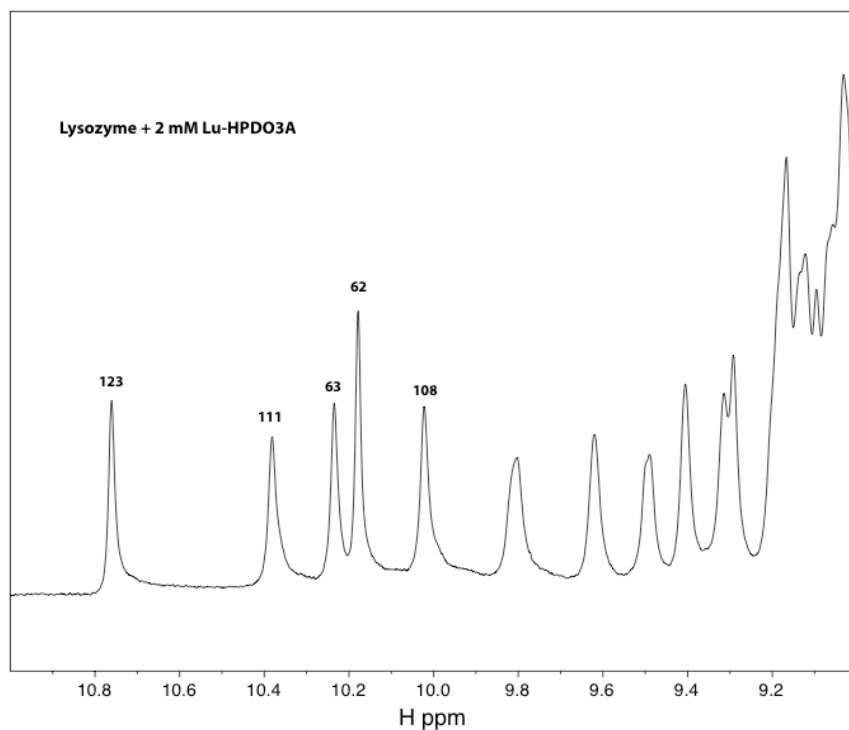


Figure 3.4.6 : Spectre RMN 1D ¹H d'une solution de lysozyme avec 2 mM de Lu-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

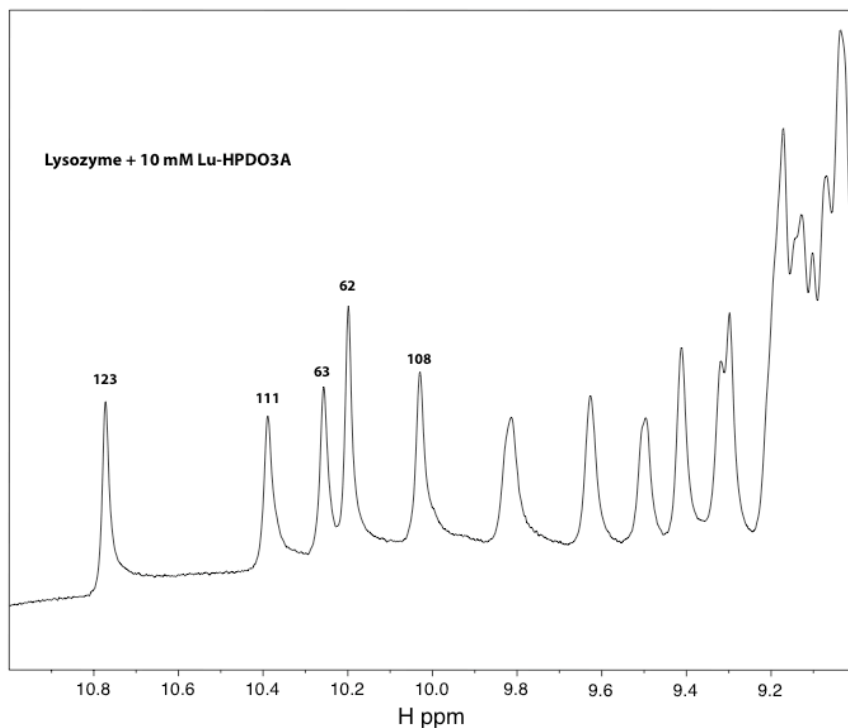


Figure 3.4.7 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme avec 10 mM de Lu-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

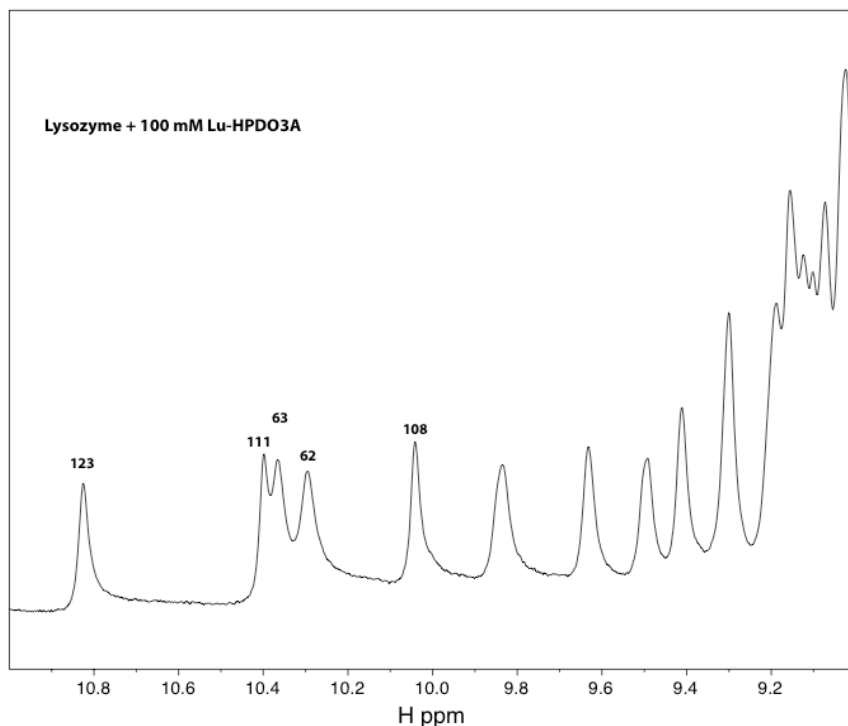


Figure 3.4.8 : Spectre RMN 1D ^1H d'une solution de lysozyme avec 100 mM de Lu-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

Les figures 3.4.6 à 3.4.8 montrent l'évolution des pics des tryptophanes en ajoutant respectivement 2, 10 et 100 mM de Lu-HPDO3A à la solution de protéine. On remarque le déplacement et la baisse d'intensité relative graduelles de certains pics. Dans la figure 3.4.8, les positions des pics sont les suivantes : Trp123 : 10,82 ppm ; Trp111 : 10,39 ppm ; Trp63 :

10,36 ppm ; Trp62 : 10,29 ppm ; Trp108 : 10,03 ppm. Par rapport à la protéine native, on remarque un décalage notable pour les pics des Trp62 et 63 et un peu moins fort pour le pic du Trp123. Ce sont également ces mêmes pics qui subissent une baisse d'intensité par rapport aux pics des Trp111 et 108, qui changent relativement peu. Comme le montre la figure 3.4.9, l'ajout d'une forte concentration du complexe de Lu³⁺ modifie l'intensité de certains pics des résidus de la protéine, mais ne les affecte pas tous.

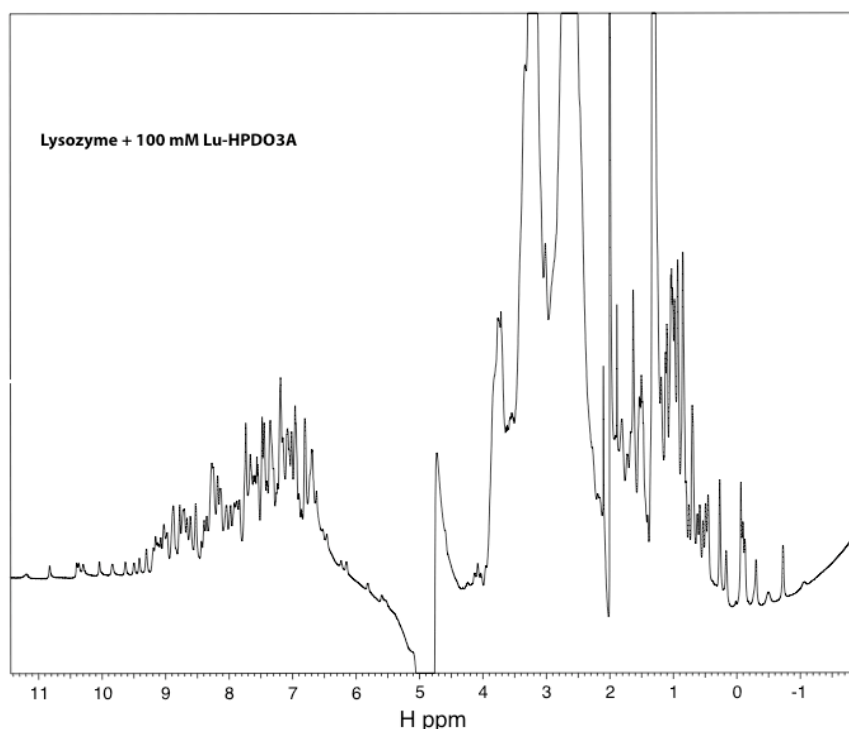


Figure 3.4.9 : Spectre entier de la solution de protéine avec 100 mM de Lu-HPDO3A. Les pics très intenses entre 1 et 5 ppm correspondent aux protons du ligand HPDO3A.

III.4.8. Interprétation des spectres

Dans le cristal, ce sont les tryptophanes Trp62, Trp63 et Trp123 qui sont proches des molécules de complexe fixées, avec des distances entre l'atome d'azote indole et l'ion Ln³⁺ de 6,8 Å, 8,6 Å, 7,5 Å et 15,0 Å pour le Trp62, 63, 123 et 108 respectivement. Le tableau 3.4.1. montre la vitesse d'échange du proton lié à l'azote du noyau indole des tryptophanes de lysozyme dans D₂O d'après Laurents & Baldwin (1997). La vitesse d'échange correspond directement à l'exposition des résidus au solvant. Les tryptophanes avec des petites vitesses d'échange sont donc plutôt enfouis dans la protéine.

Résidu	Trp62	Trp63	Trp123	Trp111	Trp108
Vitesse d'échange [s ⁻¹]	très rapide	rapide 6x10 ⁻³	lente 2x10 ⁻⁵	très lente	lente 4x10 ⁻⁵

Tableau 3.4.1 : Vitesse d'échange des protons d'azote indole des tryptophanes de lysozyme dans D₂O d'après Laurents & Baldwin (1997). Pour les vitesses très lente et très rapide les valeurs numériques ne pouvaient pas être mesurées.

Si les changements d'intensité et de position des pics des protons de tryptophanes sont dus à la présence du complexe de lanthanide dans le solvant, alors les changements devraient le plus

fortement affecter les tryptophanes les plus exposés au solvant, donc d'abord le Trp62, ensuite le Trp63 et finalement le Trp123 et Trp108. Si, par contre, le changement est dû à la fixation spécifique du complexe sur les sites de fixation, ce devrait être en premier lieu les Trp62, 63 et 123 qui sont affectés.

Les pics les plus affectés par la présence des complexes correspondent aux tryptophanes 62 et 63 et, semble-t-il un peu moins fort, le Trp123. Les tryptophanes 62 et 63, situés au voisinage des sites de fixation, sont également les plus exposés au solvant, le changement d'intensité et de position des pics peut donc être dû à la présence des ions dans le solvant. Le pic du Trp111 est le moins affecté. Ce dernier résidu est éloigné des sites de fixation et est peu exposé au solvant.

Le pic du Trp108 semble moins affecté par la présence des ions Lu^{3+} et Gd^{3+} que le pic du Trp123, alors que leur exposition au solvant est analogue. Ceci indique un effet de fixation spécifique en proximité du Trp123. Mais cet effet peut aussi n'être dû qu'au hasard, car le déplacement et le changement d'intensité du pic peuvent être différents selon les conditions particulières qui affectent le résidu.

Comme les tryptophanes les plus exposés au solvant sont, à l'exception du Trp108, également les plus proches des sites de fixation, nous avons décidé d'enregistrer des spectres 2D ^1H - ^1H NOESY pour obtenir de l'information supplémentaire sur d'éventuelles interactions du complexe avec la protéine.

III.4.9. Spectres 2D ^1H - ^1H NOESY

Des spectres de RMN bidimensionnels sont obtenus en appliquant plusieurs impulsions de radiofréquence à l'échantillon avant de mesurer la décroissance du signal. Dans une expérience NOESY (Macura *et al.*, 1981) on mesure les effets dus à l'interaction de protons voisins dans l'espace. Ils interagissent par transfert d'énergie de résonance d'un proton excité à un proton non excité pendant le temps de mélange entre deux impulsions. Une expérience NOESY permet d'obtenir de l'information sur l'interaction de protons distants de moins de 6 Å, grâce aux pics de corrélation dus à l'effet Overhauser nucléaire (NOE).

