



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité
Biophysique Moléculaire (Ecole doctorale Inter///Bio)

présentée par
Denis Vivares

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

INTERACTIONS EN SOLUTION ET CRISTALLISATION DE L' URATE OXYDASE

Soutenue le 25 juin 2003 devant le jury composé de :

Dr. Jean DELETTRE (LMCP-Université Paris VI)	Président du jury
Dr. Françoise BONNETE (CRMC2-Marseille)	Directeur de thèse
Dr. Christine EBEL (IBS-Grenoble)	Rapporteur
Pr. Juan-Manuel GARCIA-RUIZ (IACT-Université de Grenade)	Rapporteur
Dr. Luc BELLONI (CEA-Saclay)	Examineur
Dr. Daniel PICOT (IBPC-Paris)	Examineur
Dr. Mohamed EL HAJJI (Sanofi-Synthelabo)	Invité

Thèse préparée au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris (UMR 7590)
Tour 16, Case 115, 4 place Jussieu 75252 Paris Cedex 05
et au Centre de Recherche sur les Mécanismes de Croissance Cristalline (UPR 7251)
Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 09

Cette thèse s'est déroulée sur deux laboratoires. Elle a débuté au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris (LMCP, UMR 7590) situé sur la Faculté de Jussieu (Paris) et s'est terminée la dernière année au Centre de Recherche sur les Mécanismes de Croissance Cristalline (CRMC2, UPR 7251), situé sur la Faculté de Luminy (Marseille).

Je remercie Monsieur Bernard Capelle, directeur du Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris, et Monsieur Jacques Derrien, directeur du Centre de Recherche sur les Mécanismes de Croissance Cristalline, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Je tiens aussi à remercier Jean-Paul Mornon, responsable du groupe « Systèmes moléculaires et Biologie Structurale » au LMCP, pour m'avoir accueilli dans son équipe il y a quelques années maintenant.

Je remercie vivement Christine Ebel et Juan-Manuel Garcia-Ruiz qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, ainsi que Luc Belloni, Daniel Picot et Jean Delettre d'avoir accepté de faire partie du jury.

Mes pensées se dirigent aussi naturellement vers Françoise Bonneté qui a dirigé cette thèse. Merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur, ton soutien et ta disponibilité. Merci aussi pour m'avoir permis de terminer cette thèse loin de la grisaille parisienne.

Je remercie Annette Tardieu, responsable de l'équipe « Interactions Macromoléculaires » au LMCP, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci aussi pour tes conseils, tes discussions, ton enthousiasme et ta relecture du manuscrit.

Je remercie Stéphane Veessler, responsable de l'équipe « Cristallisation en solutions » au CRMC2, pour m'avoir accueilli la dernière année de ma thèse dans son équipe. Merci aussi pour m'avoir aidé à approfondir la croissance cristalline de l'urate oxydase et pour avoir relu le manuscrit.

Je suis très reconnaissant à tous ceux qui ont collaboré à ce travail. Tout d'abord, toutes les personnes impliquées dans le projet « urate oxydase » : Bertrand Castro (Sanofi-Synthelabo) qui soutient ce projet depuis plusieurs années, Mohamed El Hajji (Sanofi-Synthelabo) pour les nombreux échanges que nous avons eu (merci aussi pour les solutions de protéines). Je remercie aussi très vivement les « cristallographes » sans qui les cristaux n'auraient pas pu conduire aux structures : Nathalie Colloc'h (Caen, UMR 6551), Thierry Prangé (LURE, Orsay) et surtout Pascal Retailleau (LURE, Orsay), qui n'a pas hésité à mouiller son maillot (vert bien sûr) cette dernière année et ces dernières semaines (merci aussi pour les figures). Je les remercie aussi pour avoir relu la partie du manuscrit sur les structures. Je remercie très vivement Luc Belloni (CEA, Saclay) grâce à qui l'étude théorique des mélanges protéine-polymère a pu être réalisée. Je suis par ailleurs très reconnaissant à Javier Perez et à Patrice Vachette (LURE, Orsay) pour leur aide précieuse et leur intérêt lors des expériences de Diffusion de Rayons X aux Petits Angles. Je te remercie aussi Patrice pour m'avoir fait remarquer une importante erreur de dernière minute. Enfin, je remercie Pascal Mansuelle (Marseille, UMR 6560) pour avoir effectué l'analyse d'acides aminés.

Je remercie aussi chaleureusement les membres des deux équipes au sein desquelles j'ai travaillé qui m'ont aidé et conseillé : Ferial Skouri, Tatiana Putilina (en particulier pour leur aide précieuse lors de l'étude des α et γ cristallines) et Karine Prat à Paris, Jean-Pierre Astier, Nathalie Ferté et Marie-Claude Toselli à Marseille.

Je remercie tous les membres du LMCP (particulièrement ceux du « couloir 16-15 ») et du CRMC2 (particulièrement ceux du « R3 ») avec une mention spéciale pour Marina, Emilie et Franck (LMCP) ainsi que pour Sylvain, Laurent, Stéphane, Hélène et Pascal (CRMC2), bienheureux ex et actuels thésards pour les agréables moments passés ensemble.

Je remercie enfin mes proches et ma très proche qui ont dû me supporter et qui vont probablement devoir le faire pendant quelques années encore.

Enfin, je dédie cette thèse à mon père qui m'a transmis malgré lui un petit bout de sa passion pour la recherche. Qu'il trouve ici toute mon admiration pour son travail et sa vision scientifiques.

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction	9
A. La cristallisation des protéines :	12
I. Des origines...	12
II. A nos jours...	13
B. Solubilité, nucléation et croissance cristalline	14
I. Sursaturation, solubilité et diagramme de phases	15
II. Nucléation	16
III. Croissance cristalline	19
IV. Cristaux inorganiques / cristaux de protéines	22
V. Polymorphisme et transition de phase	23
C. Interactions en solution, solubilité et cristallisation	24
I. Interactions entre (macro)molécules en solution	24
1. Forces de volume exclu	24
2. Forces coulombiennes	25
3. Forces dipolaires	25
4. Forces de polarisation	26
5. Forces de Van der Waals	27
6. Le modèle DLVO	27
7. Forces de déplétion	28
8. Autres Forces	30
II. Effets de différents paramètres physico-chimiques sur la solubilité	31
1. Effet de paramètres externes	31
2. Effets de paramètres internes	32
III. Corrélations entre interactions en solution et cristallisation	35
D. Objet d'étude et problématique	39
I. L'urate oxydase : fonction biologique et structure 3D	39
II. L'urate oxydase et sa cristallisation : une protéine modèle ?	41
 Chapitre 2 : Second coefficient du viriel et cristallisation	 43
A. Méthodes expérimentales	45
I. Préparation des solutions d'urate oxydase	45
II. Caractérisation des interactions entre protéines en solution	47
1. La diffusion des rayons X aux petits angles	47
2. La diffusion statique de la lumière	53
B. Interactions en solution entre les molécules d'urate oxydase	54
I. Effet du pH	54
II. Effet de la température	57
III. Effet de l'ajout de sels	60
IV. Effet de l'ajout de PEG	61
V. Effets couplés : pH/PEG, sel/PEG, pH/sel/PEG	68
C. Corrélation interactions/cristallisation	71
 Chapitre 3 : Potentiels d'interaction en solution	 77
A. Description des traitements numériques utilisés	79
I. Le modèle à « un composant »	79
1. Principe du modèle	79
2. Choix du potentiel initial	82
II. Le modèle à « deux composants »	83
1. Principe du modèle	83
2. Détermination des facteurs de forme	85

B. Résultats	88
I. Solutions de protéines dans leur tampon avec et sans sel	88
II. Solutions de protéines en présence de PEG	91
1. Solutions pures de protéines et de polymères	91
2. Mélanges protéine-polymère	93
3. Détermination de l'interaction attractive de déplétion	96
4. Importance du choix du potentiel direct protéine-polymère sur le potentiel de déplétion	96
5. Comparaison avec les modèles analytiques	99
6. Etude d'autres protéines	102
7. Caractérisation des potentiels d'interaction en condition de cristallisation	110
 Chapitre 4 : Séparations de phases de l'urate oxydase	 113
A. Tracé du diagramme de phases	115
I. Méthode expérimentale	115
II. Diagramme de phases en présence de PEG 8kDa	116
B. Etude de la séparation de phase liquide-liquide	118
I. Eléments de théorie sur la séparation de phase liquide-liquide	118
II. Caractérisation par video-microscopie	119
III. Caractérisation par diffusion de rayons X aux petits angles	121
C. Croissance, morphologies, faciès et polymorphisme	127
I. Croissance cristalline	127
1. Effet de la concentration en PEG 8kDa	127
2. Effet de la concentration en protéines	131
II. Caractérisation des différents faciès observés	133
 Chapitre 5 : Cristallisation et structure de complexes d'urate oxydase	 139
A. Etat des lieux sur le mécanisme d'action	141
B. Cristallisation de complexes d'urate oxydase	143
I. Choix des inhibiteurs	143
II. Données cristallographiques	145
C. Structures des complexes et implications sur le mécanisme d'action	148
I. Description du site actif : positionnement de l'inhibiteur	148
II. Nature du substrat dans le site actif	152
II. Implications sur le mécanisme d'action	153
 Conclusion et perspectives	 155
 Références Bibliographiques	 161
 Publications	 175

