

Parcours

Biochimiste (DEA de biochimie en 1989)

Doctorat (1992): Structure cristalline des fasciculines 1 et 2 du Mamba vert

➔ *Remplacement Isomorphe Multiple + Remplacement moléculaire*

Stage postdoctoral (1992-1995): Cornell University, CHESS (Cornell High Energy Synchrotron Source)

➔ *Structure complexe Interféron-gamma / Récepteur*

➔ *MAD + Contribution installation ligne de lumière A1 à CHESS*

Depuis 1995: Chercheur au CEA à Saclay.

Travaux de cristallographie: Anticorps, enzymes (phosphatase alcaline, cytochrome cyp121), marqueur tumoraux (PLAP, UPAR)

2006: mise en place du LBSR: 5 PI: des expertises différentes mises en commun autour d'un thème général centré sur la stabilité du génome.

Un sujet principal: architecture des télomères (levure et homme)

Combinaison d'approches: cristallographie, RMN, SAXS, ultracentrifugation analytique, AFM, ITC, Sec-Mals, SRCD, ...

1

SAXS / Cristallographie :

informations et limites comparées

2

**Diffusion des rayons-X
aux petits angles :
SAXS**

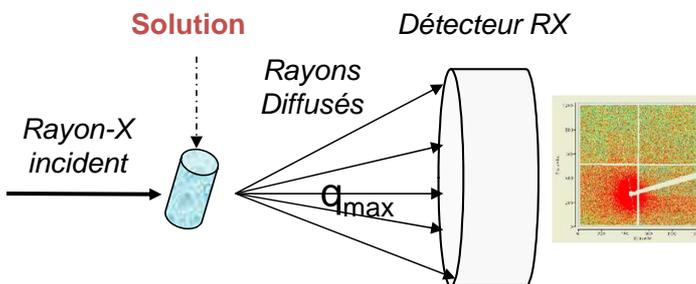
**Conformation
moyenne en solution**

**Cristallographie aux
rayons-X**

Structure cristalline

SAXS

**Conformation moyenne en
solution**

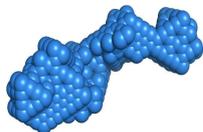


Traitement de données



Analyse
Ab initio
Modèle moléculaire

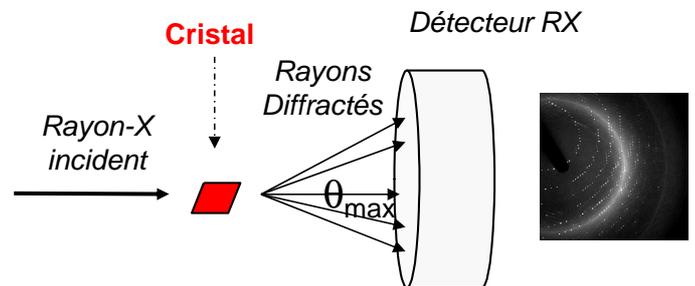
Modèle ou enveloppe



Facteurs limitants : l'**agrégation** et **hétérogénéité**

Cristallographie

Structure cristalline

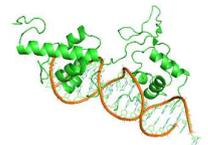


Traitement de données



Résolution
Remplacement moléculaire
MAD, SAD, MIR,...

Structure 3D



Etape limitante : obtention de **cristaux** qui diffractent

Echantillon :

SAXS

Solution concentrée

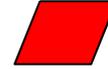


Limitations:

- Pureté
- Quantité
- Concentration
- Solubilité

Cristallographie

Cristal congelé



Limitations:

Pureté, quantité, concentration,
solubilité
Cristallisation

Goulot d'étranglement majeur
de la cristallographie

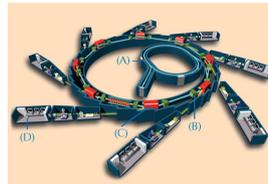
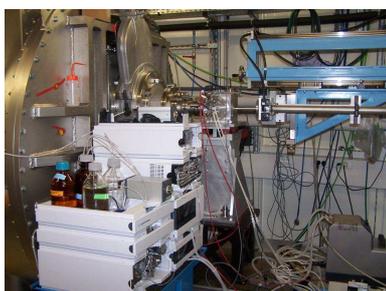
Pour un projet donné, si des cristaux ont été obtenus, alors la solution protéique remplit les conditions nécessaires au SAXS.