III.4.9.a. Enregistrement des spectres 2D

Les échantillons utilisés correspondent aux échantillons a) et g) décrits ci-dessus. En outre, le spectre 1D ^1H du complexe Lu-HPDO3A seul a été enregistré pour identifier les positions des pics correspondant aux protons du ligand (figure 3.4.10).

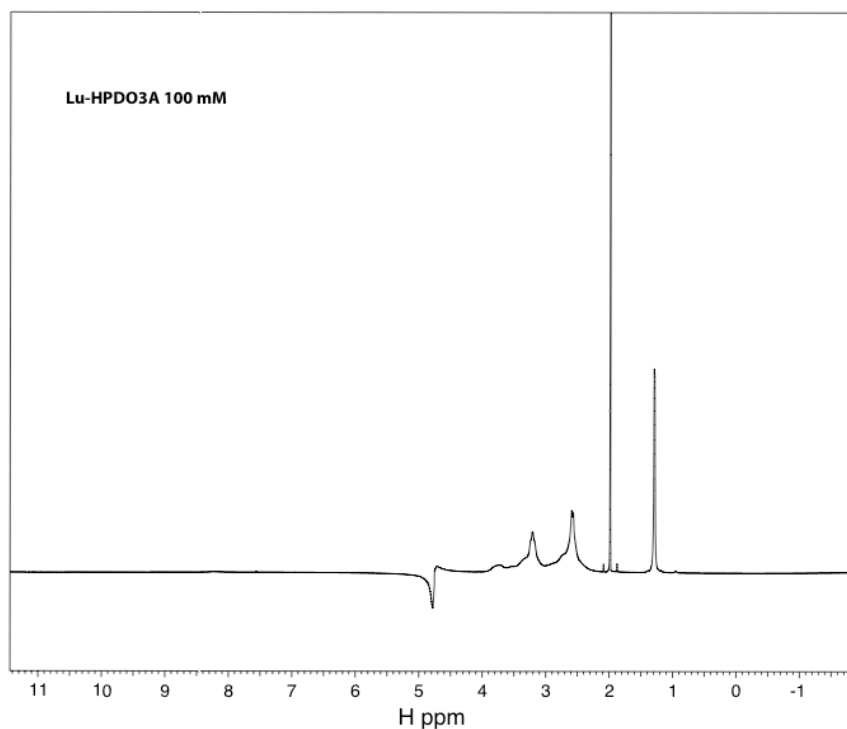


Figure 3.4.10 : Spectre 1D des protons du complexe Lu-HPDO3A.

III.4.9.b. Spécifications techniques

Les spectres 2D sont enregistrés avec le spectromètre 600MHz du LRMN de l'IBS. Le temps de mélange est de 300 ms et le temps de mesure pour un spectre est d'une nuit.

III.4.10. Spectres 2D ^1H - ^1H NOESY de lysozyme et de lysozyme avec 100 mM de Lu-HPDO3A

La figure 3.4.11 correspond au spectre NOESY de la protéine seul, la figure 3.4.12 au spectre de la protéine avec, en plus, 100 mM du complexe Lu-HPDO3A.

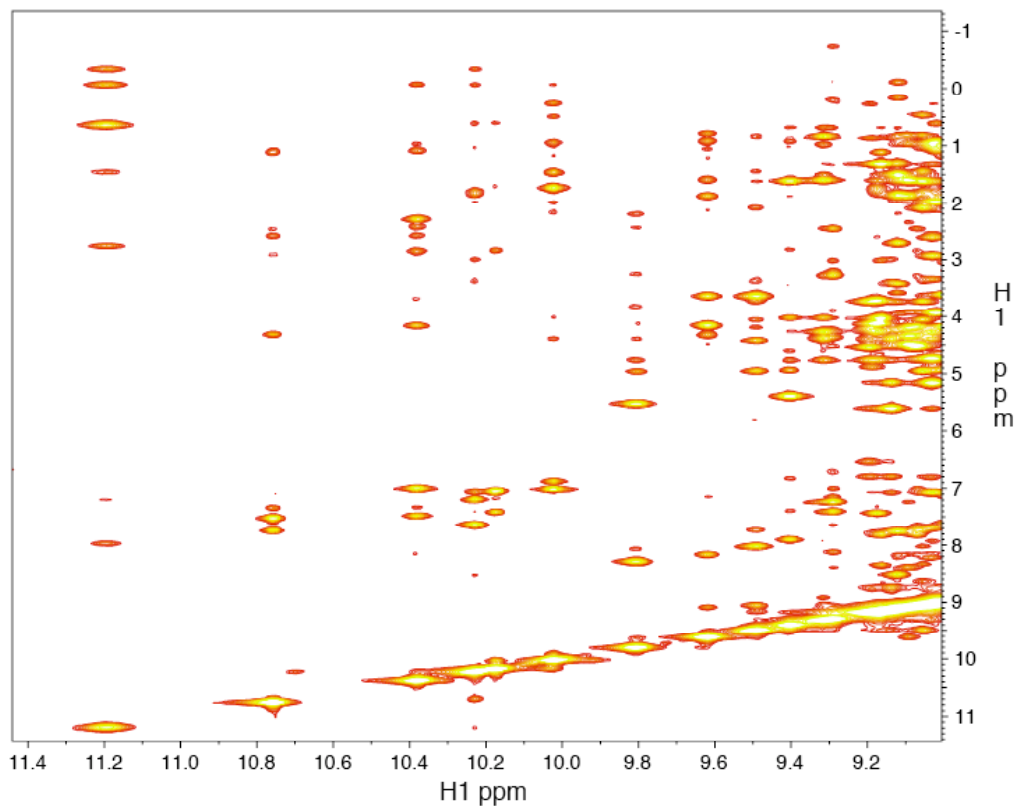


Figure 3.4.11 : Spectre ^1H - ^1H NOESY enregistré sur une solution de 2 mM de lysozyme. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

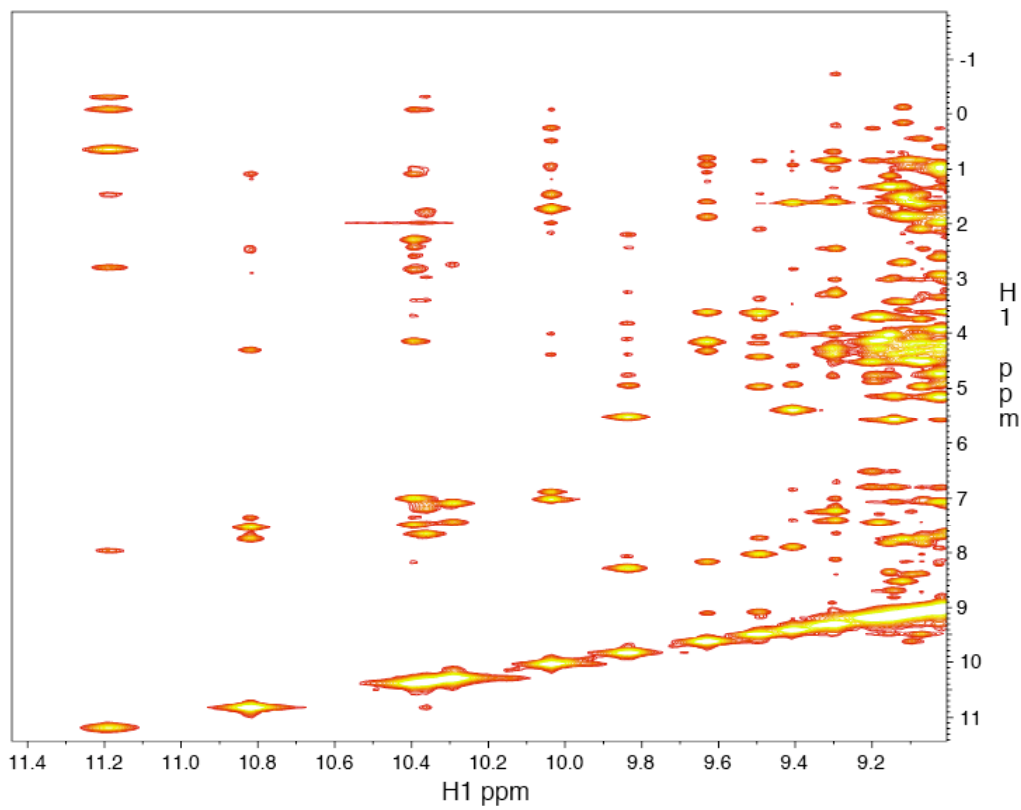


Figure 3.4.12 : Spectre ^1H - ^1H NOESY enregistré sur une solution de 2 mM de lysozyme avec 100 mM de Lu-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

Dans les spectres des figures 3.4.11 et 3.4.12, on observe, en bas du spectre, entre 10,0 et 10,8 ppm, les pics de résonance diagonaux des protons des tryptophanes. Ce sont les pics qui correspondent aux bandes observées dans les spectres 1D. On observe le même déplacement entre les pics diagonaux des tryptophanes des deux spectres que celui qui est observé dans les spectres 1D quand on ajoute le complexe de Lu^{3+} (figure 3.4.12). Le déplacement relatif entre les pics des deux spectres apparaît plus clairement dans la figure 3.4.13, qui superpose les spectres des figures 3.4.11 et 3.4.12.

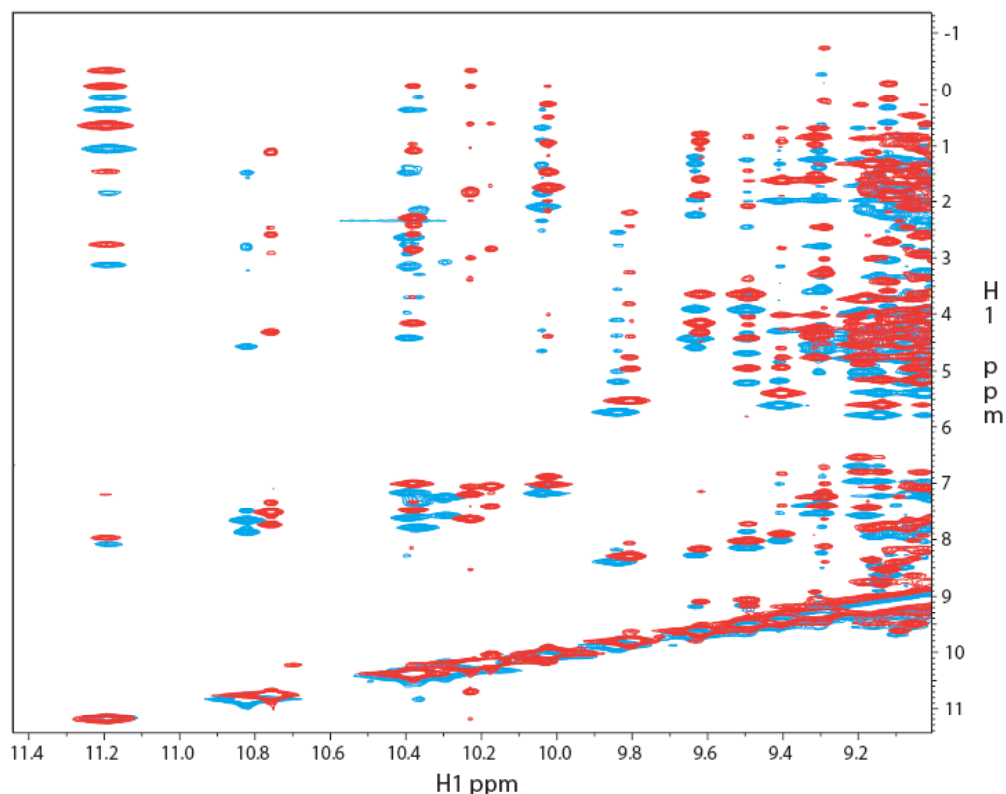


Figure 3.4.13 : Superposition des spectres enregistrés avec la solution protéique sans (rouge) et avec (bleu) 100 mM de Lu-HPDO3A. Agrandissement du domaine des tryptophanes.

Les pics diagonaux correspondant aux protons du ligand HPDO3A n'apparaissent pas dans les figures 3.4.12 et 3.4.13, car ils sont situés entre 1 et 5 ppm (voir spectre 1D du ligand seul : figure 3.4.10).

La figure 3.2.14 montre le spectre complet de la protéine avec le complexe Lu-HPDO3A. En raison de la concentration élevée du complexe, les pics correspondant aux protons du ligand forment des tracés entre 1 et 5 ppm. La forte intensité de ces pics par rapport au reste du spectre, empêche la détection d'éventuels pics de corrélation entre les protons du ligand et des protons de la protéine, qui résonnent dans le même domaine. Il est plus aisé de chercher de tels pics dans le domaine des fréquences de résonance des tryptophanes.