Chapitre 1 : Introduction

Le travail réalisé au cours de cette thèse sous la direction de Françoise Bonneté porte sur la caractérisation des interactions en solution et la cristallisation d'une protéine, l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus*. Il a débuté au LMCP (Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris) dans l'équipe d'Annette Tardieu, qui étudie depuis plusieurs années les interactions en solution entre protéines. Les interactions en solution entre macromolécules biologiques jouent un rôle déterminant dans la majorité des processus biologiques : un jeu subtil d'interactions permet ainsi aux macromolécules et aux complexes macromoléculaires de demeurer solubles et stables, et d'assurer leur fonction biologique au sein de la cellule, un milieu pourtant très concentré. L'équipe d'Annette Tardieu s'est historiquement intéressée à la compréhension de la transparence et de l'opacité du cristallin de l'œil en terme d'interactions entre protéines (Delaye et Tardieu 1983; Véré tout, Delaye et al. 1989). Elle a par la suite pu caractériser les potentiels d'interaction induisant les séparations de phase liquide-liquide au sein des solutions protéiques (Malfois 1995; Malfois, Bonneté et al. 1996) et elle a mis en évidence une étroite corrélation entre la capacité des sels à cristalliser le lysozyme et à induire des interactions attractives entre les molécules de lysozyme (Guilloteau 1991; Ducruix, Guilloteau et al. 1996). La caractérisation des interactions en solution ainsi que le lien avec la cristallisation des protéines se sont alors poursuivis. Ainsi une étroite corrélation entre les variations du second coefficient du viriel et celles de la solubilité du lysozyme en fonction de la concentration et de la nature des sels ajoutés a pu être mise en évidence (Bonneté, Finet et al. 1999). En parallèle, les potentiels d'interaction de paire ont pu être déterminés à l'aide de traitement numériques basés sur des équations de la physique des liquides (Tardieu, Le Verge et al. 1999). Enfin, le groupe d'Annette Tardieu s'est aussi intéressé au comportement d'autres protéines comme les cristallines en matière d'interactions et de cristallisation (Finet 1999). Dans le même temps, la structure de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* avec un inhibiteur compétitif, la 8-azaxanthine, a été résolue au LMCP par Nathalie Colloc'h *et al* en collaboration avec Sanofi-Synthelabo, qui commercialise cette protéine comme médicament (Colloc'h, El Hajji et al. 1997). Dans ce contexte général, nous avons entrepris d'étudier les interactions en solution et la cristallisation de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus*. Notre but était alors de comparer son comportement avec celui d'autres protéines (majoritairement de faible masse) précédemment étudiées au laboratoire, en vue d'établir des lois générales sur les interactions en solution et la cristallisation des protéines. A partir d'Avril 2002, nous avons continué ce travail au sein de l'équipe de Stéphane Veessler au CRMC2 (Centre de Recherches sur les Mécanismes de Croissance Cristalline). Nous avons ainsi notamment pu profiter de l'expérience de ce groupe (Marcq 1995; Lafont 1996;

Budayova 1998) pour étudier la solubilité et la croissance cristalline de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus*. Dans le cadre d'une collaboration avec Sanofi-Synthelabo et avec des cristallographes, nous avons alors cristallisé plusieurs complexes d'urate oxydase avec différents inhibiteurs, dont les structures, révélées par diffraction des rayons X, nous ont permis d'avancer vers l'élucidation du mécanisme d'action de cette enzyme, encore méconnu.

A. LA CRISTALLISATION DES PROTEINES :

Notre travail s'inscrit dans le domaine très large de la cristallisation des protéines. La cristallogénèse est aujourd'hui une science à part entière ; elle constitue en effet toujours une des étapes limitantes vers la détermination des structures 3D des macromolécules biologiques par diffraction des rayons X, principale technique utilisée actuellement. Nous allons dans ce paragraphe présenter succinctement l'évolution scientifique mais aussi « philosophique » de la cristallisation des protéines au cours de ces dernières décennies. Pour rédiger cette partie, nous nous sommes en partie inspirés des articles de McPherson (McPherson 1991) et Ducruix et Giégé (Ducruix et Giégé 1999).

I. Des origines...

La cristallisation des protéines est une « science » qui a aujourd'hui plus de 150 ans. Les premiers travaux sur des cristaux de protéines ont été publiés en 1840 par Hünefeld. Ce dernier a réussi à cristalliser l'hémoglobine en laissant évaporer entre deux lamelles de verre une goutte de sang de ver de terre. Durant la décennie suivante, d'autres scientifiques continuèrent à cristalliser l'hémoglobine à partir de sang de vertébrés et d'invertébrés et Reichert et Brown publièrent un volume de presque 500 pages intitulé « The Differentiation and Specificity of Corresponding Proteins and Other Vital Substances in Relation to Biological Classification and Organic Evolution : The Crystallography of Hemoglobins. » : leur idée était déjà qu'un cristal reflétait la composition et la structure des différentes molécules qui le composaient. S'en suivirent les cristallisations de différentes protéines de plante et de l'albumine par des protocoles déjà basés sur des variations de température, de pH ou encore des ajouts de sels. Dans les années 20, Sumner entreprit alors de cristalliser une enzyme, l'uréase, en vue de montrer de manière univoque qu'une enzyme était bien une protéine. En plus de l'uréase, Sumner réussira à cristalliser deux autres protéines les concanavalines A et B. Avec Stanley, qui cristallisa en 1935 le TMV (Tobacco Mosaic

Virus), et Northrop qui cristallisa la pepsine et d'autres enzymes protéolytiques en 1930, Sumner reçut le Prix Nobel de Chimie en 1946. L'ensemble des travaux sur la cristallisation des enzymes a donné lieu en 1948 à la publication d'un livre intitulé « Crystalline Enzymes ».

Jusque dans les années 30, les recherches sur la cristallisation des protéines se justifiaient car la cristallisation était utilisée pour purifier une protéine à partir d'un mélange ou encore pour montrer qu'une solution protéique était pure. L'utilisation des cristaux de protéines pour la biologie structurale débuta en 1934 lorsque Bernal et Crowfoot enregistrèrent le premier cliché de diffraction d'une protéine, la pepsine. En 1935, Bernal, Fankuchen, et Perutz ont publié un article sur la diffraction de l'hémoglobine et de la chimotrypsine. Et à la fin des années 50, avec le développement des méthodes de cristallographie, Perutz et Kendrew résolurent les premières structures à environ 6Å de résolution respectivement de l'hémoglobine et de la myoglobine. Ils reçurent pour ces travaux le Prix Nobel de Chimie en 1962. Vingt ans plus tard, un complexe membranaire, le centre de réactions photosynthétiques de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis*, fut cristallisé par Michel ; celui-ci reçut avec Huber et Deisenhofer, qui participèrent à la résolution de la structure tridimensionnelle du complexe, le Prix Nobel en 1988.

II. ...A nos jours

Les techniques de résolution de structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques ayant considérablement progressé depuis les travaux pionniers de Perutz et Kendrew, l'obtention de cristaux de protéines est vite apparue comme l'obstacle majeur pour les biocristallographes. C'est pourquoi la communauté scientifique internationale a organisé à Stanford en 1985 un premier congrès sur la cristallisation des macromolécules biologiques (Feigelson 1986). A cette occasion, Charles Bugg écrivait dans un article intitulé « The future of protein crystal growth »: « There is a compelling need to move protein crystal growth from the realm of “art” into the accepted field of “science” » (Bugg 1986). En 2002, à l'issue de la 9ème édition de ce congrès, Chernov et DeLucas écrivaient « More intensive effort to (...) move from art to science of growing crystals must become a high priority » (Chernov et DeLucas 2002). Le problème est donc toujours d'actualité même si d'énormes progrès ont été faits dans la compréhension et la prédiction des phénomènes de biocristallisation comme nous le verrons plus loin. Ces efforts sur la cristallisation ont largement participé au passage de 70-80 structures résolues à l'époque du congrès de Stanford aux 18000 structures résolues à ce jour par diffraction des rayons X (<http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>). Il faut noter que la

RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) permet aussi de déterminer la structure tridimensionnelle des macromolécules biologiques mais cette technique est limitée aux faibles masses (généralement inférieures à 30kDa) ; ainsi aujourd'hui 3000 structures par RMN sont déposées dans la PDB (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>).

Plusieurs groupes de laboratoires se sont aujourd'hui lancés dans un programme de génomique structurale. Pour chacun des organismes biologiques étudiés autour de 500 protéines solubles sont ciblées, le problème des protéines membranaires et de leur cristallisation restant pour l'instant entier. Les techniques de cristallisation sont généralement basées sur l'utilisation de robots capables de réaliser et analyser plusieurs milliers d'essais à haut débit. Ces robots utilisent des « kits » de cristallisation dont l'élaboration est basée essentiellement sur une analyse statistique des essais de cristallisation ayant réussi sur une majorité de protéines. Cependant, on estime aujourd'hui que même en multipliant les essais seulement 10% à 60% des protéines ciblées pourront être facilement cristallisées (Chernov et DeLucas 2002). Les travaux en cours de ces programmes de génomiques structurales disponibles sur internet montrent que l'étape d'obtention de cristaux susceptibles de diffracter est encore limitante (Figure I.A.1) . C'est pour cette raison que la recherche fondamentale sur la cristallisation des macromolécules biologiques est encore pleinement justifiée.

Targets	Cloning	Expression	Solubility	Purification	Fold	NMR resolution	Crystallization	X-Ray resolution
264 Targets	Cloned : 245 No clone : 1 In progress : 7	Expressed : 204 Not expressed : 27 Degraded : 0 In progress : 10	Soluble : 121 Insoluble : 71 In progress : 13	Purified : 76 Not purified : 0 In progress : 91	Not folded : 14	Solved by NMR : 0 In progress : 2	Crystallized : 22 Not crystallized : 3 In progress : 34	Solved by X-Ray : 8 In progress : 8

Figure I.A.1 : Etat des lieux au 07/05/03 du projet de génomique structurale de la levure mené par le génopole d'Evry et plusieurs laboratoires d'Ile de France (<http://genomics.eu.org/>).

La biocristallisation n'est pas uniquement utile pour satisfaire la demande grandissante des cristallographes. En effet, comprendre les processus de cristallisation peut par exemple permettre de mieux vectoriser sous forme solide des médicaments protéiques tel que l'insuline (Yip, DeFelippis et al. 1998) ou encore de mieux appréhender les maladies génétiques ayant pour origine la cristallisation in vivo de protéines, tel qu'une cataracte qui peut être causée par la cristallisation des γ -cristallines (Pande, Pande et al. 2001) ou la drépanocytose, maladie faisant intervenir la cristallisation d'hémoglobines (Vekilov, Feeling-Taylor et al. 2002). Enfin on peut aujourd'hui penser que la biocristallisation jouera un rôle dans le vaste domaine

qu'est la bionanotechnologie : la cristallisation des macromolécules biologiques est déjà considérée comme un moyen d'élaborer de nouveaux nanomatériaux (Balavoine, Schultz et al. 1999; McMillan, Paavola et al. 2002; Seeman 2003).

B. SOLUBILITE, NUCLEATION ET CROISSANCE CRISTALLINE

Nous allons dans ce paragraphe exposer les principales notions concernant la solubilité, la nucléation et la croissance cristalline dont nous aurons besoin dans la suite du manuscrit. De nombreux articles et ouvrages traitent de ces aspects et nous nous sommes principalement référés aux articles de Boistelle et Astier (Boistelle et Astier 1988), Veessler et Boistelle (Veessler et Boistelle 1999), Durbin et Feher (Durbin et Feher 1996) et Rosenberger et coll. (Rosenberger, Vekilov et al. 1996).