Par contre, on peut avoir un échantillon prêt pour le SAXS qui ne donnera jamais de cristaux.

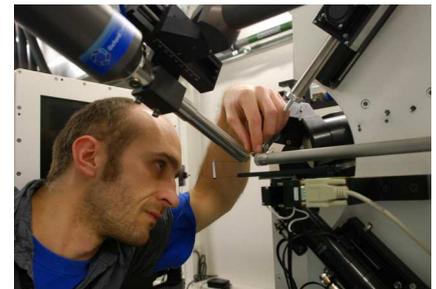
5

Acquisition des données:

SAXS

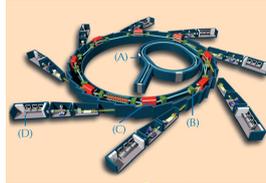


Cristallographie



Acquisition des données:

SAXS



Cristallographie



Gamme d'énergie	Between ~5 and 17 keV
Résolution en énergie	~2 eV
Source	In-vacuum U20 undulator. Source Size (sigma, μm): 388 (H) x 8.1 (V) Source Divergence (sigma, μrad): 14.5 (H) x 4.6 (V)
Optiques	Diaphragm at 11.7 m (1x0.5 mm ²) Fixed exit DCM Si ₁₁₁ at 20 m Fixed incidence focusing KB at 22.5 m Sample position : 30 - 32 m Detector / Sample Distance : 0.5 - 8 m
Environnements d'échantillon	X / Z precision table Stopped flow device for chemistry Online HPLC for proteins in solution (SAXIER project) High throughput sampler for proteins in solution (SAXIER project) Couette Cell (collaboration with LPS, Orsay) GISAXS chamber Automatic sample changer (50 samples, thermostated) Linkam heating stage THMS600
Taille du faisceau	450x20 μm ² FWHM dans la cabane expériences
Flux sur l'échantillon	8.10 ¹² ph/s @7keV, 8.10 ¹¹ ph/s @16keV (à 400 mA de courant anneau)
Détecteurs	SAXS : PCCD170170 (AVIEX), Gain > 3ADU/ph, Noise≈2ADU WAXS (2014) : Détecteur à pixels hybrides
Chambre de détection	Vide primaire, positions du détecteur SAXS : - 0.20 / + 0.20 m (horiz), -0.20 / +0.20 (vert), 0.5 m / +6 m (le long du faisceau).