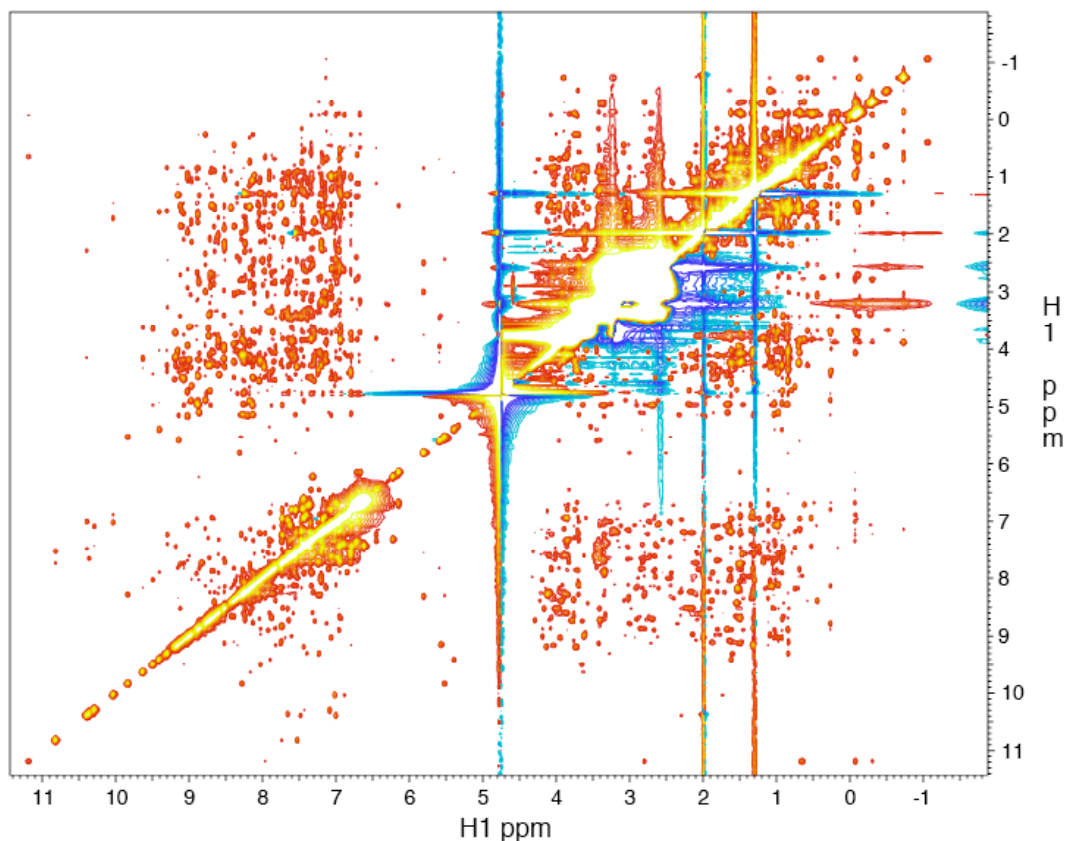


Figure 3.2.14 : Spectre ^1H - ^1H NOESY enregistré sur une solution de 2 mM de lysozyme avec 100 mM de Lu-HPDO3A. En raison de la concentration élevée du complexe, les pics correspondant aux protons du ligand forment des tracés entre 1 et 5 ppm.

III.4.11. Interprétation des spectres

S'il y avait fixation spécifique du complexe Lu-HPDO3A à proximité des tryptophanes 62, 63 et 123, des pics de corrélation entre les protons du ligand et le tryptophane considéré pourraient apparaître dans le spectre de la figure 3.4.12, alors que ces pics ne seraient pas présents dans la figure 3.4.11. Ces pics devraient apparaître aux fréquences de résonance des tryptophanes concernés. La comparaison du spectre de la figure 3.4.12 au spectre de la figure 3.4.11 ne montre aucune évidence d'apparition de tels pics.

III.4.12. Conclusions sur les expériences RMN 1D et 2D

Les expériences 1D et 2D n'ont pas permis de détecter la fixation du complexe sur la protéine, pourtant observée dans le cristal. Ceci peut être dû à différentes raisons : la fixation peut être trop peu spécifique, avec une constante de dissociation trop élevée pour permettre de détecter l'interaction.

Il se peut également que le complexe ne se fixe pas sur la protéine en solution. Il semble probable que la fixation du complexe dans le cristal de lysozyme soit favorisée par l'empilement cristallin qui forme une cavité autour des sites de fixation, impliquant trois molécules de protéine symétrique (voir chapitre II.4.8.).

Il serait intéressant de savoir si le résultat d'expériences analogues avec une protéine de la famille des ChBP serait le même, car pour ces protéines la cavité de fixation est également présente en solution.

Même si les résultats étaient plus probants, ce type d'expérience ne permettrait pas de détecter la fixation d'un complexe sur une protéine, de manière rapide et simple. En effet, l'expérience demande un équipement particulier (spectromètres RMN). De plus, l'interprétation des spectres est très compliquée, car les pics de la protéine ne sont généralement pas attribués et les différents complexes ne se fixent pas forcément sur les tryptophanes, et, enfin, l'expérience nécessite une grande quantité de protéine, de l'ordre de la dizaine de milligrammes.

III.5. La luminescence des lanthanides

III.5.1. Propriétés photophysiques des ions de lanthanides trivalents

Les cations trivalents des lanthanides ont la configuration électronique (Xe) $4fn$, avec n variant de 1 (Ce^{3+}) à 14 (Lu^{3+}). Les transitions des électrons f sont responsables des propriétés optiques des ions de lanthanides. La luminescence des lanthanides est caractérisée par une longue durée de vie des états excités, de l'ordre de la milliseconde (en comparaison, la durée typique de fluorescence de fond dans du matériel biologique (résidus aromatiques) est de l'ordre de la nano- à la microseconde). Les spectres d'absorption et d'émission sont composés de raies fines très marquées, et sont remarquablement insensibles à des changements environnementaux, dues au blindage des électrons f contre des perturbations extérieures par les orbitales $5s$ et $5p$ remplies.

C'est l'interdiction des transitions $f-f$ qui est responsable de la longue durée de vie des états excités, mais cette première résulte aussi en de faibles coefficients d'extinction des ions (de l'ordre de 0,3 (Tb^{3+}) à 3 (Gd^{3+}) $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ aux raies d'absorption (Binnemans & Görller-Walrand, 1995)), qui rendent difficile la photoexcitation directe des ions. Pour des ions de lanthanides en solution aqueuse, le rendement de luminescence est très faible, car les molécules d'eau de la première sphère de coordination donnent lieu à la désexcitation par voie non-radiative des états excités par couplage vibronique à des états vibrationnels des liaisons O-H (et N-H). La liaison des molécules d'eau entraîne également un fort raccourcissement de la durée de vie de la luminescence.

L'intensité de luminescence est proportionnelle à la concentration du lanthanide (Parker & Williams, 1996), dans la limite de concentrations "raisonnables", ne donnant pas lieu au phénomène d'extinction par effet de concentration (« concentration quenching »).

III.5.1.a. Choix des ions

De tous les ions Ln^{3+} , seuls les ions Eu^{3+} , Tb^{3+} , Gd^{3+} , Ce^{3+} , Dy^{3+} et Sm^{3+} luminescent de manière significative en solution aqueuse, à température ambiante (Horrocks, 1993). Au vu des conditions expérimentales accessibles, nous avons choisi de travailler avec l'euprimum et le terbium, leurs raies d'absorption et d'émission étant situées dans le domaine de l'ultraviolet et du visible. Nous avons également essayé d'utiliser la luminescence du Gd^{3+} , qui absorbe et qui émet dans l'ultraviolet. L'utilisation de la luminescence du Gd nous permettrait d'utiliser nos complexes sans essayer de remplacer l'ion Gd^{3+} des complexes utilisés par un autre ion de lanthanide. Cependant, comme le comportement de fixation des complexes sur les protéines

semble indépendant de l'ion Ln^{3+} chélaté (Girard *et al.*, 2003c) l'utilisation des complexes avec le gadolinium n'est pas impératif pour notre étude.

III.5.1.b. Émission stimulée par effet d'antenne (sensitized emission)

Pour les applications habituelles de lanthanides comme marqueurs luminescents, la faiblesse des coefficients d'absorption est généralement contournée en coordonnant l'ion avec un ligand qui contient un chromophore. Le chromophore, servant d'antenne, absorbe de la lumière et transfère de l'énergie sur l'ion qui luminesce. Le ligand sert également à exclure des molécules de solvant de la sphère de coordination de l'ion, ce qui empêche la désexcitation non-radiative de l'ion. En augmentant ainsi l'absorption de lumière et le rendement de luminescence, on obtient un signal fortement amplifié qui permet de détecter de faibles concentrations de l'agent luminescent, même en utilisant des sources de lumière peu intenses. Même pour des ions de lanthanides sans complexe "antenne", l'amplification de l'émission peut être importante. Ainsi, pour des ions de Tb^{3+} liés à des acides nucléiques, ces derniers servent d'antenne quand on irradie l'ensemble avec du rayonnement ultraviolet : les acides nucléiques absorbent la lumière et transmettent une partie de l'énergie aux ions Tb^{3+} qui transforment partiellement cette énergie en luminescence (Feig *et al.*, 1999). De manière analogue, les tryptophanes des protéines absorbent la lumière UV et transmettent de l'énergie aux ions Tb^{3+} liés à la protéine. Cet effet dépend de la distance entre l'antenne et l'ion, mais il peut être encore observé pour des distances sensiblement supérieures à 10 Å (Horrocks & Collier, 1981). Ce même effet n'est pas observé pour les ions Eu^{3+} .

III.5.1.c. Influence des molécules d'eau coordonnées à l'ion sur sa luminescence

Les molécules d'eau de la première sphère de coordination de l'ion provoquent le raccourcissement de la durée de vie et la baisse d'intensité de la luminescence. Le rendement de la désexcitation non-radiative, via les molécules d'eau liées, dépend de la différence d'énergie entre l'état excité, émissif, de l'ion, et le niveau vibrationnel de l'état fondamental le plus élevé. Plus la différence est faible, plus l'effet de désexcitation par voie non-radiative est fort. Pour les ions d'Eu, de Tb et de Gd, l'effet est le plus fort pour l'Eu, avec un rapport I_D/I_H^* de 40. Ce rapport est de 10 pour le Tb. Il est de 1 pour le Gd, pour lequel la différence d'énergie est la plus élevée, ce qui empêche le transfert d'énergie aux états vibrationnels des molécules d'eau.

* I_D/I_H : rapport des intensités de luminescence émises pour des ions dans une solution de D_2O et dans une solution de H_2O , les liaisons D-H ne permettant pas la désexcitation de l'ion.

III.5.1.d. Durée de vie de la luminescence

Des expériences en temps résolu, qui consistent à mesurer l'intensité émise après le délai t qui suit l'arrêt de l'excitation, permettent de déterminer la durée de vie de l'état excité de l'ion luminescent. Pour un seul environnement des ions luminescents, le déclin de la luminescence émise obéit à une loi exponentielle : $I(t) = I_0 \exp(-k_{obs} t)$, avec la constante de décroissance de luminescence observée dans l'eau : $k_{obs}^{\text{H}_2\text{O}} = k^0 + \sum k_i^{nr} + k_{OH}$, avec k^0 : constante de décroissance radiative, $\sum k_i^{nr}$: la somme des constantes de processus de désexcitation non-radiative autres que par les liaisons O-H de molécules d'eau liées, k_{OH} : constante de désexcitation non-radiative par transfert d'énergie aux oscillateurs O-H de molécules d'eau liées (Parker & Williams, 1996).

Le tableau 3.5.1 montre des durées de vie mesurées pour trois complexes d'euporium, pour des complexes en solution de H_2O et de D_2O (Anelli *et al.*, 1991). Dans les deux premiers

complexes, la sphère de coordination de l'ion comporte une molécule d'eau ; dans le complexe Eu-DO3A elle comporte deux molécules d'eau (voir chapitre I.5.2). Si, lors de la fixation du complexe à la protéine, ces molécules d'eau sont remplacées par des résidus protéiques, alors l'effet sur la durée de vie de la luminescence du complexe lié devrait être le même que lorsqu'on remplace les molécules d'eau entourant le complexe par des molécules de D₂O.

Complexe	τ_{D_2O} , 77K [ms]	τ_{H_2O} , 77K [ms]	τ_{D_2O} , 300K [ms]	τ_{H_2O} , 300K [ms]
Eu-DOTA	2,3	0,89	2,6	0,65
Eu-HPSA-DO3A	2,4	0,93	2,3	0,62
Eu-DO3A	0,74	0,38	0,70	0,31

Tableau 3.5.1 : Durées de vie mesurée pour les différents complexes d'euporium dans une solution de D₂O et dans une solution de H₂O, à température ambiante et à température cryogénique. La durée de vie est mesurée pour l'émission correspondant à la transition ⁵D₀ -> ⁷F₁.

