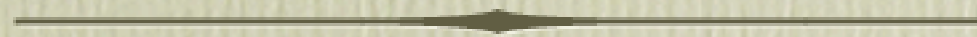


La Biologie structurale



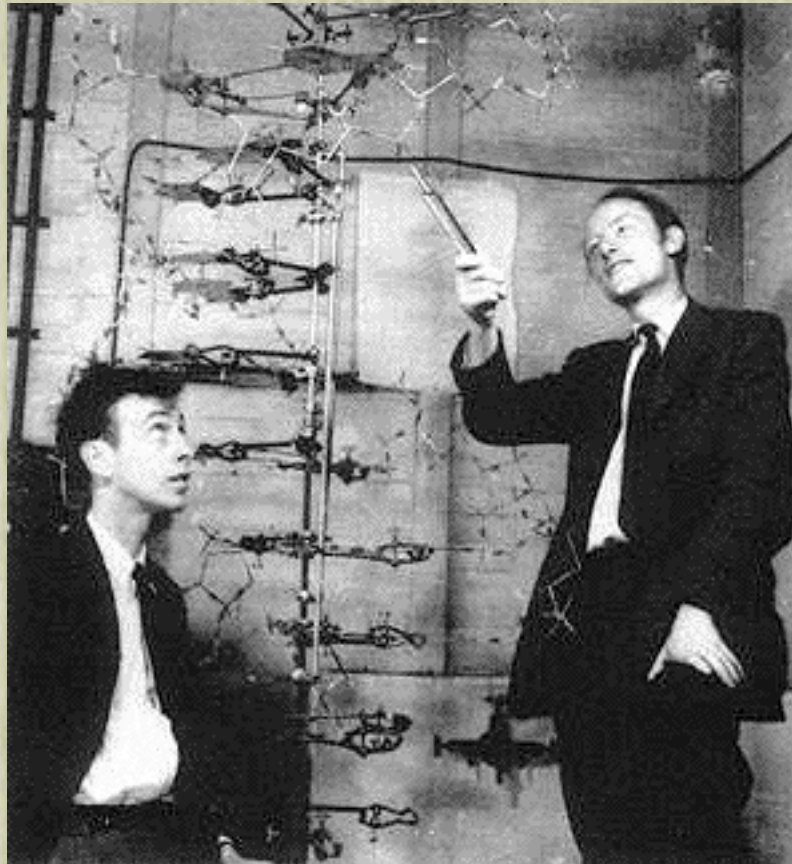
“Voir” les biomolécules en trois 3D

Journée pédagogique et scientifique
Association des Enseignants de Biochimie et de Biologie Moléculaire des Facultés de Pharmacie

L'observation “visuelle” des objets du
Vivant donne une information directe,
souvent indispensable

Ceci est vrai à toutes les échelles
y compris l'échelle atomique

Modèle de l'ADN (1953)



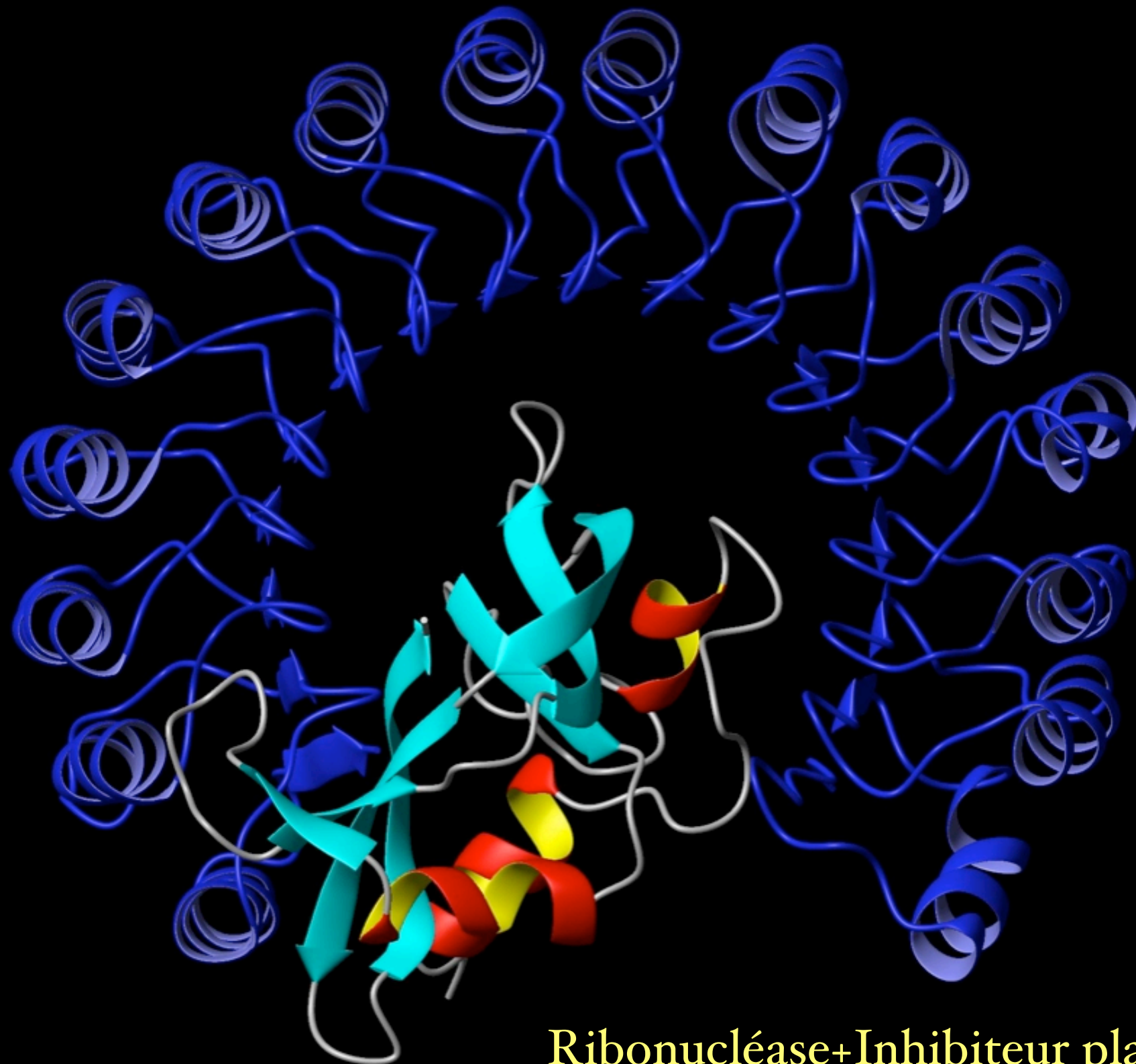
- Appariements des bases
- Code génétique
- Réplication semi-conservative

Information structurale “visuelle”



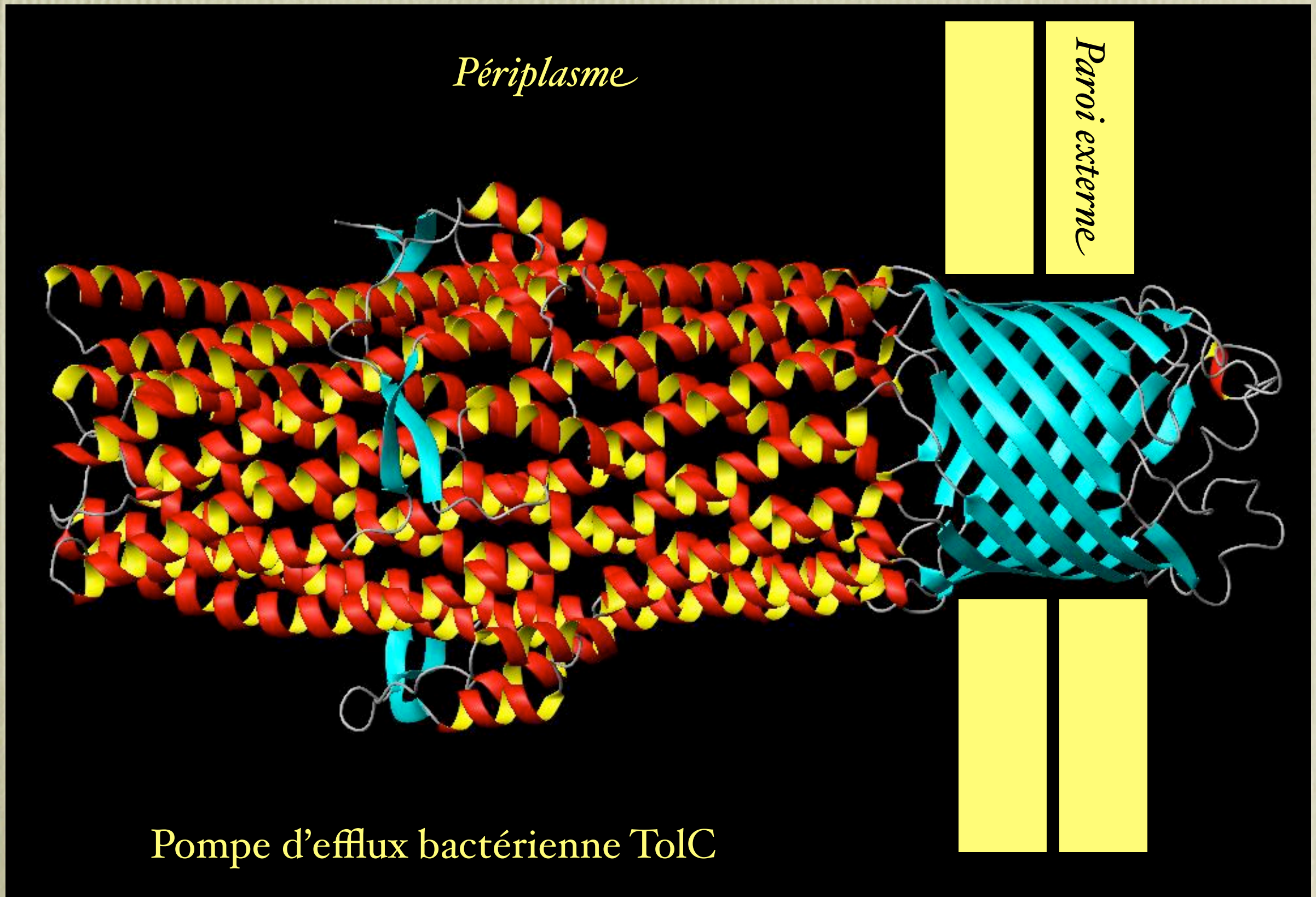
Ribonucléase

Information structurale “visuelle”



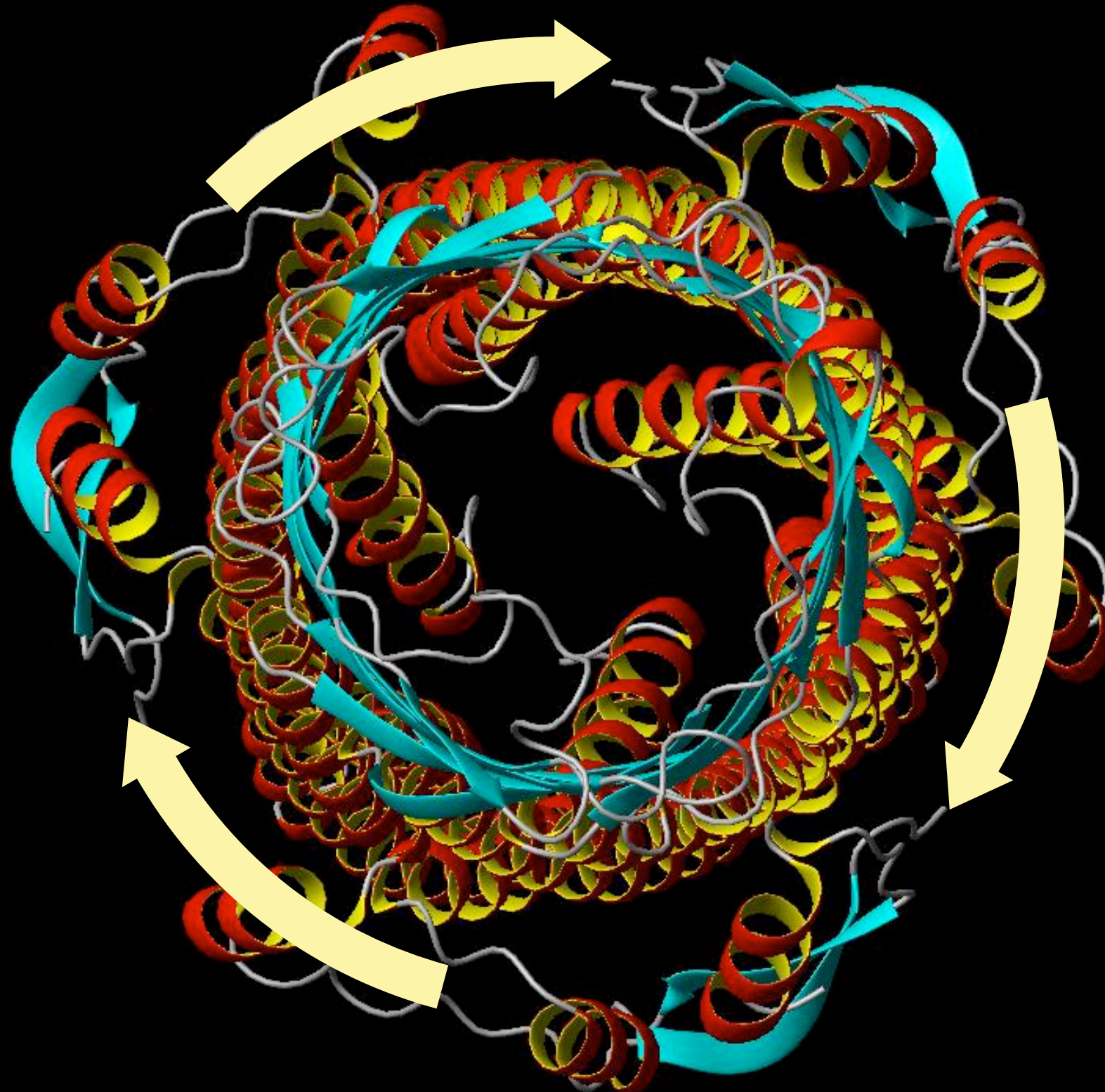
Ribonucléase+Inhibiteur placentaire

Information structurale “visuelle”



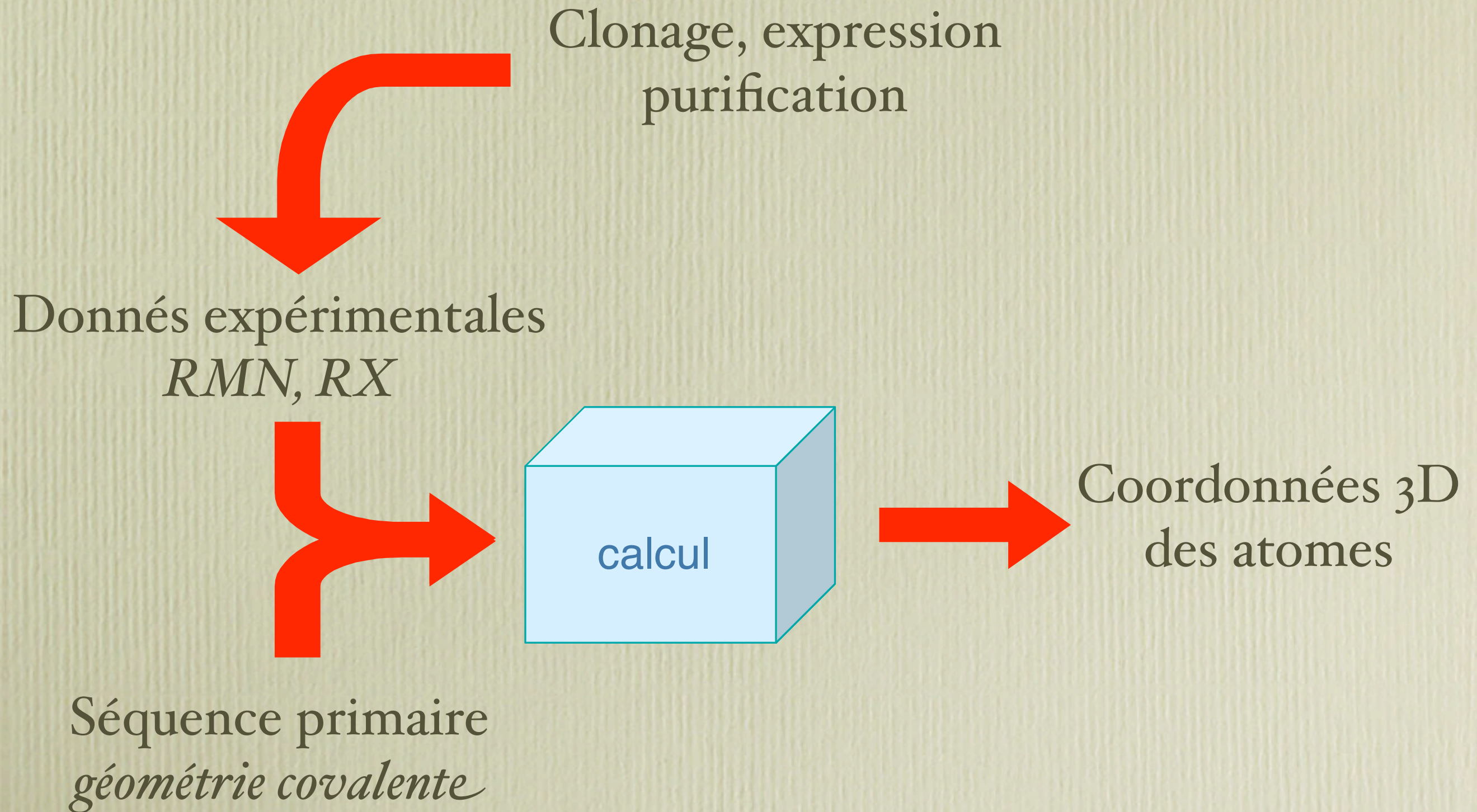
Information structurale “visuelle”

TolC fonctionne comme un diaphragme à iris



TolC

Biologie Structurale



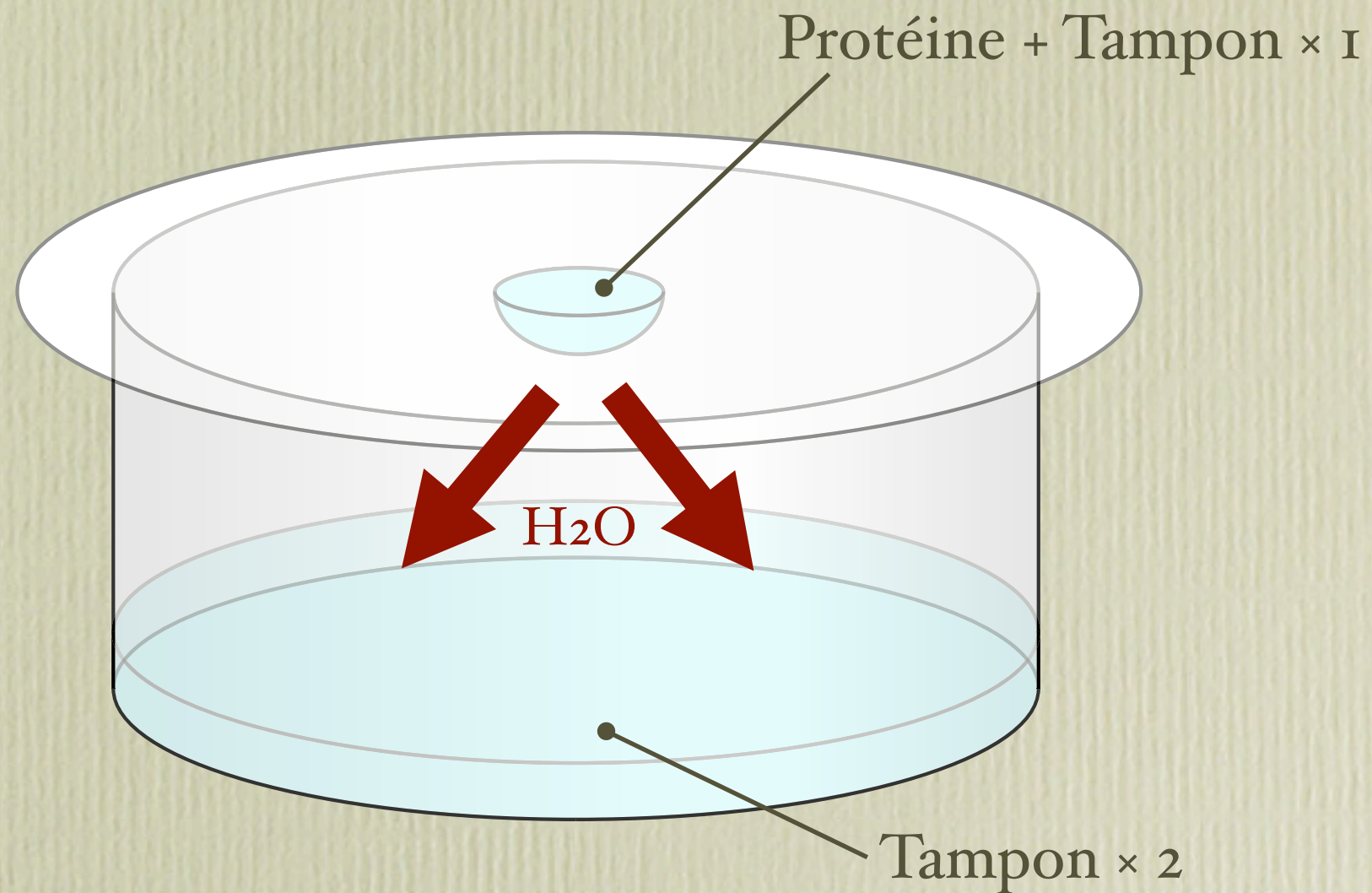
Techniques d'analyse structurale

- Cristallographie (RX)
- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)
- Cryo-microscopie électronique (CryoEM)
- Diffusion aux petits angles (SAXS, SANS)

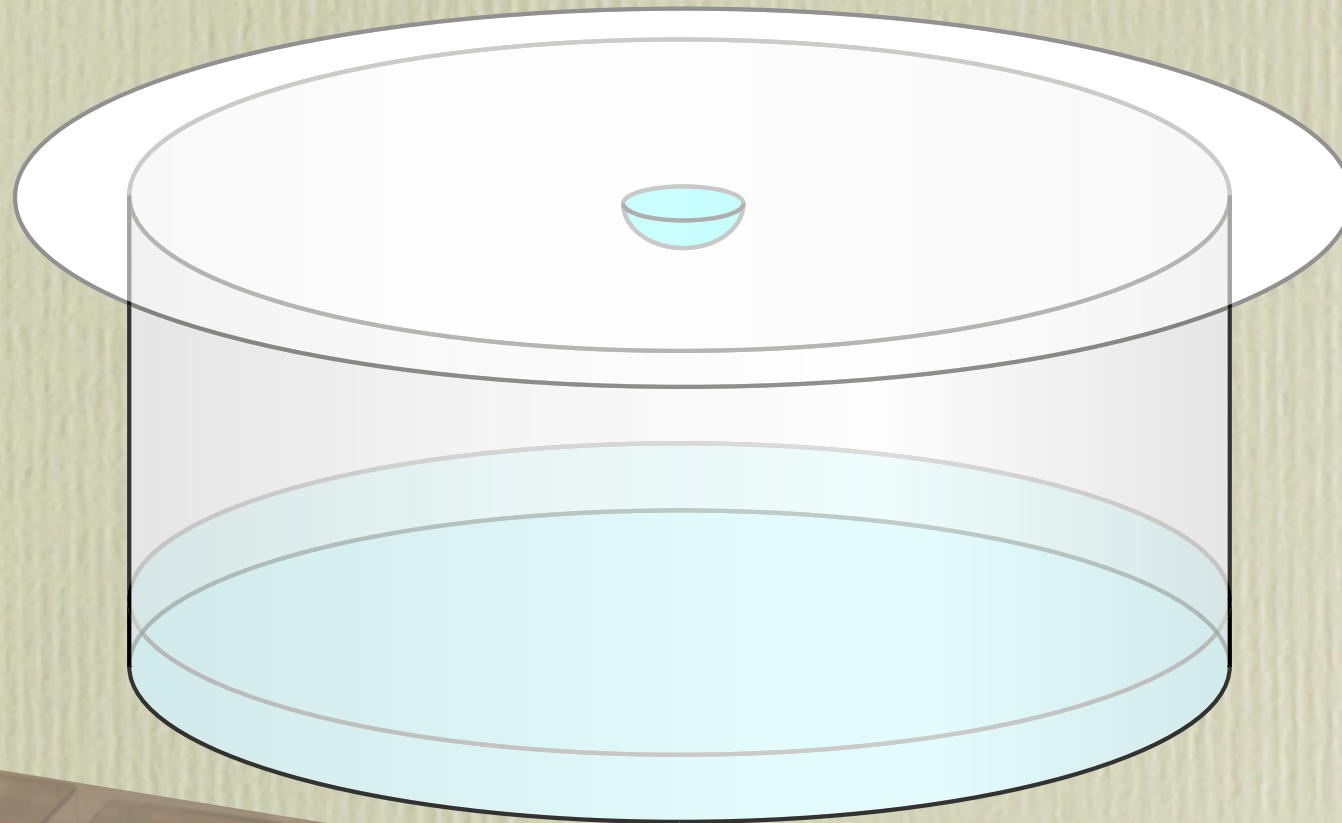
Cristallographie & Diffraction des rayons X



Cristallisation par diffusion de vapeur

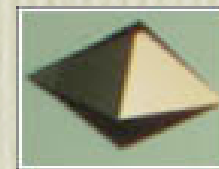
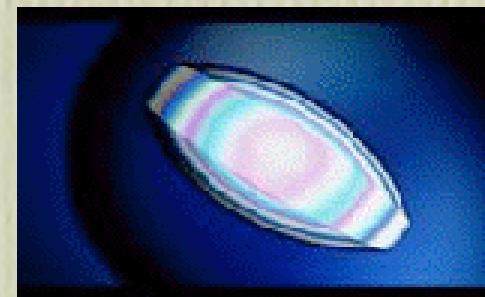
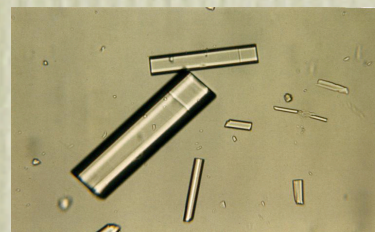
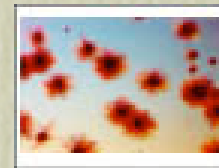