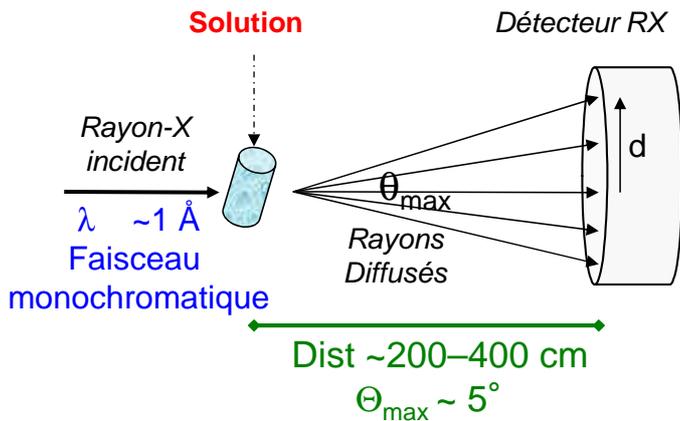
Données techniques

Energy range	Between 5 KeV and 15 KeV
Energy Resolution	~0.000075 (Si 311) - ~0.0002 (Si 111)
Source	U20 In-vacuum undulator
Flux @ first optical element	White beam - depends on undulator settings
Optics	Kirkpatrick-Baez pair of bi-morph mirrors plus channel cut cryogenically cut monochromator crystal
Sample Environment	3 circle κ goniostat (10 μm sphere of confusion) 6 axis robot sample changer (MSC/Rigaku ACTOR) Oxford Cryosystems cryostream Si drift diode energy dispersive detector plus MCA for fluoresc measurements
Beam size at sample	Variable between 100x100 μm ² to 250x250 μm ²
Flux on sample	> 2.0 e+12 Phot/s/0.02%bw for 500 mA stored current.
Detectors	ADSC Q315r
Polarization	Linear

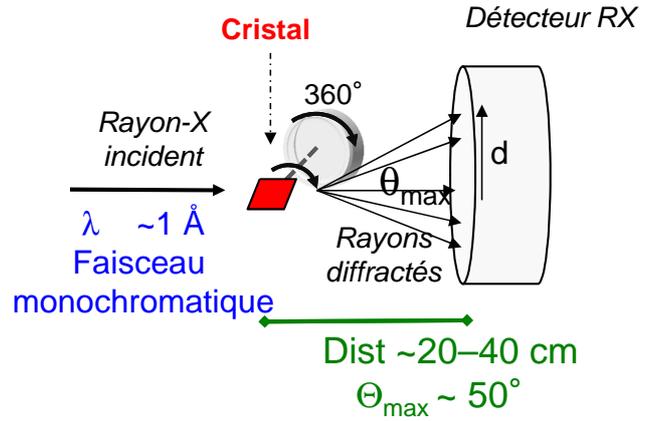
7

Acquisition des données:

SAXS



Cristallographie



Rappel: $2d \sin \Theta = n \lambda$
Donc $d = n \lambda / 2 \sin \Theta$

$\Rightarrow d \sim 6 \text{ \AA}$

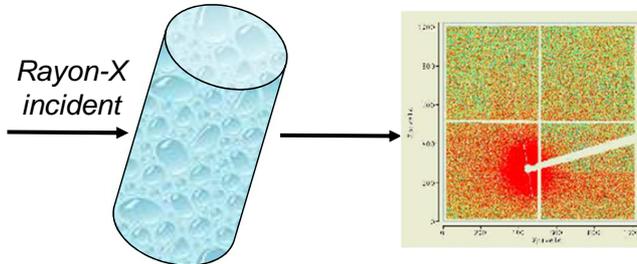
$\Rightarrow d \sim 0.6 \text{ \AA}$

Attention, la notion de résolution en SAXS est à moduler du fait qu'on obtient une moyenne de conformations

8

Acquisition des données:

SAXS

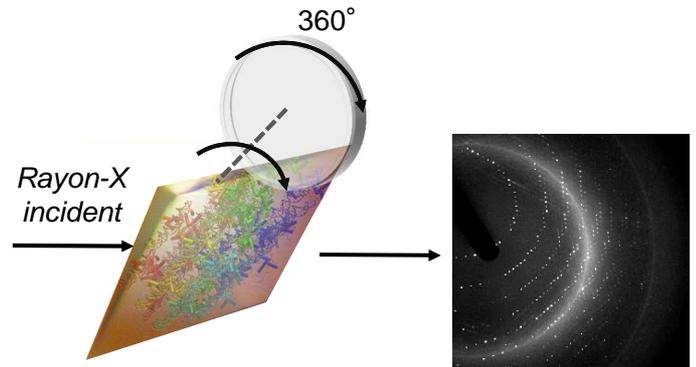


Mélange de molécules en solution dans toutes les orientations

Spectre de diffusion

On enregistre une intensité de diffusion en fonction de l'angle de diffusion → information 1D