I. Sursaturation, solubilité et diagramme de phases

Le moteur de la cristallisation d'une molécule est la **sursaturation**. Une solution est dite sursaturée lorsque la concentration en soluté C est supérieure à sa solubilité C_s . La **solubilité** correspond à la concentration en protéines en équilibre avec le cristal à une température et une pression données. D'un point de vue thermodynamique, la sursaturation correspond à la différence de potentiel chimique entre la solution sursaturée et la solution saturée :

$$\Delta\mu = \mu - \mu_s = k_B T \ln(C/C_s) \quad (\text{I-1})$$

Par commodité, on définit généralement la sursaturation par les grandeurs sans dimension β ou σ :

$$\beta = C / C_s \quad (\text{I-2})$$

$$\sigma = (C - C_s) / C_s \quad (\text{I-3})$$

La solubilité d'un soluté (protéine, molécules inorganique ou organique) dépend de nombreux paramètres (pH, force ionique, solvant, température, pression, etc...). L'évolution de la solubilité d'un soluté en fonction d'un de ces paramètres, les autres demeurant constants, correspond à la **courbe de solubilité**. Dans une représentation de type diagramme de phases, la courbe de solubilité divise ce diagramme en deux zones distinctes : en-dessous de la courbe de solubilité, la solution est sous-saturée et au-dessus de celle-ci, elle est sursaturée (Figure I.B.1).

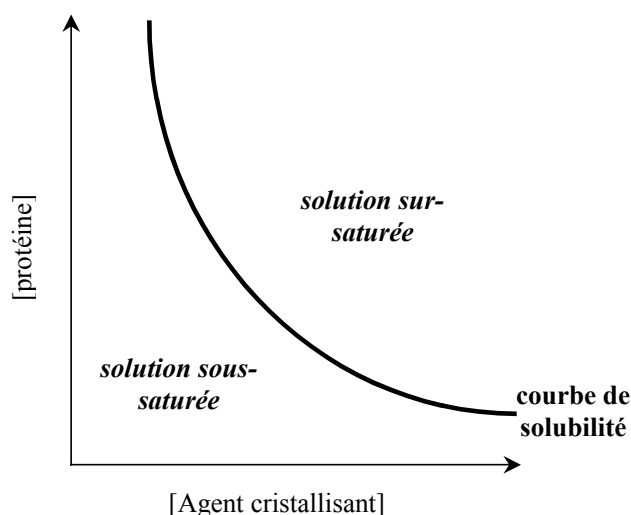


Figure I.B.1 : Diagramme de solubilité d'une protéine.

II. Nucléation

Lorsque la solution est sursaturée, son potentiel chimique est supérieur à celui de la phase cristalline, qui est par conséquent la phase la plus stable. Selon les conditions de sursaturation, de température, d'impuretés, le cristal se forme plus ou moins rapidement. Le processus conduisant à la formation de germes (ou noyaux) cristallins (formés de quelques molécules) est appelé nucléation. Les fluctuations de concentration induites par les échanges thermiques provoquent constamment l'apparition et la disparition de germes cristallins en solution. Ces germes peuvent conduire à des cristaux uniquement dans le cas d'une solution sursaturée.

Deux types de nucléation sont couramment rencontrés : la nucléation (primaire) homogène où les noyaux se forment au sein même de la solution et la nucléation (primaire) hétérogène où les noyaux se forment préférentiellement sur une surface solide (cristallisateur, poussières, etc...). Si les nouveaux germes se forment à partir de cristaux existant déjà au sein de la solution, on parle de nucléation secondaire.

Dans le cas de la **nucléation homogène**, l'énergie nécessaire à fournir pour créer un premier germe de volume V et de surface S s'écrit :

$$\Delta G = -\frac{V}{\Omega} \Delta \mu + S \gamma, \quad (\text{I-4})$$

où Ω est le volume de la molécule dans le cristal et γ la tension interfaciale entre le germe et la solution. Dans cette expression, le premier terme, thermodynamiquement favorable, correspond à l'énergie associée à la création du volume du germe, tandis que le second terme, thermodynamiquement défavorable, correspond à l'énergie nécessaire à la

création de la surface du germe. En supposant que le germe a une structure sphérique de rayon r , on peut alors écrire que :

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma \quad (\text{I-5})$$

L'enthalpie de la réaction ΔG dans une condition expérimentale donnée est maximale pour une valeur critique de r , habituellement notée r^* (Figure I.B.2).

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{\Delta\mu} \quad \text{avec} \quad \Delta G(r^*) = \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3\Delta\mu^2} \quad (\text{I-6})$$

Lorsque le germe a un rayon égal au rayon critique r^* , il est en équilibre thermodynamique avec la solution qui l'entoure. Si au contraire, $r < r^*$, le germe se dissout spontanément et dans le cas où $r > r^*$, le germe croît.

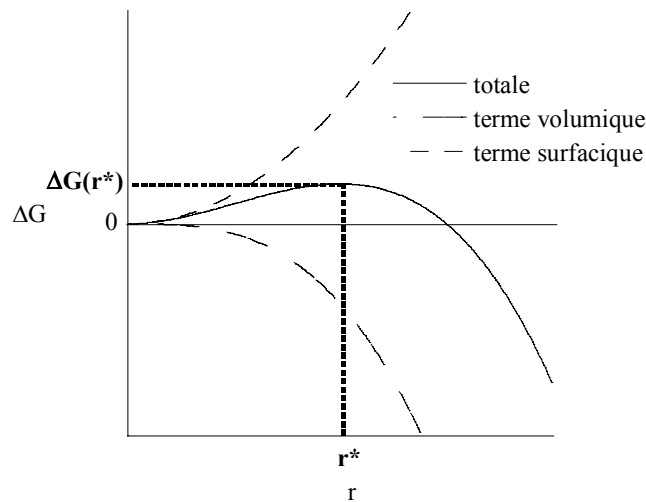


Figure I.B.2 : Variation de l'enthalpie libre de nucléation en fonction du rayon du germe selon la théorie classique de nucléation.

L'expression de l'énergie nécessaire à la formation d'un germe montre que la nucléation est favorisée lorsque $\Delta\mu = k_B T \ln \beta$ est important et/ou γ est faible. Cela signifie que la nucléation est d'autant plus probable que la sursaturation et la température sont grandes et que la tension interfaciale est faible.

Dans le cas d'une **nucléation hétérogène**, l'énergie nécessaire pour créer un germe est plus faible que dans le cas d'une nucléation homogène. Ce type de nucléation est par conséquent majoritairement observé lorsque la sursaturation est faible.

Il est nécessaire d'atteindre une sursaturation critique β^* pour que la nucléation puisse avoir lieu. L'écart entre la courbe de solubilité et la zone où cette sursaturation critique est atteinte, est appelée **zone métastable**, zone au sein de laquelle la nucléation spontanée est impossible.

Dans le cas de la cristallisation des protéines, une des questions qui fait encore débat est celle de l'existence ou non d'un intermédiaire oligomérique entre les molécules en solution et celles assemblées dans le cristal. Pour l'instant, aucune expérience n'a montré sans ambiguïté que les protéines s'associent avant de former un germe cristallin. Des expériences de diffusion de rayons X aux petits angles n'ont montré aucun intermédiaire dans le cas du lysozyme (Finet, Bonnete et al. 1998), du BPTI (Budayova-Spano, Bonnete et al. 2002) et du BMV (Brome Mosaic Virus) (Casselyn, Finet et al. 2002).

La taille et la forme des premiers noyaux de nucléation ont pu récemment être évaluées expérimentalement. Dans le domaine des protéines, des études d'AFM (Microscopie à Force Atomique) sur l'apoferritine, protéine quasi-sphérique, ont mis en évidence des noyaux de nucléation plans formés d'une ou deux couches monomoléculaires de protéines ; ces plans contenaient entre 20 et 50 molécules (Figure I.B.3) (Yau et Vekilov 2000).

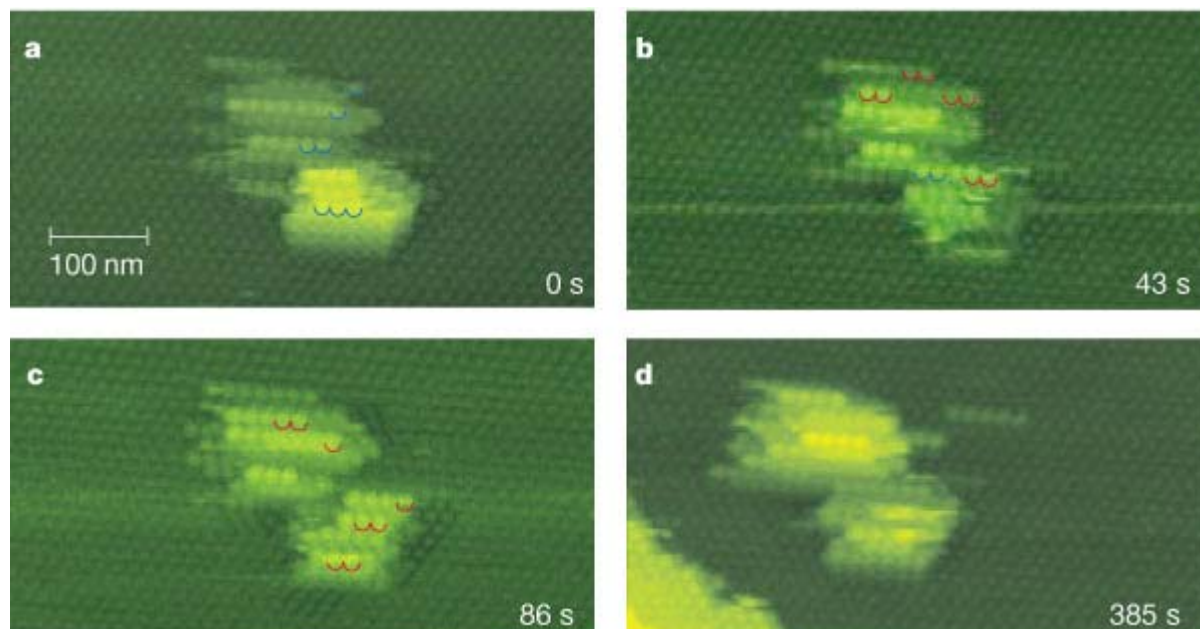


Figure I.B.3 : Observations directes in-situ par AFM (Microscopie à Force Atomique) des noyaux cristallins d'Apoferritine plans constitués de 20 à 50 molécules de protéines (Yau et Vekilov 2000).