Cristallisation par diffusion de vapeur



Des dizaines de conditions différentes sont testées

Cristaux



On affine les conditions jusqu'à obtenir des monocristaux de bonne qualité

Diffraction par un réseau cristallin

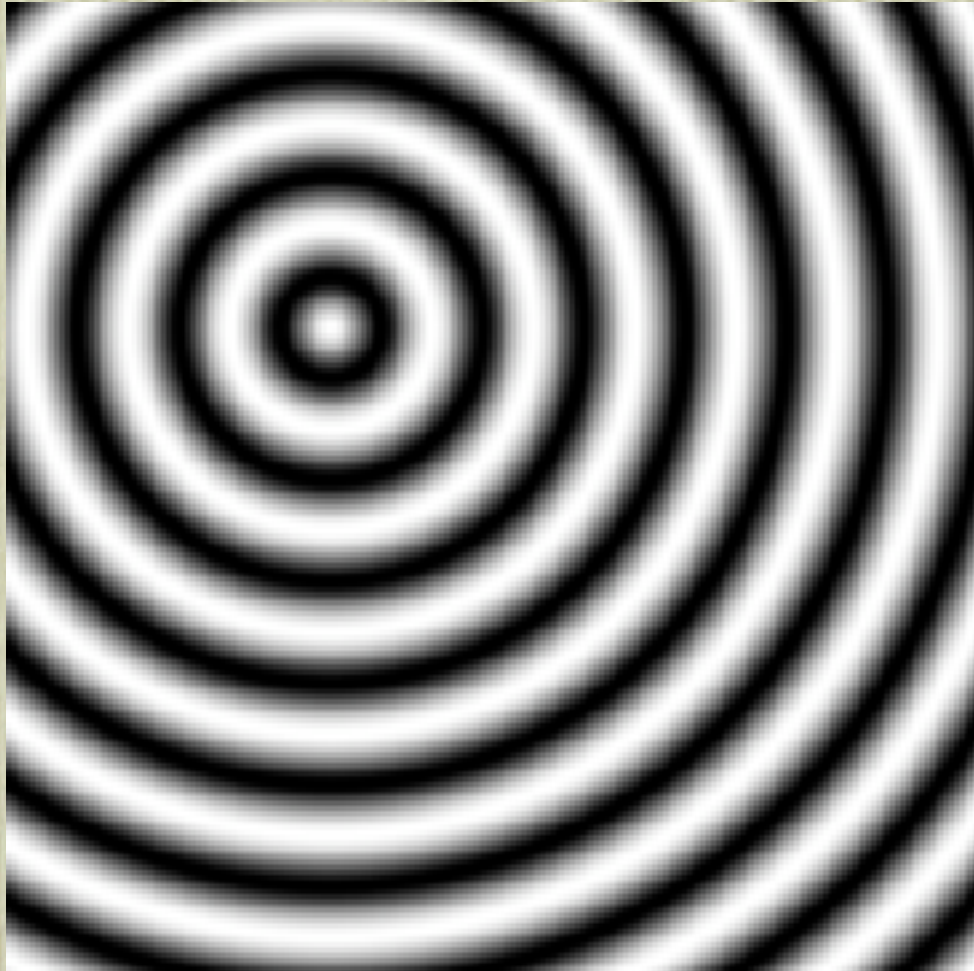
cristal de protéine



Rayons X incidents

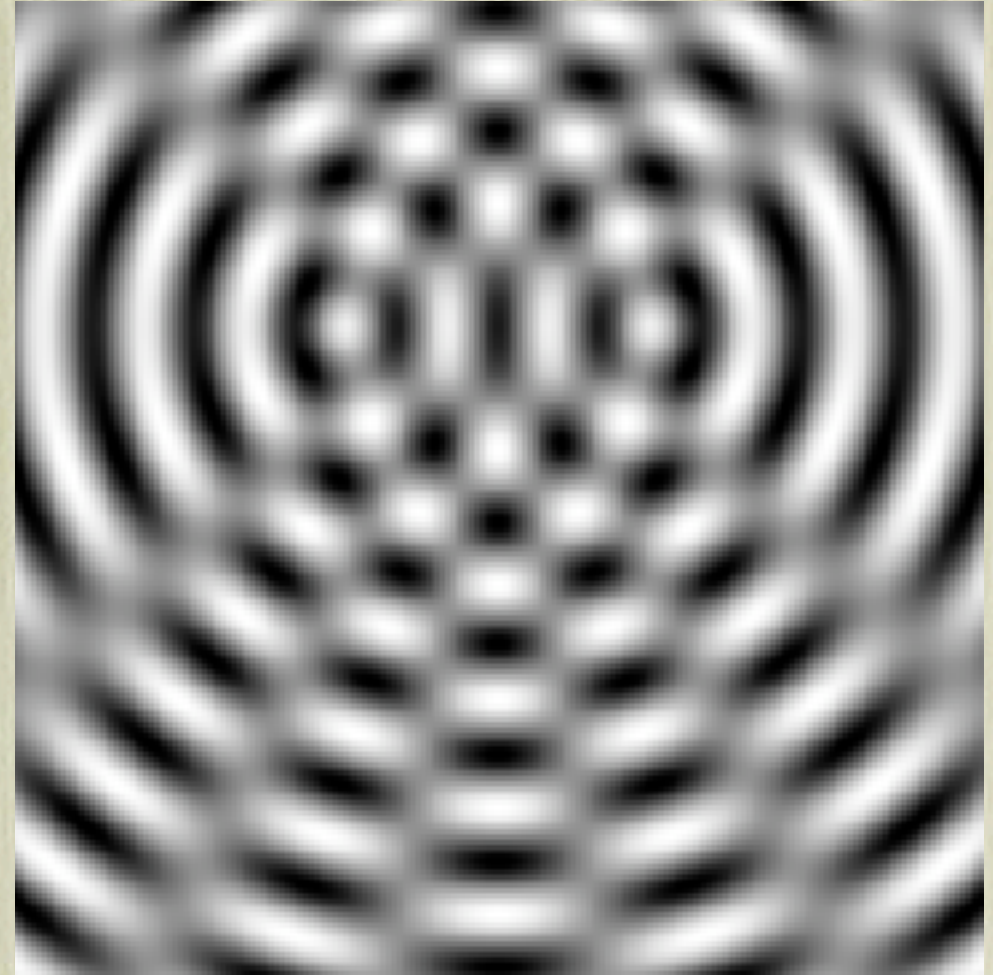
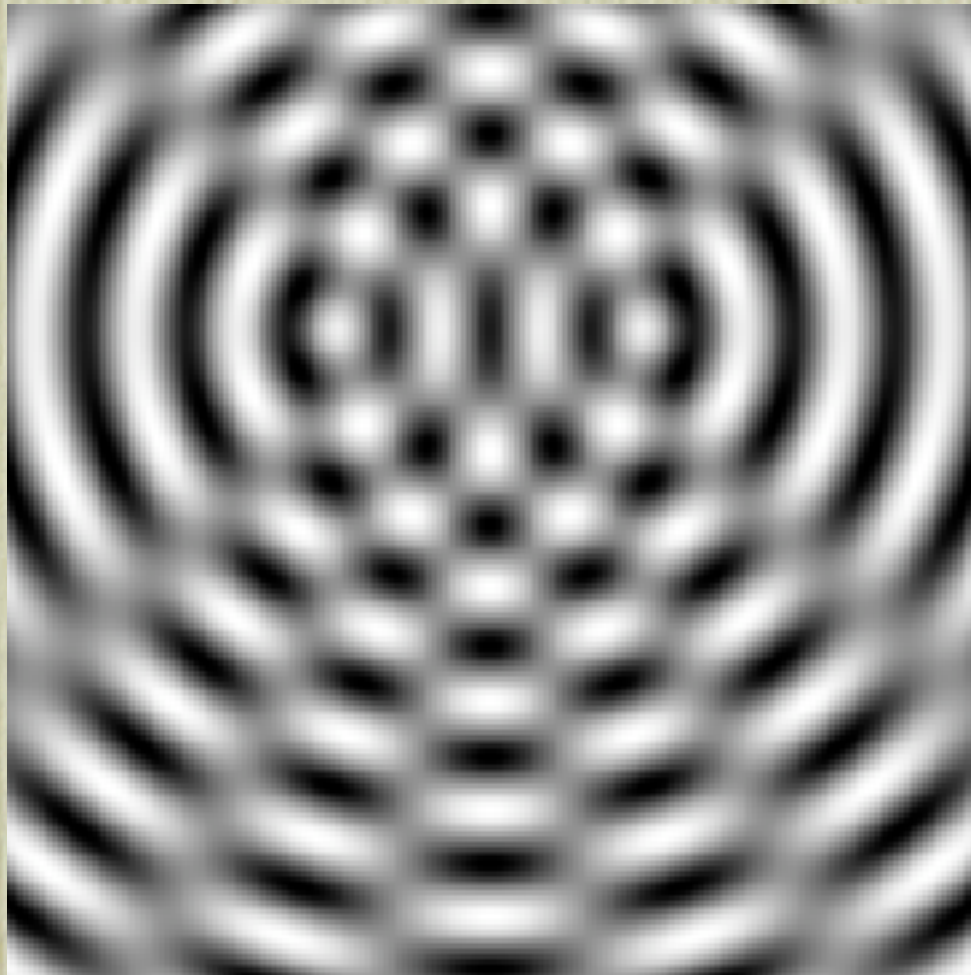
Faisceau diffracté

Diffraction



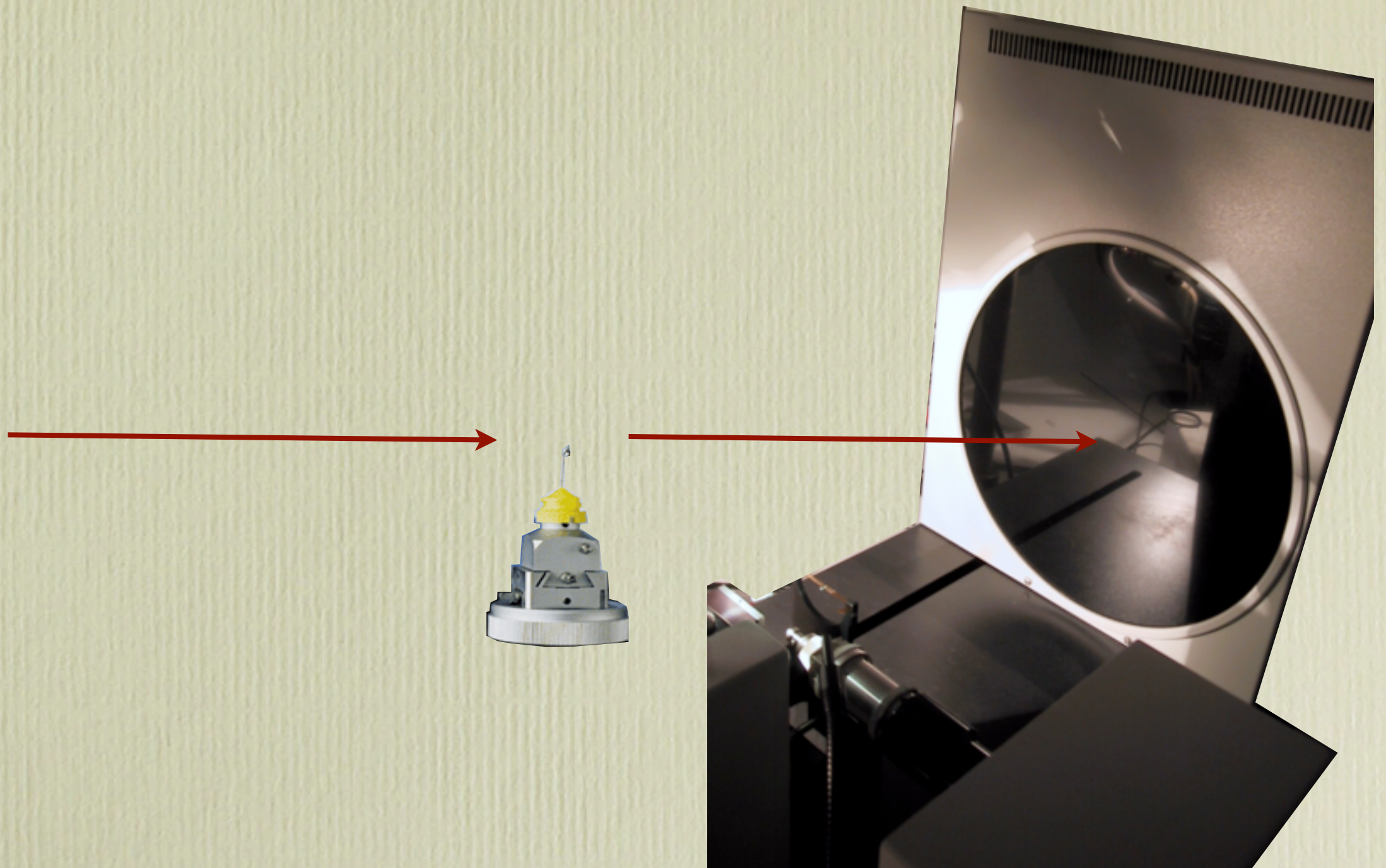
Chaque point du cristal se comporte comme une source de RX

Diffraction

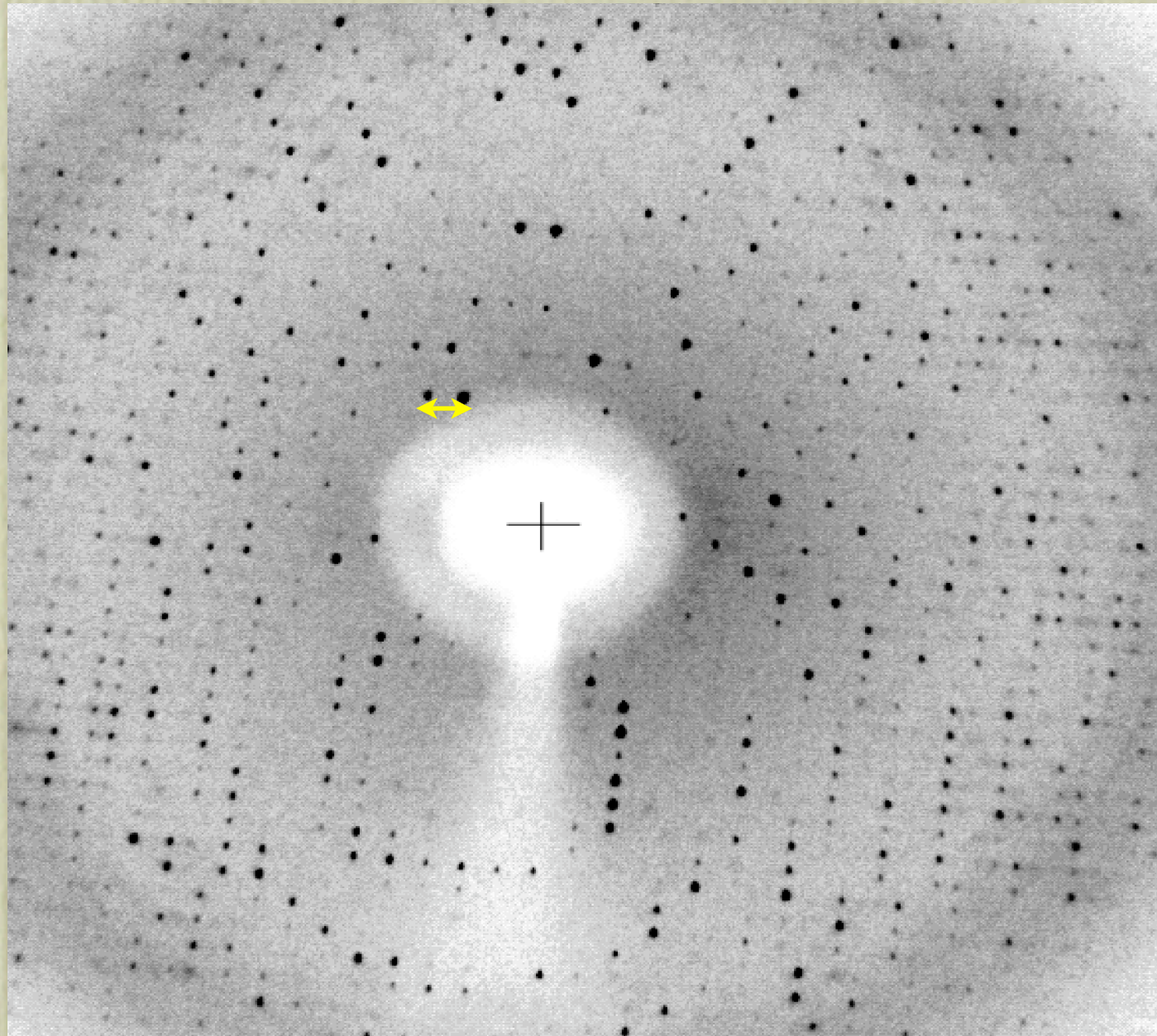


Chaque point du cristal se comporte comme une source de RX

Enregistrement des données



Cliché de diffraction

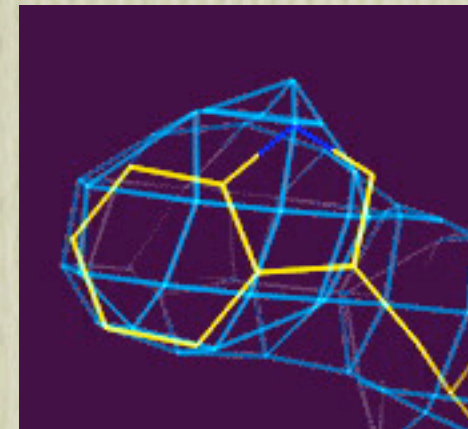
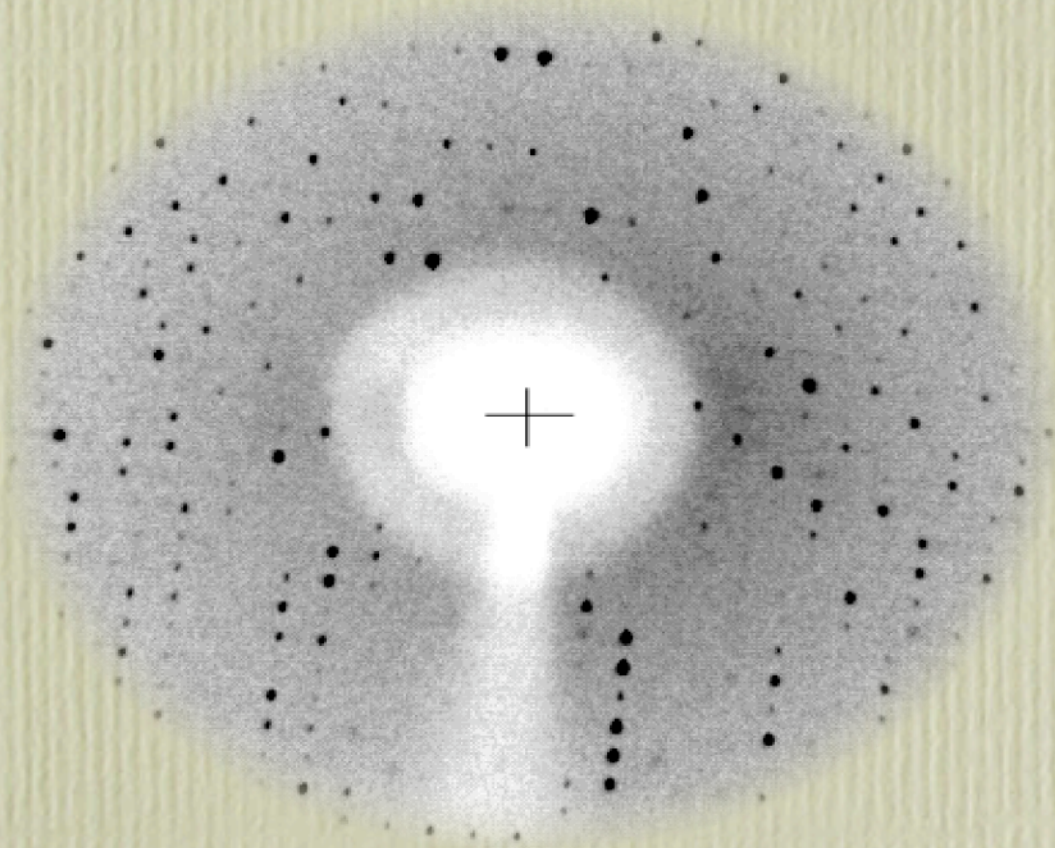


- L'espacement entre les taches est inversement proportionnel à la taille de la maille
-
- L'intensité des taches dépend de la distribution des électrons

Reconstitution de la densité électronique

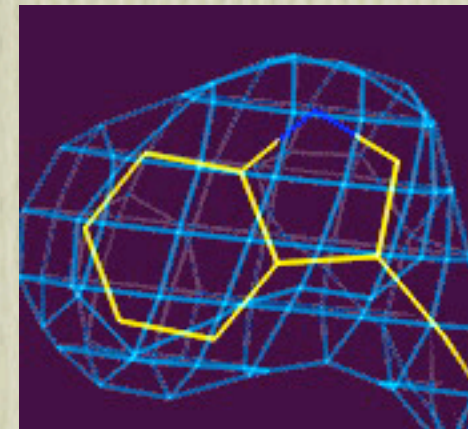
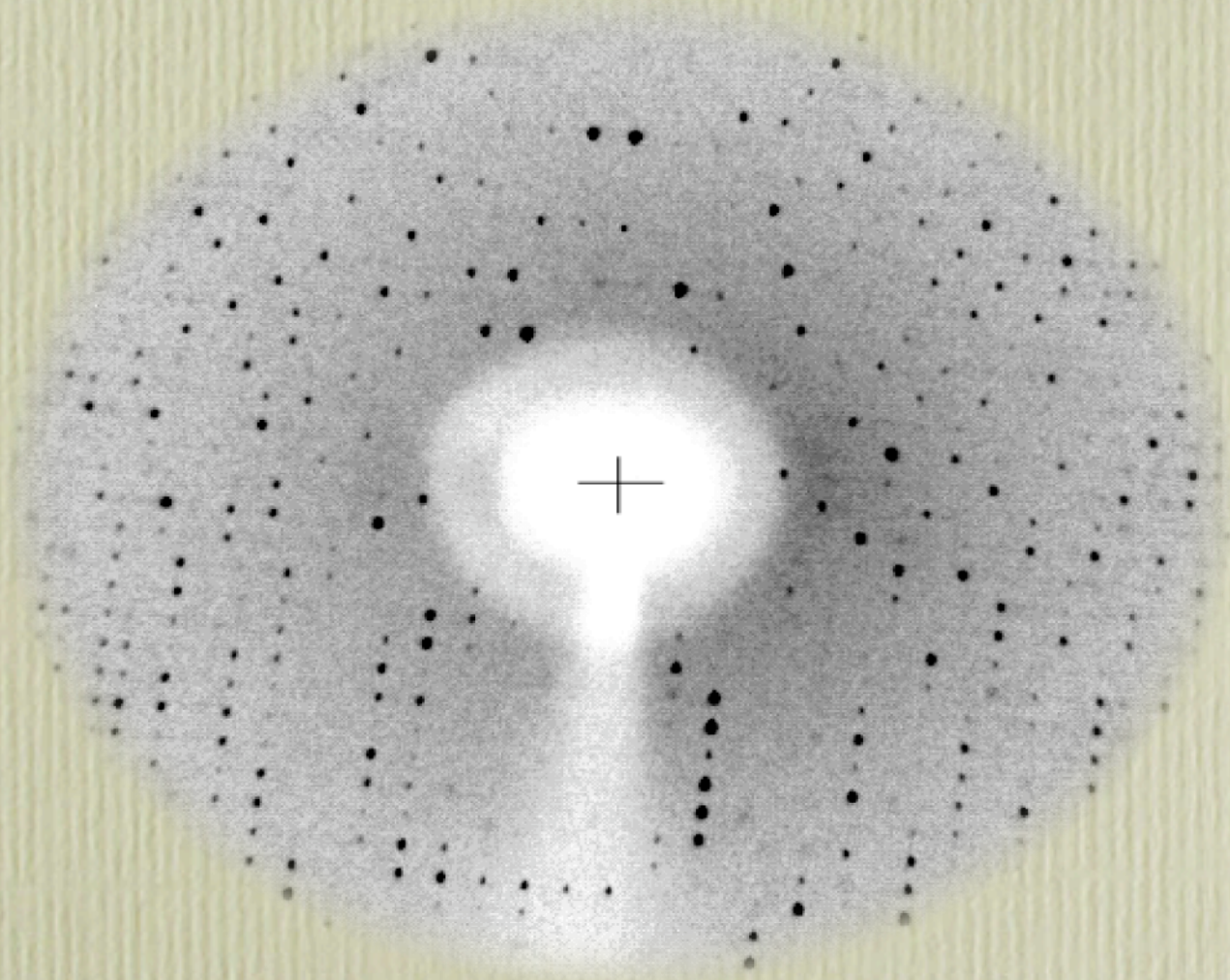
- Par transformation de Fourier du signal de diffraction, on obtient la densité électronique de la molécule
- Résolution du problème des phases
 - Dérivés isomorphes
 - Remplacement moléculaire
 - Diffusion anormale
 - Méthodes directes

Résolution



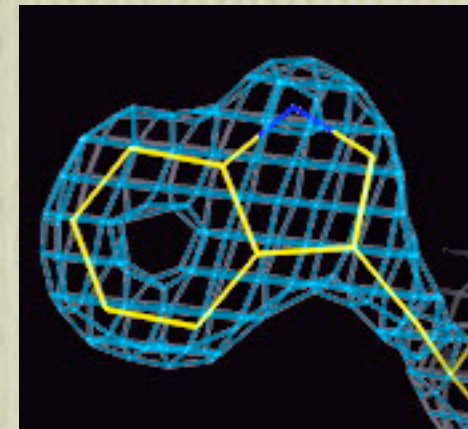
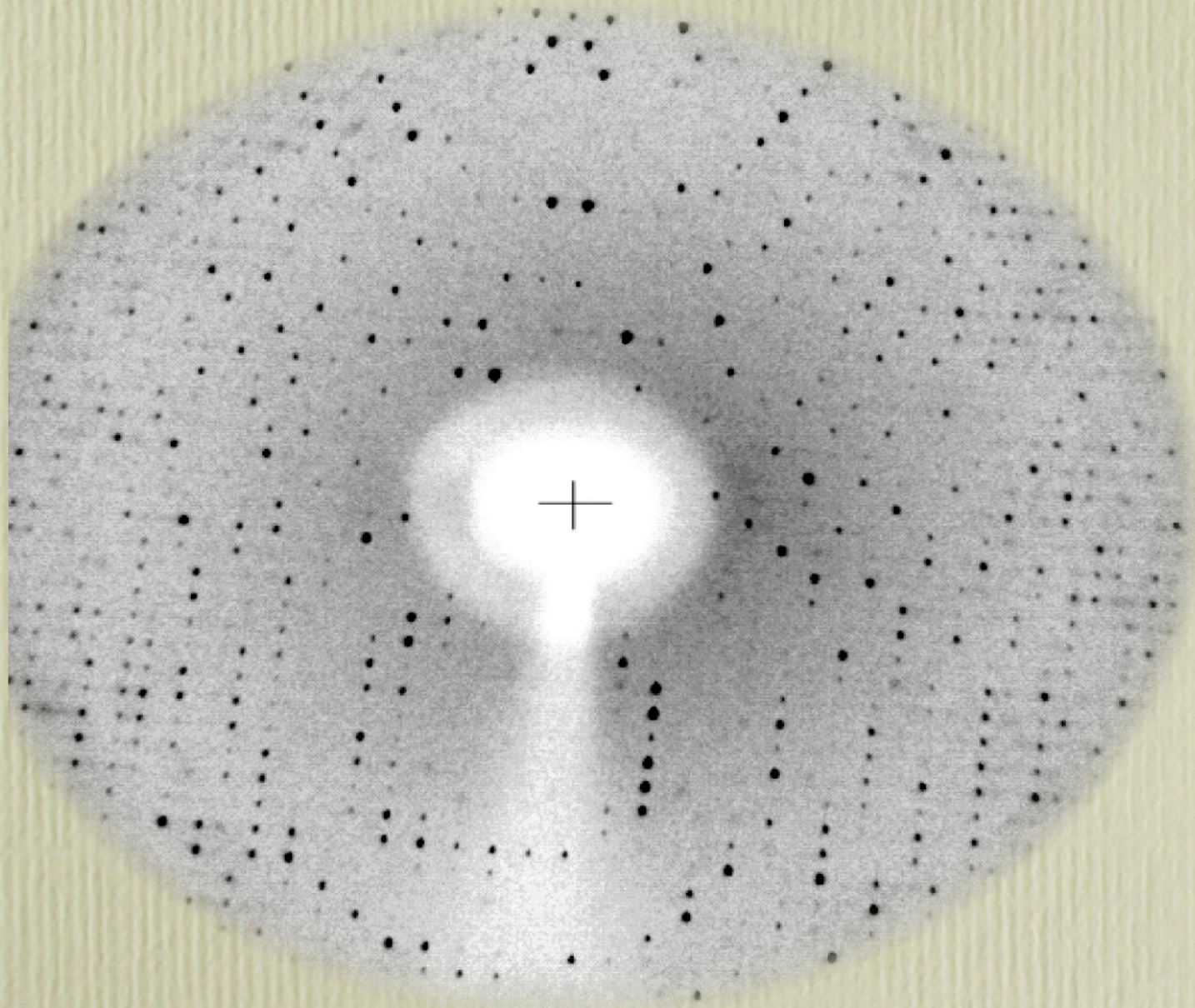
4 Å

Résolution



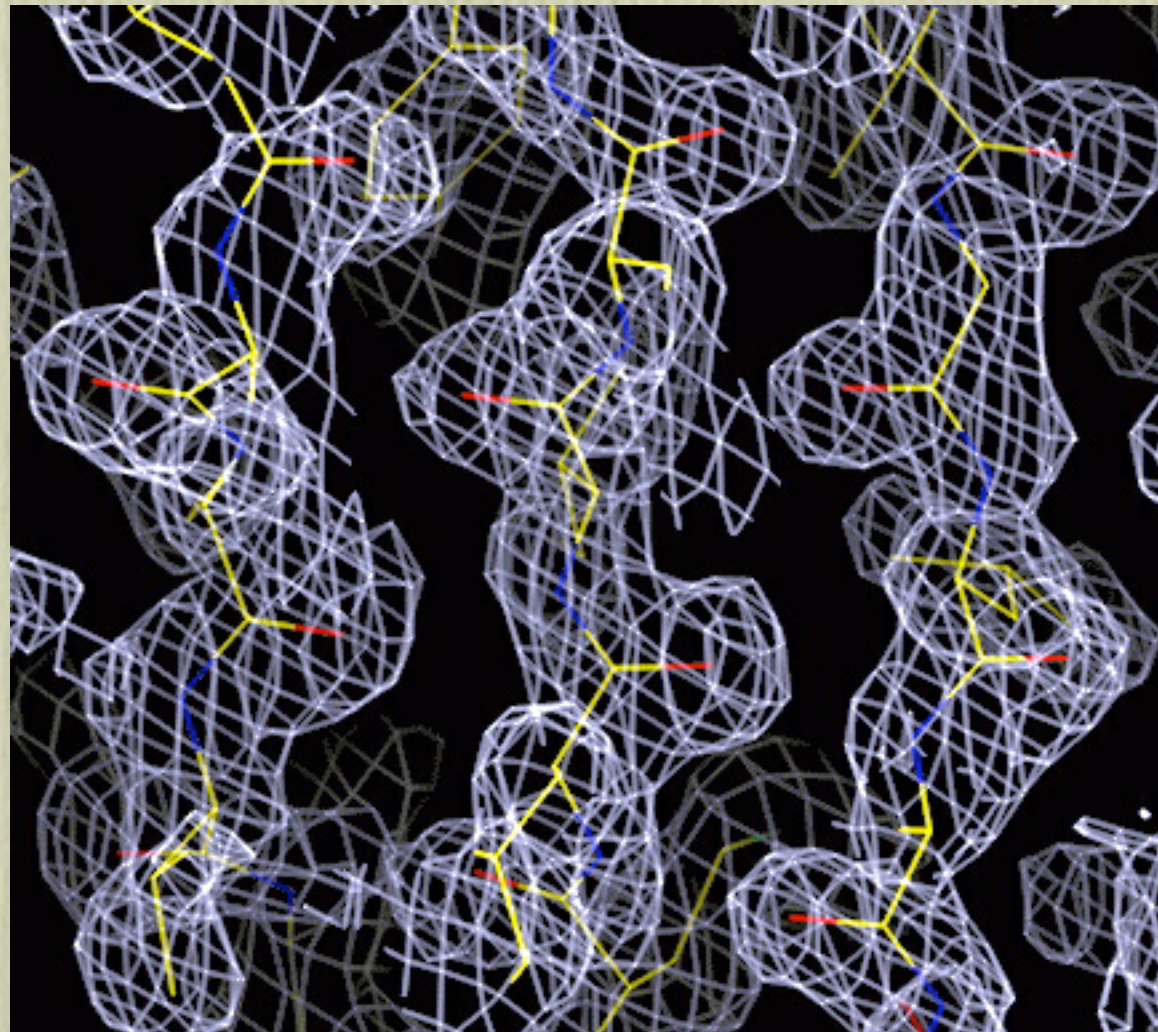
3 Å

Résolution



1.8 Å

Reconstruction de la molécule dans la densité électronique



Aujourd'hui

Résonance Magnétique Nucléaire

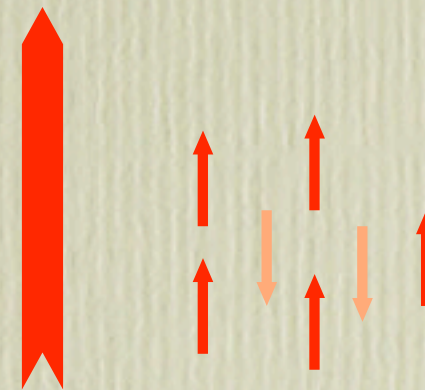
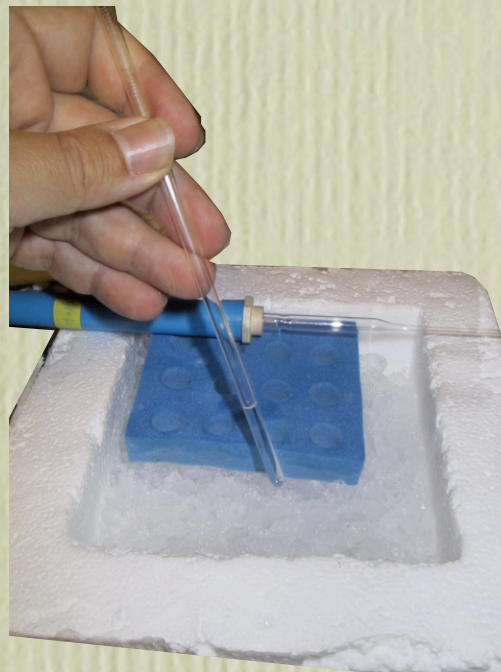