III.5.1.e. Influence de l'environnement sur la forme du spectre d'émission

La forme du spectre d'émission est relativement peu sensible à l'environnement de l'ion, car les électrons de la couche f sont blindés contre des perturbations extérieures par les électrons 5s et 5p. Pour les complexes des lanthanides, le changement du profil du spectre est d'autant moins important que l'environnement de l'ion est principalement imposé par le ligand qui l'entoure. L'environnement de l'ion peut avoir une influence sur l'intensité relative de certaines raies d'émission (transitions hypersensibles) (Eu : 615 nm, Tb : 490 nm) (Horrocks & Albin, 1991).

III.5.1.f. Applications en biologie

La luminescence des lanthanides, en particulier à travers l'utilisation de complexes de lanthanides blindant l'ion contre le solvant et comportant un chromophore, joue un rôle important pour les marqueurs employés dans la microscopie de fluorescence, ou, pour des dosages immunologiques par fluorescence (fluoroimmunoassays), en utilisant un complexe contenant un ion Ln³⁺ lié à l'anticorps ou à l'antigène de la substance à détecter. La longue durée de vie de la luminescence permet, par des expériences en temps résolu, de distinguer la luminescence du marqueur de la fluorescence de fond du matériel biologique.

Une autre application est l'étude des sites de fixation des ions Ca²⁺ ou Mg²⁺ dans les protéines. Avec un rayon ionique proche de celui de ces derniers ions, les ions de lanthanides ont une forte affinité pour la protéine à ces sites de fixation. L'inspection de la luminescence des ions Ln³⁺ liés à la protéine dans ces sites permet de caractériser leur environnement, en particulier le nombre de molécules d'eau remplacées lors de la liaison de l'ion, et, par là même, de déterminer le nombre de sites de fixation différents (Bünzli & Pfefferle, 1994; Elbanowski & Makowska, 1996). Le titrage de la protéine avec des ions de lanthanides permet, par une expérience de compétition, la comparaison d'affinités de différents ions pour le site de fixation (Feig *et al.*, 1999).

III.5.2. But : détecter la fixation de nos complexes sur les protéines

Le but de l'expérience est de détecter la fixation d'un complexe à une protéine, soit en solution, soit dans le cristal. Le problème est que l'émission de luminescence des molécules de

complexe liées à la protéine sera superposée à l'émission des molécules présentes à forte concentration dans le solvant. En outre, comme les ions sont engagés dans les complexes, leur environnement direct ne change que très peu lors de l'interaction avec la protéine et il y a donc peu de chance de pouvoir observer de fortes différences dans les caractéristiques de la lumière émise.

Il n'est pas possible de se débarrasser des ions non-liés présents dans les canaux de solvant, car il est probable que le lavage du cristal (back-soak) dans une solution ne contenant pas de complexe entraînerait non seulement une diminution de la concentration de complexe dans le solvant mais aussi une diminution du taux d'occupation des molécules de complexe dans les sites de fixation. En effet, des études préliminaires sur des cristaux dérivés contenant un complexe d'euporium de taille comparable à la taille de nos complexes et utilisant la luminescence des lanthanides, indiquent que, dans un cristal dérivé trempant dans une solution qui ne contient pas de complexe, les molécules de complexe se dissocient des sites de fixation avec un temps caractéristique de l'ordre de quelques minutes. (G. Pompidor, IBS-LCM, communication privée)

Il serait intéressant de voir, si, avec des mesures précises et en choisissant de manière astucieuse les conditions expérimentales, il serait possible de détecter certains effets dus à la fixation d'un complexe sur une protéine. De tels effets pourraient être :

- a) Le changement de durée de vie par le remplacement de molécules d'eau, avec un effet attendu le plus fort pour un complexe d'Eu. Ceci nécessite que la fixation du complexe se fasse via la coordination de l'ion par des résidus protéiques, remplaçant ainsi la (ou les) molécule(s) d'eau liée(s) à l'ion (voir, au chapitre II.4, les modes de fixation affinés). Une expérience en temps résolu permettrait de distinguer la luminescence des molécules de complexe non-liées, hydratées, de la luminescence des ions liés à la molécule qui décroîtrait moins rapidement.
- b) Le changement d'intensité résultant des trois effets suivants :
 - dans le cas d'un cristal, de l'augmentation de concentration du complexe due à la fixation du complexe à la protéine,
 - de l'éventuel remplacement de molécules d'eau liées à l'ion de lanthanide par des résidus protéiques,
 - éventuellement, avec les ions Tb^{3+} et en utilisant une source de lumière UV, par une augmentation de la luminescence par transfert d'énergie absorbée par les tryptophanes sur les ions.
- c) Distinguer les molécules de complexe de Tb^{3+} en solution de celles qui sont liées à des tryptophanes (lysozyme, ChBP), par excitation avec un rayonnement absorbé par les tryptophanes mais non pas par les ions. Cependant, il n'est pas sûr que le complexe et la protéine soient liés pendant suffisamment longtemps pour permettre le transfert d'énergie. Et dans ce cas, le transfert se fera-t-il de manière privilégiée sur les ions des complexes liés et non pas sur les ions dans le solvant ?

L'étude du changement d'intensité de luminescence dû à la fixation du complexe à la protéine dans le cristal n'est possible qu'en comparant différents complexes dans des cristaux d'une même protéine, car la concentration apparente dépend du contenu de solvant du cristal. Pour une concentration de 100 mM des molécules de complexe non-liées dans les canaux de solvant d'un cristal de lysozyme et de glucose isomérase, avec des pourcentages de solvant respectifs de 29% et 48%, la concentration apparente est de 29 mM et de 48 mM. Si on considère que les molécules de complexe liées s'ajoutent aux molécules de complexe libres et en supposant qu'une molécule de complexe se lie à une molécule de protéine, avec la concentration de protéine dans le cristal de 14 mM pour la glucose isomérase (voir chapitre

I.5.4.) et de $C_p = \frac{16}{V_{\text{maille}} \times N_A} = 120mM$ pour le lysozyme, la fixation du complexe entraînerait

donc une augmentation notable de la concentration, de 30 % et de 400% respectivement.

Les effets attendus dépendront des conditions expérimentales, de l'ion de lanthanide utilisé, mais également du mode de fixation du complexe sur la protéine (fixation par le côté ionique, par le côté du macrocycle, via des tryptophanes...).

La mesure des effets mentionnés ci-dessus nécessite un montage expérimental qui permette de choisir une longueur d'onde d'excitation dans le domaine d'absorption des ions ou d'éventuelles antennes et détecter le rayonnement à la longueur d'onde d'émission. Il est nécessaire de pouvoir quantifier la luminescence mesurée et de pouvoir réaliser des expériences en temps résolu avec des temps caractéristiques de l'ordre de la milliseconde.

III.5.3. Expériences de luminescence avec des complexes et des ions de lanthanides avec des cristaux et des solutions de protéine

III.5.3.a. Choix de la longueur d'onde de la lumière incidente

Pour l'excitation directe des ions, les spectres d'absorption correspondent aux spectres d'excitation, ce qui correspond à un rendement relativement constant (Anelli *et al.*, 1991). Pour une excitation directe efficace il faut donc viser des raies d'absorption. Le tableau 3.5.2 montre les domaines d'absorption et d'émission des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} décrits dans la littérature.

	Raies d'absorption [nm]	Raies d'émission [nm]
Eu^{3+}	250, 280-330, 355-360, 370-400	585-600, 610-630, 577-581, 700
Tb^{3+}	245-300 ^a , 300-380 ^b	280-330, 355-360, 370-400, 485-500, 540-555

Tableau 3.5.2 : Longueurs d'onde des raies d'absorption et émission pour les ions Eu^{3+} et Tb^{3+} . ^a : forte absorption, ^b : faible absorption. (Elbanowski & Makowska, 1996 ; Binnemans & Görrler-Walrand, 1995 ; Binnemans & Görrler-Walrand, 1995 ; Anelli *et al.*, 1991). Dans Horrocks & Albin (1991), les spectres sont enregistrés avec des solutions de $[\text{LnEDTA}]$, dans Binnemans & Wallrand (1995) avec des solutions de perchlorate de Ln(III). Toutes les gammes de longueur d'onde sont approximatives.

Pour une absorption de la lumière par les résidus de protéine aromatiques il faut travailler avec une source de lumière UV. Le maximum d'absorption des tryptophanes est situé à 280 nm (Brooks, 2005).

En travaillant avec une source de lumière de longueur d'onde supérieure à 300 nm on exclue le transfert d'énergie via les résidus aromatiques.

III.5.3.b. La luminescence de l'ion Gd^{3+}

L'ion Gd^{3+} présente plusieurs raies d'absorption vers 275 nm (Binnemans & Görrler-Walrand, 1995). La seule raie d'émission relativement intense est située vers 310 nm (Anelli *et al.*, 1991), elle coïncide avec le domaine d'émission des résidus aromatiques de la protéine et ne pourra probablement en être distinguée que par des expériences en temps résolu.

III.5.3.c. Synthèse des complexes de lanthanides

Notre premier problème pour procéder aux expériences de luminescence a été que nous ne disposions que des complexes de Gd^{3+} et non pas des complexes analogues d' Eu^{3+} ou de Tb^{3+} . Par la suite, nous avons pu obtenir les complexes Eu-DOTA et Eu-HPSA-DO3A de la part de

Pier Lucio Anelli de la société Bracco Imaging, qui nous avait déjà fourni la plupart des complexes de gadolinium. Nous avons également contacté l'équipe de David Parker (Parker & Williams, 1996) qui devait nous fournir du complexe Eu-DO3A qui ne nous est pas encore parvenu.

En fait, lorsqu'on dispose du ligand et du sel de lanthanide, la synthèse des complexes est relativement facile et nous aurions pu la faire nous-mêmes. Grâce à la forte affinité des ligands pour les ions de lanthanides, il suffit d'ajouter la quantité stœchiométrique de sel de lanthanide à la solution du ligand. Cependant, parmi les huit ligands, trois seulement sont disponibles commercialement : les ligands DTPA, DOTMA et DOTA. Remplacer un ion de lanthanide chélaté par le ligand contre un autre ion est beaucoup plus délicat : pour dissocier le ligand de l'ion d'origine, il faut travailler dans des conditions très acides tout en chauffant pendant plusieurs jours ce qui nécessite des équipements dont nous ne disposons pas à l'IBS.

III.5.4. Conditions expérimentales

Les expériences de luminescence ont été réalisées avec le microspectrophotomètre du " cryobench ", équipement installé à l'ESRF en collaboration avec l'IBS, et qui est habituellement utilisé pour des études d'absorption et fluorescence de cristaux de protéines dans l'UV/visible (Bourgeois *et al.*, 2002). Les expériences ont été réalisées avec l'aide d'Antoine Royant (LCCP, IBS) qui m'a montré comment utiliser cet équipement.

III.5.4.a. Spécifications techniques du microspectrophotomètre utilisé

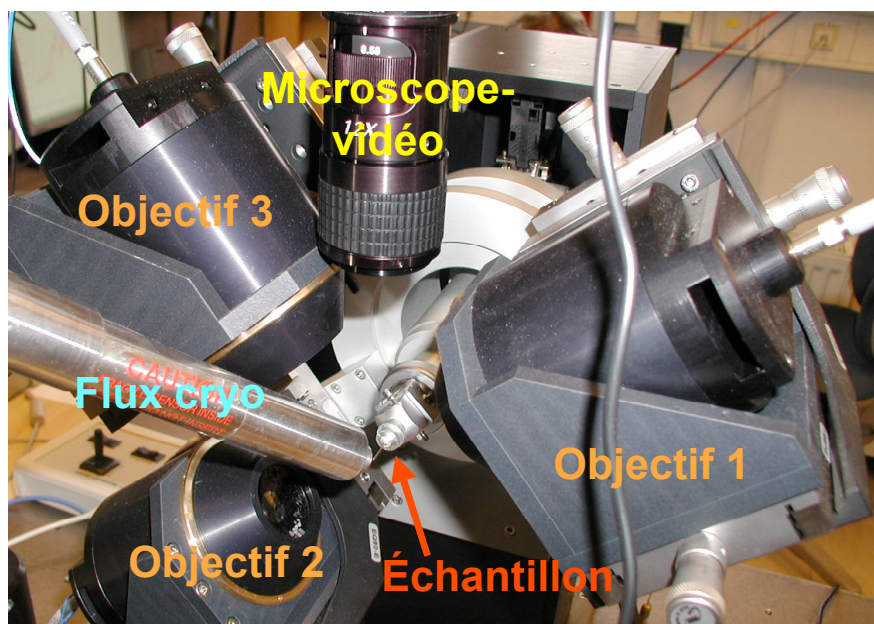


Figure 3.5.1 : Montage expérimental sur le " cryobench ".