Dans le domaine des colloïdes, les noyaux de nucléation de particules colloïdales sphériques ont pu être observés par microscopie optique confocale. Ces noyaux se sont révélés de surface rugueuse et de forme plutôt ellipsoïdale et contenaient entre 60 et 160 molécules (Gasser, Weeks et al. 2001). Ces deux exemples récents montrent que considérer les noyaux de nucléation comme sphériques peut s'avérer être une approximation abusive.

Par ailleurs, après les premiers travaux sur le lysozyme (Ishimoto et Tanaka 1977; Taratuta, Holschbach et al. 1990) et sur les γ -cristallines (Thomson, Schurteberger et al.

1987), il est à présent admis qu'une solution protéique sursaturée peut subir, en plus d'une séparation de phase solide-liquide menant à la cristallisation, une séparation de phase liquide-liquide. Cette séparation de phase conduit à deux phases, l'une riche en protéines et l'autre pauvre en protéines, généralement métastables vis-à-vis de la phase cristalline. La position de la courbe de séparation de phase vis à vis de la courbe de solubilité est particulièrement importante pour la cristallisation des protéines. En effet, la nucléation est favorisée de manière non prévue par la théorie classique de la nucléation lorsqu'on s'approche de la séparation de phase. Ce phénomène a été observé expérimentalement sur le lysozyme (Muschol et Rosenberger 1997; Galkin et Vekilov 2000) et expliqué théoriquement par un mécanisme faisant intervenir deux étapes (ten Wolde et Frenkel 1997; Haas et Drenth 1998).

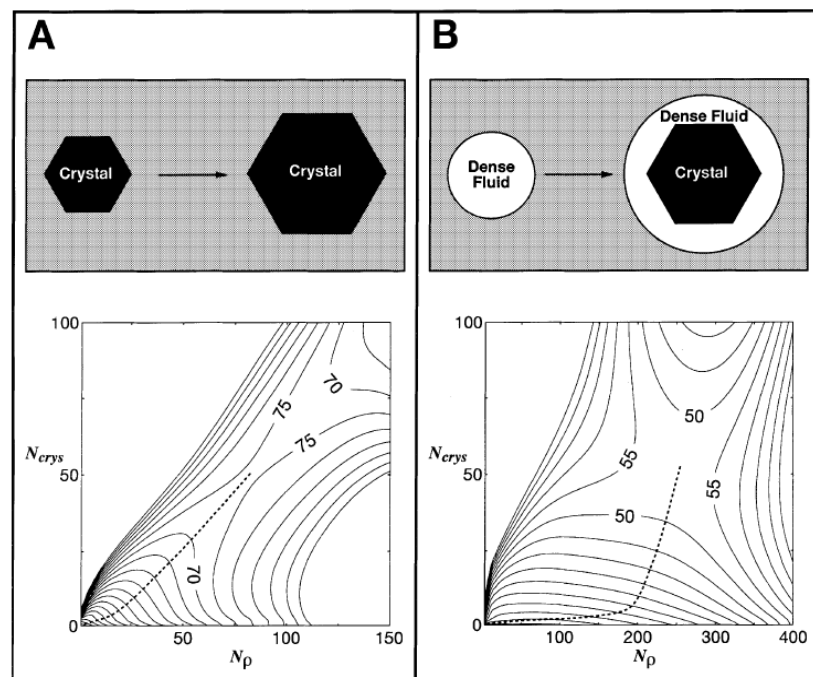


Figure I.B.4 : Chemins énergétiques sans passer (A) et en passant (B) par la formation de gouttelettes riches en protéines (ten Wolde et Frenkel 1997). Ten Wolde et Frenkel ont montré théoriquement qu'il était énergétiquement plus favorable que la nucléation soit précédée par la formation de zones denses en protéines. N_{crys} est le nombre de particules appartenant à un noyau cristallin et N_p le nombre de particules « connectées » les unes aux autres ou encore de densité locale supérieure à la densité moyenne en solution. Lorsque N_{crys} est proportionnel à N_p , les particules s'assemblent sous la forme d'un édifice cristallin.

La première étape est la formation de gouttes concentrées en protéines. Ten Wolde et Frenkel ont proposé que ces zones de forte densité en protéines résultaient de fluctuations de concentrations autour du point critique dans la solution (Figure I.B.4) (ten Wolde et Frenkel 1997). Haas et Drenth ont considéré que ces régions riches en protéines provenaient directement de la séparation de phase liquide-liquide métastable (Haas et Drenth 1998). La seconde étape est la formation de noyaux cristallins dans les zones de haute densité en

protéines. Même si les récents travaux de Galkin et Vekilov (Galkin et Vekilov 2000) tendent à confirmer la théorie de ten Wolde et Frenkel, d'autres études sont à présent nécessaires pour confirmer l'un ou l'autre des schémas théoriques proposés.

III. Croissance cristalline

Un cristal est constitué de plusieurs faces, qui caractérisent sa morphologie. Au niveau macroscopique, la morphologie finale d'un cristal est imposée par les faces qui croissent le plus lentement. Il est important à ce stade de distinguer les termes forme cristalline, morphologie cristalline et faciès cristallin. La **forme cristalline** caractérise entièrement un cristal d'un point de vue cristallographique à l'échelle microscopique : elle est associée à un groupe d'espace bien particulier. Afin de décrire macroscopiquement un cristal, on a recours à deux termes : la morphologie et le faciès. La **morphologie** est caractérisée par les faces (indexées hkl) extérieures du cristal. Le **faciès** correspond à la forme extérieure générale du cristal (plaquette, aiguille, cube,...).

Au niveau microscopique, la croissance du cristal est favorable thermodynamiquement, une fois que la taille du germe cristallin est supérieure à la taille critique. Les mécanismes de croissance et les taux de croissance dépendent alors non seulement du milieu de croissance (sursaturation, solvant, température, présence d'impuretés,...) mais aussi de la nature interne des cristaux (défauts, liaisons intermoléculaires au sein du cristal,...).

Afin de croître, les molécules doivent tout d'abord être transportées de la solution vers le cristal. En l'absence de tout processus de convection, les molécules sont apportées à la surface du cristal par **diffusion volumique** : un gradient de concentration se développe, la solution à la surface du cristal s'appauvrissant en protéines. L'apport d'unité(s) de croissance sur le cristal peut aussi se réaliser par **convection**. En effet, la densité de la solution au voisinage du cristal est généralement plus faible que celle dans le cristalliseur ce qui a pour conséquence l'apparition de mouvements de convection à la surface du cristal.

Une fois qu'une ou plusieurs molécules ont approché la surface, plusieurs mécanismes sont alors possibles pour qu'elle(s) puisse(nt) s'attacher au cristal. Cette étape est habituellement appelée la **diffusion surfacique**. Le mécanisme d'attachement des unités de croissance est reflété dans la structure de la surface du cristal. Cette structure conditionne le taux d'incorporation des molécules additionnelles.

Récemment, la microscopie à force atomique (ou AFM pour Atomic Force Microscopy) (McPherson, Malkin et al. 2000; Astier, Bokern et al. 2001) et l'interférométrie laser de type

Michelson (Vekilov, Ataka et al. 1995) ont pu mettre en évidence les deux mécanismes de diffusion surfacique dans le cas de la cristallisation des macromolécules biologiques : la croissance par germination bidimensionnelle et la croissance par spirale (Figure I.B.5).

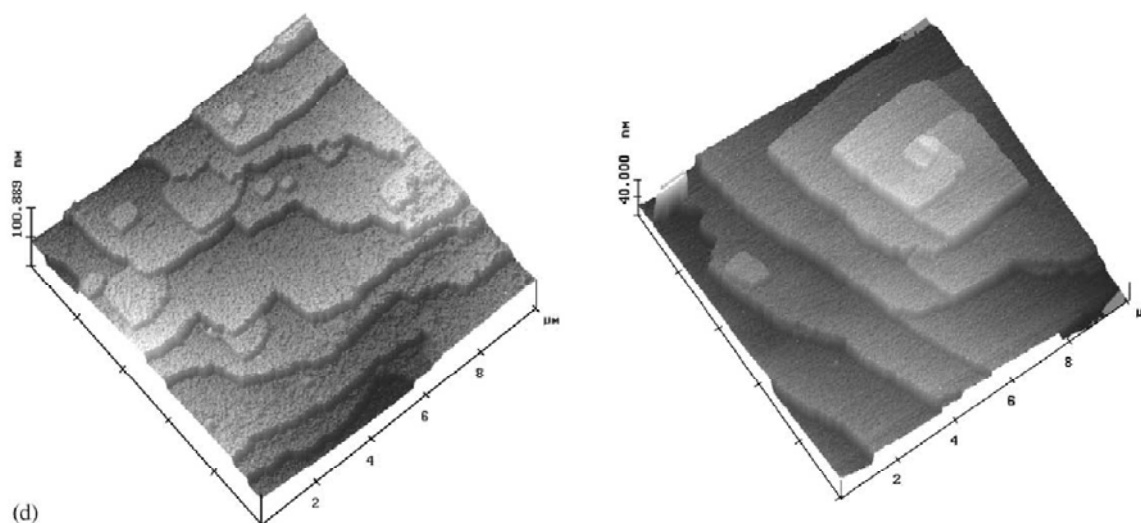


Figure I.B.5 : Images d'AFM réalisées sur l' α -amylase (Astier, Bokern et al. 2001) illustrant les deux mécanismes de diffusion surfacique : a) croissance par germination bidimensionnelle b) croissance par spirale.

Si la surface cristalline ne présente aucun défaut, la croissance se fait par **germination bidimensionnelle**. Pour créer un germe bidimensionnel, les molécules adsorbées doivent diffuser sur la surface et s'assembler. Une fois que le germe a atteint une taille critique, il devient stable et présente alors des sites de croissance où les nouvelles unités de croissance peuvent être facilement incorporées. Comme dans le cas de la nucléation tridimensionnelle, la création d'un germe bidimensionnel se fait à partir d'une sursaturation critique.

Dans la majorité des cas, les surfaces cristallines présentent des défauts et la croissance va se poursuivre à partir de ces défauts. Ainsi, lorsqu'une dislocation vis apparaît sur la surface d'un cristal, cela génère une ou plusieurs marches qui piègent les molécules adsorbées. La croissance se fait alors en rotation autour du point origine de la dislocation. C'est la raison pour laquelle on parle de **croissance par spirale**.