La spectroscopie RMN

Définition : Observation des noyaux des atomes magnétiquement actifs (^1H , ^{15}N , ^{13}C) placés dans un champ magnétique très intense



Un aimant supraconducteur plongé dans l'hélium liquide crée un champ magnétique statique de 10 à 20 Teslas

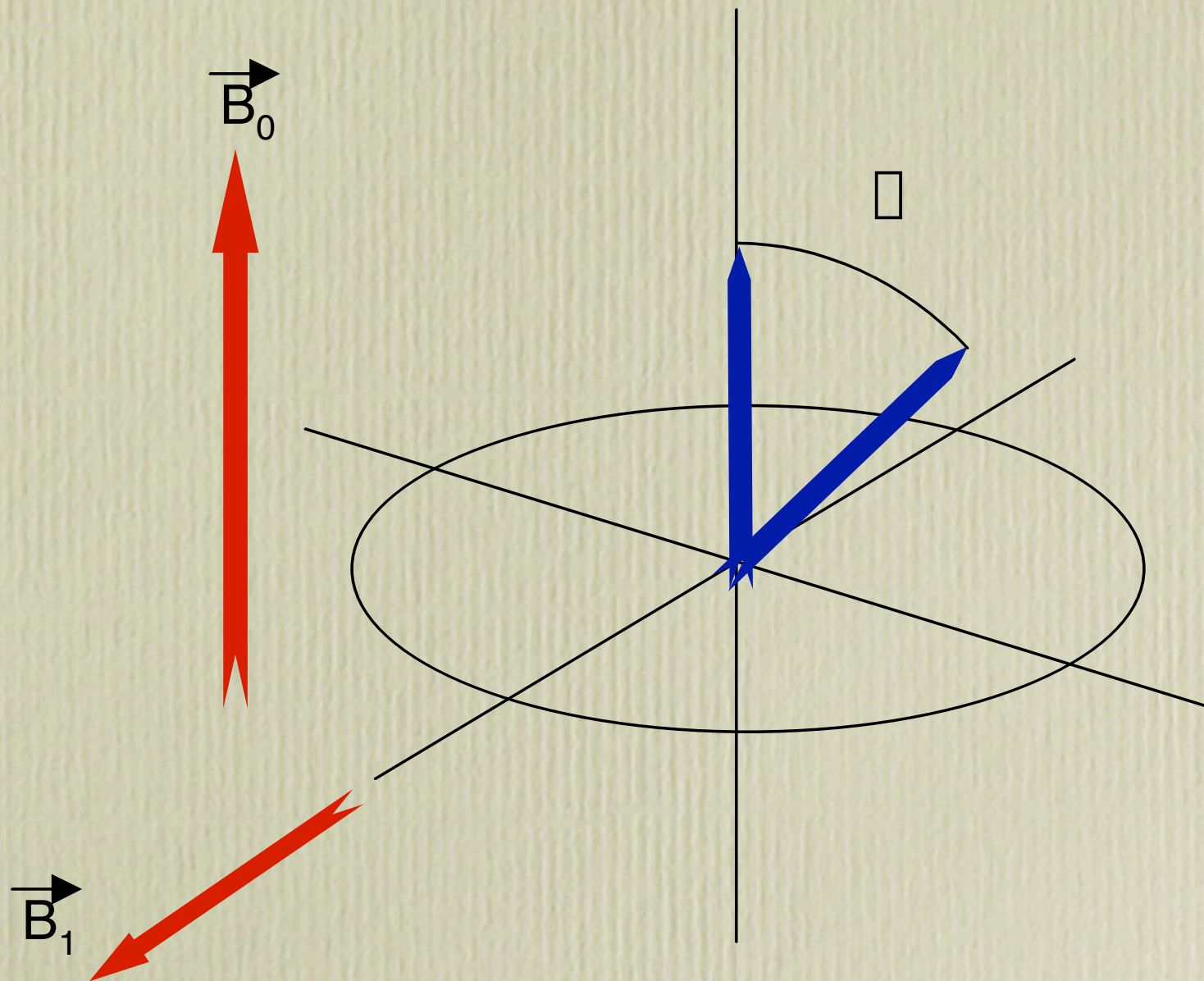


Les dipôles magnétiques nucléaires (spins) s'alignent dans le champ statique

La majorité des spins devient parallèle au champ, créant une aimantation macroscopique dans l'échantillon

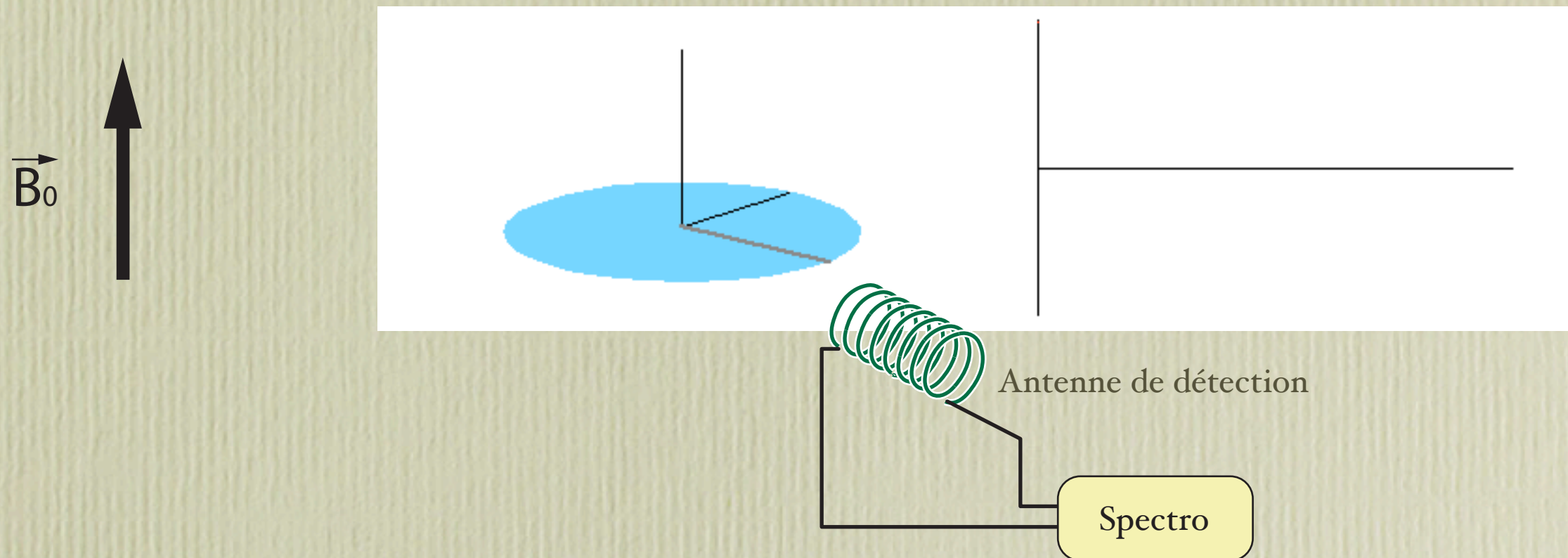
La RMN se focalise surtout sur les noyaux d'hydrogène ^1H (protons)

Expérience RMN standard



Au moyen d'un second champ magnétique B_1 , appliqué pendant une courte durée, on peut basculer l'aimantation des spins d'un angle ϑ que l'on peut contrôler

Signal de précession magnétique



Expérience RMN :

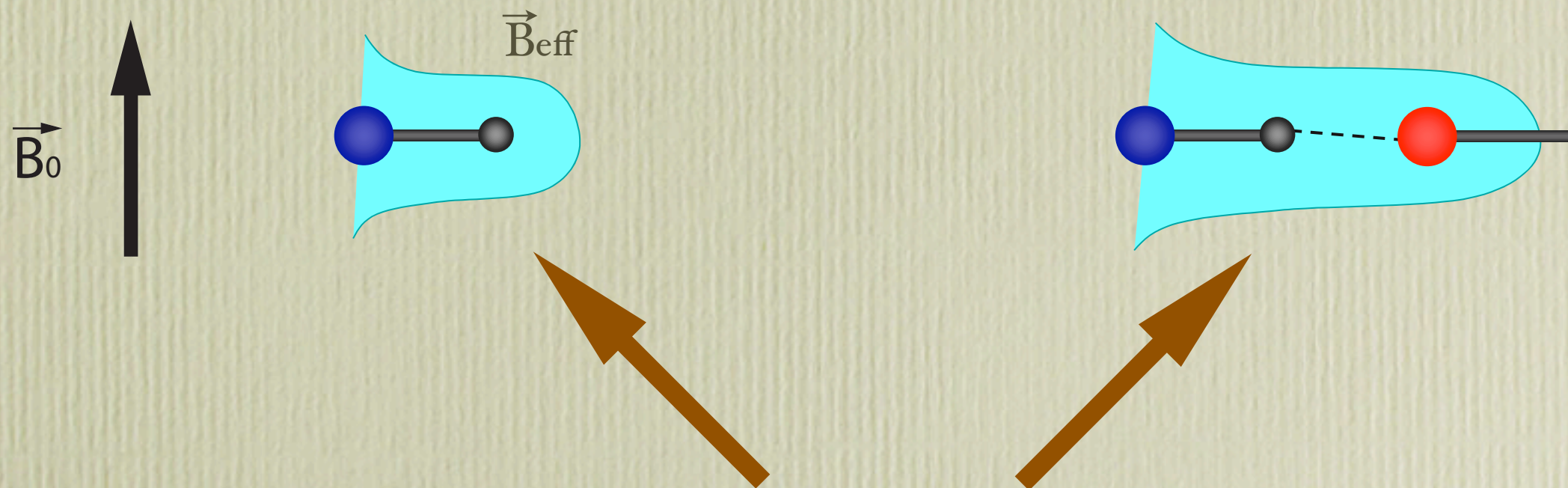
Le signal détecté est une sinusoïde amortie :

- Le dipole tourne autour de l'axe du champ avec une fréquence $\omega = \gamma B_0$

moment gyromagnétique

Dans une molécule tous les noyaux ne “voient” pas
le même champ magnétique

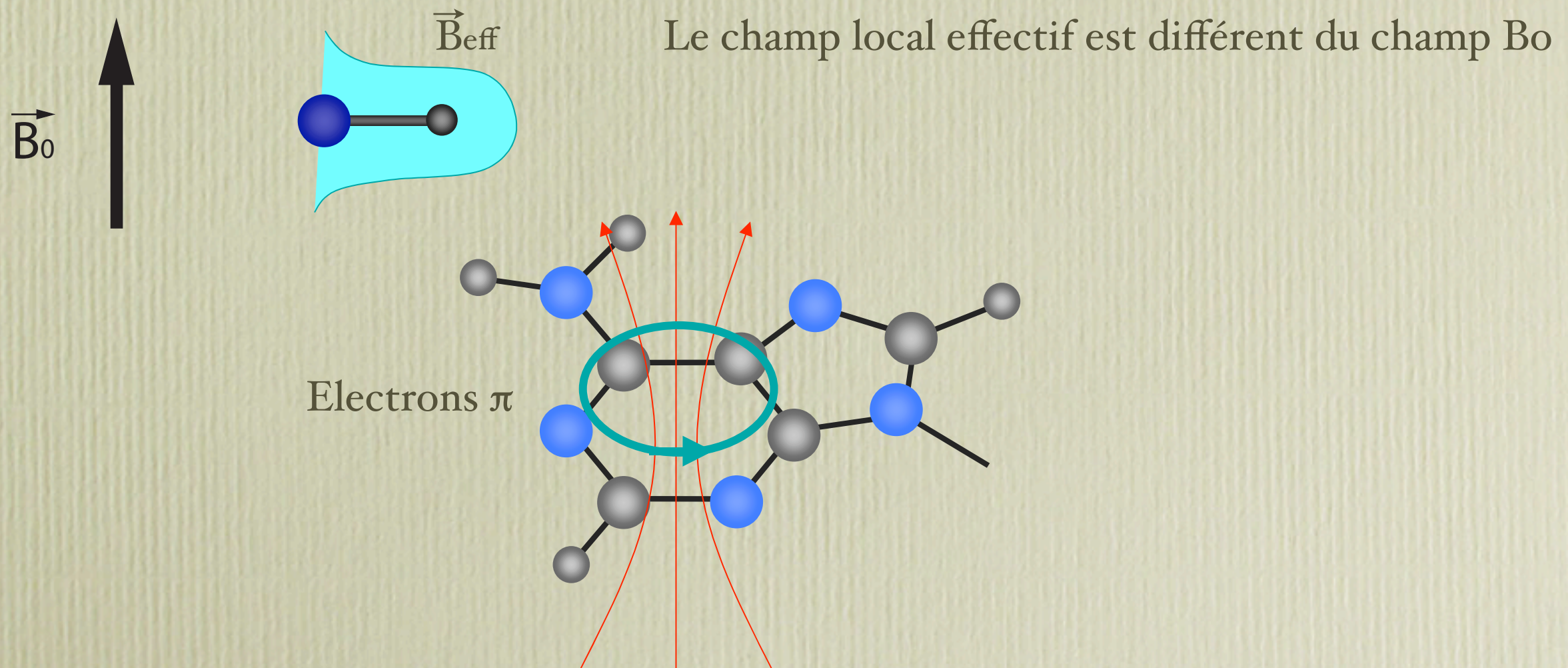
Les électrons qui gravitent autour de la molécule font écran au champ magnétique



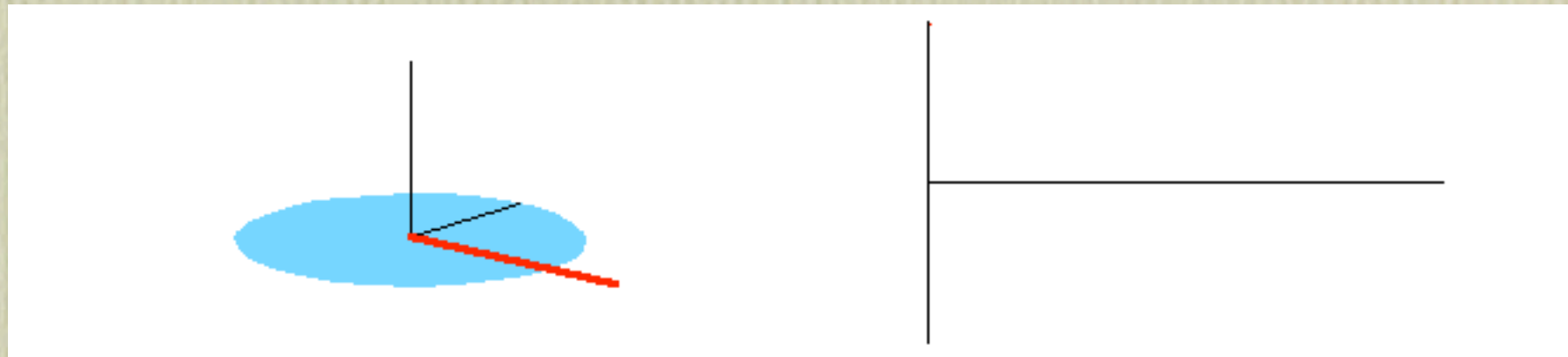
Les liaisons hydrogènes modifient la distribution des
électrons et donc le champ effectif “vu” par les spins
nucléaires

Dans une molécule tous les noyaux ne “voient” pas
le même champ magnétique

Les cycles aromatiques se comportent comme des “nano-bobines” de courant



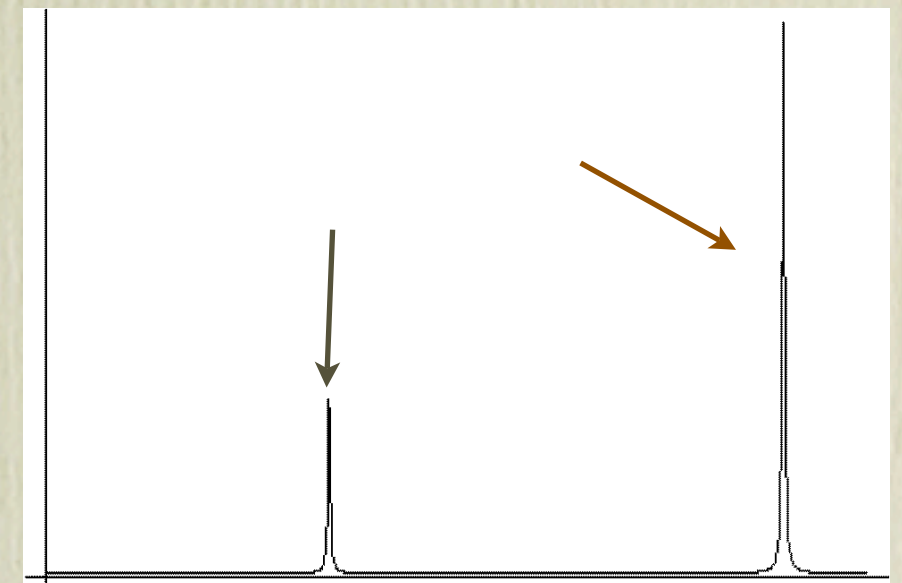
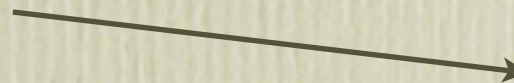
Spin multiples



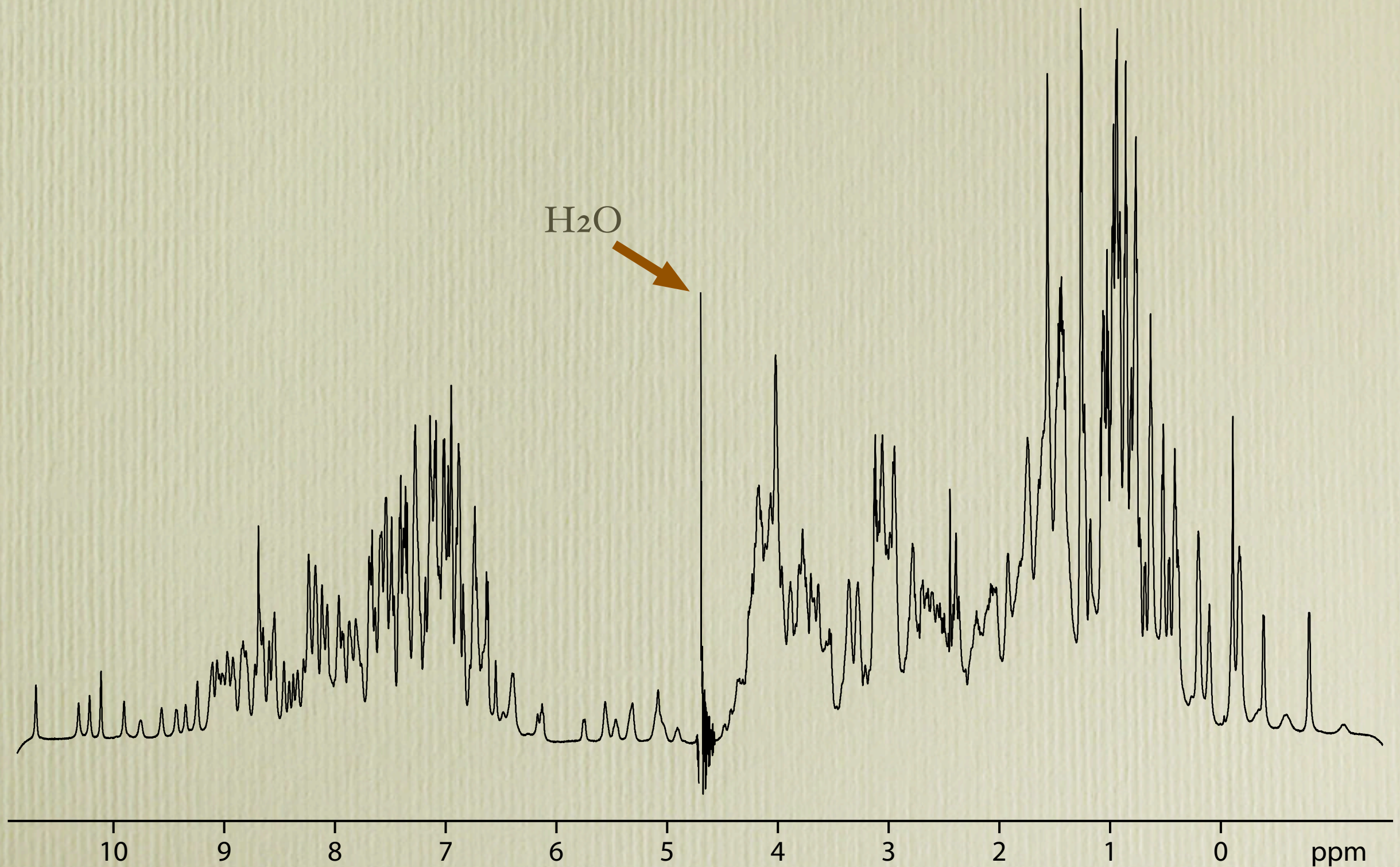
Le signal résultant est la somme des signaux individuels

Identification des contributions individuelles
→ Extraction des fréquences du signal temporel