Cristallographie



Crystal de molécules ordonnées dans l'espace

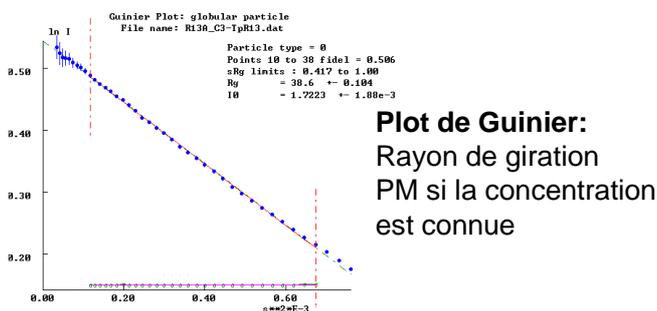
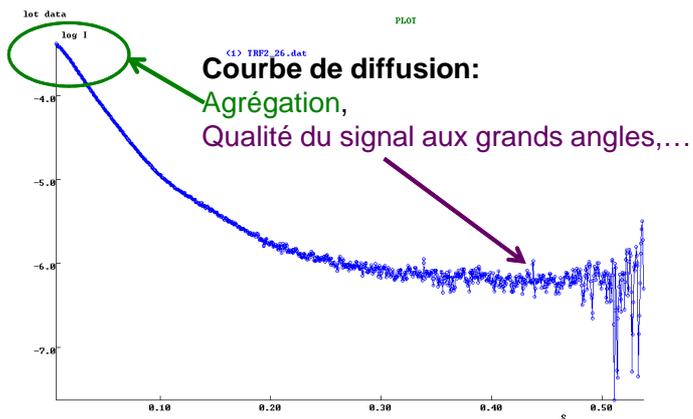
Clichés de diffraction

On enregistre un jeu d'intensités diffractées à chaque position hkl dans l'espace réciproque → information 3D

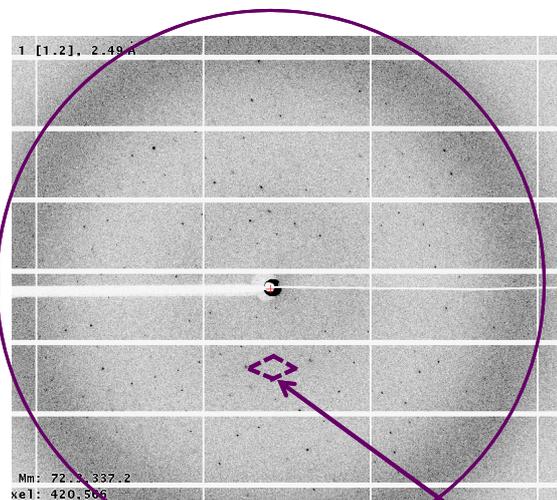
9

Informations Directes:

SAXS



Cristallographie



10

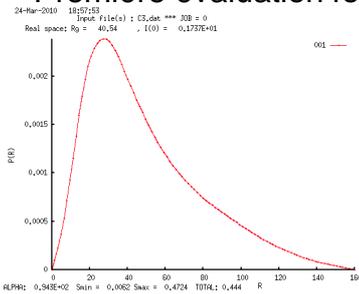
Informations Directes:

SAXS

P(R) :

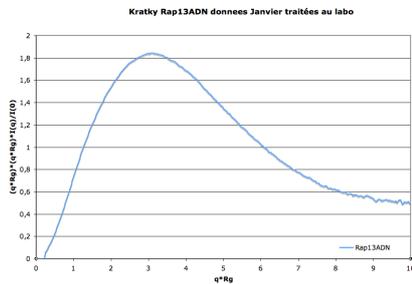
Rg, Dmax

Première évaluation forme de la particule



Plot de Kratky :