En accord avec les prédictions théoriques, le mécanisme de croissance par germination bidimensionnelle est expérimentalement observé à forte sursaturation tandis que la croissance cristalline par spirale, pour laquelle aucun germe ne doit être formé, est observé à faible sursaturation (Astier, Bokern et al. 2001).

Dans le cas des cristaux de macromolécules biologiques, il semble se confirmer que la diffusion volumique est le processus le plus lent et impose donc la cinétique de croissance globale du cristal (Boistelle, Astier et al. 1992).

IV. Cristaux inorganiques / cristaux de protéines

Il est à présent admis et démontré que les mécanismes gouvernant la nucléation et la croissance des cristaux inorganiques et des cristaux de macromolécules biologiques sont similaires (Boistelle et Astier 1988). Cependant les macromolécules biologiques sont connues pour être en général beaucoup plus difficiles à cristalliser que les sels ou complexes inorganiques ou même que les petites molécules organiques. La nucléation des biocristaux intervient en général pour des sursaturations nettement plus élevées que pour les cristaux inorganiques. C'est ainsi, qu'en plus des cristaux désirés on obtient aussi parfois des phases amorphes ou précipitées. Par ailleurs, les cristaux biologiques sont généralement beaucoup plus petits, plus fragiles et diffractent à de moins bonnes résolutions. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer l'ensemble de ces phénomènes (Durbin et Feher 1996). La première est la quantité importante de solvant que l'on trouve au sein d'un cristal de macromolécule biologique (de 30% à 90% dans les cas les plus limites). La seconde est que, bien que les contacts cristallins entre macromolécules soient comparables en énergie à ceux existant dans les cristaux inorganiques, la densité de contacts est moins grande. Par ailleurs, la taille et la complexité des biomacromolécules font qu'elles peuvent développer différents types de contacts et s'orienter de multiples manières les unes par rapport aux autres selon les conditions expérimentales. Enfin, en pratique les solutions biologiques contiennent un grand nombre d'impuretés qui sont défavorables à la cristallisation. Les impuretés peuvent être de différentes natures (incluant le solvant et les éventuelles formes dégradées de la protéine). Elles peuvent venir s'adsorber sur la surface cristalline et on parle alors d'« empoisonnement ». Dans ce cas, les taux de nucléation et de croissance diminuent fortement et la qualité cristalline est moins bonne. Par ailleurs, si les impuretés se fixent préférentiellement sur une face bloquant sa croissance, la morphologie du cristal peut en être modifiée. L'une des solutions est de réaliser les expériences de cristallisation en microgravité ou en milieu gélifié (Robert, Vidal et al. 1999; Lorber 2002). La microgravité élimine tout mouvement de convection en solution et le mouvement des molécules est alors uniquement contrôlé par la diffusion. Par conséquent, l'incorporation jusqu'aux surfaces cristallines des impuretés de taille importante ou d'agrégats diminue, leur coefficient de diffusion étant plus faible que celui des protéines étudiées. La qualité cristalline peut aussi être améliorée par variation de température par exemple en travaillant à faible sursaturation (Boistelle, Astier et al. 1992).

V. Polymorphisme et transition de phase

Dans certains cas, plusieurs formes cristallines du même soluté appelées **polymorphes** peuvent être observées. Les polymorphes ont par définition la même composition chimique mais des formes cristallines différentes. Dans le cas des protéines, les polymorphes n'existent pas réellement dans la mesure où les agents cristallisants et le solvant font partie du cristal. Cependant dans un souci de simplicité, deux structures cristallines différentes d'une même protéine sont dites polymorphiques. Dans le cas où plusieurs polymorphes sont présents en solution, chacun d'entre eux a sa propre courbe de solubilité, délimitant le diagramme de solubilité en plusieurs zones (Boistelle, Astier et al. 1992) (Figure I.B.6). Si la solution n'est sursaturée que par rapport à une seule phase, seule celle-ci peut cristalliser. Si par contre la solution est sursaturée par rapport aux deux phases, l'une ou l'autre phase cristalline peut se former. Selon la règle d'Ostwald (1897), souvent vérifiée, la phase qui se forme la première n'a pas besoin d'être la phase la plus stable mais est celle qui est la plus proche en énergie de la phase fluide, c'est-à-dire la phase la plus soluble donc la phase métastable. Stranski et Totomanow ont réexaminé 35 ans plus tard cette loi et ont suggéré que la phase qui cristallise la première est celle dont l'énergie nécessaire à la nucléation est la plus faible. En d'autres termes, ce sont les facteurs cinétiques et non les facteurs thermodynamiques qui imposent la cristallisation d'une phase au profit de l'autre. Généralement, la phase dont l'énergie de nucléation est la plus faible est la phase métastable.

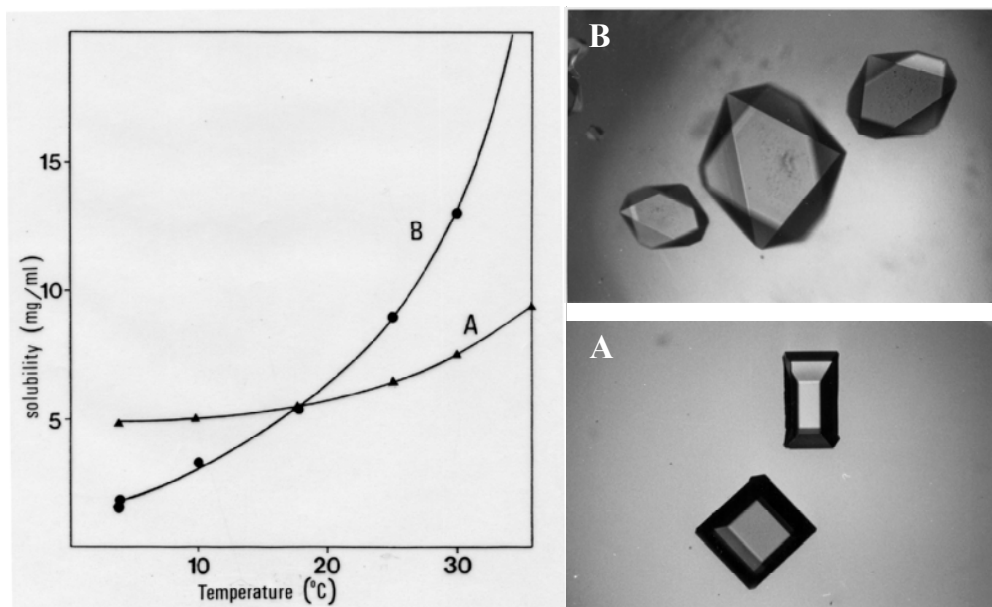


Figure I.B.6 : Courbes de solubilité en fonction de la température des deux variétés polymorphiques (A et B) de l' α -amylase. Chacun des polymorphes peut se former au-dessus de sa courbe de solubilité (Boistelle, Astier et al. 1992).

C. INTERACTIONS EN SOLUTION, SOLUBILITE ET CRISTALLISATION

Nous venons de voir que la nucléation et la croissance cristalline dépendent d'un grand nombre de paramètres. Le principal paramètre guidant la cristallisation est la sursaturation β ($\beta = C / C_s$). La sursaturation peut être modifiée en faisant varier soit la concentration initiale en molécules, soit la solubilité. La solubilité est fonction de paramètres physico-chimiques dont principalement: la température, le pH, la force ionique, la nature de l'agent cristallisant ajouté, la pression et la constante diélectrique du solvant. Afin de mieux cerner les raisons pour lesquelles ces paramètres affectent la solubilité d'une macromolécule, il convient de rappeler les interactions susceptibles d'exister entre macromolécules biologiques. Nous nous sommes en partie appuyer pour cela sur l'ouvrage d'Israelachvili (Israelachvili 1994).

I. Interactions entre (macro)molécules en solution

A l'échelle moléculaire, la force d'interaction entre particules est généralement notée F . Celle-ci est directement reliée au potentiel d'interaction U via l'équation: $F = -\text{grad}(U)$. Une force répulsive tend à éloigner les particules et une force attractive tend à les rapprocher. Les énergies sont habituellement exprimées en unité $k_B T$, qui correspond à l'énergie d'agitation thermique. Par ailleurs, on fait souvent référence à la portée d'une force, qui correspond à la distance entre les particules jusqu'à laquelle la force est ressentie de manière significative. Lorsque deux molécules sont considérées, le potentiel d'interaction $U(r)$ est appelé potentiel de paire. Dans un modèle simple, nous considérerons dans toute la suite, ces grandeurs isotropes, c'est-à-dire uniquement fonction de la distance r entre deux particules. Par ailleurs, les particules seront considérées comme sphériques.

1. Forces de volume exclu

Lorsque deux macromolécules globulaires s'approchent, elles ne peuvent s'interpénétrer à cause de la répulsion de leur nuage électronique. Cette répulsion se traduit par une force de volume exclu, aussi appelée communément force de répulsion stérique. Une bonne approximation est de considérer les protéines comme des sphères dures. Dans ce cas, l'expression du potentiel résultant, dit de sphères dures, est la suivante :

$$U(r) = +\infty, \text{ pour } r < \sigma \quad (\text{I-7})$$

$$U(r) = 0, \text{ pour } r > \sigma,$$

où σ est la diamètre de la particule considérée.

Il faut noter que d'autres formes de potentiel existent afin de tenir compte de la compressibilité éventuelle de la particule.

2. Forces coulombiennes

Entre deux particules de charge Z_1 et Z_2 , il existe des forces de répulsion électrostatique dites coulombiennes, dont l'expression du potentiel résultant est la suivante :

$$U(r) = \frac{Z_1 Z_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}, \quad (I-8)$$

où ϵ_r est la constante diélectrique du solvant et r la distance entre les charges Z_1 et Z_2 .

Cette interaction à longue portée est répulsive pour des particules de même charge et attractive pour des particules de charges opposées.

Les interactions électrostatiques ne sont pas seulement répulsives. On rencontre notamment les interactions attractives appelées forces dipolaires et forces de polarisation.

3. Forces dipolaires

Si une particule présente un moment dipolaire permanent μ , des interactions attractives de type dipôle-charge ou dipôle-dipôle sont présentes. Les dipôles sont capables de tourner plus ou moins librement. Sachant que les interactions charge-dipôle fixe et dipôle fixe-dipôle fixe sont généralement d'intensité inférieure à l'énergie d'agitation thermique $k_B T$, il est alors possible de calculer les potentiels d'interaction dipolaire en moyennant sur toutes les orientations du dipôle et en utilisant la statistique de Boltzman.