Transformée de Fourier



Spectre de macromolécule

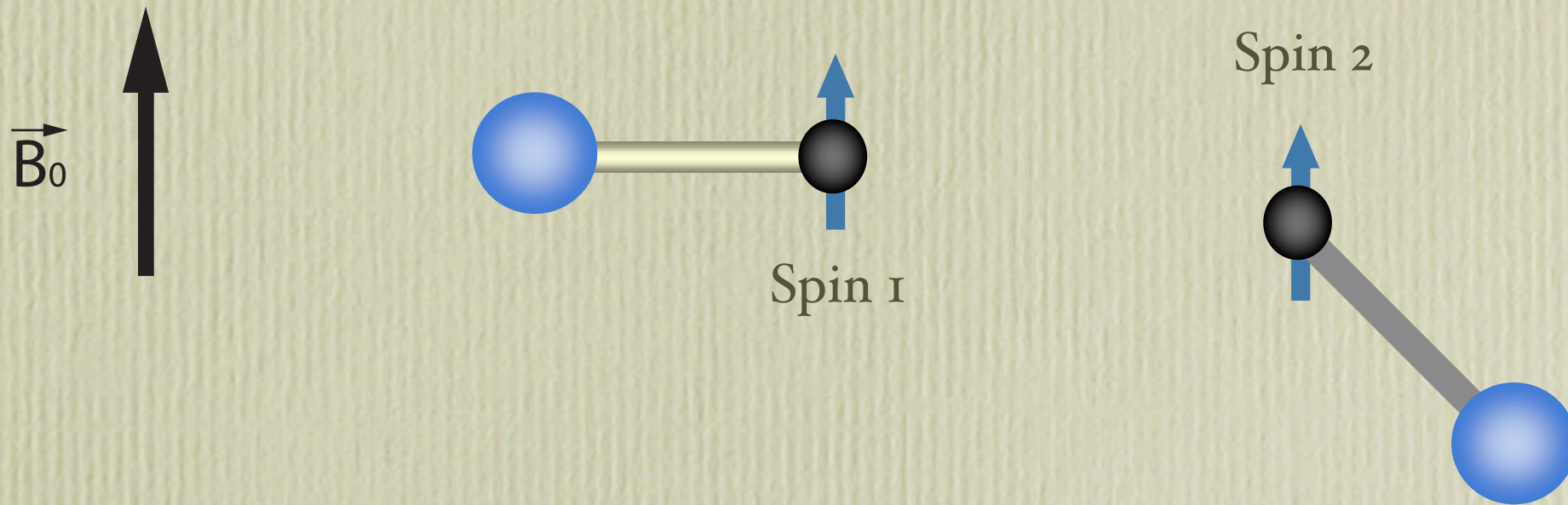


≈ 800 protons

Problème : extraire l'information de ce spectre complexe

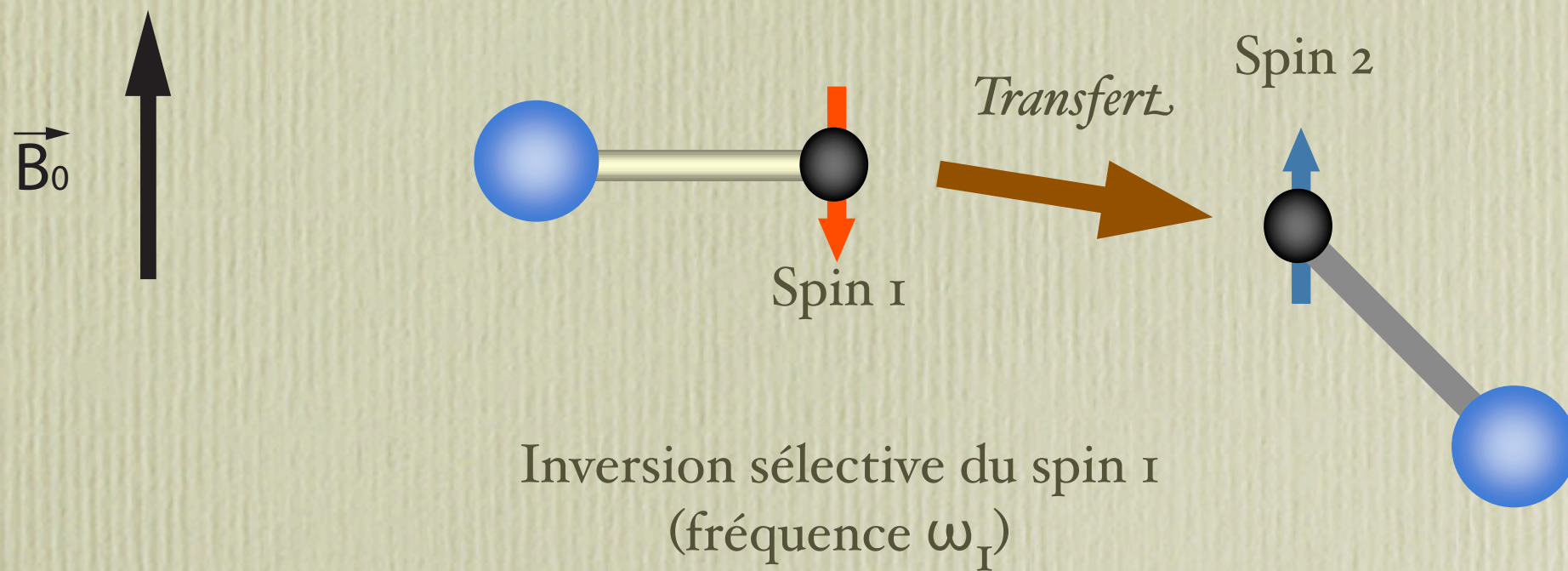
Couplage dipolaire

Transfert d'aimantation



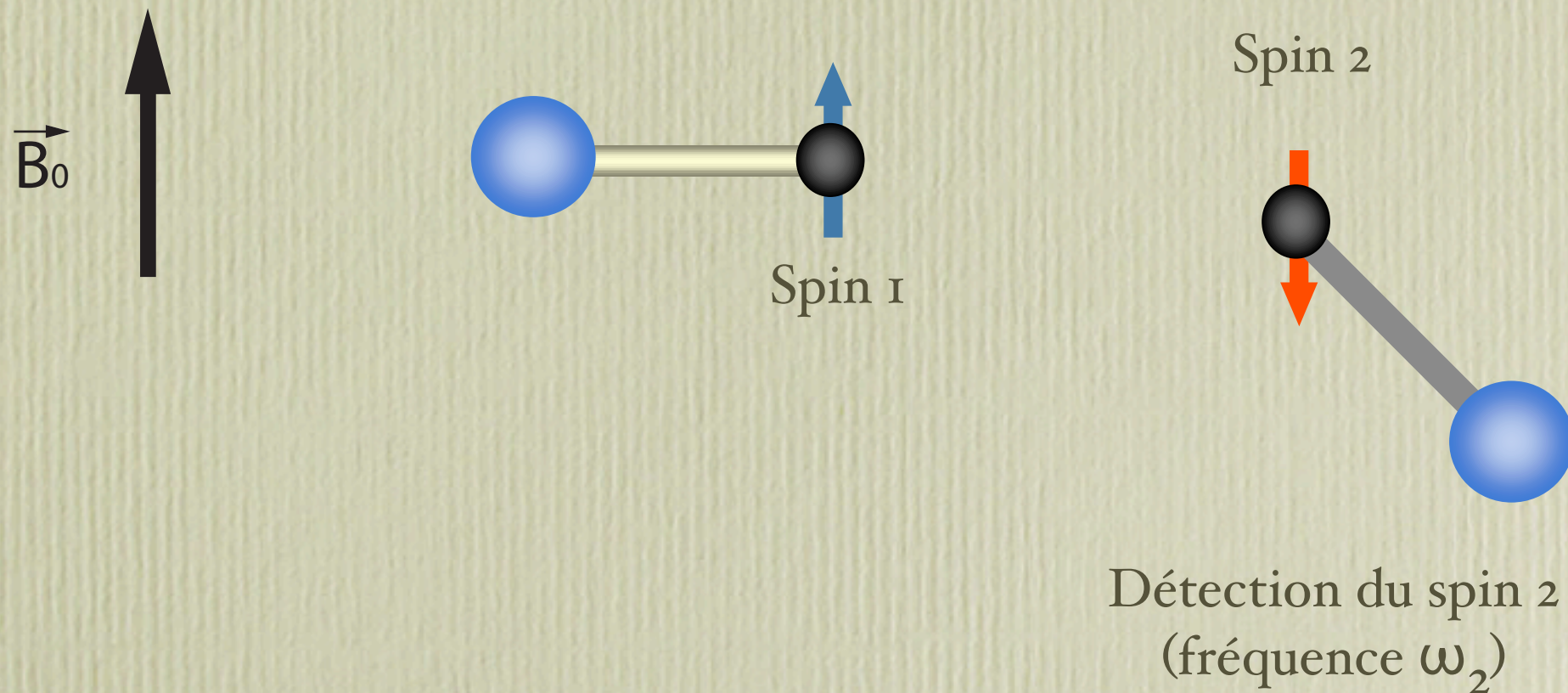
Couplage dipolaire

Transfert d'aimantation



Couplage dipolaire

Transfert d'aimantation



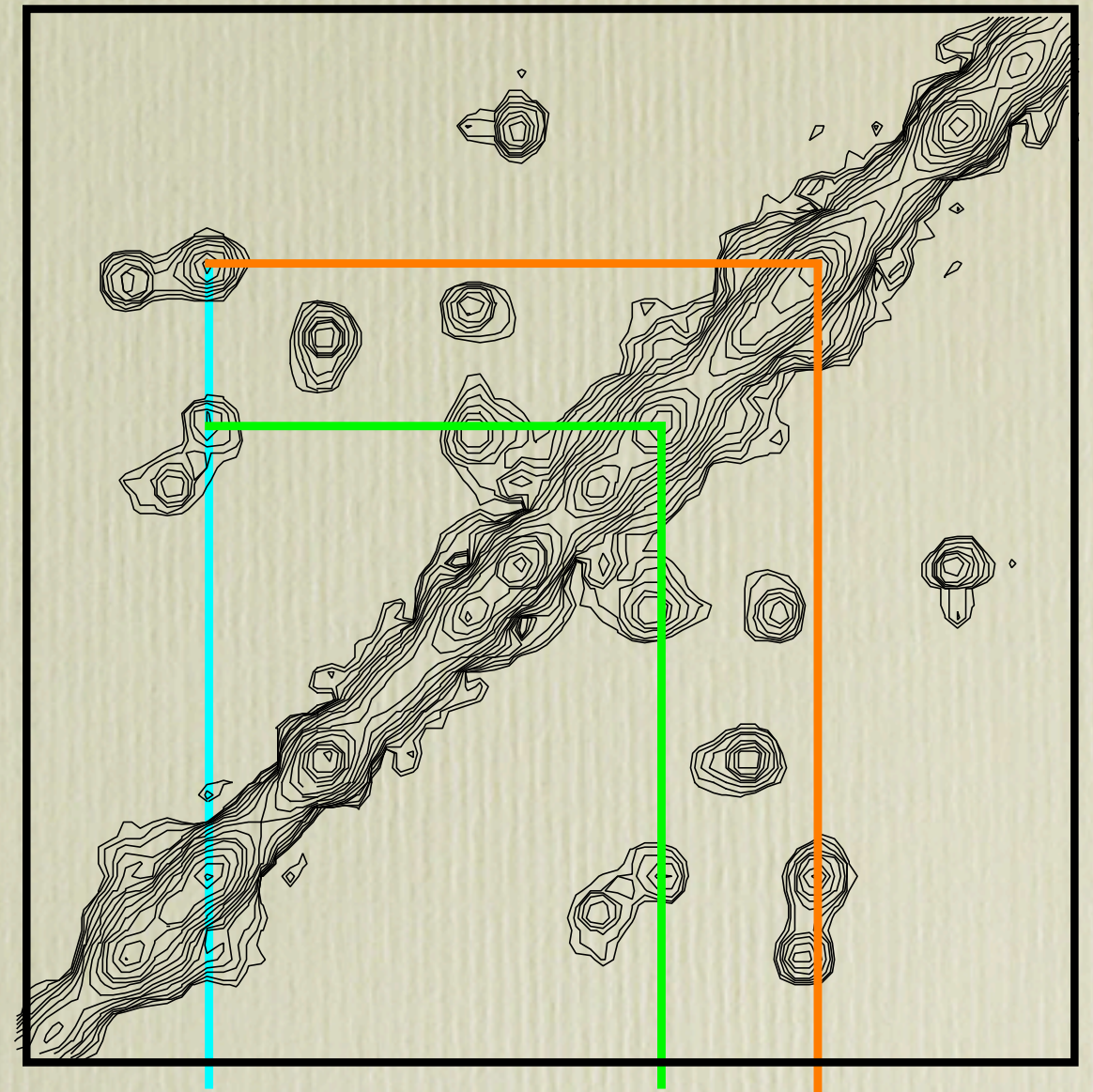
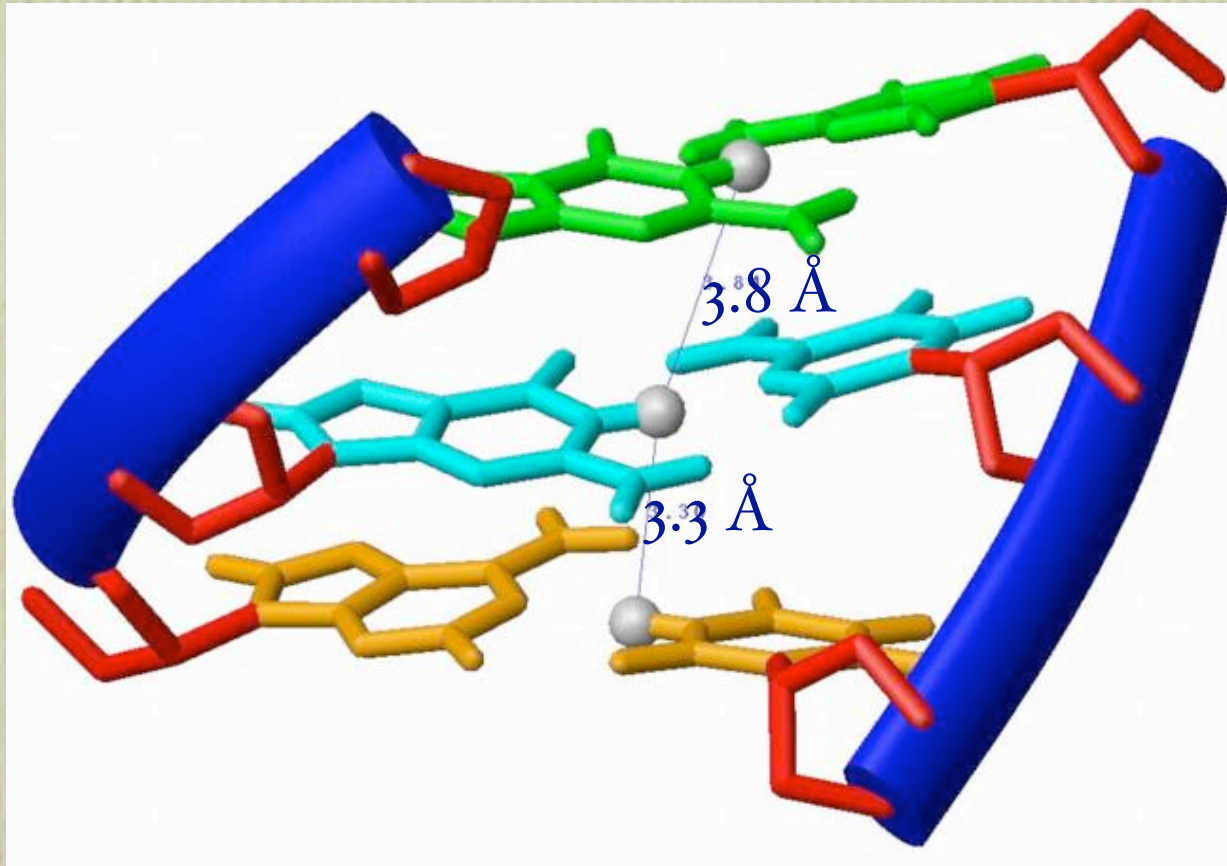
Interaction dipole-dipole

L'efficacité du transfert décroît avec la distance ($1/d^6$)

Observable jusqu'à $\approx 5\text{\AA}$

Effet Overhauser Nucléaire (NOE)

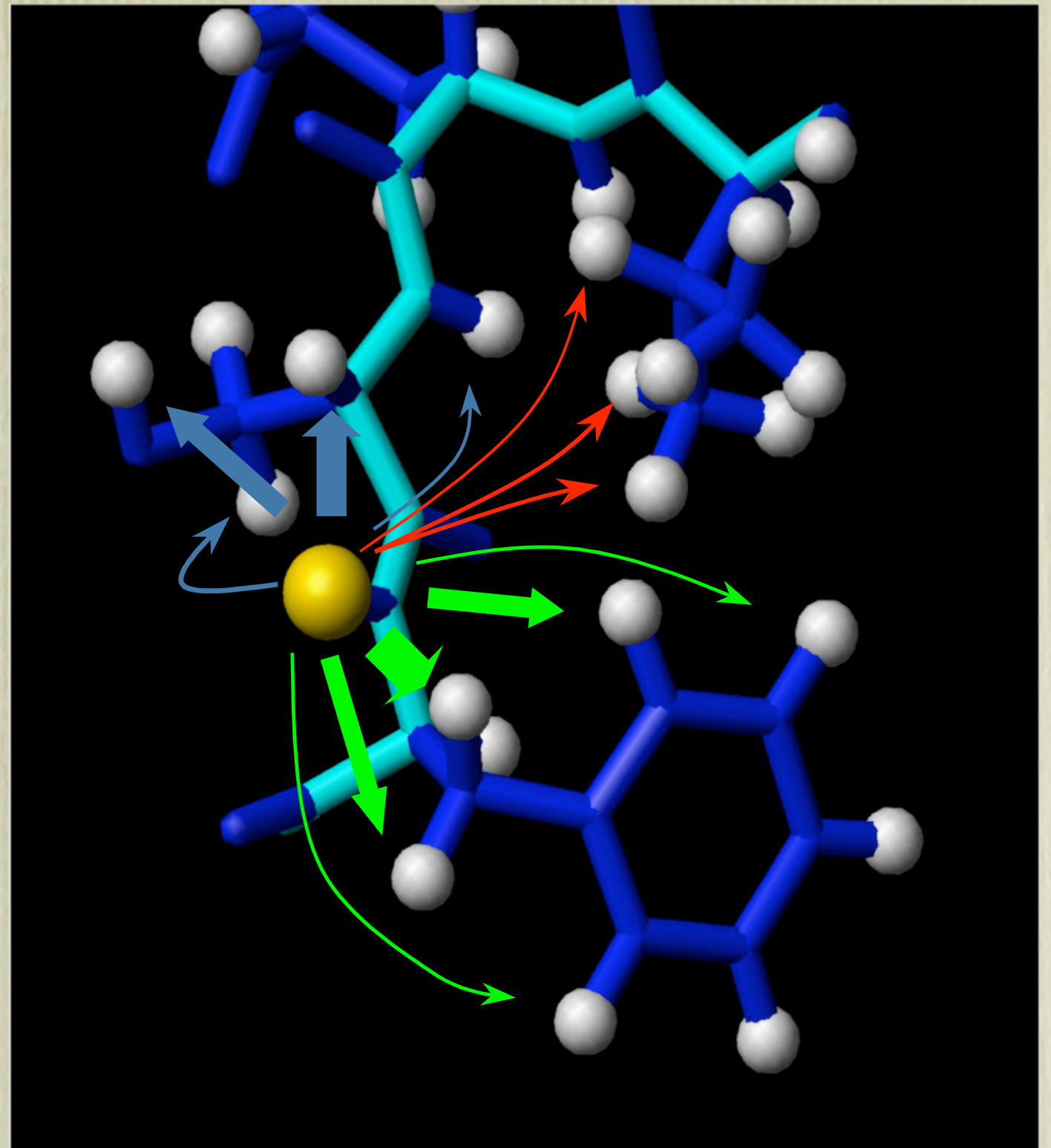
RMN à 2 dimensions



Le couplage dipolaire permet d'identifier les relation de voisinage entre hydrogènes

Structure & distances inter hydrogènes

- Transfert à l'intérieur d'un même résidu : *Identification du type de l'acide aminé*
- Transfert au résidu précédent : *Position dans la séquence*
- Transfert à plus longue distance : *Structure 3D*



Reconstruction de structure

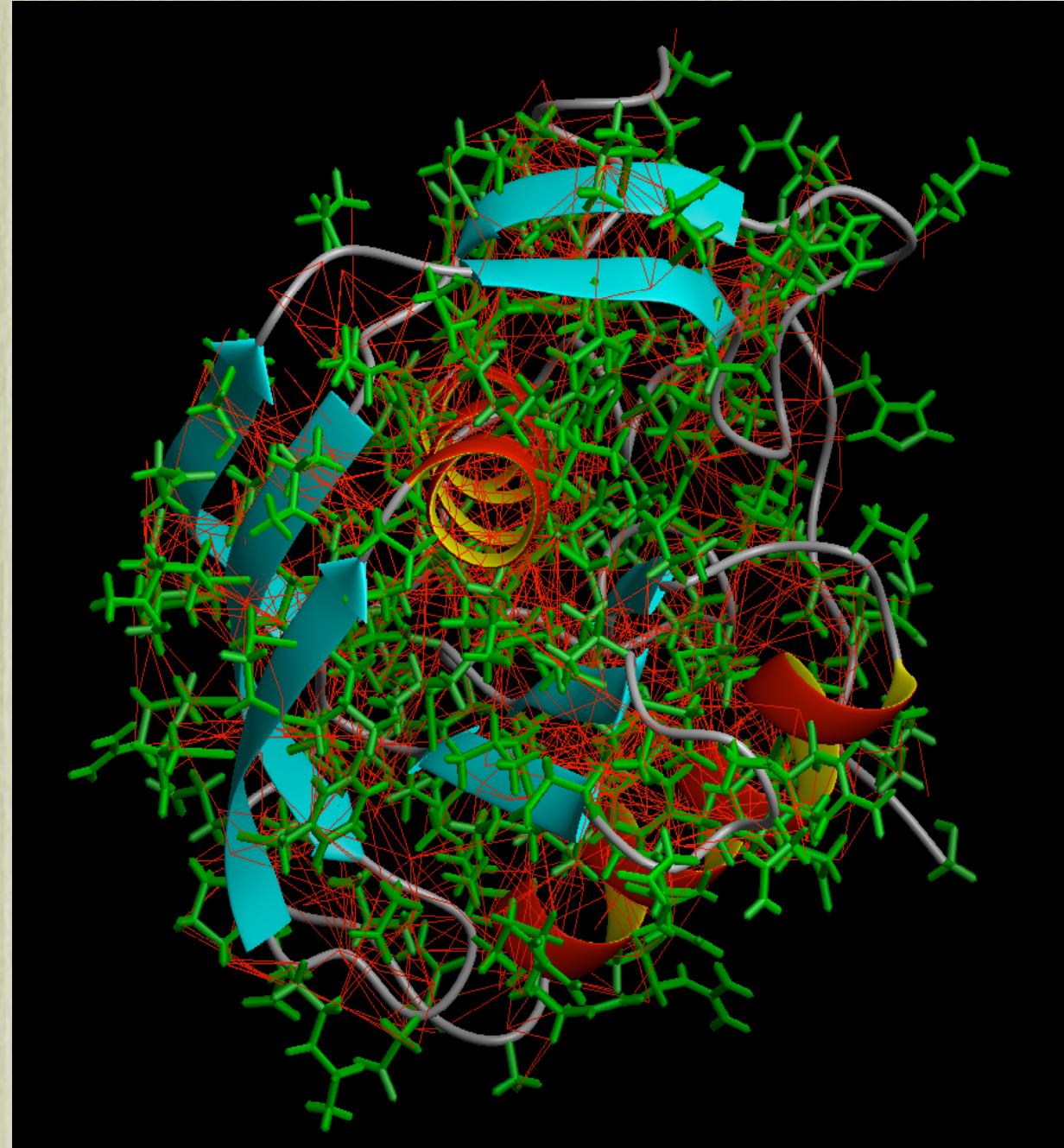
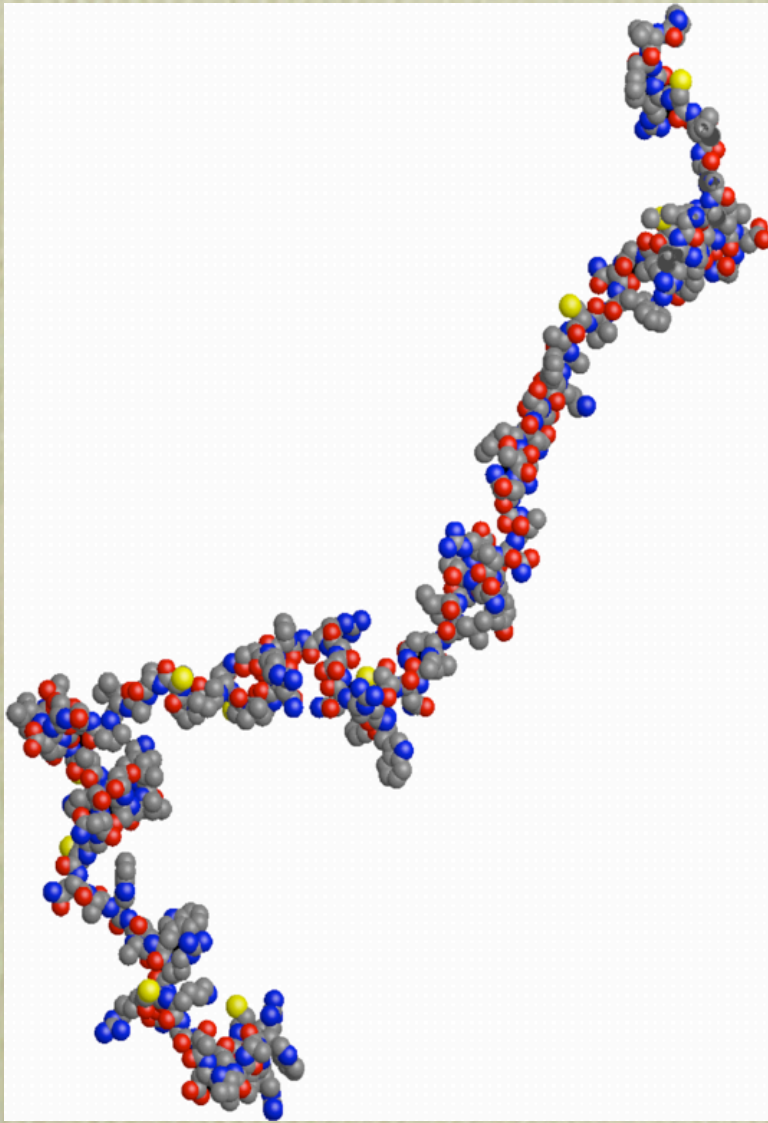
L'analyse RMN permet de compiler une liste de distances et d'angles dièdres entre atomes

Problème : reconstituer la structure 3D à partir d'un jeu de distance



La qualité de la structure dépend de la précision et du nombre de distance mesurées

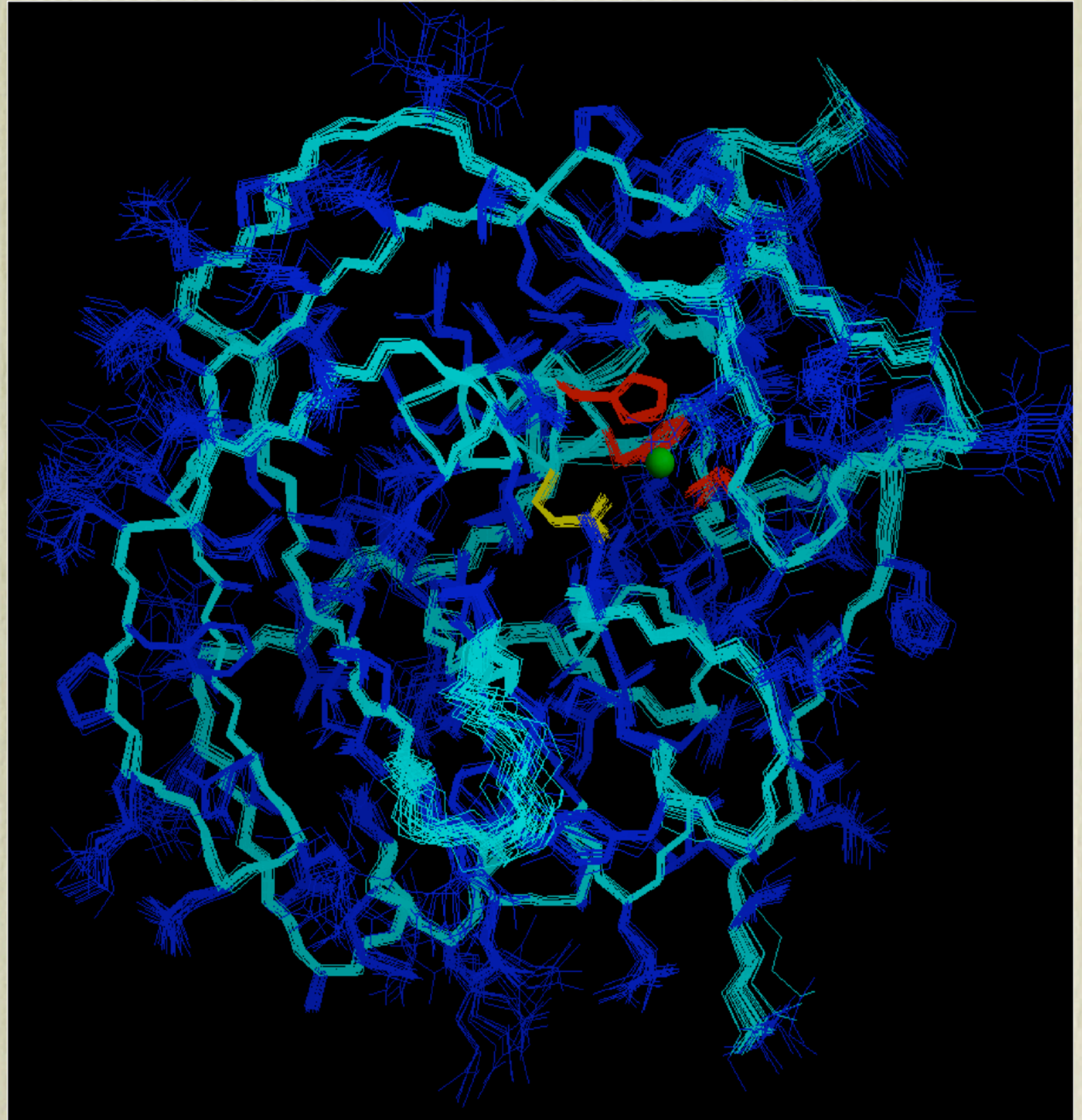
Reconstruction géométrique de la structure



Précision des structures obtenues

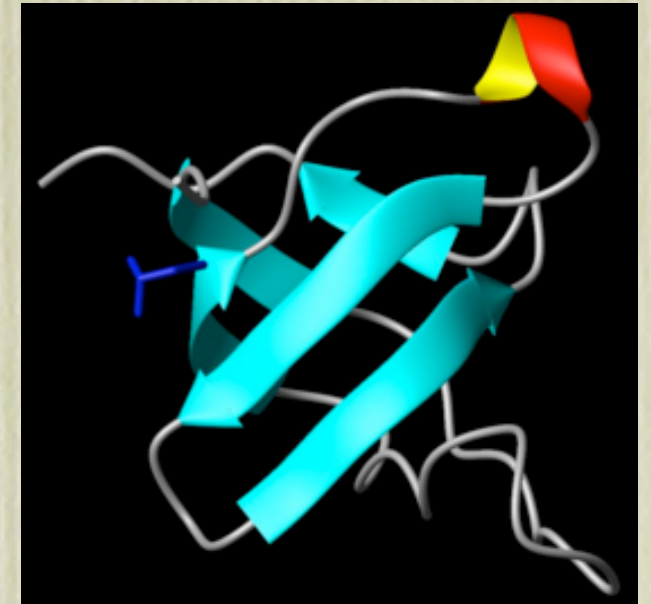
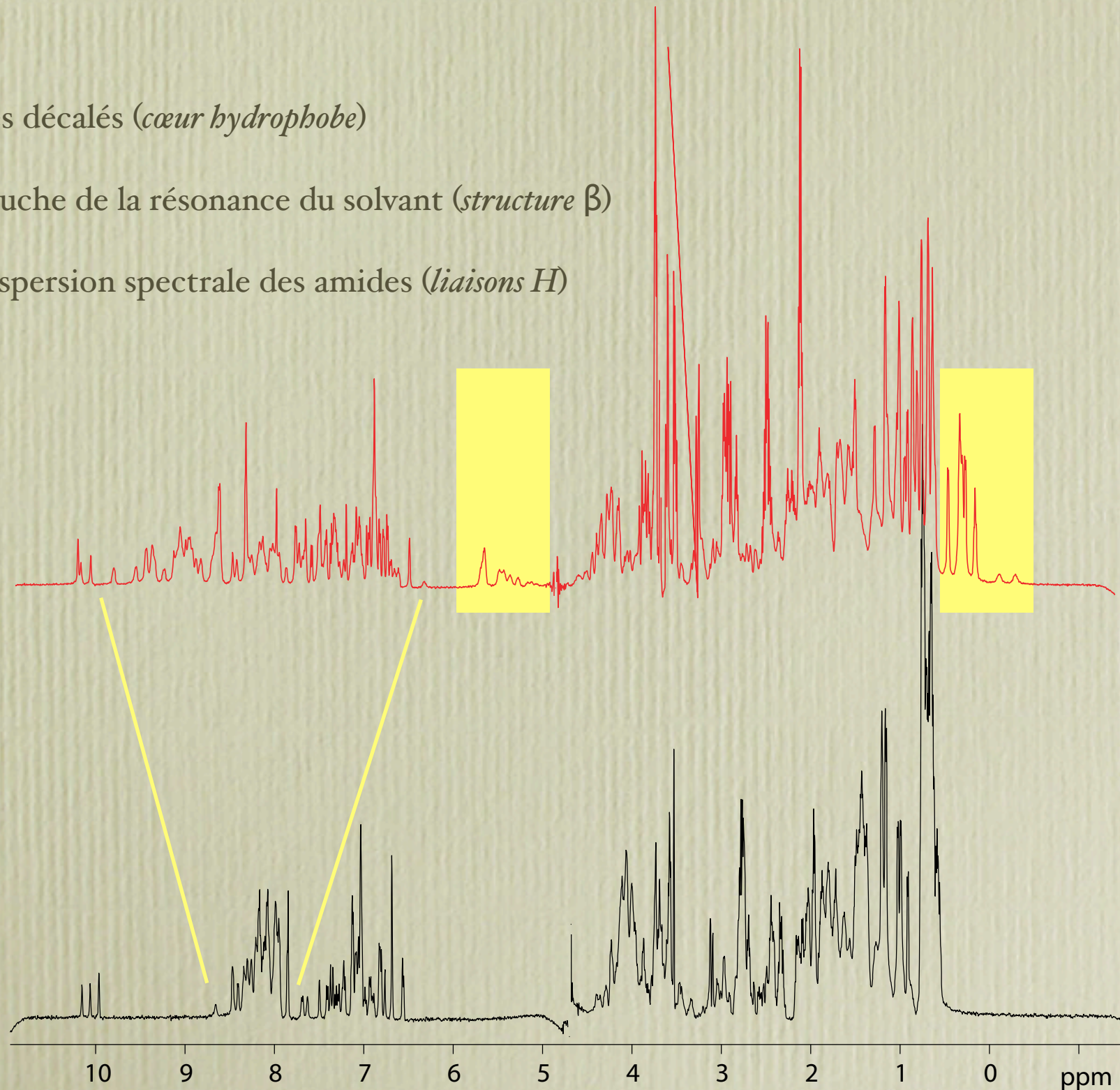
En répétant les calculs de structure à partir de différentes conditions initiales, on échantillonne les conformations compatibles avec les contraintes de distance.

En superposant les conformations obtenues, on obtient une image de la précision de la structure.