Evaluation du degré de structuration de la particule



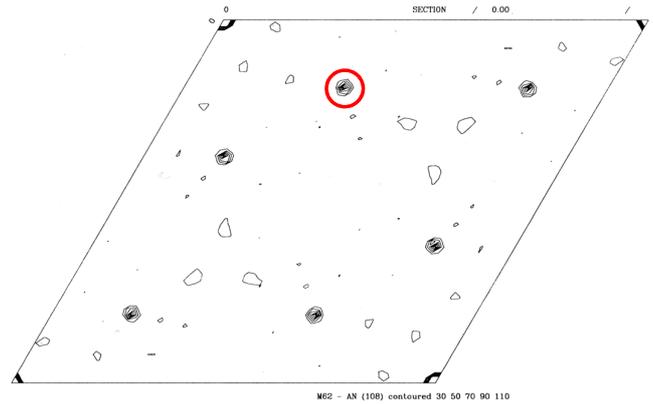
Cristallographie

Fonction de Patterson :

Carte de différence de Patterson

Position des atomes lourds et/ou des diffuseurs anomaux.

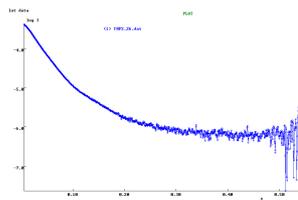
On calcule une carte de différence de Patterson en utilisant les coefficients $F_{PH} - F_P, F_{PH+} - F_{PH-}$, ou Dano



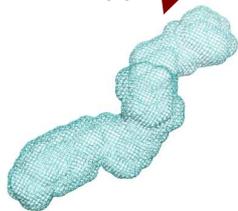
11

Analyse des données:

SAXS



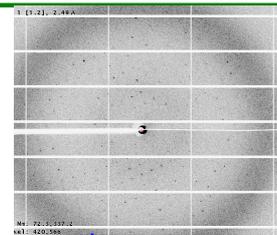
Approches *ab initio*, calcul d'enveloppe



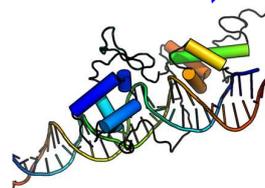
calcul de structure moyenne



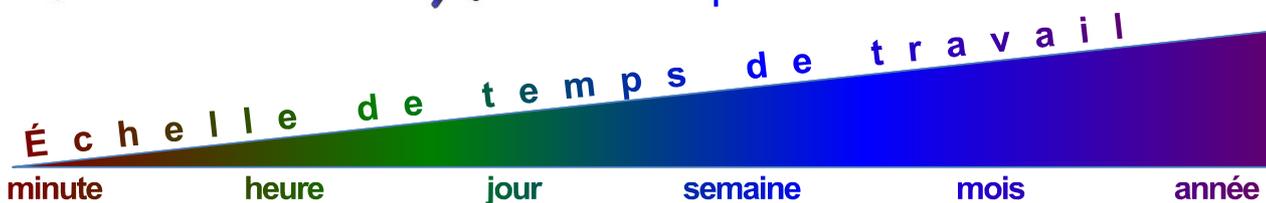
Cristallographie



Remplacement moléculaire



Approches expérimentales: MIR, SAD, MAD, SIRAS,...



12

Résultat:

SAXS

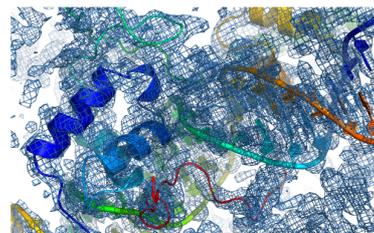


Enveloppe ou modèle:
Conformation tridimensionnelle
moyenne en solution

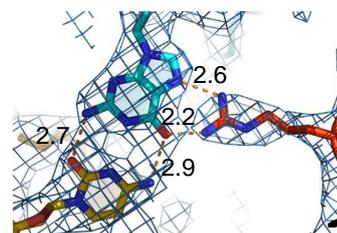


Analyse des propriétés globales
de la particule en solution:
proportions, flexibilité,
assemblage,...