Le potentiel d'interaction entre une charge Z et un dipôle μ s'écrit alors :

$$U(r) = -\frac{Z^2 \mu^2}{6(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 k_B T r^4} \text{ pour } \frac{Z\mu}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^2} < k_B T \quad (I-9)$$

Le potentiel d'interaction entre deux dipôles μ_1 et μ_2 s'écrit pour sa part :

$$U(r) = -\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 k_B T r^6} \text{ pour } \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^3} < k_B T \quad (I-10)$$

Cette interaction est appelée l'interaction de Keesom ou encore l'interaction d'orientation.

4. Forces de polarisation

Tout atome ou toute molécule est polarisable. Cela signifie que toute particule, en présence d'un champ électrique extérieur $\mathbf{E}$ créée par les charges ou les dipôles permanents environnants, possède un moment dipolaire induit μ_{ind} proportionnel à $\mathbf{E}$, dû à la déformation de son nuage électronique:

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha E, \quad (\text{I-11})$$

où α est la polarisabilité de l'atome ou de la molécule.

Trois types d'interaction impliquant ces dipôles induits sont alors possibles : les forces d'interaction charge-dipôle induit, dipôle permanent-dipôle induit et dipôle induit-dipôle induit.

Le potentiel d'interaction entre une charge Z et un dipôle μ_{ind} (de polarisabilité α) induit par le champ électrique créé par cette charge est :

$$U(r) = -\frac{Z^2 \alpha}{2(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 r^4} \quad (\text{I-12})$$

Le potentiel d'interaction entre un dipôle permanent μ et un dipôle μ_{ind} (de polarisabilité α) induit par le champ électrique créée par ce dipôle est :

$$U(r) = -\frac{\mu^2 \alpha}{(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 r^6}, \quad (\text{I-13})$$

et plus généralement lorsque deux particules différentes possèdent un moment dipolaire permanent (μ_1 et μ_2) et une polarisabilité (α_1 et α_2),

$$U(r) = -\frac{(\mu_1^2 \alpha_1 + \mu_2^2 \alpha_2)}{(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 r^6} \quad (\text{I-14})$$

Cette interaction est appelée interaction de Debye ou encore interaction d'induction.

Enfin, toute molécule même apolaire possède à tout instant un dipôle instantané créée par une dissymétrie dans la répartition des charges due à la rotation des électrons autour des noyaux. En moyenne, ce moment dipolaire instantané est nul. Ce dipôle instantané crée un champ électrique qui génère un dipôle induit au sein des atomes ou molécules voisines. Le potentiel d'interaction résultant entre deux dipôles induits μ_{ind1} (de polarisabilité α_1) et μ_{ind2} (de polarisabilité α_2) prend pour deux atomes l'expression suivante:

$$U(r) = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 r^6} \frac{I_1 I_2}{(I_1 + I_2)}, \quad (\text{I-15})$$

où I_1 et I_2 sont les énergies de première ionisation pour les deux atomes.

Cette force est couramment appelée force de dispersion ou force de London.

5. Forces de Van der Waals

Les interactions dipôle permanent / dipôle permanent (interaction de Keesom), dipôle permanent / dipôle induit (interaction de Debye) et dipôle induit / dipôle induit (interaction de London) constituent ce que l'on nomme les interactions de Van der Waals.

Dans le cas général de molécules polaires en solution, l'expression du potentiel d'interaction de Van der Waals s'écrit :

$$U_{VDW}(r) = -\frac{C_{ind} + C_{orient} + C_{disp}}{r^6}, \quad (I-16)$$

où C_{ind} , C_{orient} et C_{disp} s'exprime à partir de l'expression des forces concernées ci-dessus.

Cette expression est valable pour des atomes ou des molécules. Si on désire à présent considérer l'interaction entre deux macromolécules (telles qu'une protéine) composées de milliers d'atomes, l'interaction de Van der Waals peut être calculée à l'aide de la théorie de Lifshitz-Hamaker. Dans cette théorie, la structure atomique de la particule est ignorée et les particules sont traitées comme des milieux continus. Entre deux particules sphériques identiques de rayon R situées à une distance r l'une de l'autre, le potentiel de Van der Waals s'écrit alors :

$$U_{vdw}(r) = -\frac{A}{12} \left[\frac{4R^2}{r^2 - 4R^2} + \frac{4R^2}{r^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{4R^2}{r^2} \right) \right], \quad (I-17)$$

où A est la constante de Hamaker.

A courte distance, ce potentiel tend vers $-\frac{AR}{12r}$, tandis qu'à longue distance, il varie en $\frac{1}{r^6}$. La constante de Hamaker A est fonction des constantes diélectriques et des indices de réfraction relatifs au solvant et à la particule. Dans le cas des protéines, elle a été évaluée dans l'eau à environ $3k_B T$ (Malfois, Bonneté et al. 1996; Roth, Neal et al. 1996).

6. Le modèle DLVO

Dans le cas où des macromolécules chargées sont plongées au sein d'un électrolyte de faible force ionique, un modèle simple, le modèle DLVO, a été élaboré il y a plus de 50 ans par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek pour exprimer le potentiel d'interaction entre particules. Dans ce modèle, le potentiel résultant existant entre deux macromolécules est la somme du potentiel de sphères dures U_{HS} , du potentiel coulombien U_{coul} et du potentiel de Van der Waals U_{vdw} :

$$U(r) = U_{HS}(r) + U_{coul}(r) + U_{vdw}(r) \quad (I-18)$$

Les expressions des potentiels de sphères dures et de Van der Waals ont été données plus haut. Dans le modèle DLVO, les ions sont considérés comme ponctuels et n'interviennent explicitement qu'à travers la constante d'écrantage κ . Le potentiel coulombien est alors issu de la théorie de Poisson-Boltzman linéarisée :

$$U_{\text{coul}}(r) = \frac{Z^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{\exp(-\kappa(r-2R))}{(1+\kappa R)^2}, \quad (\text{I-19})$$

où Z et R sont respectivement la charge et le rayon de la macromolécule.

Le potentiel DLVO (Figure I.C.1) est plus particulièrement adapté aux solutions diluées en colloïdes lorsque les interactions ions-colloïdes sont faibles.

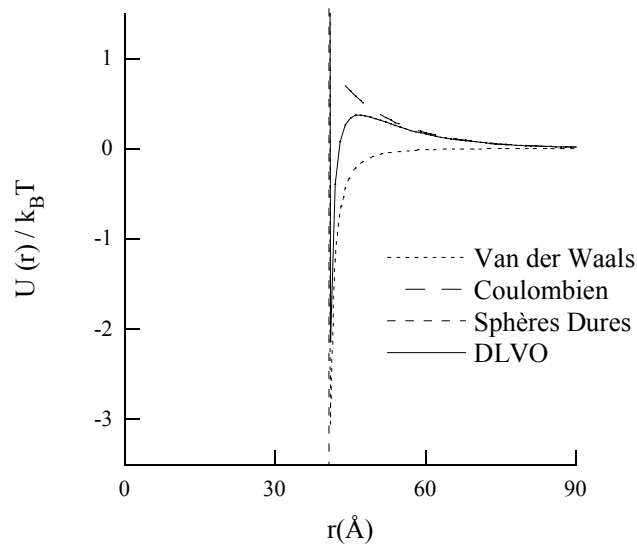


Figure I.C.1 : Représentation du potentiel DLVO dans le cas d'une particule de diamètre $\sigma=40\text{\AA}$, de charge $Z=5.5$, pour une force ionique $I=40\text{mM}$ et un potentiel de Van der Waals caractérisé par une constante de Hamaker de $2.5k_B T$.

7. Forces de déplétion

Il est connu expérimentalement depuis longtemps que lorsqu'on ajoute à une suspension colloïdale des polymères non-adsorbants, une séparation de phase entre une phase riche en colloïdes et une phase pauvre en colloïdes peut avoir lieu. Les premières explications théoriques de ce phénomène ont été proposées par Asakura et Oosawa (Asakura et Oosawa 1954) puis par Vrij (Vrij 1976) et elles ont été plus récemment reprises par Lekkerkerker et coll. (Lekkerkerker, Poon et al. 1992). Il a pour origine l'interaction attractive dite de déplétion existant entre molécules de colloïdes induit par l'ajout de polymères. Selon le modèle simple d'Asakura-Oosawa (Figure I.C.2), au sein d'un mélange de colloïdes de rayon R et de polymères de rayon R_g (appelé rayon de giration), les molécules de polymères sont libres de s'interpénétrer (solution de polymère idéale). Elles sont par contre exclues d'une région d'épaisseur R_g autour des colloïdes, région appelée zone de déplétion. Lorsqu'à la suite

de mouvements browniens deux colloïdes se rapprochent suffisamment et que leur zone de déplétion se recouvre, les molécules de polymères sont alors exclues de la région entre les colloïdes. Le déséquilibre de pression osmotique (due aux molécules de polymère), qui en résulte à la surface des colloïdes, donne un lieu à une interaction attractive « de déplétion » entre les molécules de colloïdes. Cette interaction libère par ailleurs un volume supplémentaire aux molécules de polymère dans la solution et provoque ainsi une augmentation de leur entropie, ce qui est thermodynamiquement plus favorable.

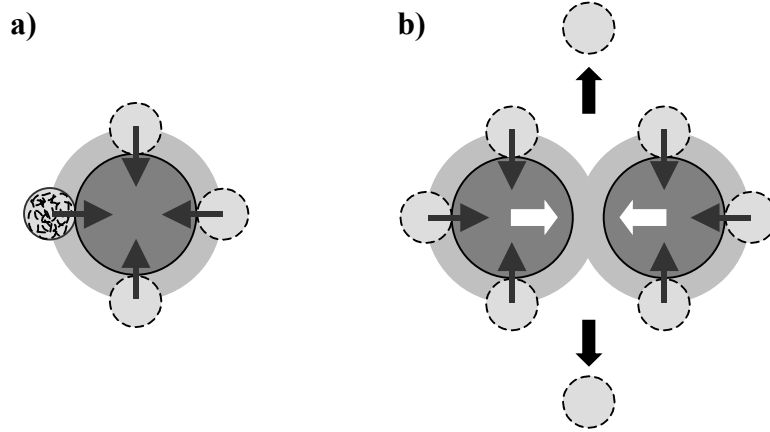


Figure I.C.2 : Modèle simple pour expliquer l'origine de l'interaction de déplétion. a) en gris foncé, la molécule de colloïde, en gris clair celle de polymère, en gris intermédiaire la zone de déplétion. La pression osmotique exercée par les molécules de polymères sur les molécules colloïdales est en moyenne nulle. b) lorsque les deux zones de déplétion se recouvrent, certaines molécules de polymère sont expulsées de la région créant un déséquilibre de pression osmotique et donc une interaction attractive de déplétion entre les molécules de colloïdes.