Analyse du repliement

- Méthyles décalés (*cœur hydrophobe*)
- H α à gauche de la résonance du solvant (*structure β*)
- Large dispersion spectrale des amides (*liaisons H*)



Domaine SH3 **sauvage**
protéine repliée

Domaine SH3 mutant (*L*→*P*)
pelote statistique

La diffusion centrale

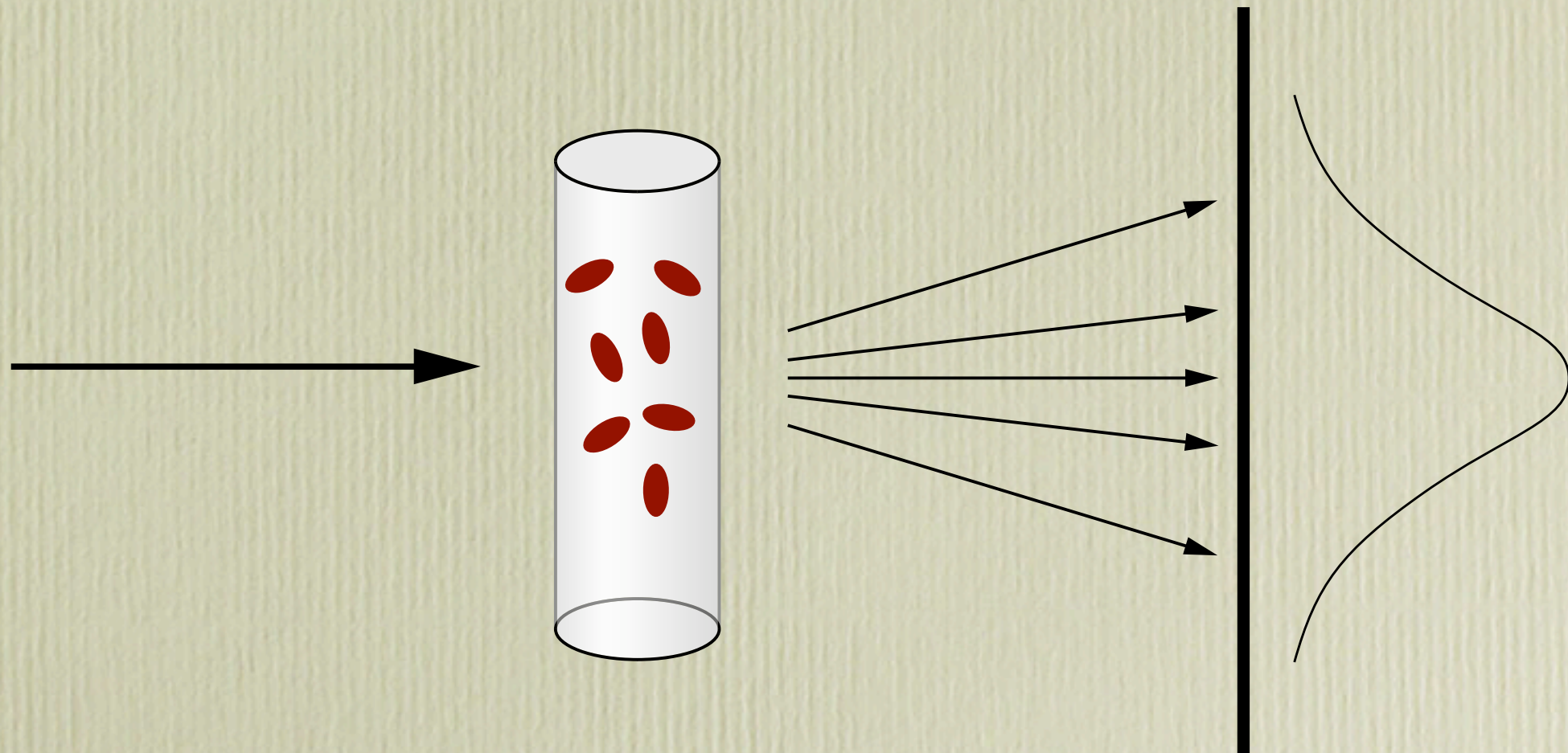
Rayons X et Neutrons

Toute particule en solution diffuse la lumière.
La diffusion dépend de la taille de l'objet

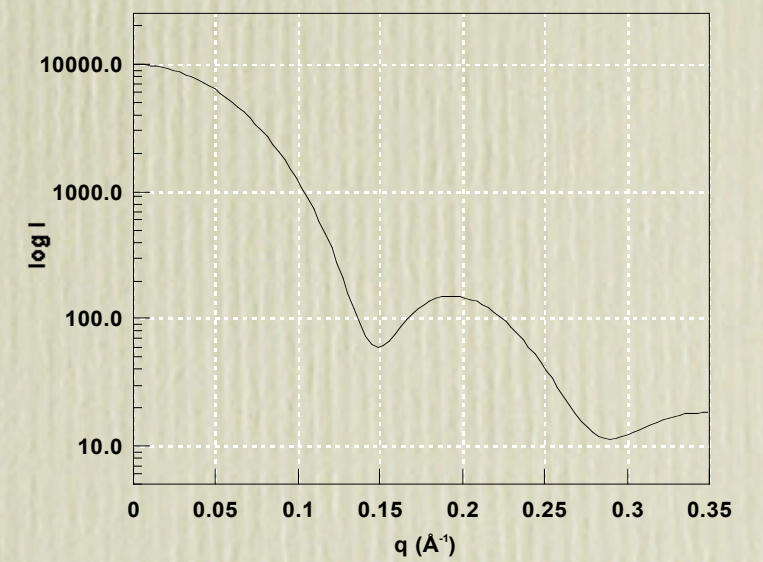
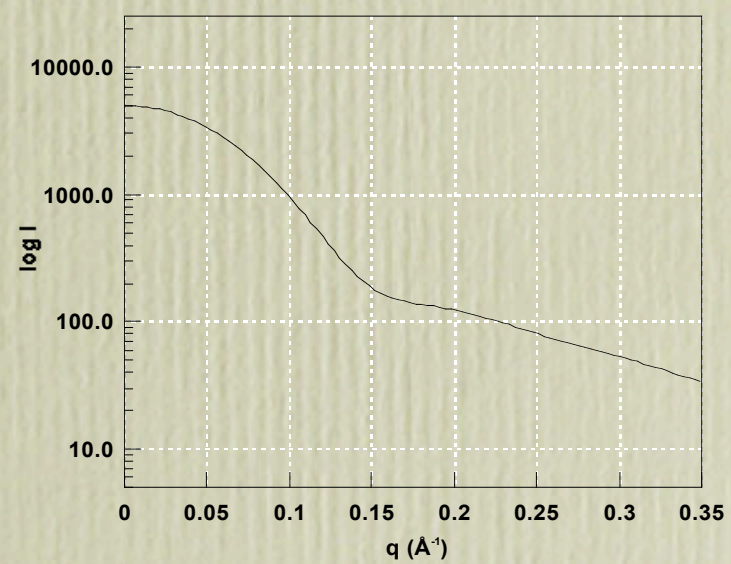
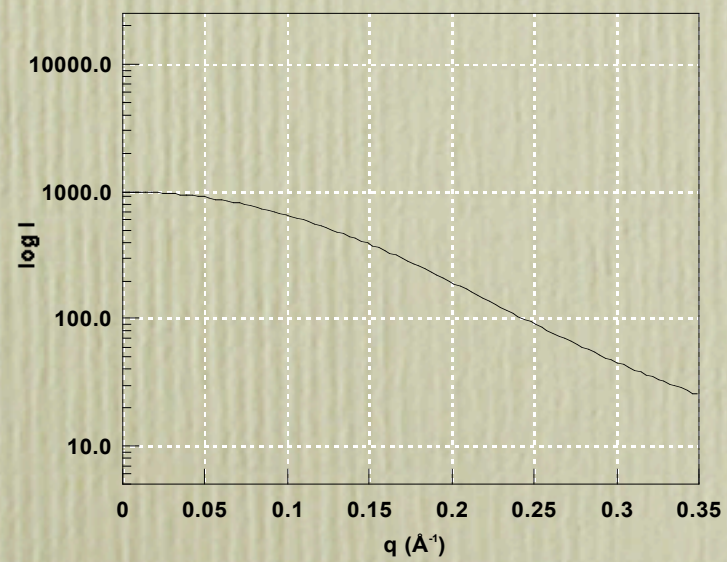
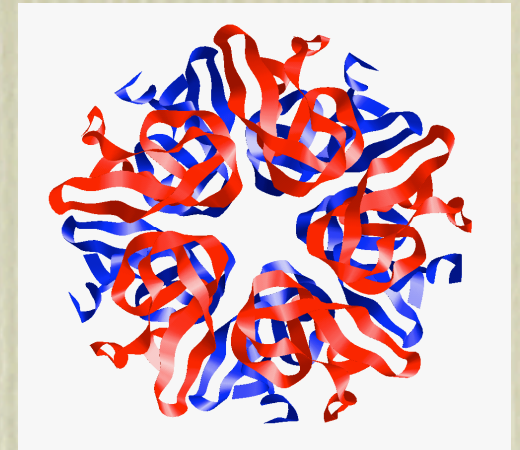


Emulsion eau/lait

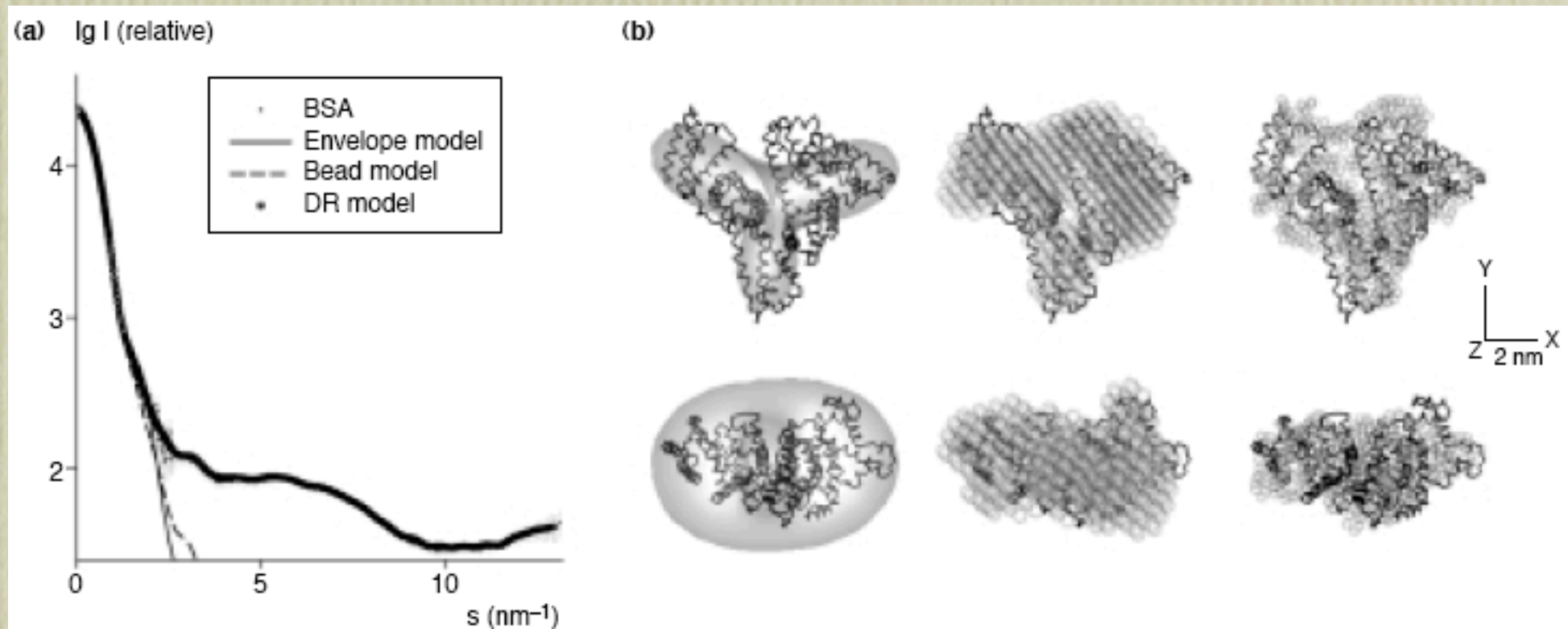
L'intensité diffusée varie en fonction de l'angle.
La forme de la courbe de diffusion dépend de la forme de l'objet qui diffuse



Diffusion / Forme



Reconstitution de la forme

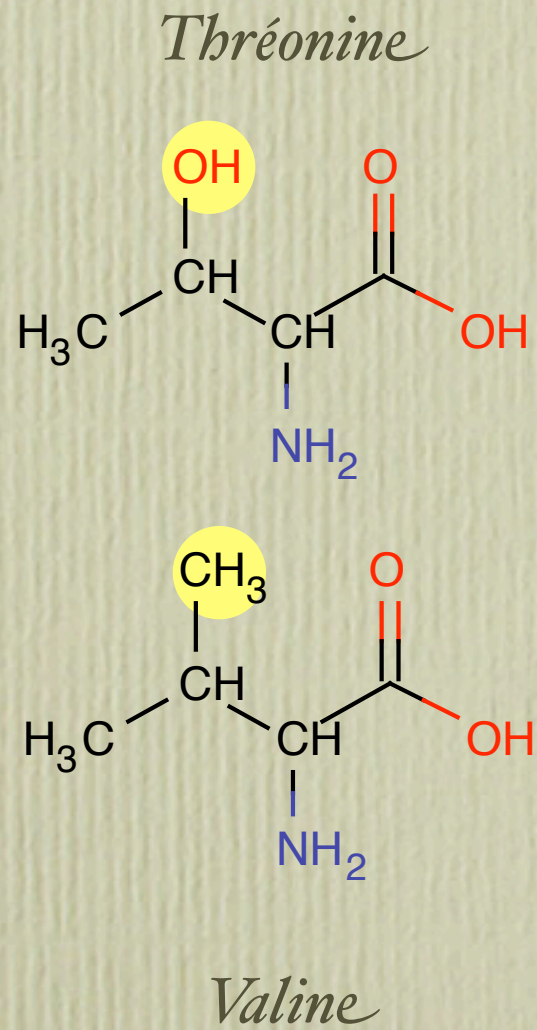


Svergun & Koch (2002) **Current Opinion in Structural Biology**, 12:654-660

Applications de la Biologie Structurale

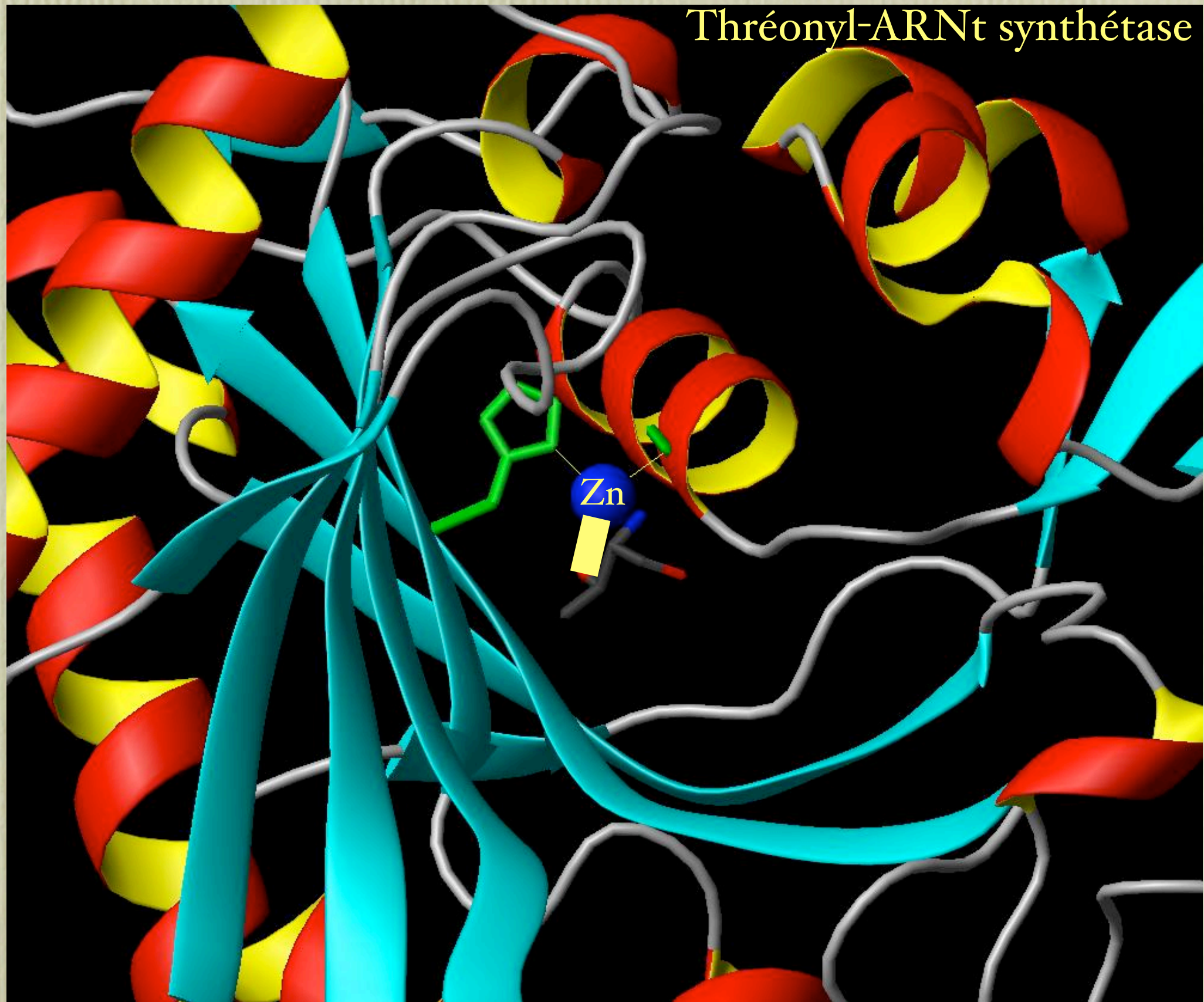
Enzymologie et Biochimie Structurales

Enzymologie Structurale



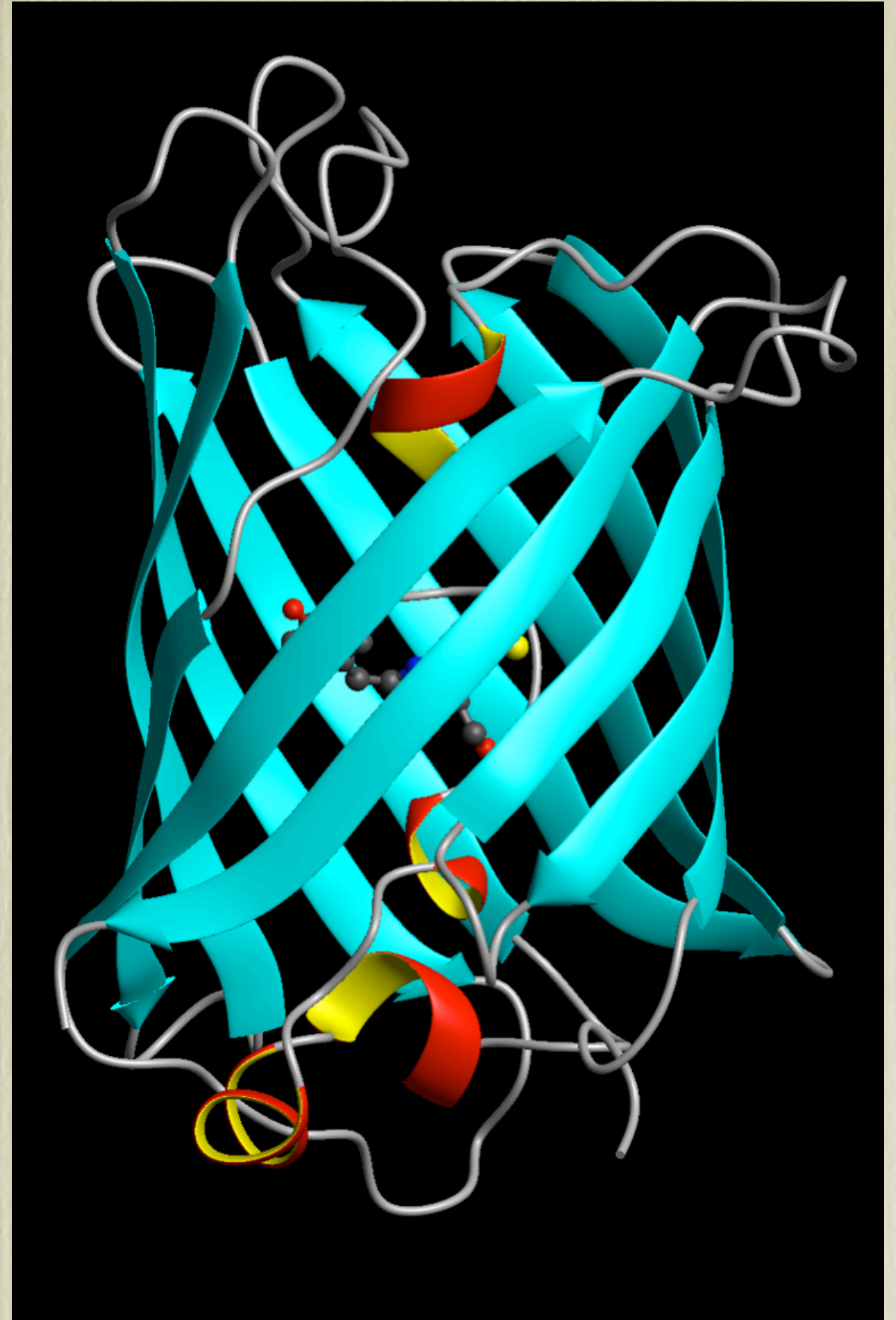
Comment la thréonyl-ARNt synthétase fait-elle la distinction entre deux acides aminés très proches structuralement ?

Enzymologie Structurale

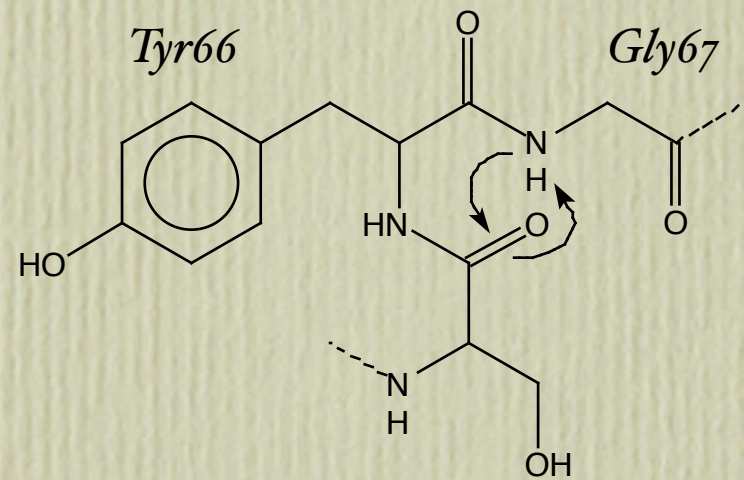


Protéine fluorescente verte (GFP)

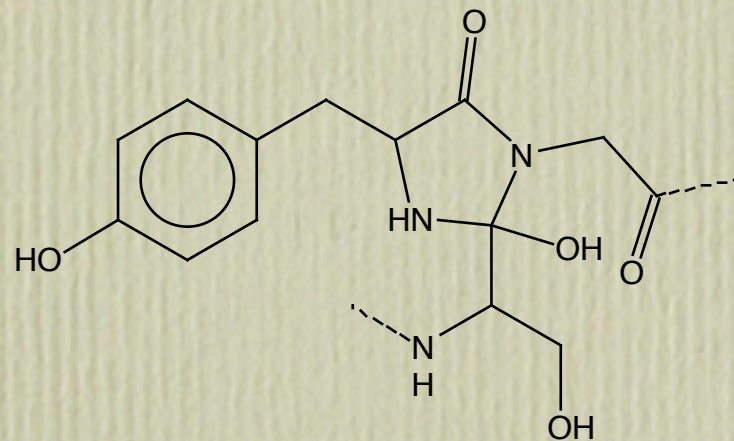
Aqueorea victoria



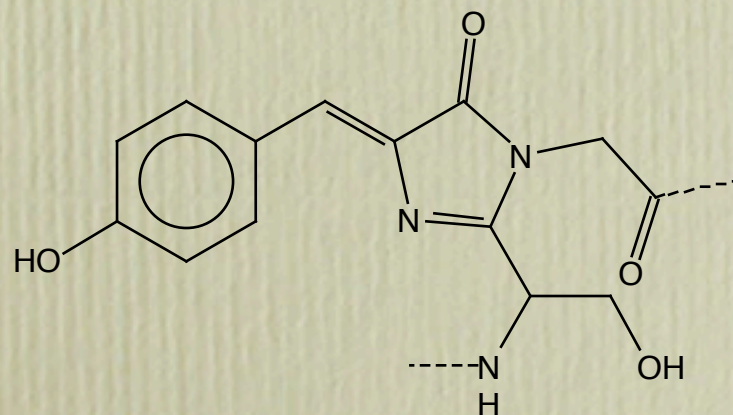
Protéine fluorescente verte (GFP)



Cyclisation



Déshydratation
Oxydation



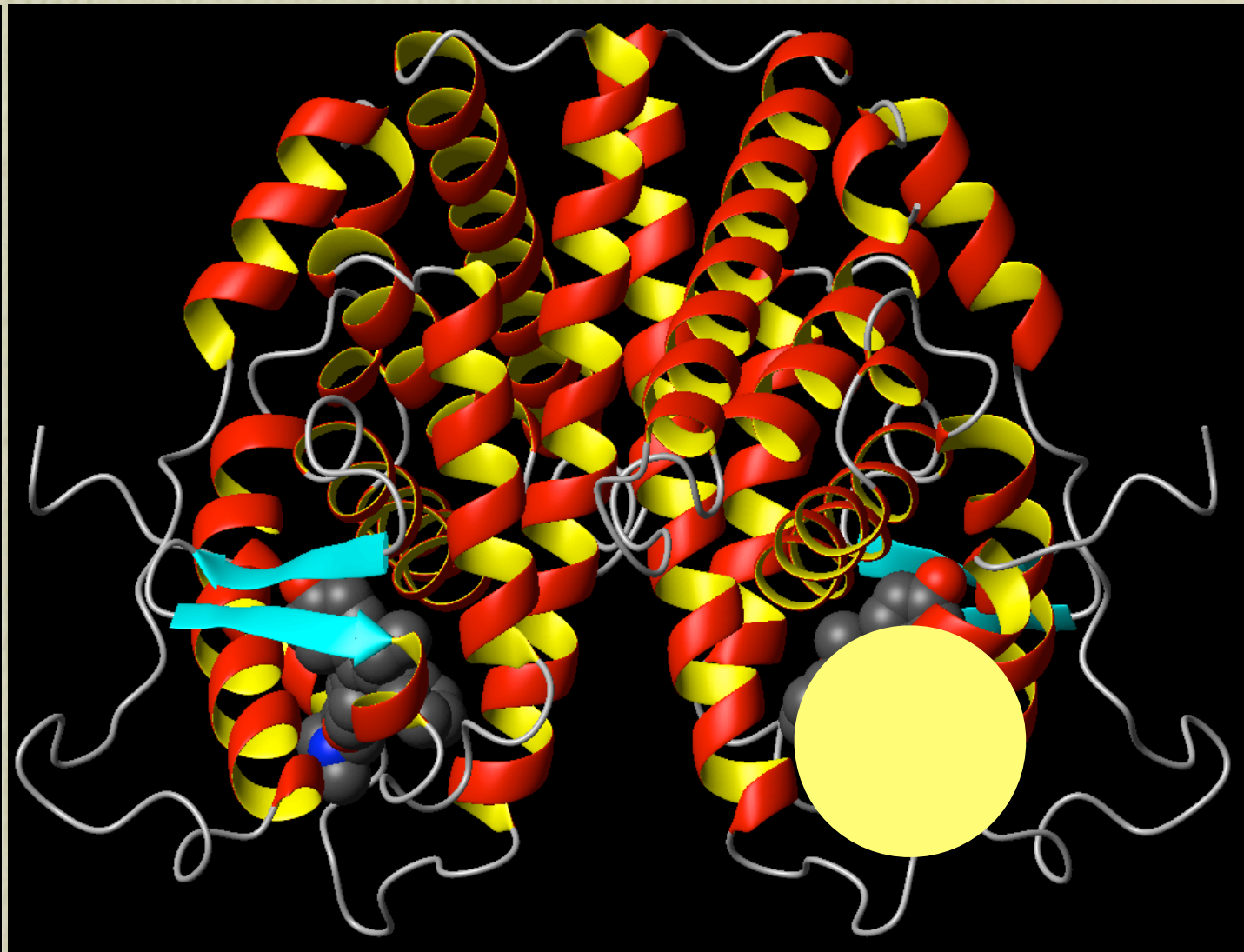
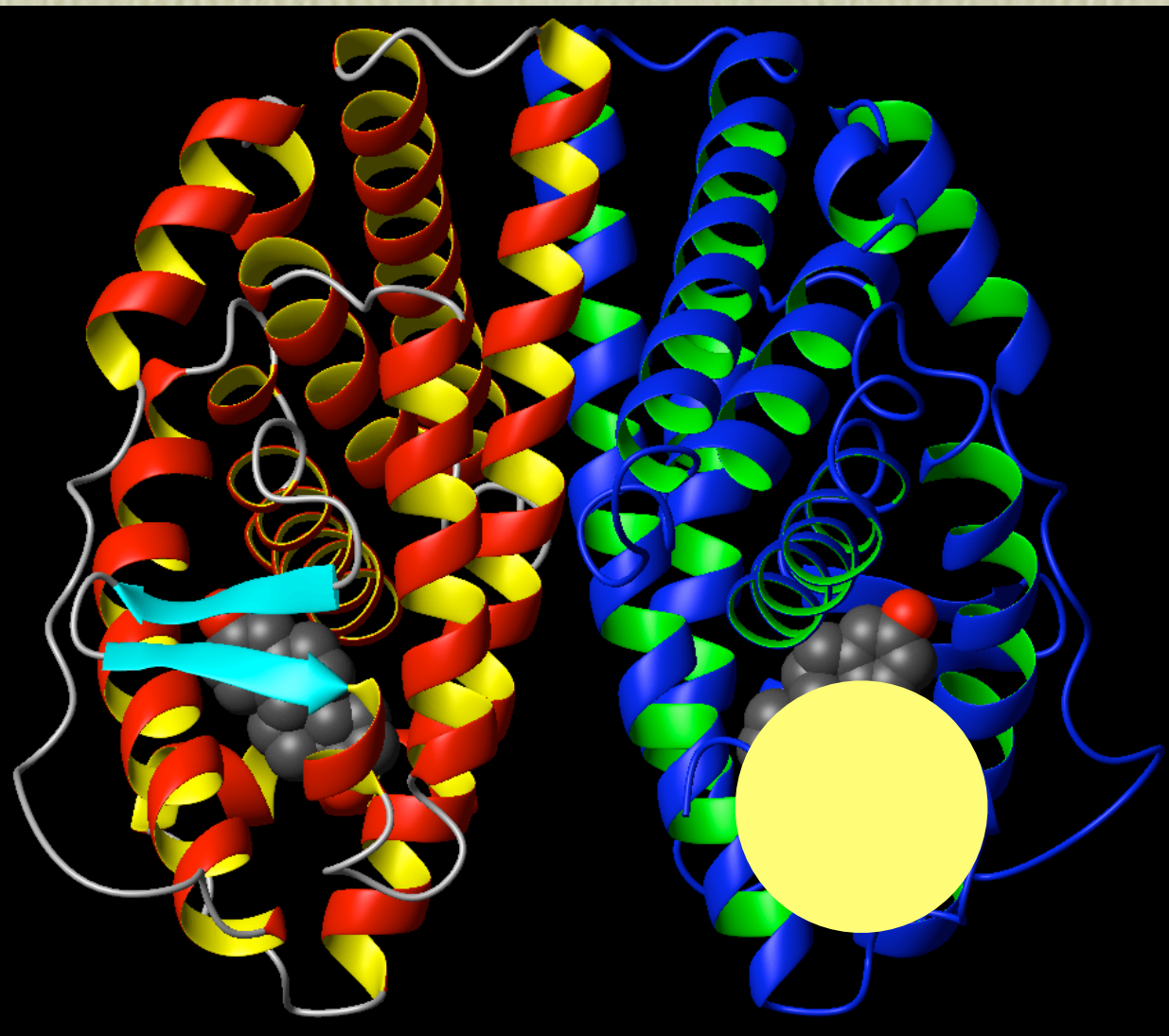
Interactions ligand-récepteur