La figure 3.5.1 montre le montage expérimental utilisé. L'échantillon est monté dans une boucle standard sur une tête goniométrique. L'expérience peut se faire soit à température ambiante, soit avec un échantillon congelé sous flux d'azote gazeux. La lumière est amenée sur l'échantillon à travers un premier objectif qui est relié à la source de lumière par une fibre optique. Un deuxième objectif, face au premier, recueille la lumière envoyée au détecteur qui permet de mesurer des spectres d'absorption. Un troisième objectif, à 90° de la lumière

incidente, permet l'acquisition de spectres de fluorescence. Un microscope permet d'observer l'échantillon et de régler les objectifs et les fentes pour pouvoir concentrer la lumière incidente sur l'échantillon et recueillir la lumière transmise ou émise à travers les deux autres objectifs. L'échantillon peut être un cristal de protéine ou une goutte de solution. Dans le deux cas, la quantité de protéine utilisée est assez faible, avec un volume de l'échantillon de l'ordre de 10^{-12} - 10^{-9} L. Nous avons effectué toutes les expériences à température cryogénique, ce qui empêche l'échantillon de sécher et peut retarder d'éventuels dégâts d'irradiation. Les sources de lumière disponibles sur le microspectrophotomètre sont des lasers avec des longueurs d'onde d'émission de 266 nm, 355 nm et 532 nm et une lampe de lumière blanche émettant un spectre avec une intensité relativement constante sur l'ensemble du domaine UV/visible. Le détecteur CCD « one-shot » utilisé, permet l'acquisition rapide de spectres d'émission UV/visible avec une résolution de 2,3 nm.

III.5.4.b. Problèmes expérimentaux

Le montage, simple, fait que le signal à détecter doit être relativement intense (pertes dans les objectifs, passage à travers l'air, lumière diffusée...). Ceci, ajouté à la faible taille de l'échantillon, fait que nous n'avons pas pu détecter de signaux de luminescence, ni acquérir des spectres d'absorption en utilisant la source de lumière blanche. Nous n'avons pu détecter des signaux de luminescence provenant des ions de lanthanide qu'en utilisant les lasers. Notre choix de longueur d'onde d'excitation a donc été restreint aux longueurs d'onde 266 nm et 355 nm. Il n'est pas possible, sur ce montage, de faire des expériences en temps résolu et l'acquisition des spectres se fait en même temps que l'irradiation. C'est pourquoi nous ne pouvons ni déterminer la durée de vie des états excités des ions luminescents, ni distinguer la luminescence d'ions dans des environnements différents (liés, non-liés), ni enfin nous débarrasser de la fluorescence de fond du matériau biologique utilisé.

De nombreux phénomènes peuvent venir perturber la mesure : l'intensité du signal de luminescence dépend fortement de l'orientation de l'échantillon dans le trajet de la lumière, il peut y avoir des réflexions, des perturbations par le porte-échantillon, etc... Il n'est donc pas possible de réaliser des mesures d'intensité quantitatives absolues qui permettraient de comparer les signaux de différents échantillons, mais il est possible de comparer l'intensité relative de différentes raies d'émission. La nécessité de travailler avec une lumière excitatrice intense peut entraîner une dégradation rapide de l'échantillon lorsqu'on travaille avec le laser ultraviolet (voir figure 3.5.15).

III.5.4.c. Porte-échantillons utilisés

Pour nos premières expériences, nous avons utilisé des boucles en nylon comme porte-échantillon. Pour les expériences suivantes, nous avons travaillé avec des boucles lithographiées en mylar, car le nylon est lui-même fluorescent. On s'est alors aperçu que, sur les boucles de mylar utilisées pour la première fois, des impuretés fluorescaient fortement lorsqu'on les irradiait avec de la lumière ultraviolette, et leur fluorescence pouvait, selon la géométrie utilisée, perturber fortement nos spectres d'émission (figure 3.5.12).

III.5.5. Expériences de luminescence

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer des conditions expérimentales, comme la longueur d'onde et l'intensité de la lumière excitatrice, adaptées à l'acquisition des spectres de luminescence avec les différents échantillons.

La longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et le temps d'acquisition (t) sont indiqués sur tous les spectres présentés. Dans ces spectres, la raie observée à la longueur d'onde de la lumière excitatrice correspond à un reflet de la lumière incidente, la raie à 730 nm à un artefact du détecteur.

Les protéines utilisées sont le lysozyme de blanc d'œuf de poule et la glucose isomérase (GI) de *Streptomyces rubiginosus*.

III.5.5.a. Préparation des échantillons

Les cristaux utilisés sont obtenus avec les conditions de cristallisation décrites en II.1.3. Sauf mention contraire, les cristaux sont cryoprotégés par trempage dans une solution cryoprotectrice et les solutions de protéine et de complexes de lanthanides par ajout de la quantité nécessaire d'agent cryoprotecteur afin d'éviter la formation de cristaux de glace, qui provoqueraient une forte diffusion de la lumière émise.

III.5.6. Spectre de fluorescence d'un cristal et d'une solution de protéine native

Les figures 3.5.2 et 3.5.3 montrent la fluorescence des échantillons de protéine, dont il faut tenir compte pour l'interprétation des spectres qui suivent, puisque, avec ce montage expérimental, on ne peut pas séparer la fluorescence de fond, de courte durée de vie, de la luminescence émise par les lanthanides. Les échantillons biologiques et la boucle de nylon fluorescent, avec un large domaine d'émission entre 400 et 500 nm (figure 3.5.2), fluorescence à laquelle s'ajoute, lorsque l'échantillon est irradié avec de la lumière ultraviolette, la forte fluorescence des résidus aromatiques, avec un maximum d'émission autour de 330 nm (figure 3.5.3).

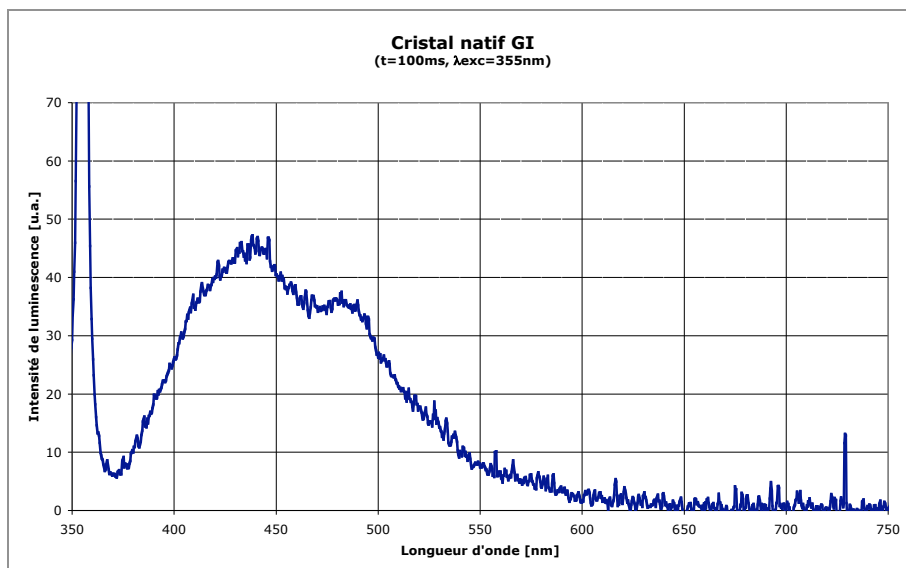


Figure 3.5.2. : Spectre de luminescence d'un cristal de glucose isomérase native, irradié avec un laser de longueur d'onde 355 nm. La raie à 355 nm correspond à un reflet de la lumière excitatrice, la raie à 730 nm à un artefact du détecteur. L'émission entre 400 et 500 nm provient de la fluorescence de la protéine et de la boucle de nylon.

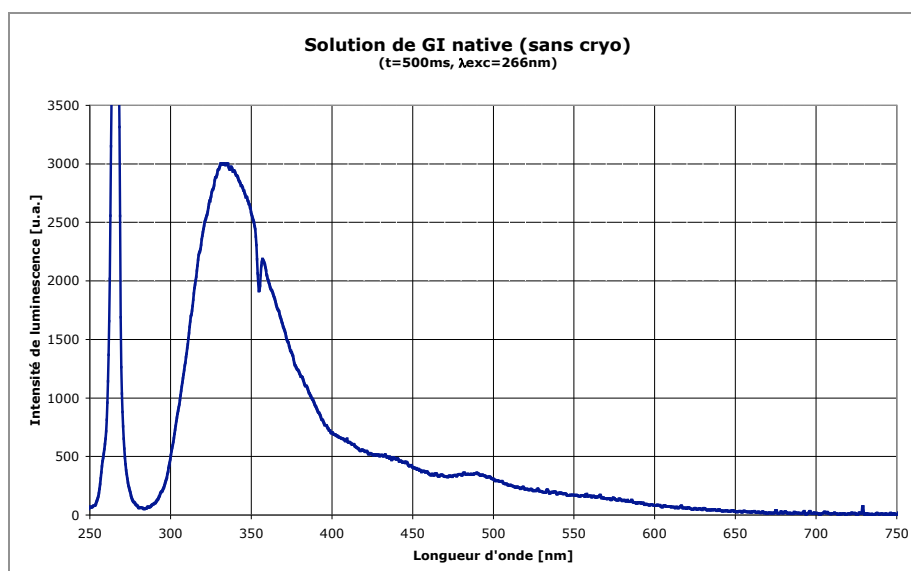


Figure 3.5.3. : Spectre de luminescence d'un cristal de glucose isomérase native, irradié avec un laser de longueur d'onde 266 nm. La forte luminescence avec un maximum autour de 330 nm correspond à la fluorescence des résidus aromatiques. L'incision vers 355 nm est un artefact du détecteur.

Le tableau 3.5.3 résume les caractéristiques de la luminescence des résidus aromatiques. On remarque les valeurs assez élevées du coefficient d'absorption et du rendement de fluorescence, en particulier pour le tryptophane.

	Absorption		Fluorescence		
	Longueur d'onde [nm]	Coefficient d'absorption molaire	Longueur d'onde [nm]	Durée de vie [ns]	Rendement de fluorescence
Tryptophane	280	5600	348	2,6	0,20
Tyrosine	274	1400	303	3,6	0,14
Phénylalanine	257	200	282	6,4	0,04

Tableau 3.5.3. : Caractéristiques de la fluorescence des résidus aromatiques (Brooks, 2005).

III.5.7. Résultats d'expériences préliminaires avec des ions de lanthanides

Comme nous ne disposons pas de complexes d' Eu^{3+} ou de Tb^{3+} nous avons d'abord procédé à des expériences préliminaires avec des ions de lanthanides.

III.5.7.a. Interaction des ions Ln^{3+} avec les protéines

Il est connu que la glucose isomérase lie fortement les ions de lanthanides sur ses sites de fixation des métaux divalents Ca, Mn ou Mg (Rey *et al.*, 1988). Le lysozyme, quant à lui, ne lie pas les ions de lanthanides.

III.5.7.b. Préparation des échantillons

Les cristaux dérivés de protéine avec les ions de lanthanides ont été préparé en ajoutant de la solution de chlorure d'euprium, EuCl_3 , ou de nitrate de terbium, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$, à la goutte contenant les cristaux natifs de protéine. Les volumes ajoutés ont été calculés pour obtenir une concentration de 1 à 10 mM de sel de lanthanide dans la goutte. Les gouttes ont été mises en équilibre avec le puits pendant plusieurs jours. Lors de la manipulation des échantillons contenant des sels de lanthanides, j'ai bien fait attention d'éviter toute contamination de personne ou de matériel, car, contrairement aux complexes qu'on utilise habituellement, les sels des lanthanides sont toxiques.

III.5.7.c. Expériences de luminescence avec l'ion Tb^{3+}

La figure 3.5.4 représente le spectre enregistré avec une solution de Tb^{3+} à une concentration de 50 mM. Ce spectre présente les raies d'émission caractéristiques du Tb^{3+} . La raie d'émission à 580 nm est dédoublée. La figure 3.5.5 représente le spectre enregistré avec une solution contenant la protéine glucose isomérase et des ions de terbium. On y distingue toujours clairement les raies d'émission du terbium.