Selon le modèle d'Asakura-Oosawa, l'expression de l'interaction de déplétion est :

$$U_{\text{dep}}(r) = +\infty \text{ pour } r \leq 2R \quad (\text{I-20})$$

$$U_{\text{dep}}(r) = -\Pi_{\text{pol}} V_{\text{overlap}}(r) \text{ pour } 2R < r \leq 2R + 2R_g$$

$$U_{\text{dep}}(r) = 0 \text{ pour } r > 2R + 2R_g,$$

Π_{pol} étant la pression osmotique exercée par les polymères sur les colloïdes et V_{overlap} le volume de recouvrement des zones de déplétion.

Les expressions de Π_{pol} et V_{overlap} sont :

$$V_{\text{overlap}}(r) = \frac{4}{3}\pi(R+R_g)^3 \left(1 - \frac{3r}{4(R+R_g)} + \frac{1}{2} \left[\frac{r}{2(R+R_g)} \right]^3 \right) \quad (\text{I-21})$$

$$\Pi_{\text{pol}} = n_{\text{pol}} k_B T, \text{ où } n_{\text{pol}} \text{ est la densité volumique de polymères.}$$

Nous pouvons observer que la portée et l'intensité des interactions sont fonction de la taille et de la concentration en polymères.

8. Autres Forces

D'autres forces, dont l'origine et le mécanisme sont, pour la plupart, encore méconnus, peuvent intervenir en solution. Ces forces sont souvent décrites comme des forces non-DLVO, terme qui montre que la théorie DLVO seule ne suffit plus pour les expliquer. Nous allons ici nous focaliser sur les forces de solvation faisant intervenir les interactions entre les particules et l'eau ainsi que sur les forces spécifiques des sels ajoutés.

Les forces de solvation comprennent les **forces hydrophiles** (ou d'hydratation) et les **forces hydrophobes**. Les surfaces (généralement polaires ou chargées) ayant plus d'affinité pour l'eau qu'entre elles sont dites hydrophiles et les forces susceptibles d'agir entre elles sont qualifiées d'interactions hydrophiles. L'interaction hydrophile résultante entre deux surfaces hydrophiles est répulsive. Les surfaces ayant peu d'affinité pour l'eau sont dites hydrophobes. L'interaction dite hydrophobe entre deux surfaces hydrophobes est attractive. Les interactions hydrophiles et hydrophobes sont toutes deux dues à une restructuration des molécules d'eau au voisinage des surfaces respectivement hydrophiles ou hydrophobes. Cependant aucune approche théorique satisfaisante expliquant l'origine de ces deux forces n'est disponible dans la littérature (Israelachvili 1994; Israelachvili et Wennerström 1996; Marcelja 1997).

L'autre effet partiellement expliqué est l'effet spécifique des sels sur les interactions colloïdes-colloïdes. Selon, la théorie simple DLVO évoquée ci-dessus, l'ajout de sel à une suspension colloïdale ne devrait qu'écranter les interactions répulsives électrostatiques. Or il a été montré expérimentalement dans le cas des protéines par exemple (Muschol et Rosenberger 1995; Ducruix, Guilloteau et al. 1996) que l'ajout de sel pouvait induire des interactions attractives entre les protéines fonction de la nature de l'anion et dans une moindre mesure de celle du cation. Cet effet est connu sous le nom d'**effet Hofmeister** : Hofmeister a classé il y a près de 120 ans les cations et les anions susceptibles de faire précipiter les protéines du blanc d'œuf de poule (Hofmeister 1888). Cet effet a depuis été retrouvé dans un grand nombre de phénomènes physico-chimiques (Collins et Washabaugh 1985; Cacace, Landau et al. 1997) et est le résultat d'interactions complexes protéine-eau, protéine-sel et sel-eau. Il est encore partiellement méconnu même si certaines explications ont été avancées. Ainsi, l'ajout de sel induit une augmentation de la tension superficielle de l'eau ce qui impliquerait une hydratation préférentielle de la protéine ou un appauvrissement en ions à la surface de la protéine ; de plus, certains sels sont par contre susceptibles de se lier préférentiellement aux protéines (Melander et Horvath 1977; Timasheff et Arakawa 1988; Ebel, Faou et al. 1999; Curtis, Ulrich et al. 2002). L'ensemble de ces interactions préférentielles ions-protéines seraient à l'origine des interactions attractives entre protéines induites par l'addition de sels. Il

a été plus récemment proposé par le groupe de Ninham que les interactions de dispersion ionique pouvaient rendre compte en partie de l'effet Hofmeister (Boström, Williams et al. 2001). Leur approche théorique revient à coupler les interactions électrostatiques et celles de Van der Waals, qui sont considérées séparément dans la théorie DLVO.

II. Effets de différents paramètres physico-chimiques sur la solubilité

Nous allons dans ce paragraphe développer l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques sur la solubilité des macromolécules biologiques en nous focalisant plus sur les protéines. La plupart des paramètres qui suivent affectent aussi les étapes de nucléation et de croissance cristalline.

1. Effet de paramètres « externes »

Les paramètres externes tels que la température, la pression ou encore l'influence de champs externes (électriques ou magnétiques) présentent l'avantage de pouvoir être très facilement contrôlés.

Le paramètre externe le plus facile à contrôler est la **température**. La variation de la solubilité d'une protéine en fonction de la température peut être soit directe, et dans ce cas la solubilité augmente avec la température, soit inverse. Certaines protéines ont ainsi une variation de solubilité directe comme le lysozyme (à pH 4.5 et en présence de NaCl) (Rosenberger, Howard et al. 1993). D'autres protéines ont un comportement inverse vis à vis de la température comme l'albumine (à pH 5.5 et en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Rosenberger, Howard et al. 1993) ou l'hémoglobine (à pH 7.35 et en présence de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) (Vekilov, Feeling-Taylor et al. 2002), certaines comme le BPTI ayant une variation directe ou inverse selon la nature du sel ajouté (Lafont, Veisler et al. 1997). Enfin, l'apoferritine par exemple (à pH 5.0 et en présence de CdCl_2) (Petsev, Thomas et al. 2001) a une solubilité quasi-indépendante de la température. En utilisant des notions simples de thermodynamique (Vekilov, Feeling-Taylor et al. 2002), il est possible de montrer que si la variation de la solubilité avec la température est directe, la réaction de cristallisation est exothermique ($\Delta H^0 < 0$) et la cristallisation est alors favorisée enthalpiquement. Dans le cas où la variation est nulle ou inverse, $\Delta H^0 = 0$ et $\Delta H^0 > 0$ (cristallisation endothermique) respectivement et la cristallisation est alors favorisée par un gain d'entropie ($\Delta S^0 > 0$), majoritairement dû à la libération des molécules de solvant associées aux protéines avant le processus de cristallisation.

L'influence de la **pression hydrostatique** sur la cristallisation des protéines et plus spécifiquement sur leur solubilité a été étudiée récemment. Selon la protéine et selon même la forme cristalline d'une même protéine, des comportements très différents ont été observés. Ainsi, dans le cas des cristaux orthorhombiques du lysozyme, la solubilité diminue lorsque la pression hydrostatique augmente. Une variation antagoniste est observée dans le cas de la forme tétragonale du lysozyme (Sazaki, Nagatoshi et al. 1999). Par ailleurs, la solubilité de la subtilisine augmente avec la pression imposée (Webb, Waghmare et al. 1999) tandis que la tendance inverse est remarquée avec la glucose isomérase (Suzuki, Sazaki et al. 2002). L'origine de l'effet de la pression sur la solubilité est encore assez floue mais ce paramètre externe joue très certainement sur le cristal et moins sur les interactions en solution entre protéines.

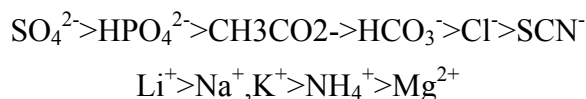
La cristallisation mais pas forcément la solubilité peut aussi être influencée par des champs extérieurs, tels que les champs magnétiques (Astier, Veesler et al. 1998; Wakayama 2003) ou les champs électriques (Taleb, Didierjean et al. 2001).

2. Effet de paramètres « internes »

Les protéines sont des macromolécules chargées dont les charges sont fonction du pH de la solution, via les pKa des divers acides aminés qui les composent. Aussi, le premier paramètre « interne » dont dépend la solubilité des macromolécules biologiques est le **pH** (Riès-Kautt et Ducruix 1999). La solubilité des protéines est habituellement minimale au point isoélectrique (pI) d'une protéine, c'est-à-dire à son point de charge nulle, tandis que de part et d'autre du pI, elle augmente lorsque le pH de la solution s'éloigne du pI. Cet effet peut être expliqué par une diminution de la répulsion coulombienne entre protéines au pI.

La solubilité dépend aussi fortement des agents ajoutés appelés couramment agents cristallisants. La solubilité des protéines est ainsi fonction de l'ajout de **sels** et notamment de la nature des sels ajoutés. Les variations en fonction des sels ajoutés ont été interprétées en terme de salting-in et de salting-out (Ries-Kautt et Ducruix 1989; Riès-Kautt et Ducruix 1999). Ainsi, pour certaines protéines telle que la carboxyhémoglobine, la solubilité dans un premier temps augmente avec la force ionique, on parle de salting-in, puis diminue et on parle de salting-out. Il faut noter que le phénomène de salting-in n'est pas rencontré pour toutes les protéines (Figure I.C.3). Le phénomène de salting-out qui correspond à une diminution de la solubilité de la protéine à haute force ionique n'est pour l'instant pas complètement expliqué : ainsi, même lorsque les charges de la protéine sont écrantées et que la répulsion coulombienne est supprimée, la solubilité continue à diminuer. Cet effet encore inexpliqué s'identifie à

l'effet Hofmeister et est fonction de la charge de la protéine ainsi que de la nature des ions ajoutés. Les anions et les cations sont classés suivant les séries dites de Hofmeister:



Dans le cas d'une protéine portant une charge nette négative, les anions les plus efficaces pour diminuer la solubilité de la protéine sont classés suivant l'ordre de la série de Hofmeister. Pour une protéine portant une charge nette positive, les anions les plus efficaces sont au contraire classés suivant l'ordre inverse de la série de Hofmeister (Figure I.C.3).