Récepteur humain aux œstrogènes

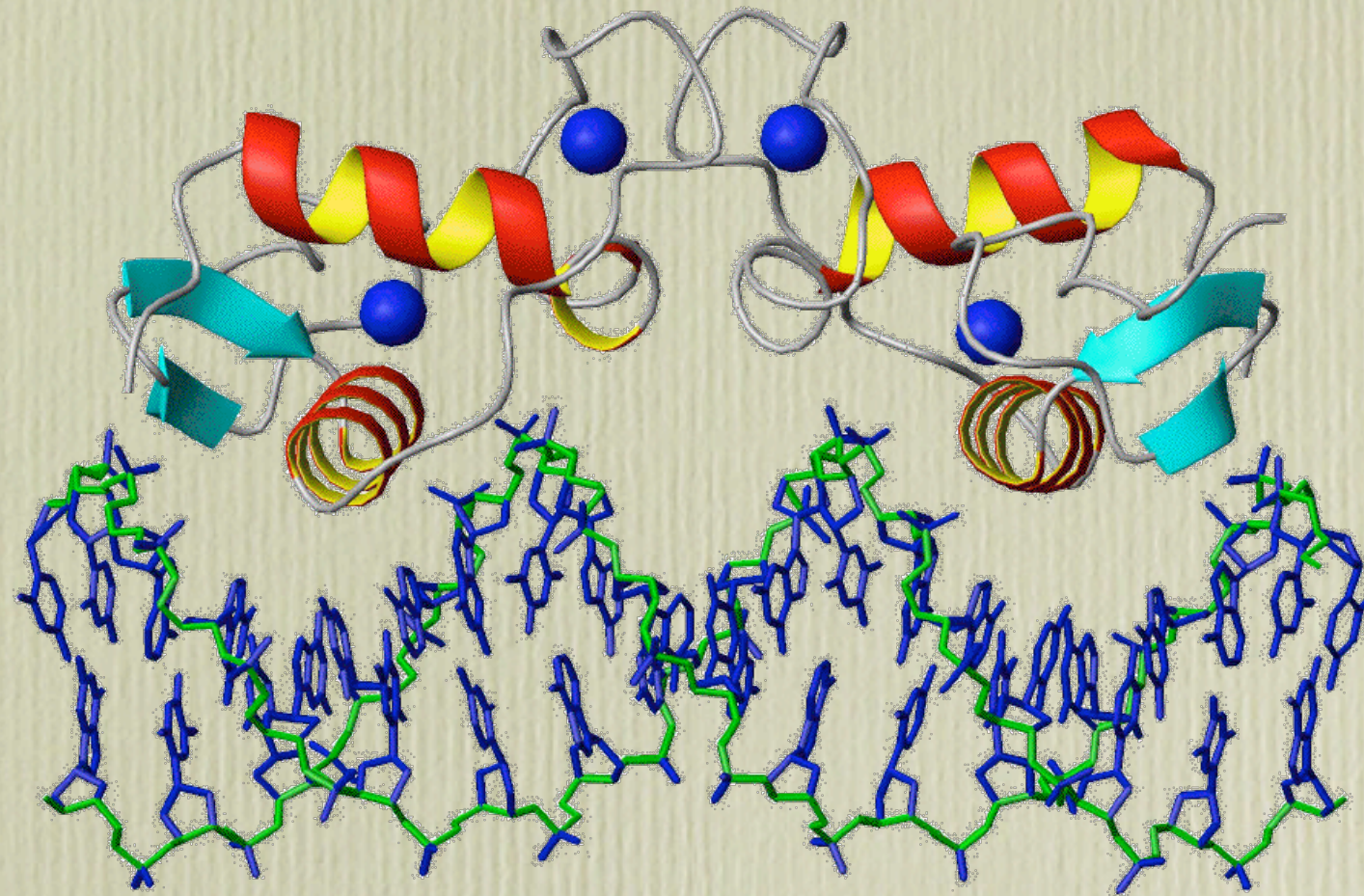
Complexe avec l'œstradiol
(agoniste)

Complexe avec le tamoxifène
(antagoniste)

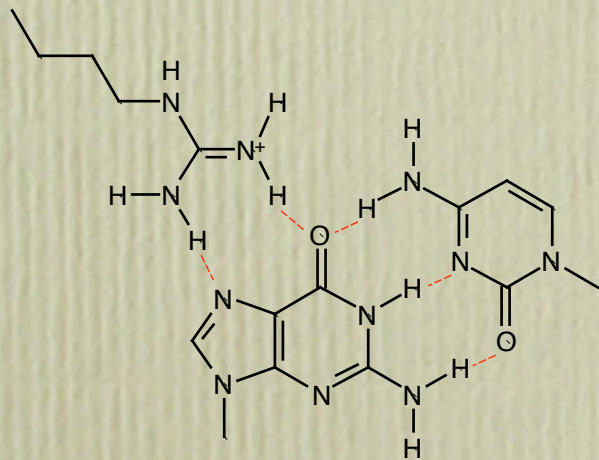


Interactions protéines - acides nucléiques

Les protéines peuvent “lire” les bases de l'ADN dans le grand sillon

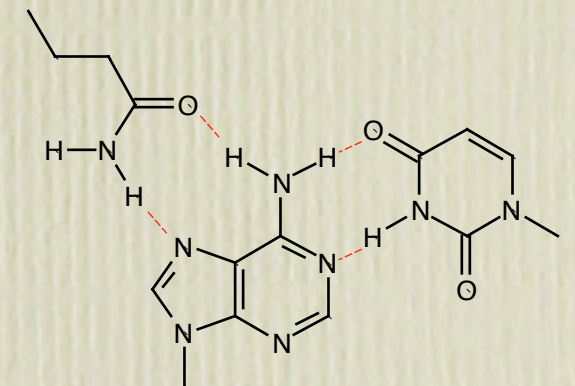


Récepteur nucléaire de l'androstérone



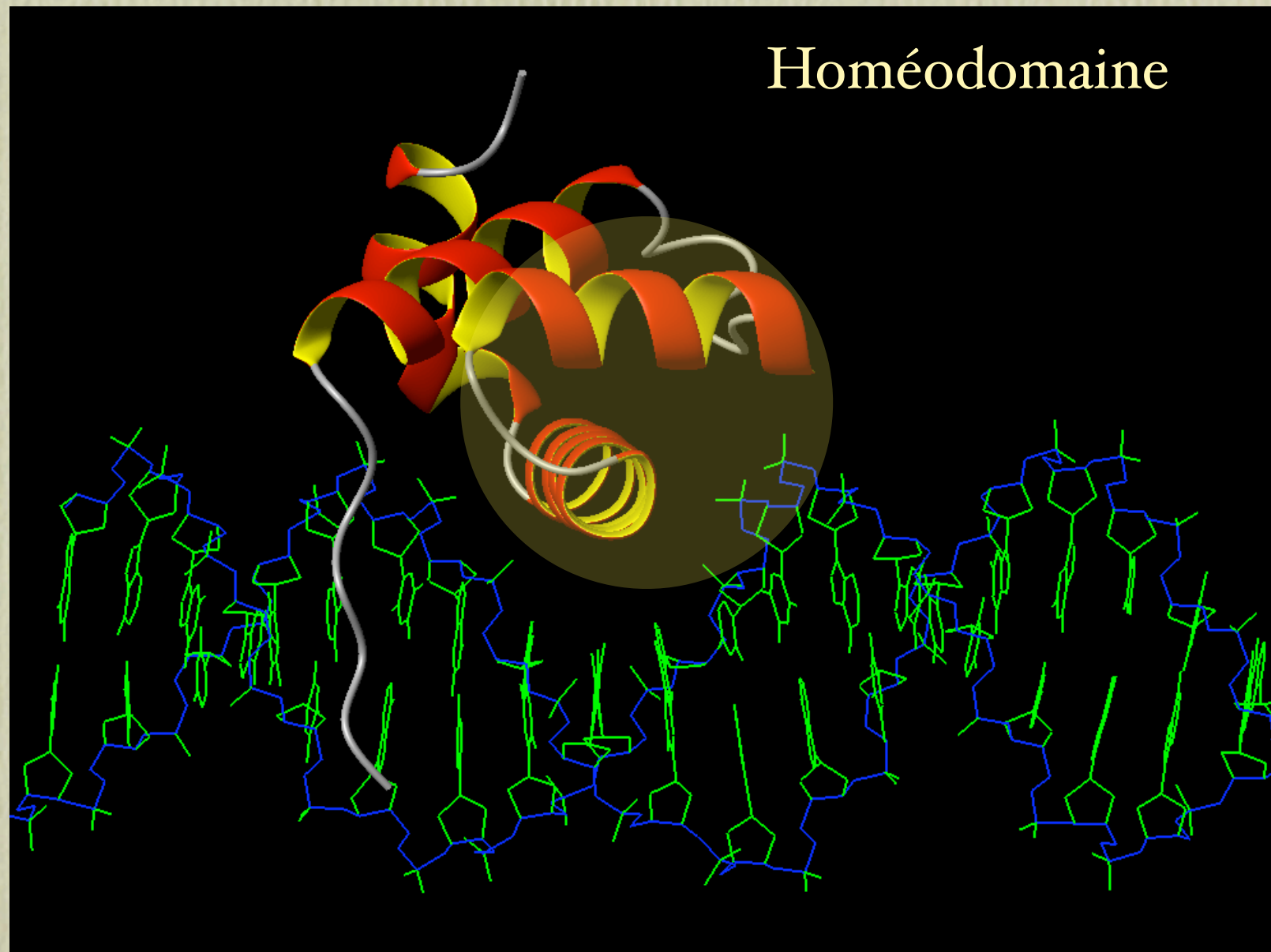
Reconnaissance du G par une arginine

La taille du grand sillon correspond au diamètre d'une hélice α

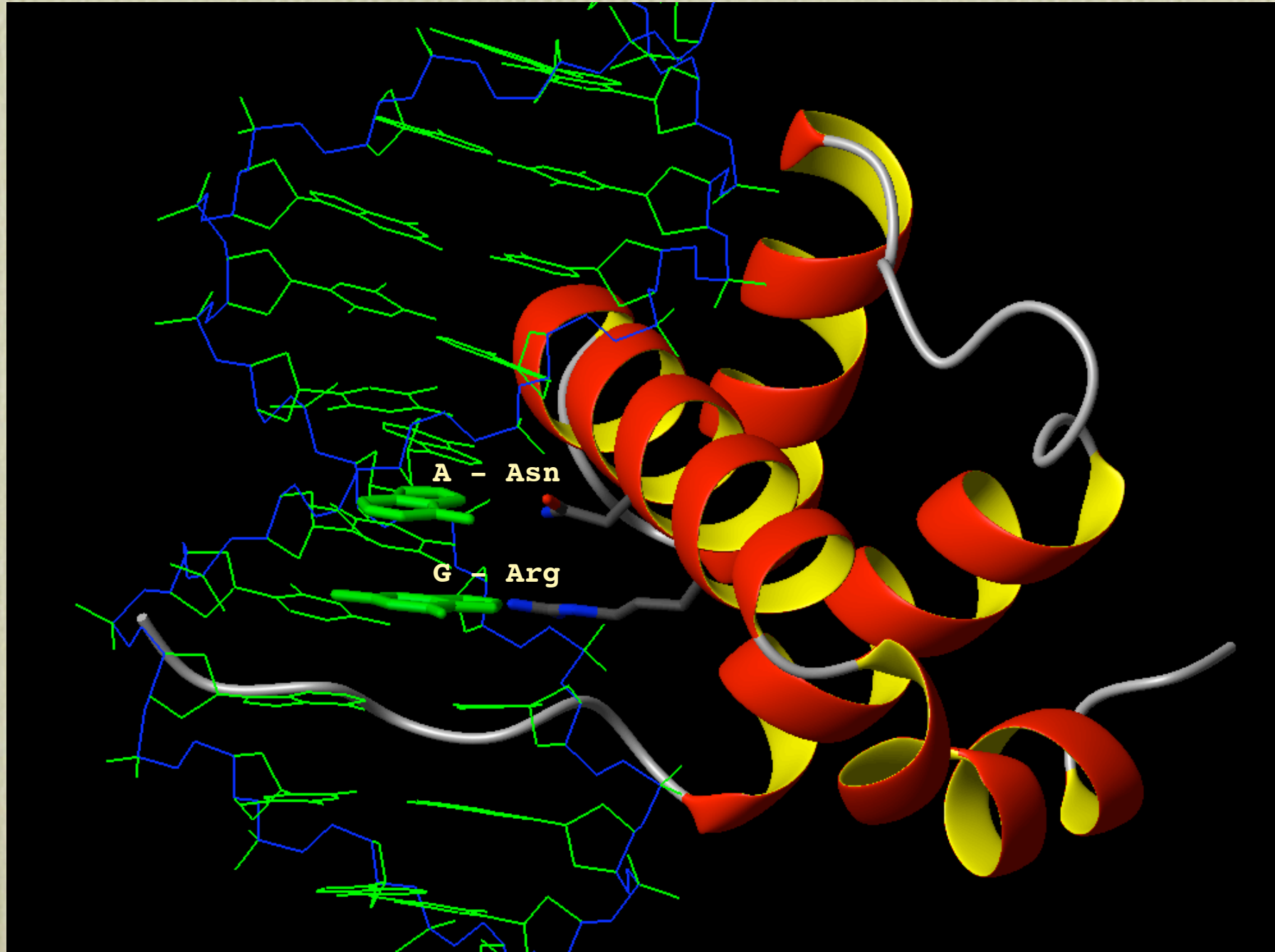


Reconnaissance du A par un amide

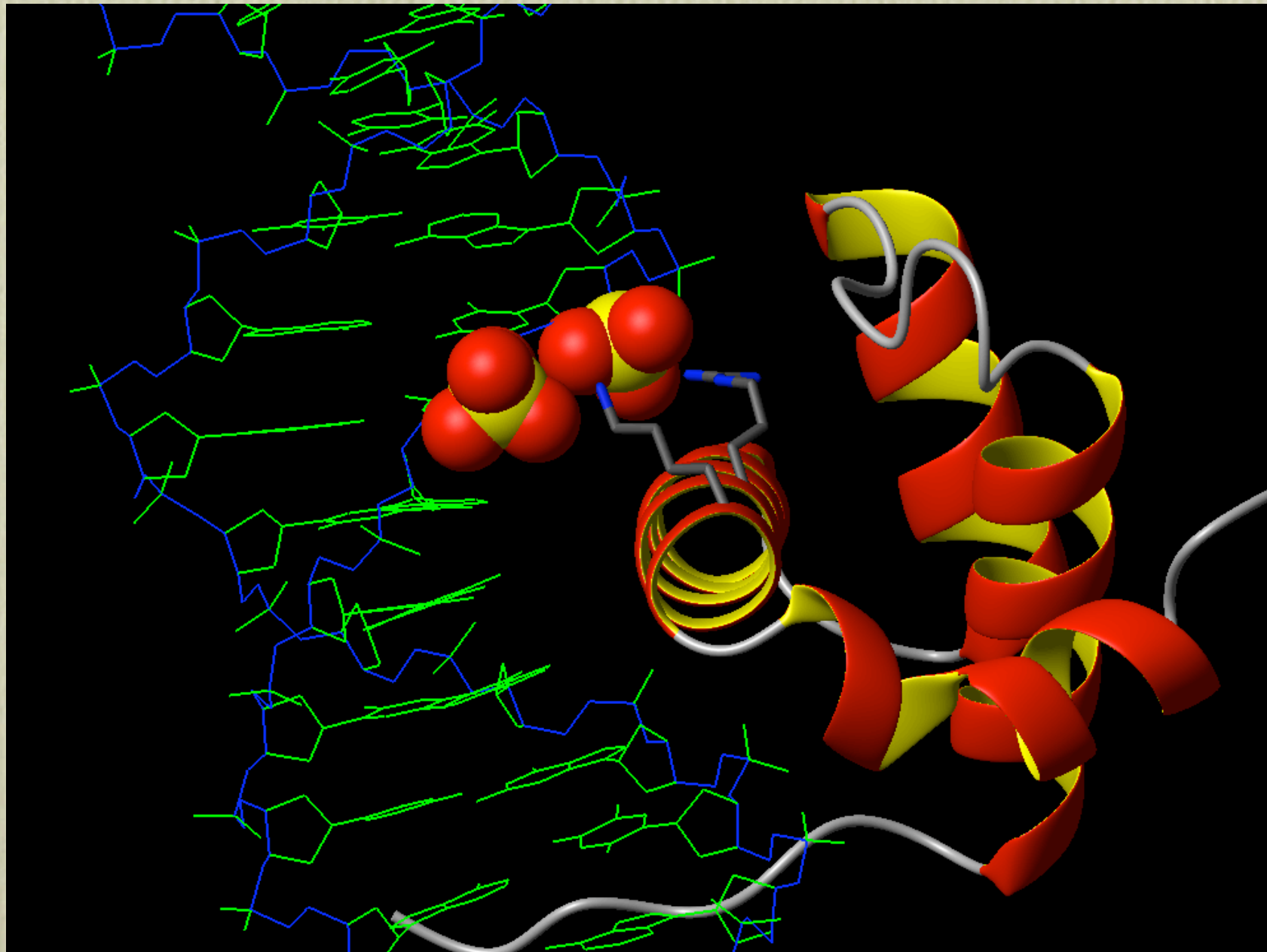
Exemple : le motif hélice-boucle-hélice



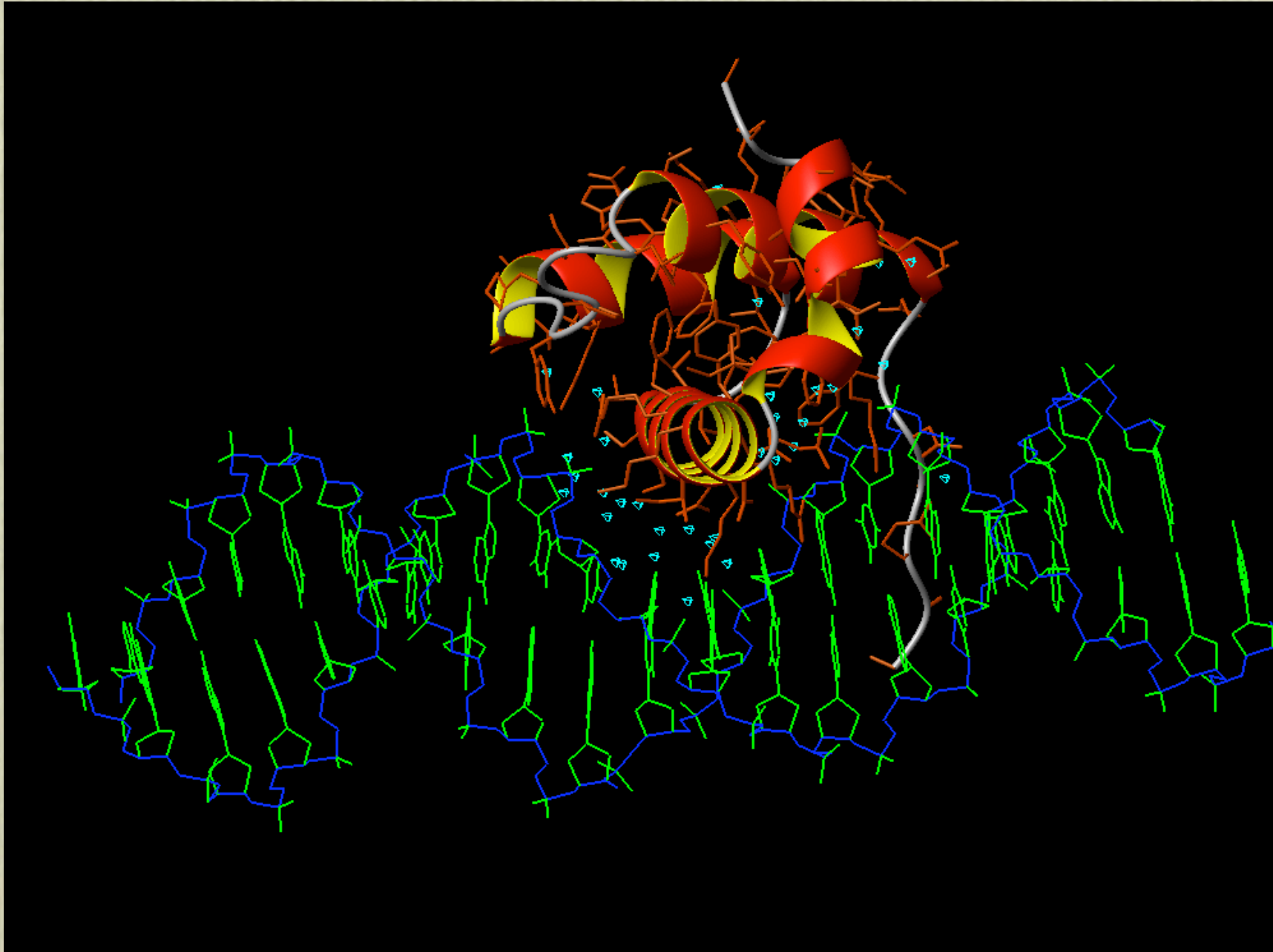
Reconnaissance de l'ADN



Reconnaissance de l'ADN



Reconnaissance de l'ADN

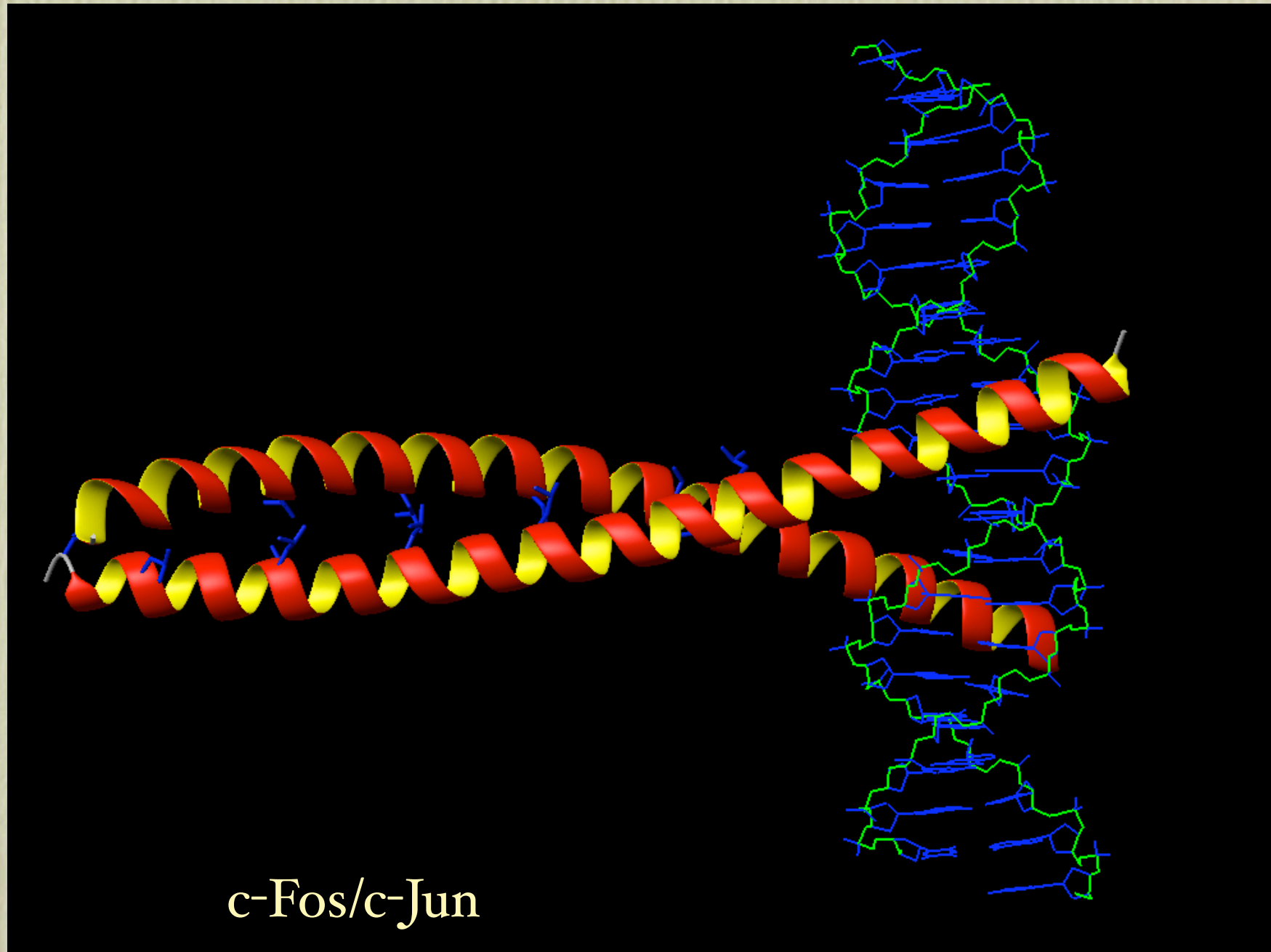


Une partie de la reconnaissance se fait via des molécules d'eau interfaciales

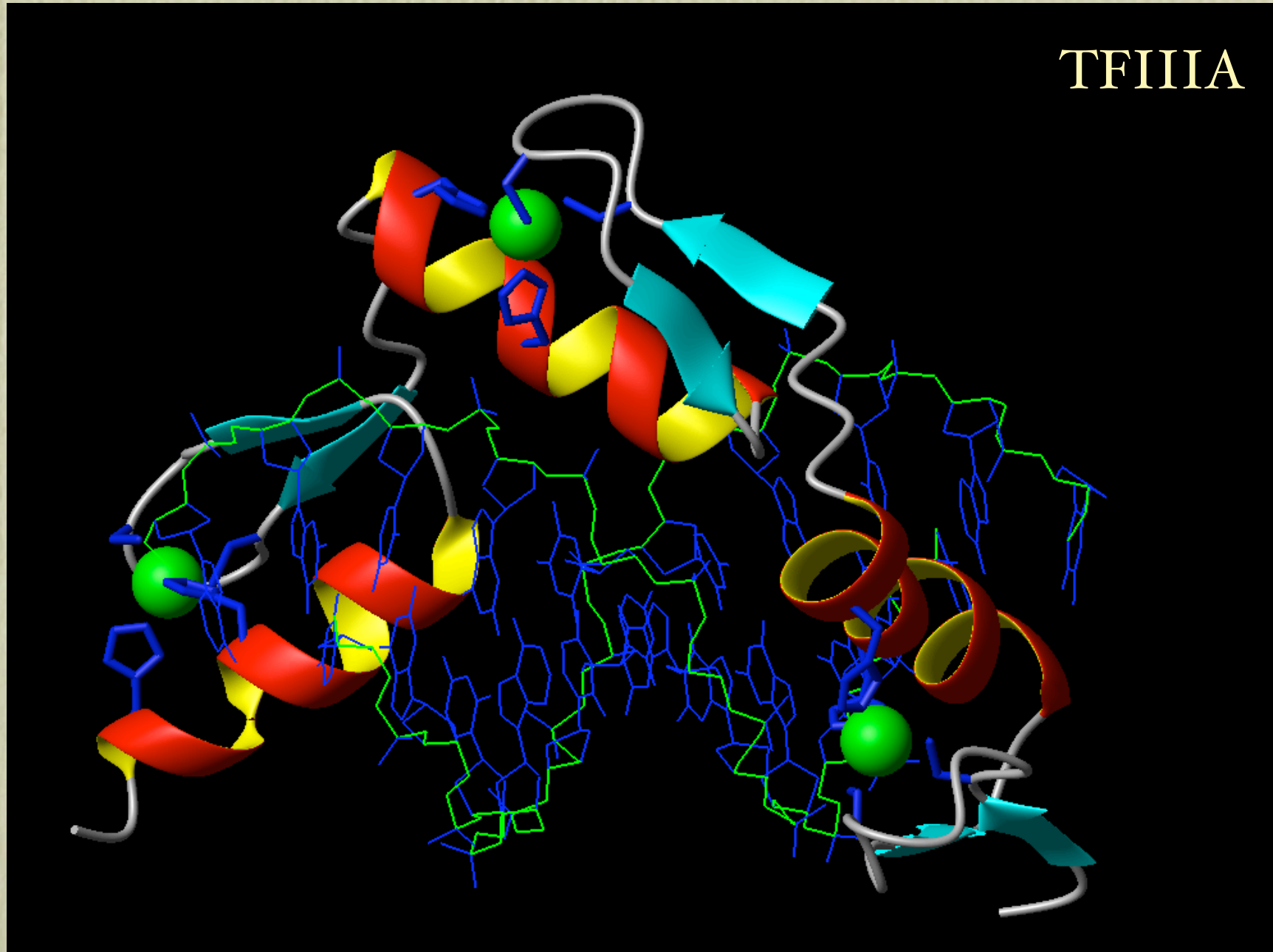
Motifs structuraux de reconnaissance de l'ADN