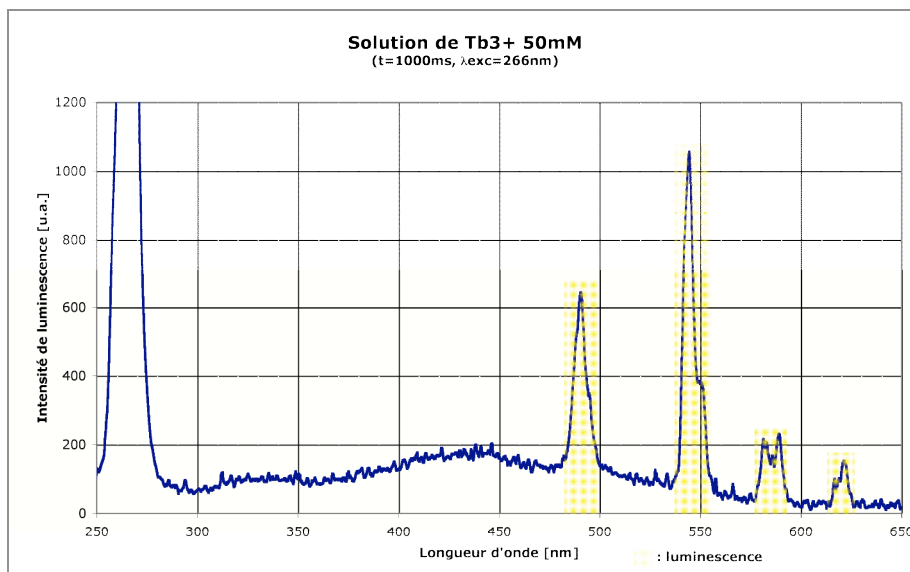


Figure 3.5.4. : Spectre d'émission d'une solution de Tb^{3+} . Les raies d'émission sont situées aux longueurs d'onde 490, 544, 583 et 621 nm.

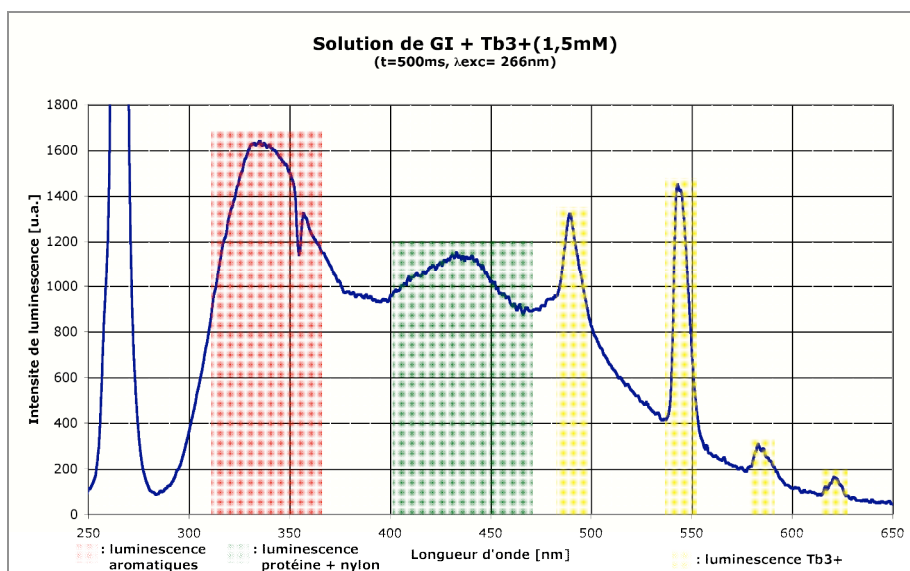


Figure 3.5.5. : Spectre d'émission d'une solution de glucose isomérase avec 1,5 mM de Tb^{3+} . Les raies d'émission du Tb^{3+} sont superposées au spectre d'émission de la protéine, mais se distinguent clairement.

III.5.7.d. Résultats des expériences avec les ions Tb^{3+}

Avec le laser à 266 nm, on excite dans une zone de forte absorption (voir figure 3.5.6). Ainsi, nous avons une forte excitation directe (figure 3.5.4) des ions Tb^{3+} en solution qui conduit à des raies d'émission très prononcées, malgré le faible rendement de luminescence des ions en solution aqueuse. Les raies d'émission sont situées aux longueurs d'onde de 490, 544, 583 et 621 nm, avec des raies dédoublées à 544 et à 621 nm.

Les raies d'émission des ions en présence de la glucose isomérase, qui lie les ions, (figure 3.5.5) sont situées aux mêmes longueurs d'onde et sont à peu près aussi intense que les raies du spectre de la figure 3.5.4. Cependant, le temps d'acquisition du spectre enregistré avec la protéine est deux fois plus court et la concentration des ions Tb^{3+} est 33 fois moins élevée que pour le spectre de l'ion en solution. Que l'intensité de luminescence soit aussi forte pour le spectre enregistré avec la protéine peut avoir deux causes : a) la liaison des ions Tb^{3+} par les résidus protéiques qui remplacent des molécules d'eau de la sphère de coordination, ce

qui augmente le rendement de luminescence des ions et, éventuellement, b) l'émission amplifiée par transfert d'énergie des tryptophanes de la protéine (la glucose isomérase a huit tryptophanes dans sa séquence, dont deux à proximité des sites de fixation des ions, à 5,5 et 6,8 Å respectivement). Nous ne savons pas quelle est la raison du dédoublement des raies d'émission du spectre de l'ion en solution.

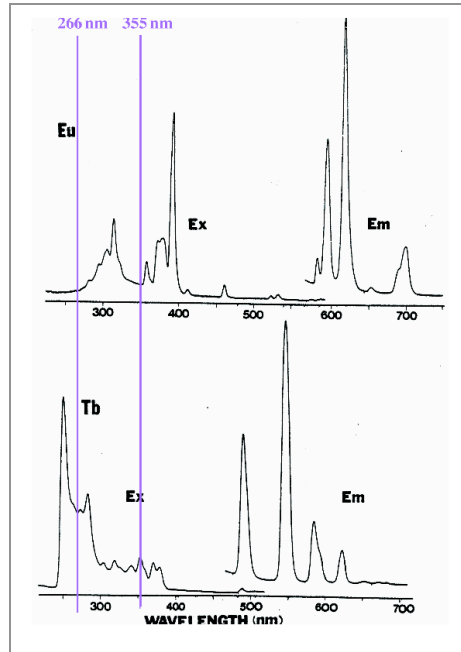


Figure 3.5.6. : Spectres d'excitation et d'émission pour l'euprimum et le terbium enregistrés sur des solutions de [LnEDTA]⁻ (Horrocks & Albin, 1991).

III.5.7.e. Expériences de luminescence avec l'ion Eu^{3+}

La comparaison des spectres obtenus avec deux cristaux de protéine trempés dans une solution de 10 mM d' Eu^{3+} et irradiés avec de la lumière à 355 nm, montre que le signal obtenu avec le cristal dans lequel les ions de lanthanides sont fortement liés (figure 3.5.8) montre des raies de luminescence de l'ion beaucoup plus fortes que le signal obtenu pour le cristal dans lequel les ions ne sont pas liés (figure 3.5.7).

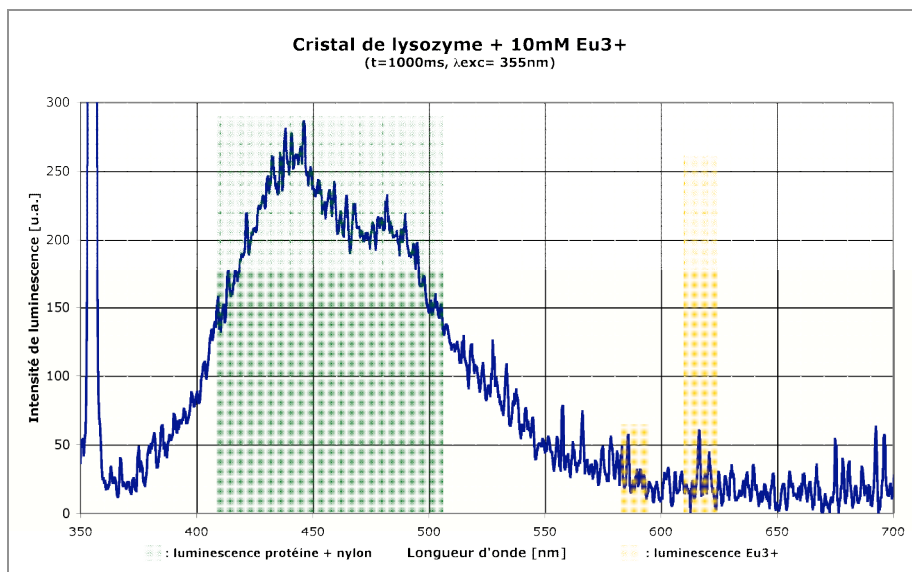


Figure 3.5.7. : Spectre de fluorescence d'un cristal de lysozyme trempé dans une solution contenant 10 mM d'Eu³⁺, irradié avec un laser de longueur d'onde 355 nm.

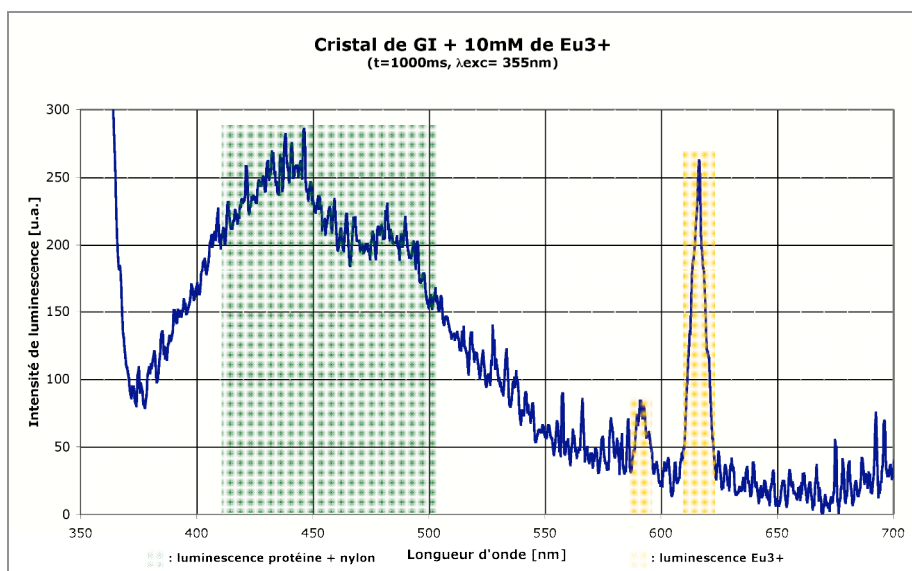


Figure 3.5.8. : Spectre de fluorescence d'un cristal de glucose isomérase trempé dans une solution contenant 10 mM d'Eu³⁺, irradié avec un laser de longueur d'onde 355 nm.

L'amplification du signal de luminescence due à la fixation des ions dans le cristal de protéine peut avoir deux causes : a) l'augmentation de la concentration des ions dans le cristal où les ions sont liés et b) le remplacement des molécules d'eau de la sphère de coordination des ions liés par des atomes des résidus protéiques.

III.5.8. Expériences avec les complexes de lanthanides

Alors qu'avec les ions de lanthanides, il est facile de détecter leur fixation sur des protéines, ceci s'avère moins facile avec les complexes. Le rendement de luminescence des ions complexés est plus fort que celui des ions en solution aqueuse et l'effet d'amplification du signal lors de la fixation du complexe, dû au remplacement des molécules d'eau, est donc beaucoup plus faible, sinon inexistant. L'affinité beaucoup plus faible des complexes pour les protéines, comparée à celle des ions pour la glucose isomérase par exemple, fait que les

différences de concentration entre les molécules de complexe liées et non-liées seront également plus faibles.

Les résultats obtenus avec les deux seuls complexes d'Eu³⁺ dont nous disposons et avec plusieurs complexes de Gd³⁺ sont présentés ci-dessous.

III.5.8.a. Expériences avec les complexes d'euporium

La figure 3.5.9 montre les raies d'émission d'une solution de Eu-DOTA irradiée avec de la lumière ultraviolette. Le spectre présente des raies étroites et intenses qui correspondent exactement aux spectres donnés dans la littérature pour des complexes d'euporium de même type (Anelli *et al.*, 1991). On remarque la différence du spectre du complexe par rapport au spectre de l'ion (irradié à 355 nm), ce dernier ne présente que la raie très intense vers 615 nm et une raie beaucoup moins forte vers 590 nm.

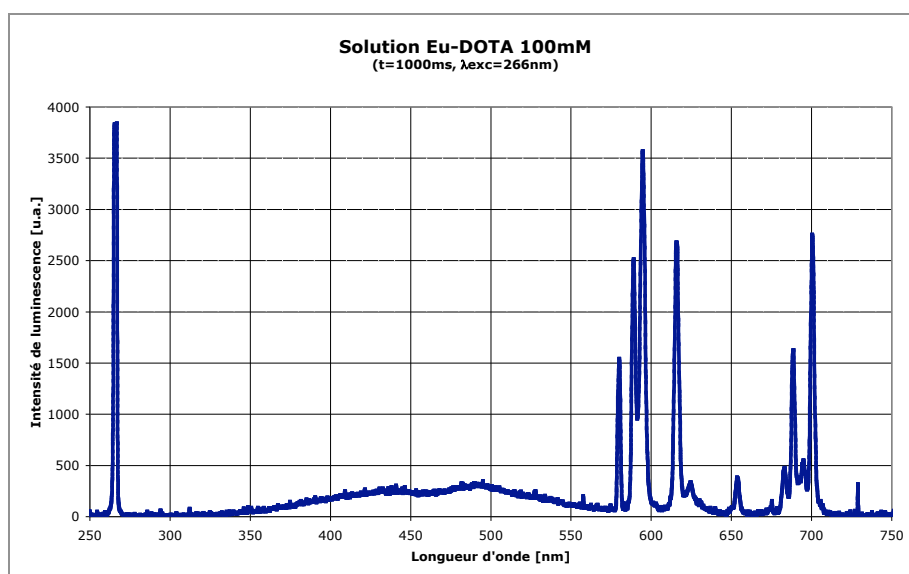


Figure 3.5.9. : Spectre de fluorescence d'une solution du complexe Eu-DOTA à 100 mM.