Cristallographie



Structure tridimensionnelle
expérimentale de la particule
cristallisée

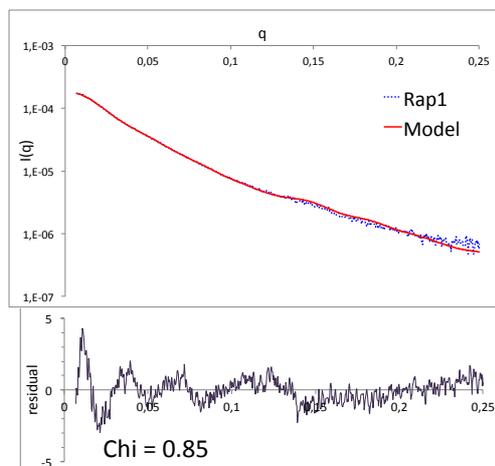


Analyse à l'échelle atomique:
conformation, distance,
délocalisation des électrons,...

Evaluation des résultats

SAXS

Accord entre les données calculées et
les données expérimentales;



$$\text{Residual} = (I_{\text{th}} - I_{\text{exp}}) / \text{sigma}(I_{\text{exp}})$$

$$\text{Chi} = 1 / (N-1) \sum_1^N [(I_{\text{th}} - I_{\text{exp}}) / \text{sigma}(I_{\text{exp}})]^2$$

On dispose de quelques centaines de points

Cristallographie

Data collection	
Wavelength (Å)	0.98
Space-group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Diffraction limits (last shell)	2.95 Å (3.13 Å – 2.95 Å)
Unit cells (a×b×c×α×β×γ)	40.6×102.9×116.8 90×90×90
R _{merge}	0.138 (0.688)
Number of unique reflections	9831
I/σ	14.32 (3.39)
Completeness	0.901 (0.688)
Molecular replacement	
LLG =	1305.76
Refinement	
Buster5	
Resolution	2.95 Å
R _{work}	0.1923
R _{free}	0.2650
Figure of merit	0.869
Number of residues	223
Number of bases	62
Number of water molecules	6
RMSD bond	0.0010
RMSD angles	1.48
Average B-factor (protein, Å ²)	62
Average B-factor (DNA, Å ²)	100
Average B-factor (residues 675-601, Å ²)	69
PDB entry	3UKG

Paramètres multiples d'évaluation de la
structure

Plusieurs milliers ou dizaines de milliers
de réflexions

Quelques centaines à quelques milliers
d'atomes

➔ Fiabilité ++

Limites méthodologiques:

SAXS

Production d'un échantillon

- Pur
 - > 95%
- En grande quantité
 - échelle du mg
- Soluble à forte concentration → échelle du mg/ml
- Supportant l'irradiation le temps de l'expérience
- Ne formant pas d'agrégats

Cristallographie

Production d'un échantillon

- Pur
 - > 95%
- En grande quantité
 - échelle du mg
- Soluble à forte concentration → échelle du mg/ml
- Capable de cristalliser
- Capable de diffracter
- Permettant de calculer une densité électronique

15

Limites des informations:

SAXS

**Enveloppe ou modèle:
Conformation tridimensionnelle
moyenne en solution**

**Analyse des propriétés globales
de la particule en solution:
proportions, flexibilité,
assemblage,...**

- **Modèle moyen**
- **Pas d'information atomique**
- **Pas de structure expérimentale**

Cristallographie

**Structure tridimensionnelle
expérimentale de la particule
cristallisée**

**Analyse à l'échelle atomique:
conformation, distance,
délocalisation des électrons,...**

- **Pas d'information en solution**
- **Pas (ou presque pas)
d'information dynamique**

16

Complémentarité:

SAXS

Cristallographie

*Conformation globale moyenne
en solution*

*Modélisation possible des
régions flexibles*

*Structure 3D à l'état
solide*

*Permet de vérifier quel
assemblage est compatible
avec les données de diffusion*

*Permet d'estimer la flexibilité
d'organisation des domaines*

*Ambiguïté d'assemblages
multimérique*

*Ambiguïté d'organisation de
domaines protéiques*