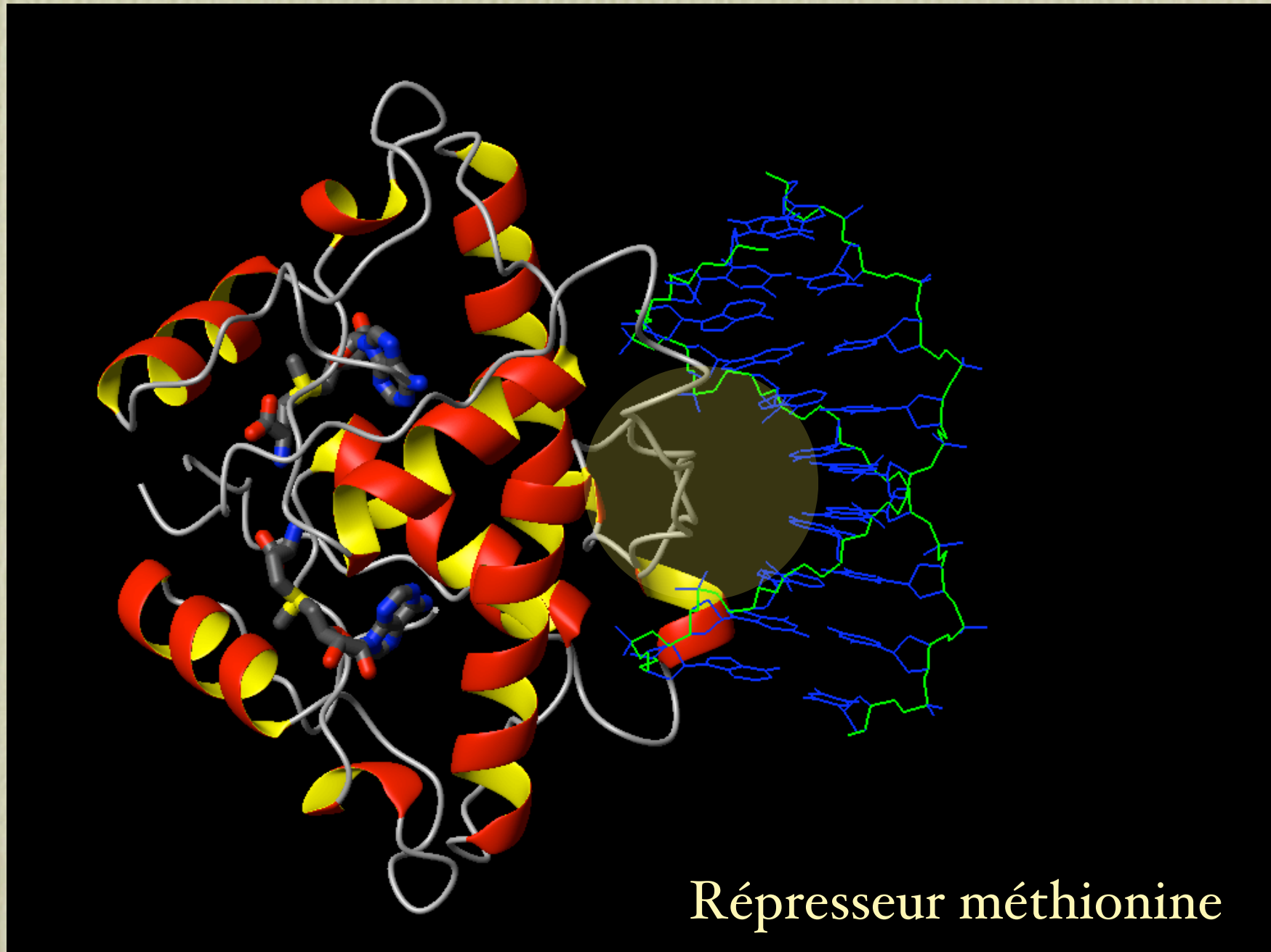
Glissière à leucine (leucine-zipper)



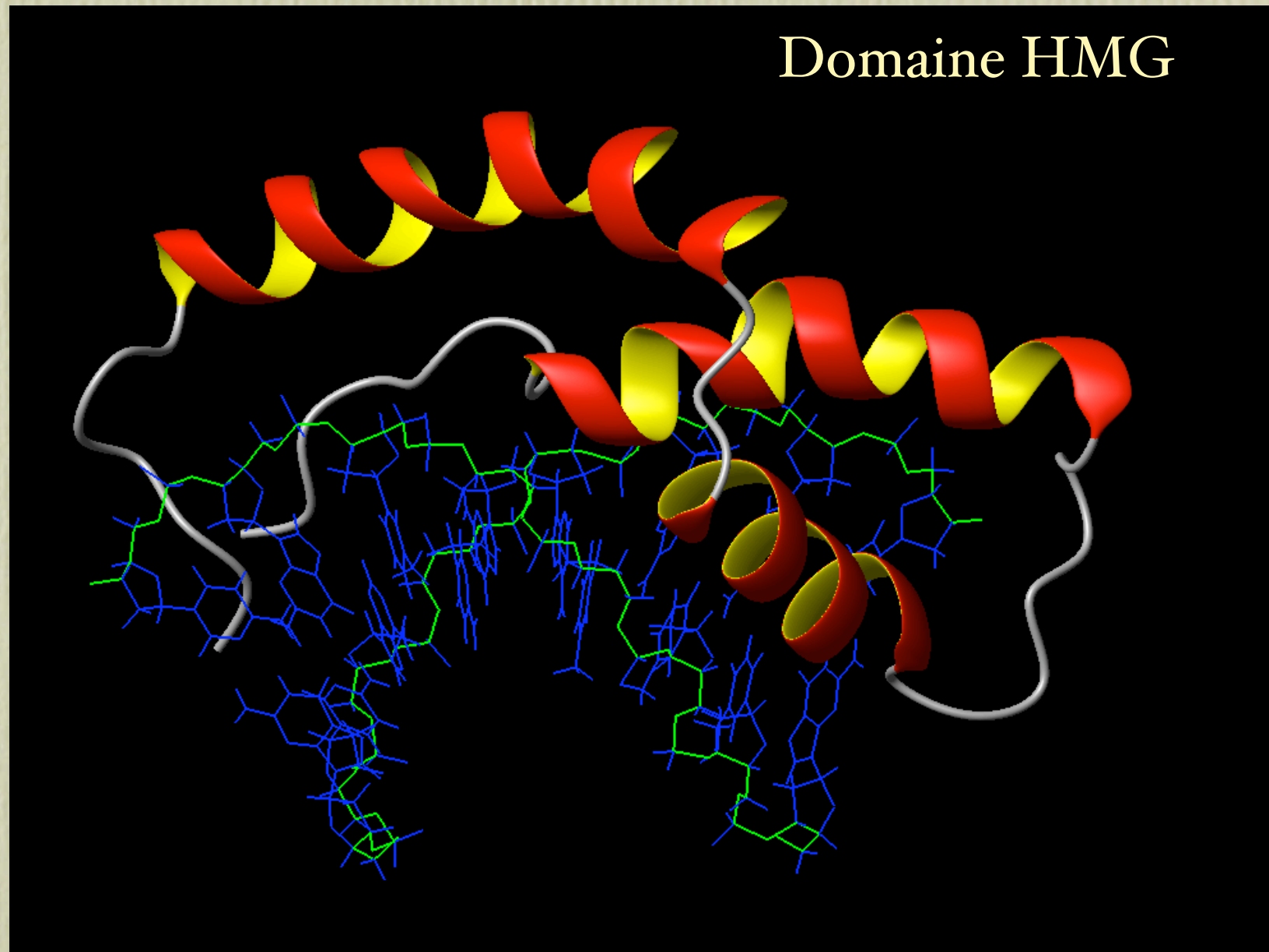
Doigts à zinc (zinc-fingers)



Reconnaissance par un feuillet β



Interactions dans le petit sillon



“Sex-determining factor SRY”

Interactions dans le petit sillon

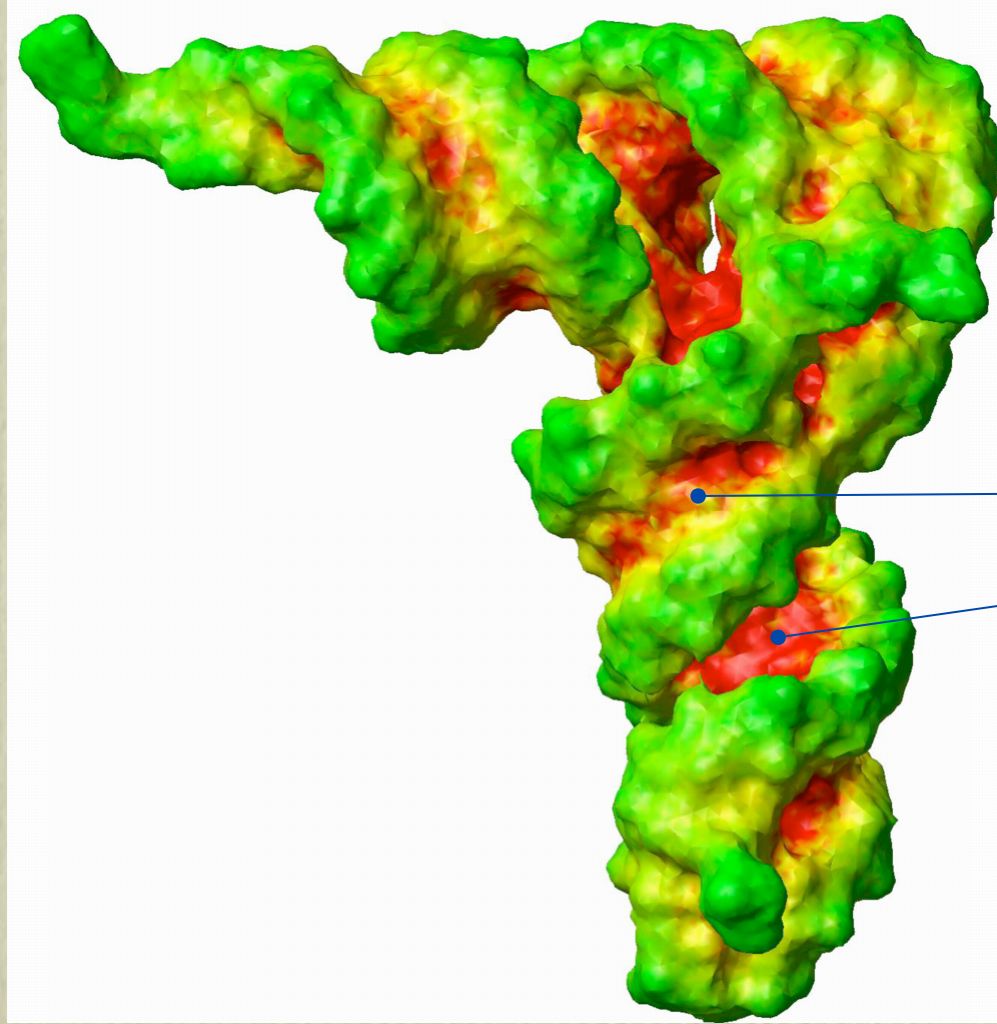


Facteur d'intégration d'*E.coli*

Interactions protéine/ARN



La géométrie des sillons de l'ARN est différente

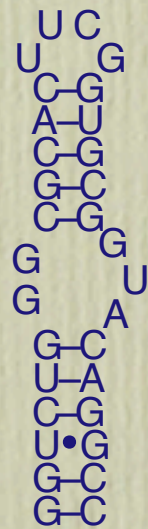


Le petit sillon est peu marqué

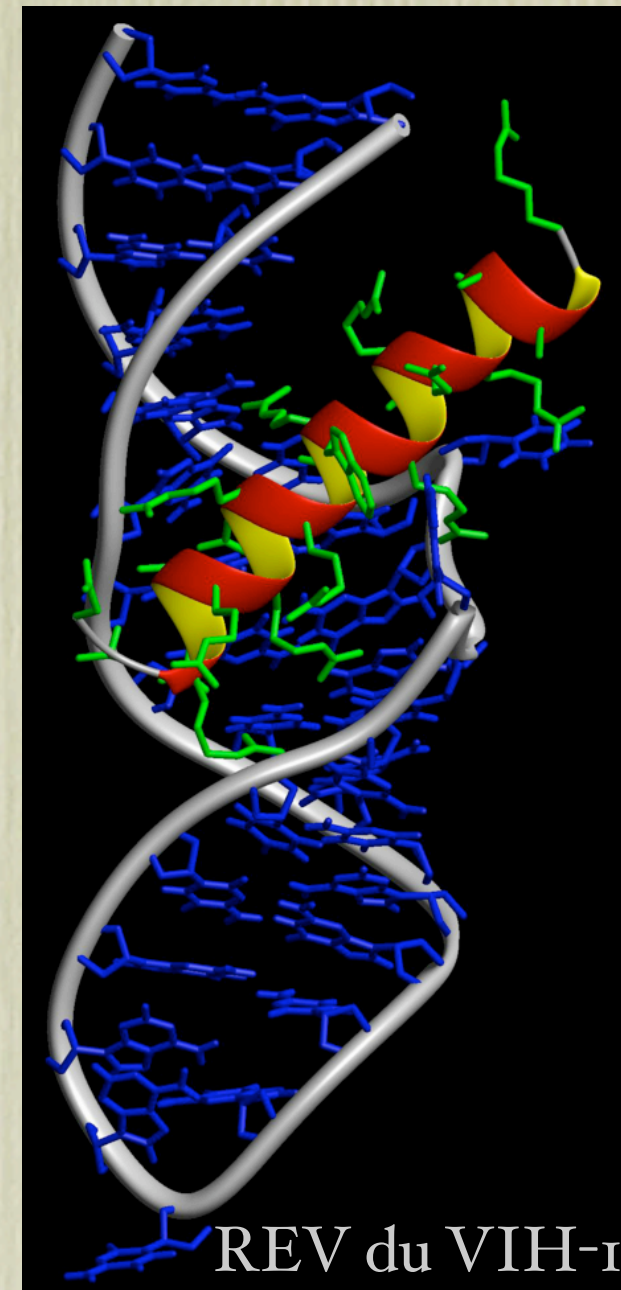
Le grand sillon est très profond et pincé

Interactions ARN-protéine

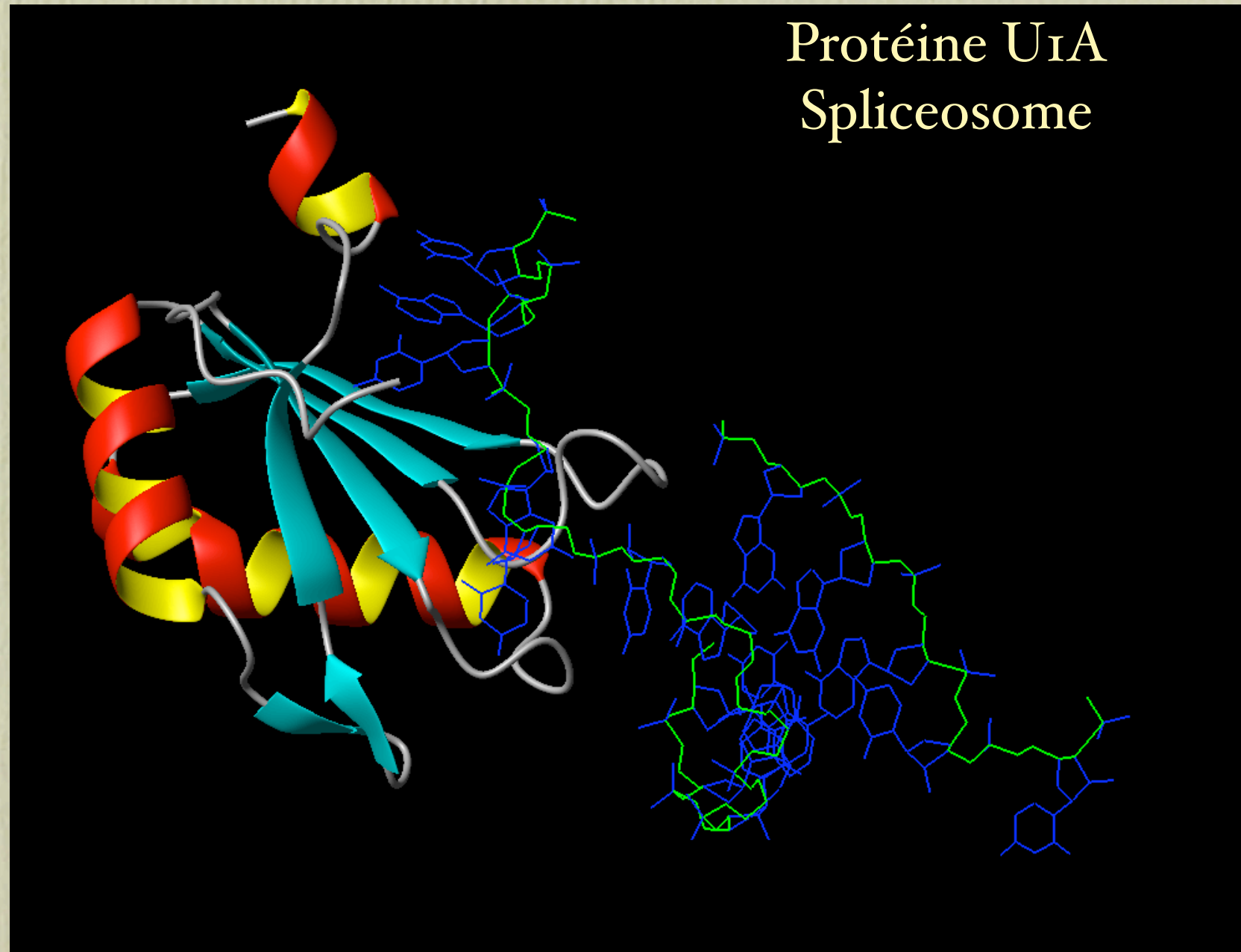
La reconnaissance spécifique d'un ARN s'effectue souvent via les zones de structure non-canonique



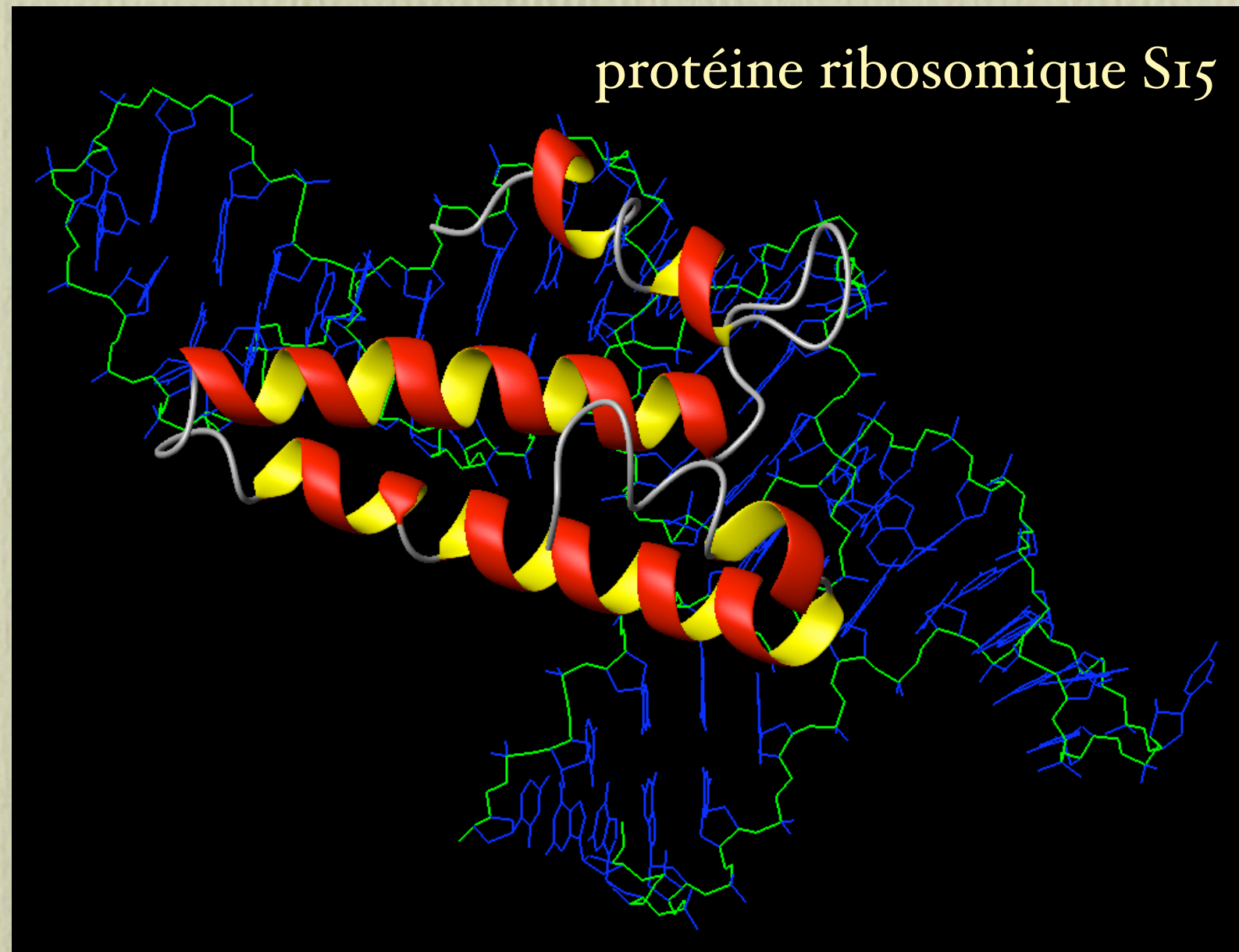
La protéine se fixe dans une irrégularité de l'hélice



Reconnaissance d'une tige-boucle

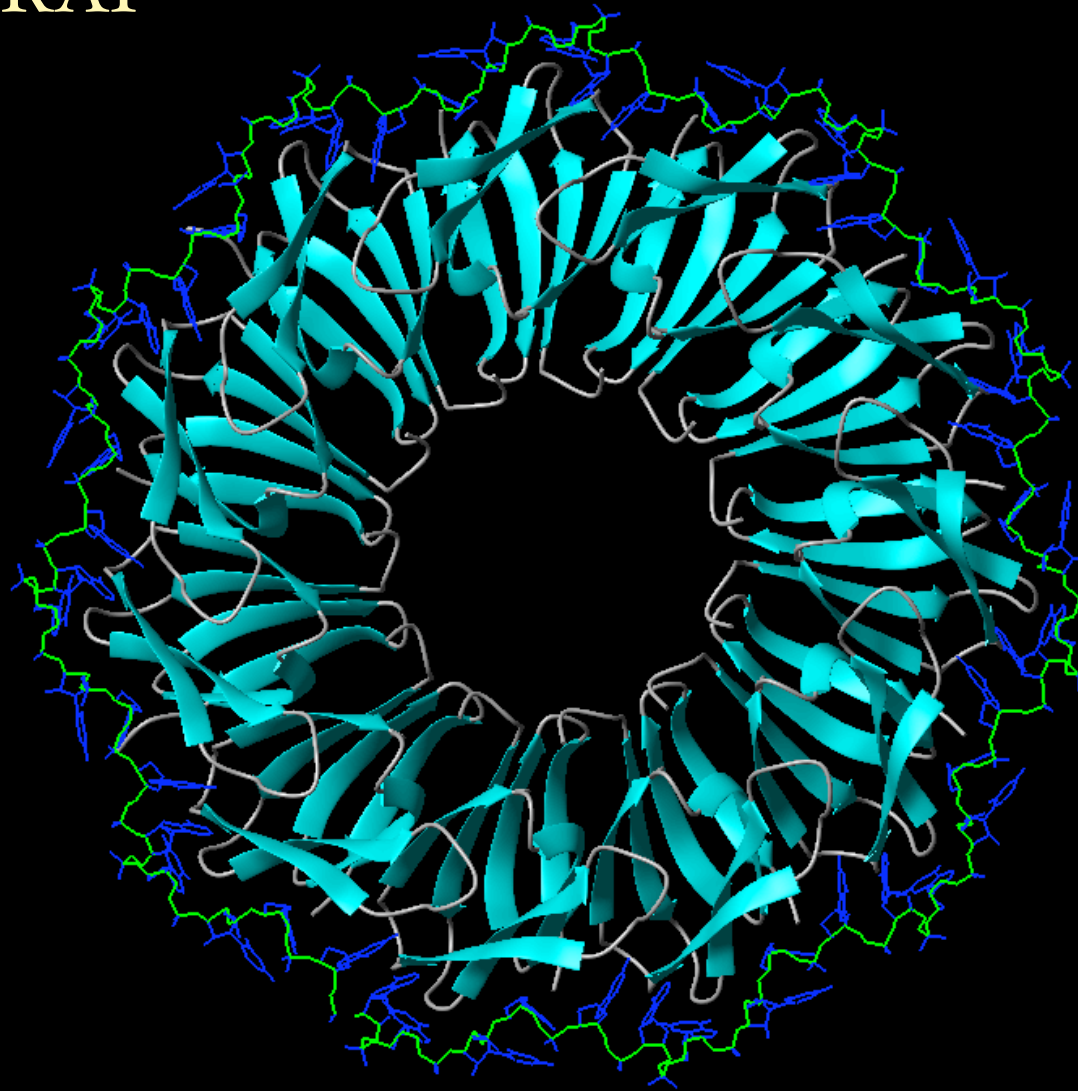


Reconnaissance d'une jonction triple



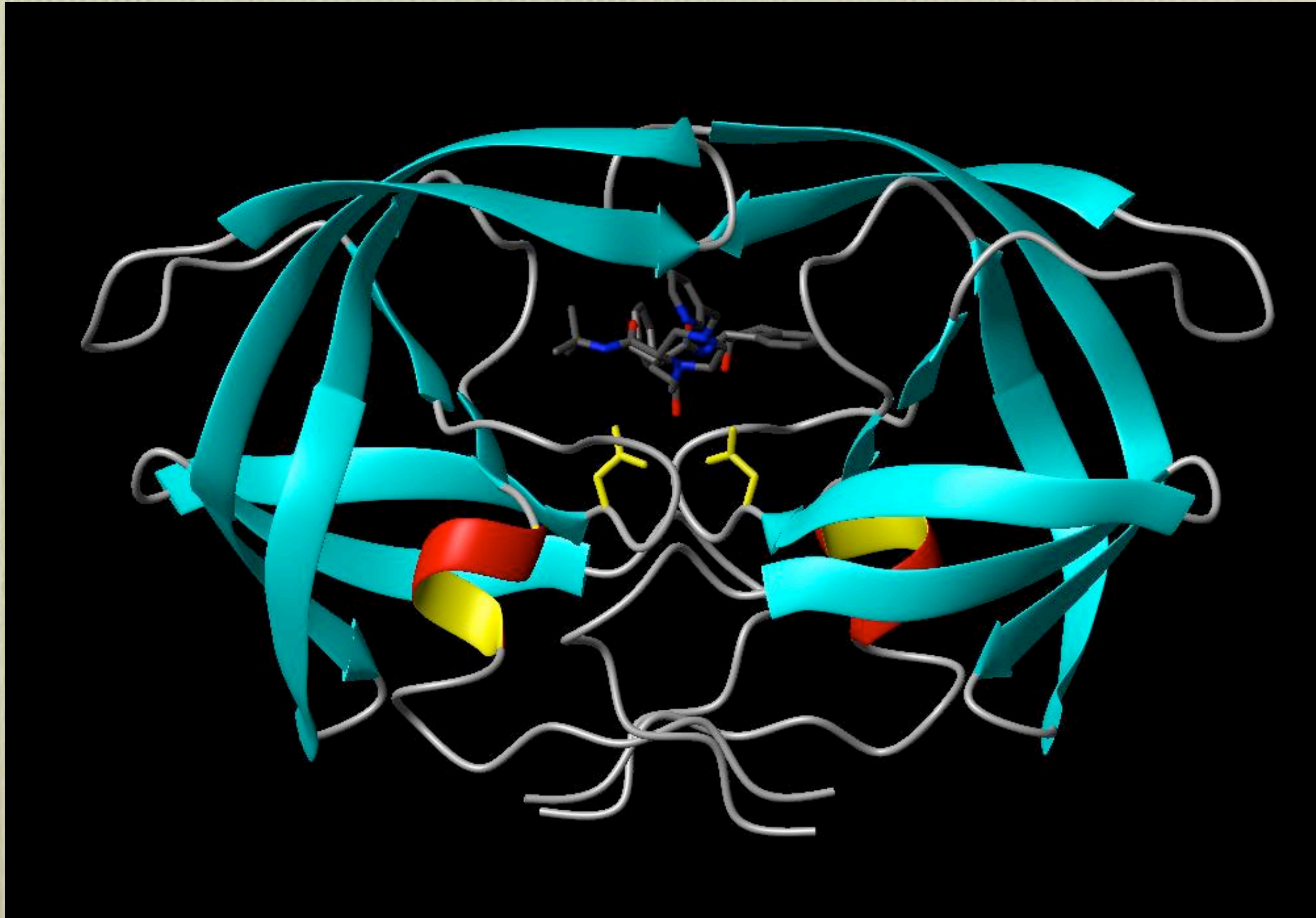
Reconnaissance d'une séquence simple-brin

TRAP

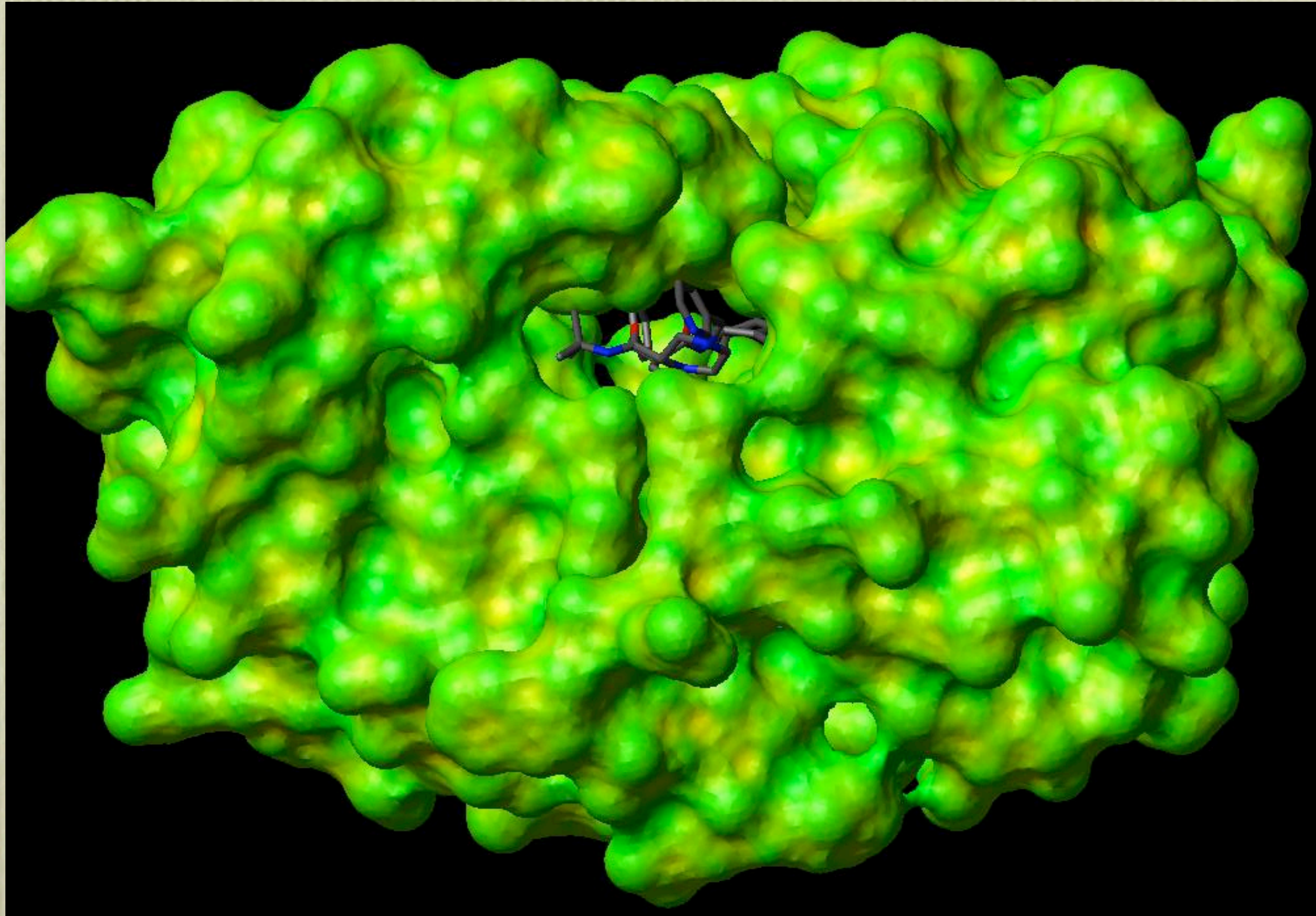


“Drug design”