III.5.8.b. Préparation des cristaux dérivés

Les cristaux dérivés de glucose isomérase ont été préparés par trempage des cristaux natifs dans des solutions contenant 100 mM du complexe de lanthanide. Les cristaux dérivés de lysozyme ont été préparés par cocristallisation avec 100 mM du complexe correspondant.

III.5.8.c. Spectres obtenus

Les figures 3.5.10 et 3.5.11 montrent les spectres de fluorescence des cristaux dérivés du lysozyme et de la glucose isomérase avec le complexe Eu-DOTA. Le lysozyme lie le complexe Eu-DOTA avec des taux d'occupation relativement élevés alors que la glucose isomérase ne lie pas le complexe. Dans le lysozyme, le complexe se fixe dans des sites très proches de tryptophanes (voir chapitre II.4.8). Dans les deux spectres, les raies d'émission du complexe se détachent bien de la fluorescence de fond et correspondent au spectre observé pour le complexe seul. Malheureusement, une comparaison quantitative des deux spectres n'est pas possible, car l'intensité du signal dépend de l'orientation du cristal. On ne peut pas non plus se référer à la hauteur du pic de fluorescence des résidus aromatiques, car ceux-ci se dégradent très vite sous irradiation avec de la lumière ultraviolette (voir figures 3.5.15).

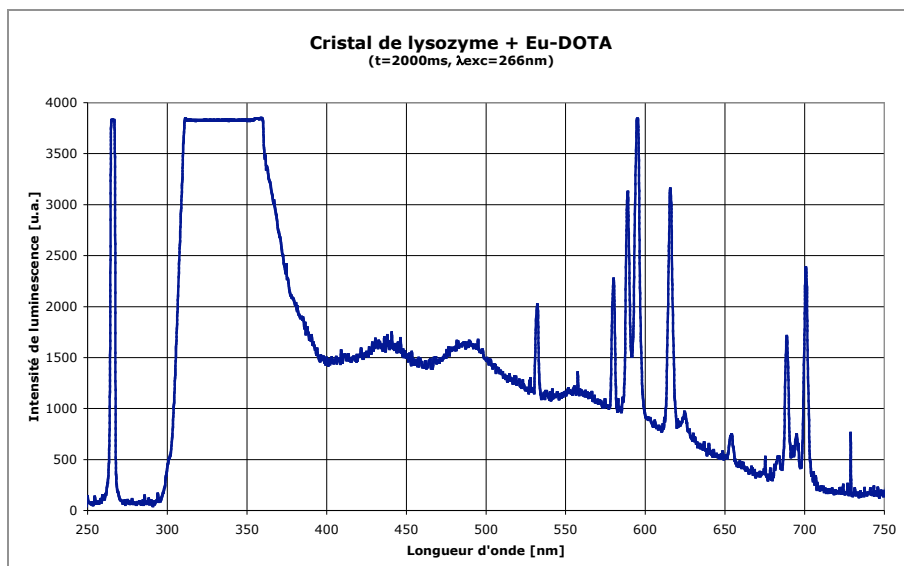


Figure 3.5.10. : Spectre de fluorescence d'un cristal de lysozyme cocristallisé avec 100 mM de Eu-DOTA. Les émissions de fluorescence dans le domaine ultraviolet saturent le détecteur. La raie à 532 nm est un artefact expérimental et correspond à deux fois la longueur d'onde excitatrice.

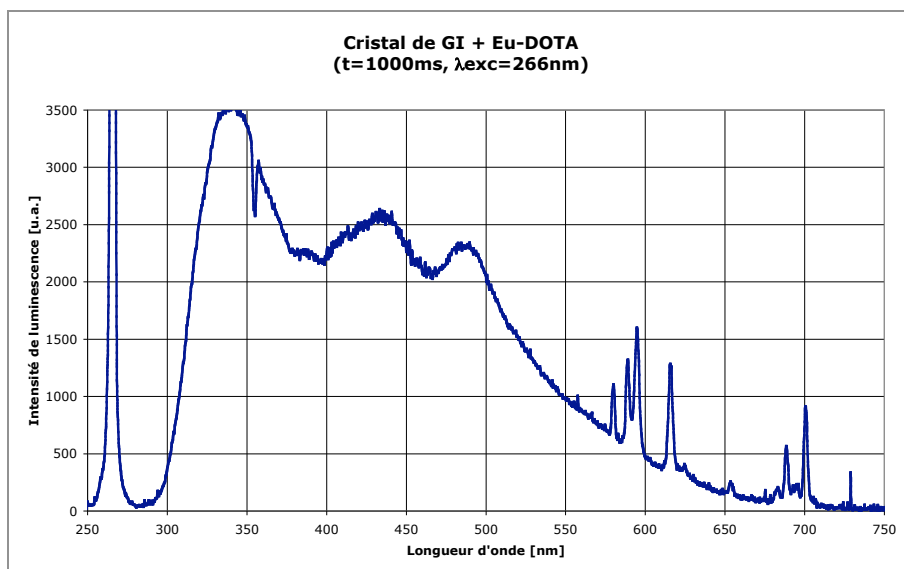


Figure 3.5.11. : Spectre de fluorescence d'un cristal de glucose isomérase trempé dans 100 mM de Eu-DOTA.

La figure 3.5.12 montre le signal de fluorescence d'un cristal dérivé de lysozyme obtenu avec 100 mM du complexe Eu-HPSA-DO3A. Le spectre du complexe est identique au spectre du complexe Eu-DOTA excité à la même longueur d'onde et se détache également bien de la fluorescence de fond. Le complexe Eu-HPSA-DO3A ne se lie pas au lysozyme.

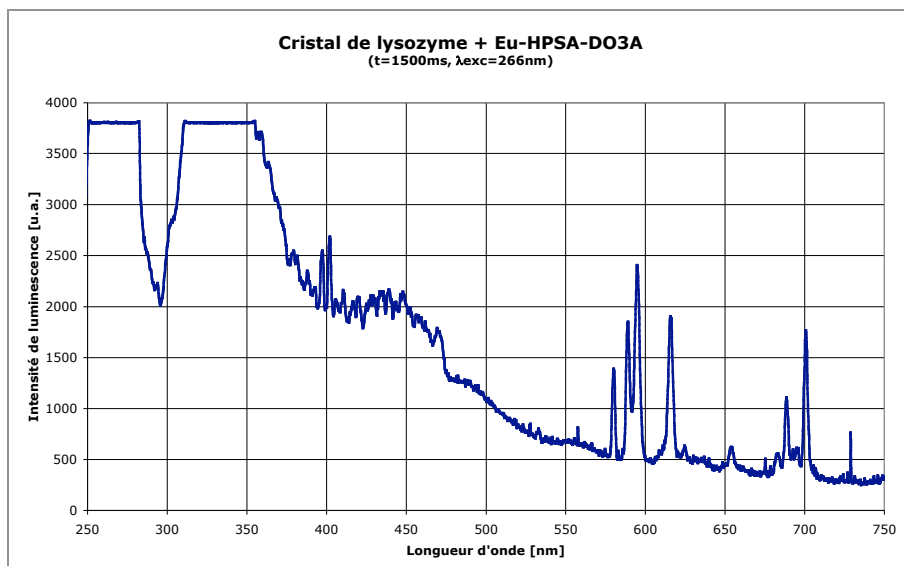


Figure 3.5.12. : Spectre de fluorescence d'un cristal de lysozyme cocristallisé avec 100 mM du complexe Eu-HPSA-DO3A. La fluorescence entre 350 et 450 nm correspond à des impuretés sur la boucle de mylar utilisée.

Tous les spectres présentés ci-dessus ont été obtenus en irradiant avec le laser ultraviolet à 266 nm. Les expériences avec le laser à 355 nm ou avec la source de lumière blanche n'ont pas permis d'obtenir des spectres avec des raies d'émission de l'euprium.

III.5.8.d. Expériences avec les complexes de gadolinium

Les figures 3.5.13 et 3.5.14 montrent les spectres de luminescence de solutions à haute concentration des complexes Gd-DTPA et Gd-DOTA. Les deux spectres présentent un seul pic d'émission étroit à 312 nm. On remarque l'intensité relativement faible du pic d'émission pour les deux complexes.

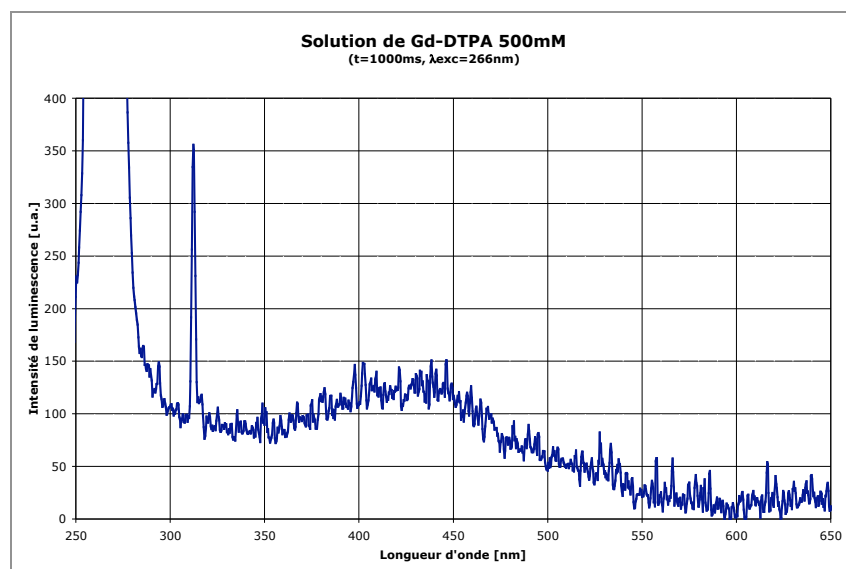


Figure 3.5.13. : Spectre de fluorescence enregistré avec une solution de Gd-DTPA à une concentration de 500mM.

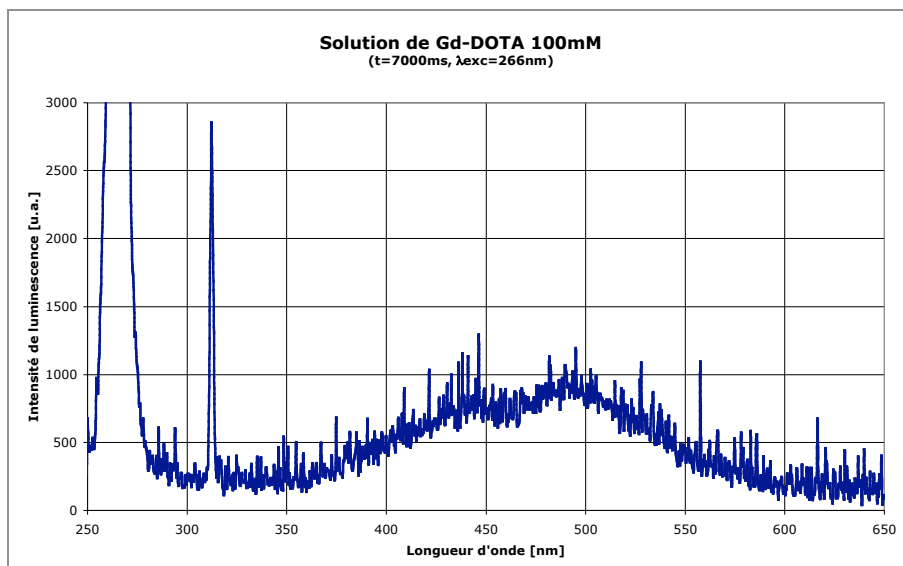


Figure 3.5.14. : Spectre de fluorescence enregistré avec une solution de Gd-DOTA à une concentration de 100 mM.

La figure 3.5.15 montre les spectres enregistrés avec un cristal dérivé de lysozyme cocrystallisé avec 100 mM de Gd-DOTA. Dans aucun des trois spectres, on ne distingue la raie d'émission du Gd^{3+} . En effet, la raie dans le domaine ultraviolet est entièrement dominée par l'émission des résidus aromatiques, cette dernière étant beaucoup plus intense que la première.

III.5.8.e. Dégâts d'irradiation III - inconvénient de l'irradiation dans l'UV

La figure 3.5.15 montre la baisse de l'émission de fluorescence des résidus aromatiques au cours de l'irradiation avec une lumière ultraviolette. Cette baisse est due à la dégradation très rapide des résidus aromatiques. En effet, l'échantillon se dégrade en quelques secondes d'irradiation avec le laser à 266 nm.

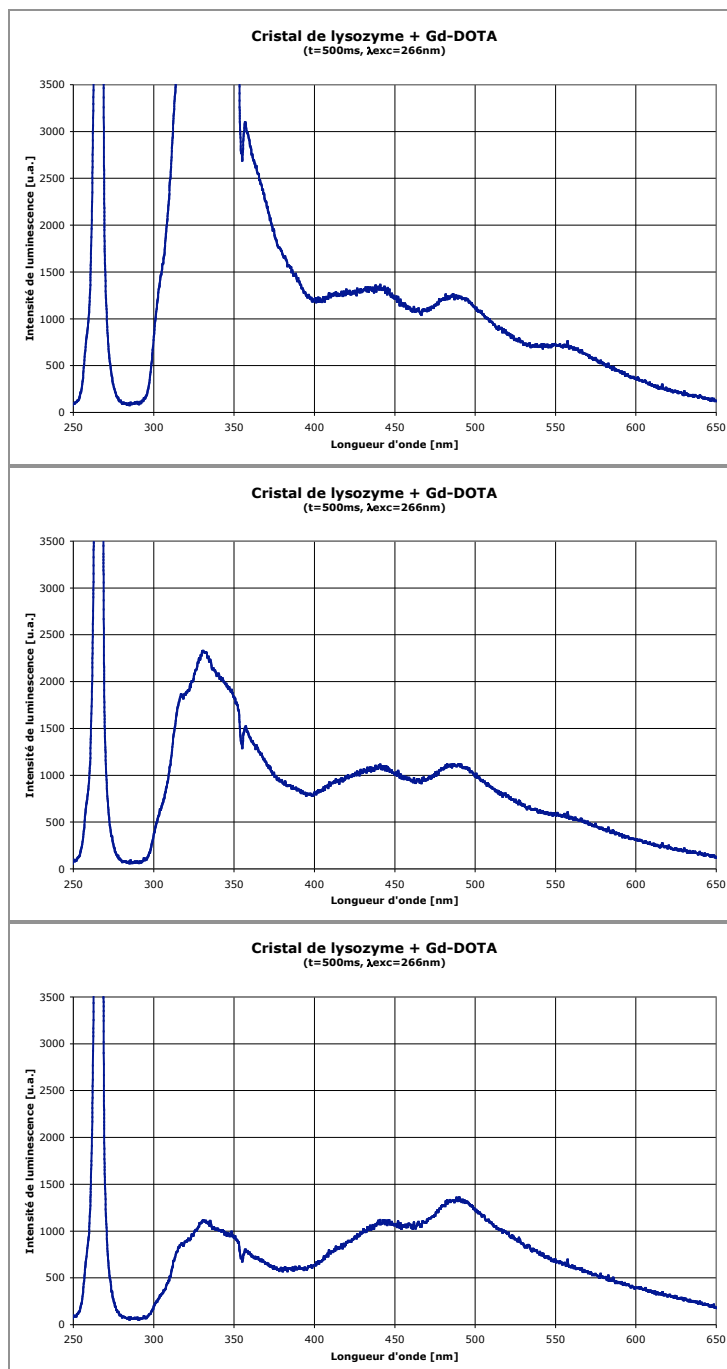


Figure 3.5.15. : Les spectres sont enregistrés sur un même cristal de lysozyme cocristallisé avec 100 mM de Gd-DOTA. On voit la dégradation des résidus aromatiques due à l'irradiation du cristal avec de la lumière ultraviolette. Entre les différents spectres le cristal n'est irradié que pendant quelques secondes.

Les figures 3.5.16 et 3.5.17 montrent les spectres enregistrés avec des échantillons contenant le complexe Gd-DOTA-BOM. Le spectre de fluorescence de ce complexe est très différent des autres complexes grâce au groupement (phénylméthoxy)méthyle du ligand. Dans le spectre enregistré avec un cristal dérivé de lysozyme avec le complexe Gd-DOTA-BOM on distingue aisément la fluorescence intense du complexe de la fluorescence de la protéine. Le complexe Gd-DOTA-BOM se lie assez fortement au lysozyme dans les cristaux.

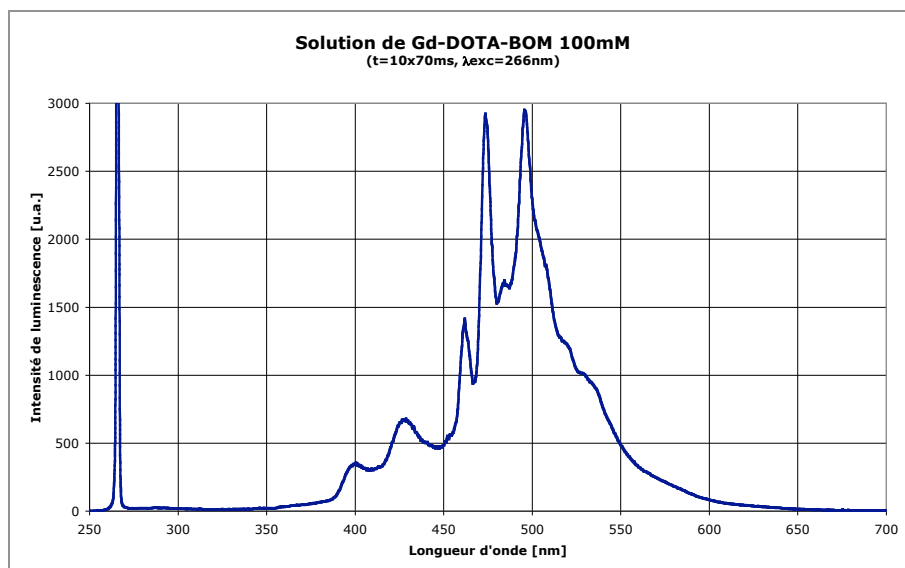


Figure 3.5.16. : Spectre de fluorescence enregistré sur une solution du complexe Gd-DOTA-BOM à une concentration de 100 mM.

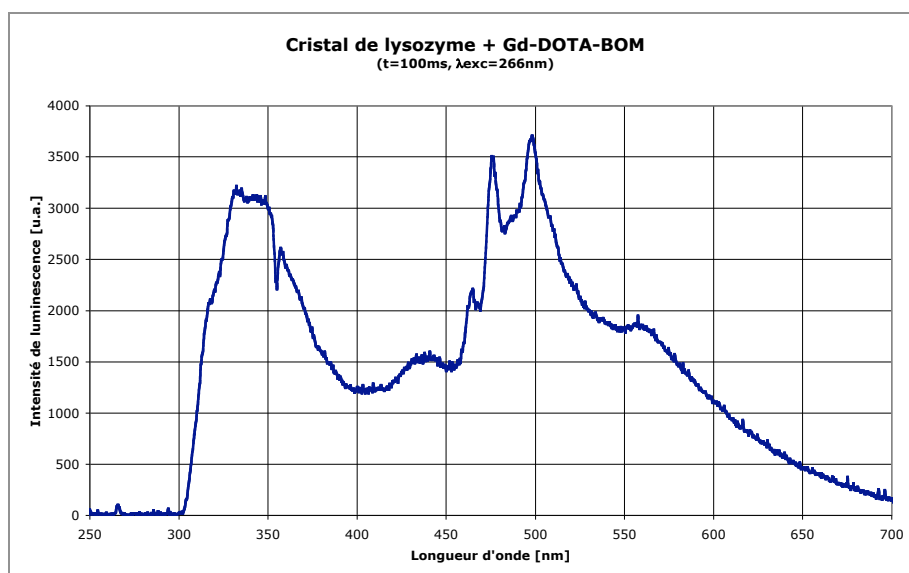


Figure 3.5.17. : Spectre de fluorescence enregistré avec un cristal de lysozyme cocrystallisé avec 100 mM de Gd-DOTA-BOM.

III.5.9. Conclusions et perspectives pour les expériences de luminescence des lanthanides

À Grenoble, il existe plusieurs groupes de recherche spectroscopique qui utilisent des montages permettant de faire des expériences de luminescence des lanthanides sous des conditions différentes de celles du microspectrophotomètre du "cryobench". Un des montages expérimentaux permet, entre autre, de choisir la longueur d'onde de lumière incidente. Ce montage ne permet que des expériences sur des échantillons en solution, et avec un volume beaucoup plus élevé. La géométrie du montage permet de faire des mesures quantitatives de l'intensité de luminescence et on peut faire des expériences en temps résolu (Spectrophotomètres UV-visible du Laboratoire d'Electrochimie Organique et Photochimie Redox (LEOPR), Université Joseph Fourier Grenoble).

Dans notre équipe et en collaboration avec l'équipe de Patrice Baldeck du Laboratoire de Spectrométrie Physique de l'Université Joseph Fourier de Grenoble des expériences sur la luminescence d'un complexe d'euporium dans des cristaux de protéine sont en cours. Le complexe utilisé présente des caractéristiques proches des complexes décrits dans ce travail, sauf qu'il n'y a aucune molécule d'eau dans la sphère de coordination de l'ion Eu^{3+} . Ces expériences de luminescence permettent de déterminer la concentration du complexe dans l'échantillon. Une expérience au cours de laquelle le cristal dérivé est trempé dans une solution de complexe dans lequel l'ion Eu^{3+} a été échangé contre un ion non-luminescent, et l'analyse de la dynamique de la décroissance du signal de luminescence du complexe dans le cristal, pourrait permettre de distinguer entre les molécules de complexe des canaux de solvant du cristal et des molécules de complexes liées à la protéine. Les études de la luminescence de cristaux trempés dans différentes solutions de complexe permettent en outre d'étudier la dynamique de diffusion et de fixation des complexes dans les cristaux.

III.6. Conclusions sur les différentes méthodes physico-chimiques testées

Bien que nous n'ayons pas trouvé de méthode qui permette de détecter la fixation d'un complexe sur une protéine, je vais comparer les caractéristiques des différentes méthodes testées.

Afin qu'une méthode puisse être appliquée dans un contexte plus général, il faut qu'elle soit facilement applicable, qu'elle consomme peu de protéine et que les appareils nécessaires soient facilement accessibles.

Le tableau 3.6.1 résume les avantages et les inconvénients des différentes méthodes testées.

Méthode	$m_{\text{protéine}}$ [mg]	État	Matériel nécessaire	Succès
Calorimétrie	~30	solution	-	non
Gel	~10 ⁻²	solution	+	?
RMN	~10	solution	-	?
Luminescence	~10 ⁻⁶ à 1	cristal & solution	-	?

Tableau 3.6.1 : Résumé des avantages et des inconvénients des différentes méthodes testées. $m_{\text{protéine}}$: masse de protéine nécessaire pour tester un complexe. Pour la luminescence, la quantité peut varier de plusieurs ordres de grandeur en fonction du montage expérimental utilisé. Pour le matériel nécessaire un "-" signifie que les expériences nécessitent un équipement particulier et, le plus souvent, difficilement accessible, le signe "+" signifie que le matériel nécessaire est facilement accessible dans un laboratoire de biochimie classique.

Aucune des méthodes testées n'a permis, dans les conditions utilisées, de distinguer un dérivé avec un taux de fixation du complexe élevé d'un dérivé avec un taux de fixation bas. La calorimétrie ne permet clairement pas d'étudier les interactions caractérisées par d'aussi faibles affinités. La RMN est une méthode qui est difficile à mettre en œuvre et dont l'analyse des résultats est également difficile. Il reste à déterminer si, en optimisant les conditions d'utilisation, l'utilisation de gels de polyacrylamide natifs pourrait permettre la détection de la fixation des complexes chargés. Cependant, ces conditions devraient probablement être réadaptées pour chaque nouvelle protéine. La luminescence est la seule méthode qui se réalise aussi bien avec les cristaux qu'avec la solution de protéine. Elle permet l'étude de phénomènes associés à la diffusion de complexes de lanthanides dans les cristaux de protéine, mais, même en optimisant les conditions expérimentales, il semble peu probable qu'elle puisse permettre la détection de la fixation d'un complexe dans une protéine.

Un problème associé aux études de la protéine en solution est que l'interaction du complexe avec la protéine n'est pas nécessairement la même en solution que dans le cristal : certaines cavités qui permettent de piéger une molécule de complexe ne résultent que de l'empilement cristallin, alors que d'autres sites de fixation, accessibles en solution, se trouvent dans des zones de surface impliquées dans des contacts intermoléculaires dans le cristal, ce qui empêche la fixation du complexe dans ces sites. Le mode de fixation affiné des complexes dans les dérivés de lysozyme (chapitre II.4.8) laisse supposer que l'empilement cristallin privilégie la fixation des complexes. Nous avons couramment utilisé le lysozyme comme protéine modèle, mais il semble que, pour les méthodes de caractérisation en solution, il serait plus judicieux de travailler avec d'autres protéines.