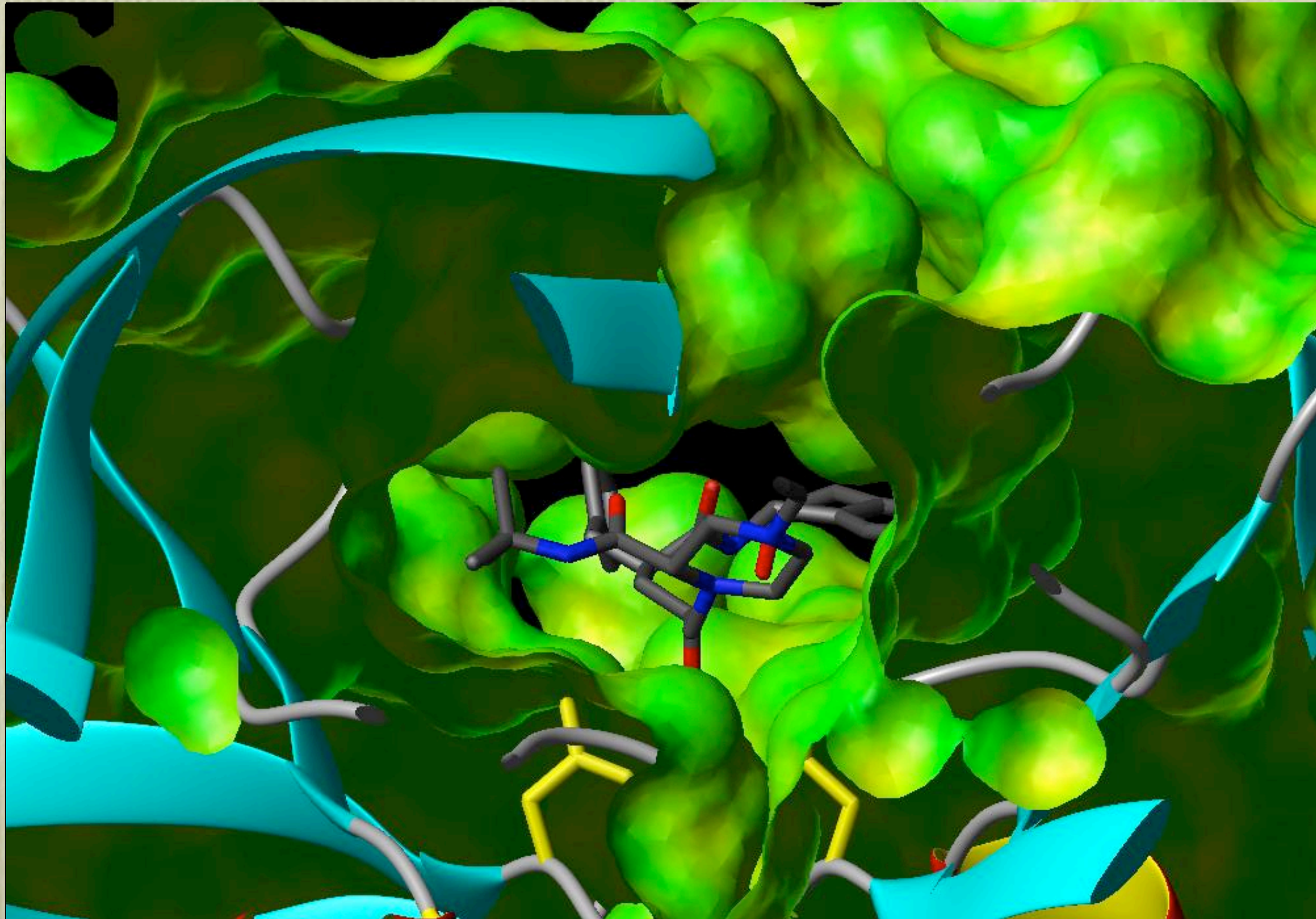
Anti-protéase VIH



Anti-protéase VIH



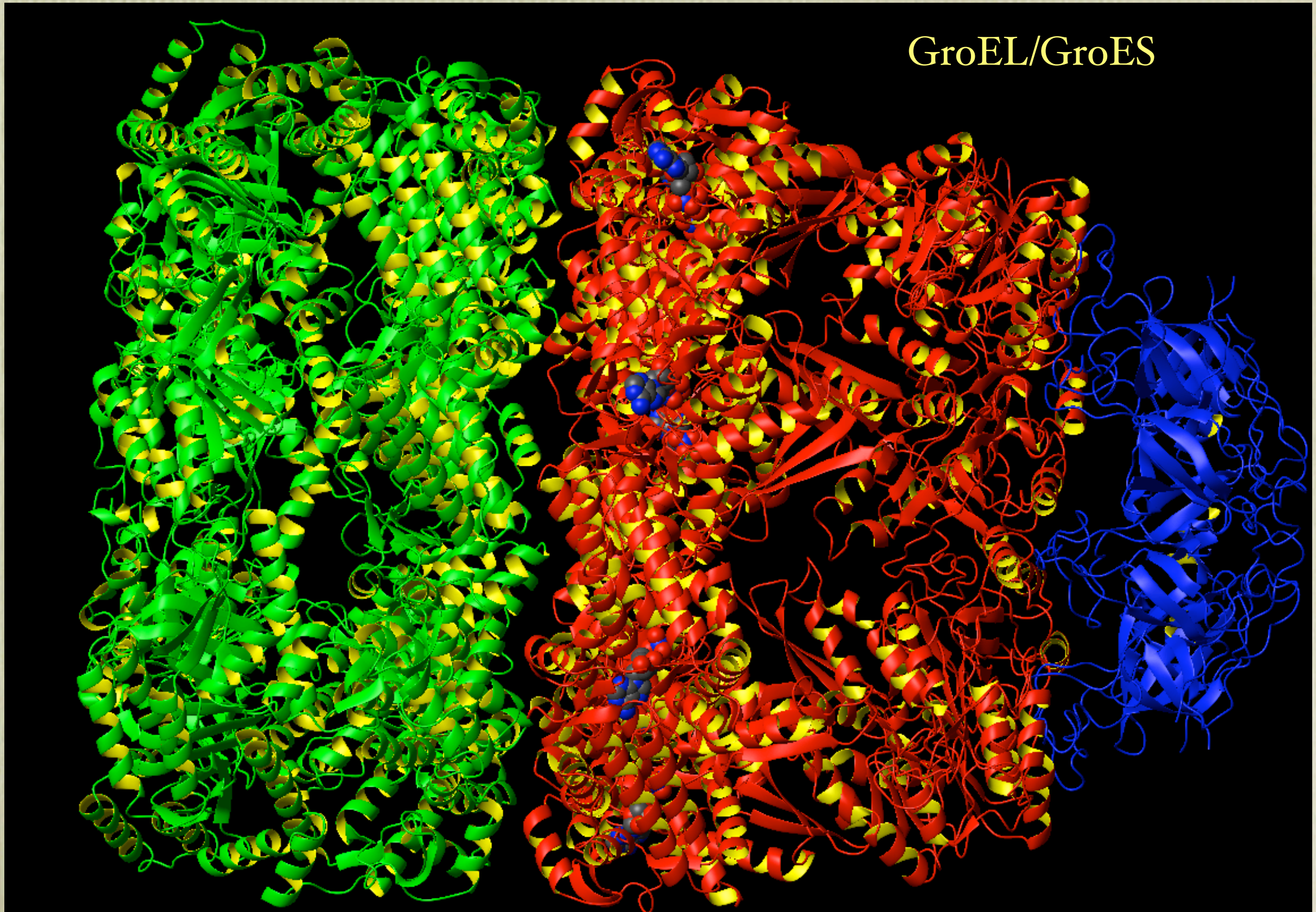
Anti-protéase VIH



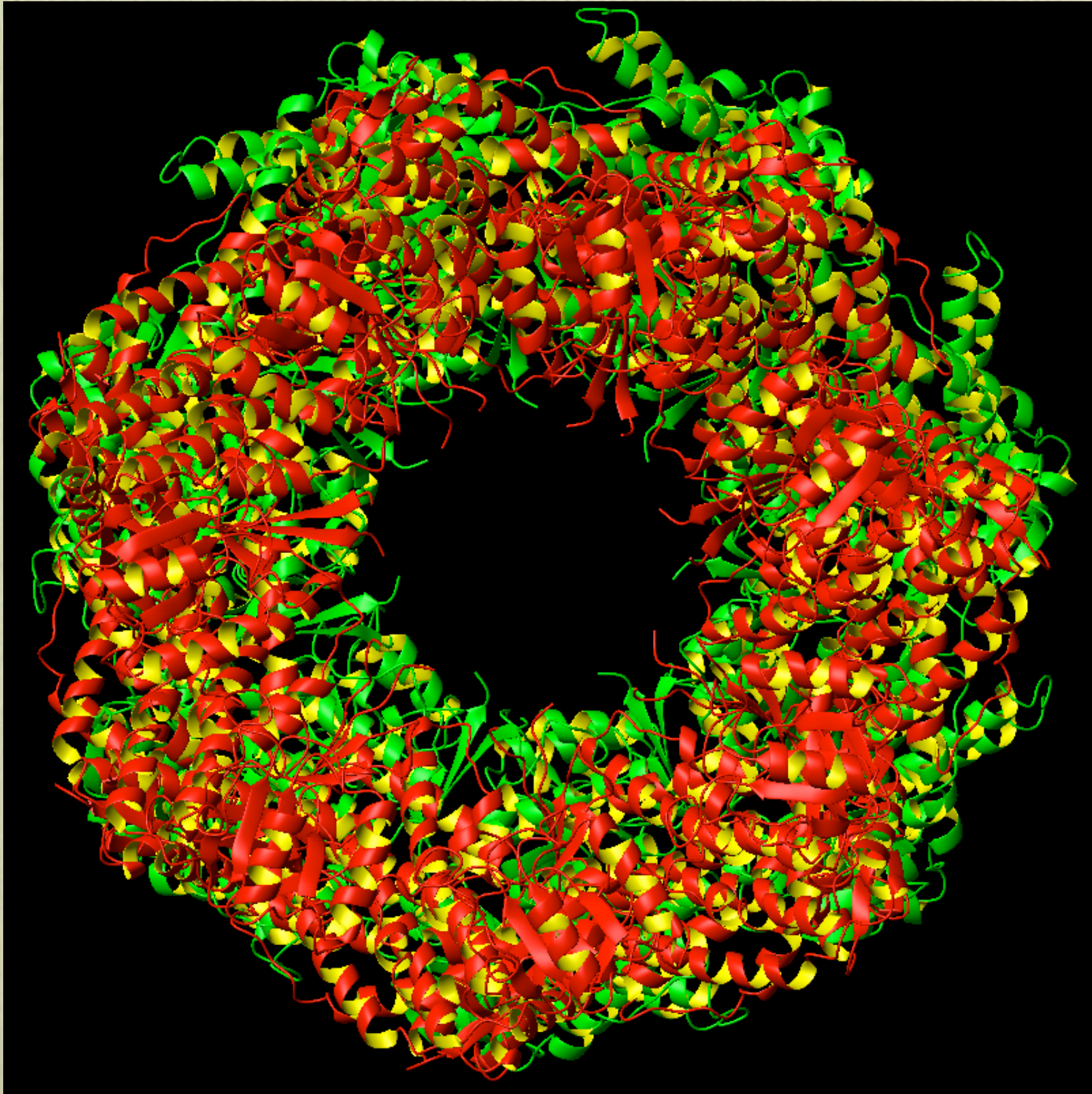
Edifices macromoléculaires



Chaperons moléculaires

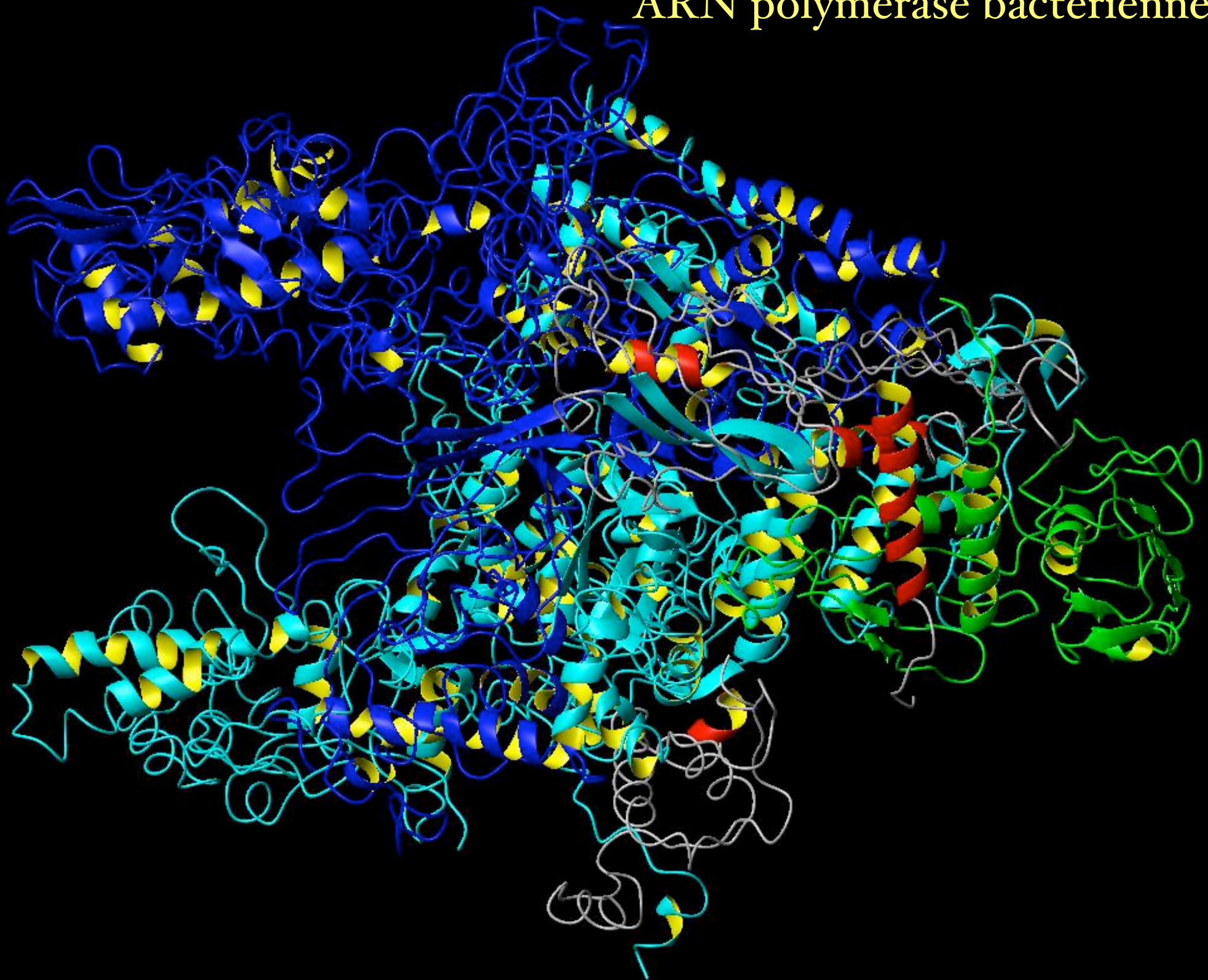


Chaperons moléculaires



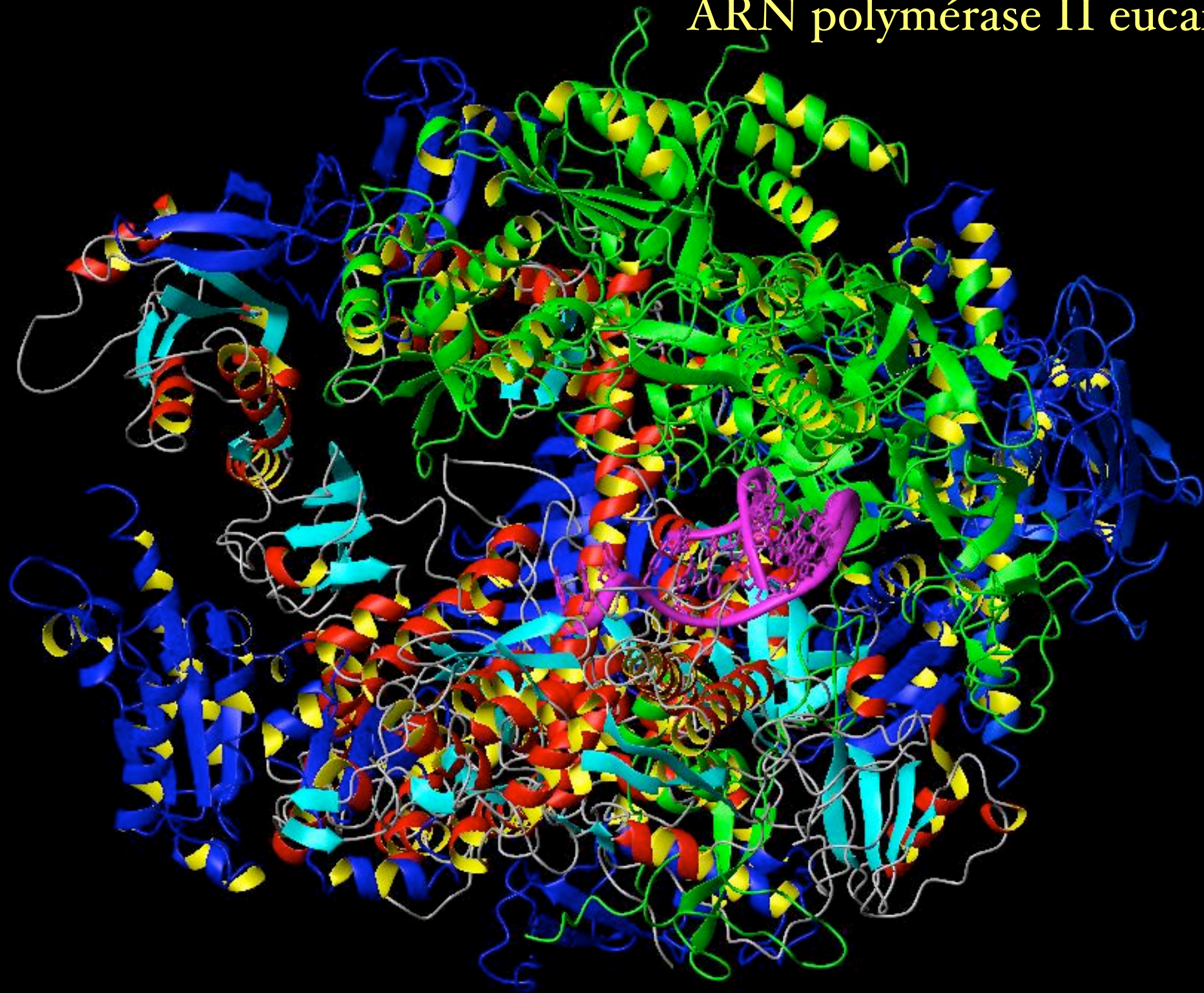
Polymérase/Transcription

ARN polymérase bactérienne

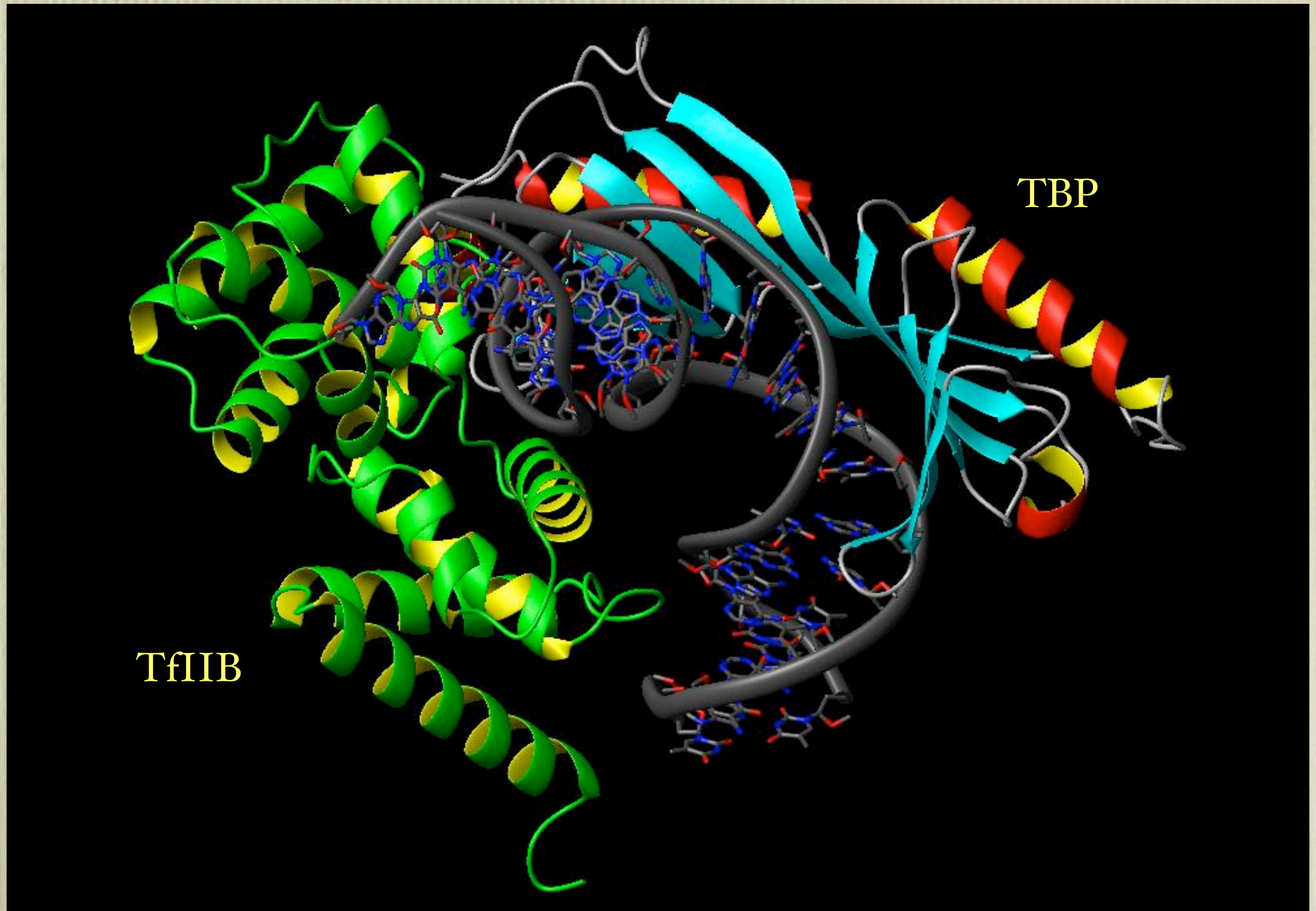


Polymérase/Transcription

ARN polymérase II eucaryote



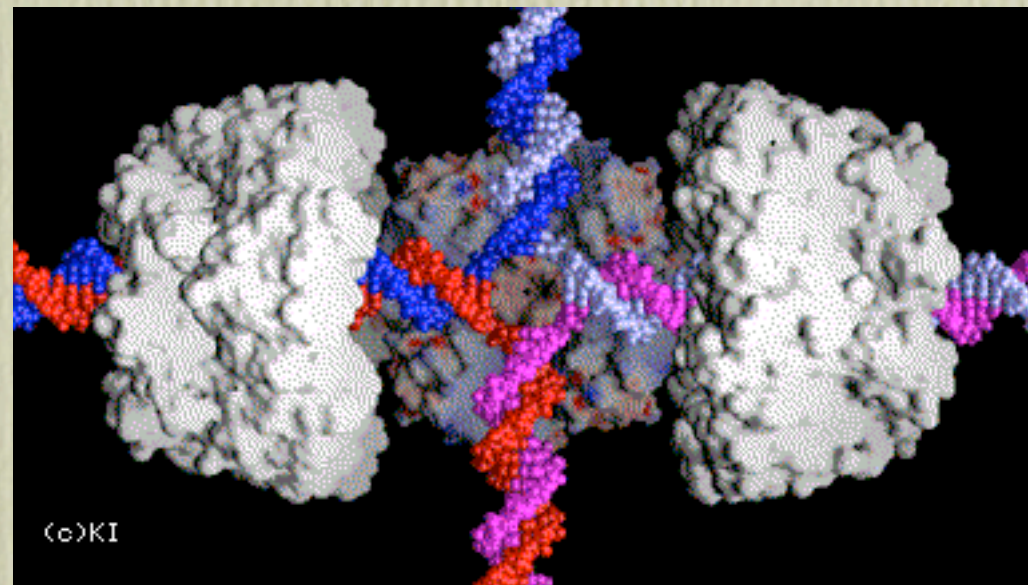
Polymérase/Transcription



Moteurs moléculaires

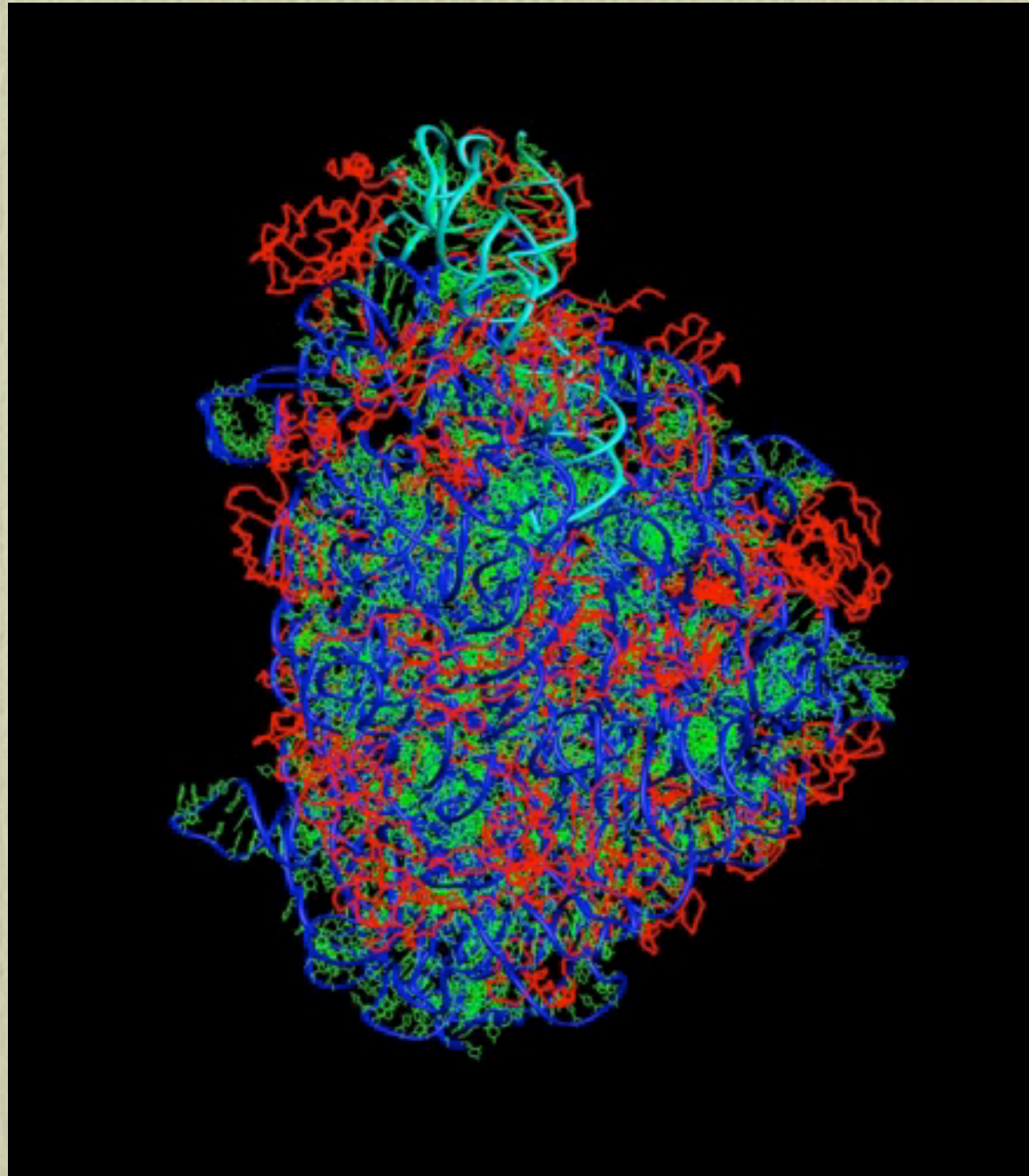


Hélicase de jonction Holliday (RuvAB)



<http://www.shef.ac.uk/mbb/ruva/ruva.html>

Ribosome



Le ribosome est un ribozyme