Récemment, une étude a montré que la solubilité du lysozyme était aussi fonction de la nature des cations mais celle-ci a porté sur des cations inhabituels pour la plupart : Cs^+ , Rb^+ , Mn^{2+} , Co^{2+} et Yb^{3+} (Benas, Legrand et al. 2002). Il serait intéressant de réaliser des études similaires sur des cations plus communs et sur d'autres protéines.

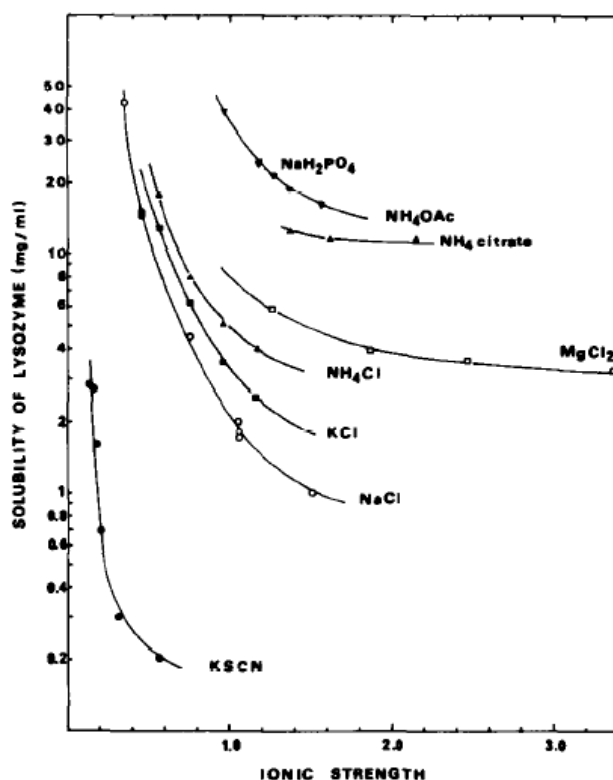


Figure I.C.3 : Effets des anions et des cations sur la solubilité du lysozyme à pH 4.5 et à 18°C (Ries-Kautt et Ducruix 1989). Seul l'effet de salting-out est observé avec le lysozyme.

En dehors des sels, l'un des agents cristallisants les plus efficaces est un polymère neutre non-adsorbant, le **PolyEthylène Glycol** ou **PEG** (McPherson 1976). Même si le PEG est le polymère le plus utilisé aujourd'hui, d'autres polymères ont montré leur capacité à cristalliser les protéines (Patel, Cudney et al. 1995). Les premières études systématiques se sont focalisées sur l'efficacité des PEG de différentes masses à précipiter les protéines (Atha et Ingham 1981) (Figure I.C.4).

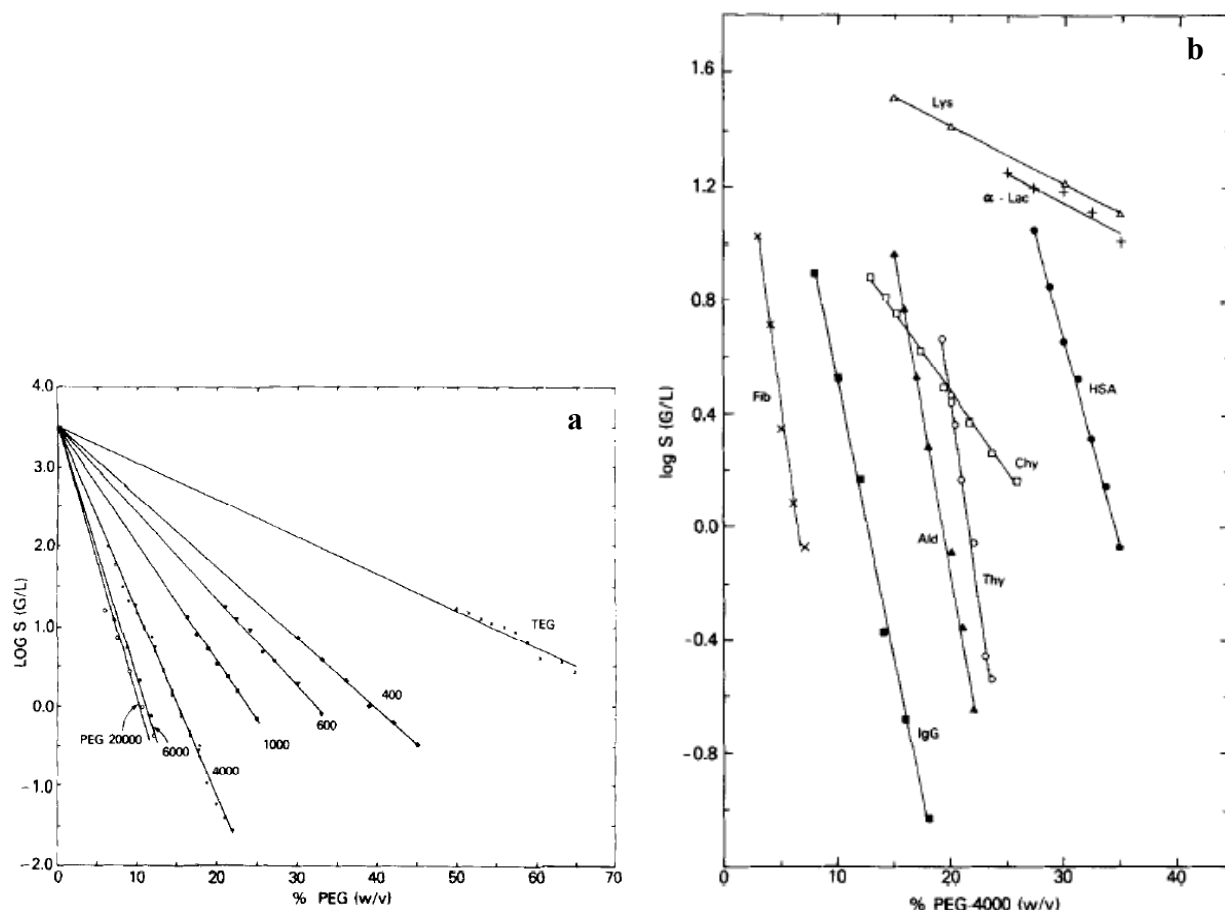


Figure I.C.4 : Travaux d'Atha&Ingham (Atha et Ingham 1981) sur la solubilité des protéines en présence de PEG ; a) solubilité de l'Humaine Serum Albumine en fonction de la taille et de la concentration en PEG ; b) solubilité de diverses protéines en fonction de la concentration en PEG 4kDa.

Il a été ainsi montré que plus la masse et donc la taille du PEG était grande, moins la concentration en PEG nécessaire pour précipiter les protéines était importante. Par ailleurs, les protéines les plus larges ont tendance à précipiter pour des concentrations en PEG plus faibles. Atha et Ingham et d'autres groupes après eux ont expliqué ce phénomène comme le résultat d'interactions répulsives de volumes exclus entre les molécules de protéines et celles de polymères, les molécules de polymères et de protéines ne pouvant s'interpénétrer. Dans le domaine des mélanges de colloïdes et de polymères, les diverses séparations de phase observées sont attribuées aux interactions attractives de déplétion entre molécules de colloïdes (Lekkerkerker, Poon et al. 1992). Ces deux approches ne sont en fait pas contradictoires dans la mesure, où comme nous l'avons vu, l'interaction de déplétion résulte d'interactions répulsives (ou de volumes exclus) entre les molécules de protéines et celles de polymères. En résumé, on peut dire que la précipitation (ou la cristallisation) des protéines induites par l'ajout de PEG peut être vue comme le résultat d'interactions attractives de déplétion entre

protéines ou bien d'interaction répulsives entre protéines et polymères. Par la suite, quelques études de solubilité en présence de PEG ont été entreprises, montrant clairement une diminution de la solubilité en fonction du PEG ajouté (Haire, Tisel et al. 1984; Odahara, Ataka et al. 1994; Gaucher, Riès-Kautt et al. 1997).

Nous avons ici mentionné uniquement les effets des sels et du PEG mais il existe bien d'autres agents cristallisants susceptibles d'influencer la solubilité des protéines: par exemple le MPD (Methyl Pentane Diol) induit une diminution de la solubilité de la malate déshydrogénase (Costenaro, Zaccai et al. 2001) tandis que le glycérol provoque une augmentation de la solubilité du BPTI (Farnum et Zukoski 1999). De la même manière, le choix du solvant est très important : ainsi la solubilité du BPTI est plus faible dans l'eau lourde que dans l'eau (Budayova-Spano, Lafont et al. 2000).

III. Corrélations entre interactions en solution et cristallisation

Les colloïdes sont connus pour cristalliser en régime répulsif, le processus de cristallisation étant favorisé par un gain d'entropie lors de la transition de phase (Frenkel 1999). En effet, paradoxalement les particules dans le cristal ont plus de liberté de mouvements que dans la phase liquide métastable de même densité ; l'entropie est par conséquent plus importante dans le cristal que dans la phase liquide métastable.

Les protéines sont souvent comparées aux colloïdes. La question se posait alors de savoir dans quel régime, attractif ou répulsif, cristallisent les macromolécules biologiques. Dans le cas du lysozyme, Tardieu et coll., par diffusion de rayons X (Figure I.C.5) (Guilloteau 1991; Ducruix, Guilloteau et al. 1996), et Muschol et Rosenberger, par diffusion de lumière (Muschol et Rosenberger 1995), ont montré que les interactions entre protéines en solution passaient d'un régime répulsif à un régime attractif par ajout de sels. Ainsi, en condition de cristallisation, les interactions entre molécules de lysozyme sont attractives. Par ailleurs, ces études expérimentales ont aussi mis en évidence l'effet différentiel des anions et des cations sur les interactions et un premier parallèle entre interaction et cristallisation a pu être établi avec le lysozyme: plus un anion ou un cation induit des interactions attractives entre protéines en solution, plus il est efficace pour diminuer la solubilité de la protéine.

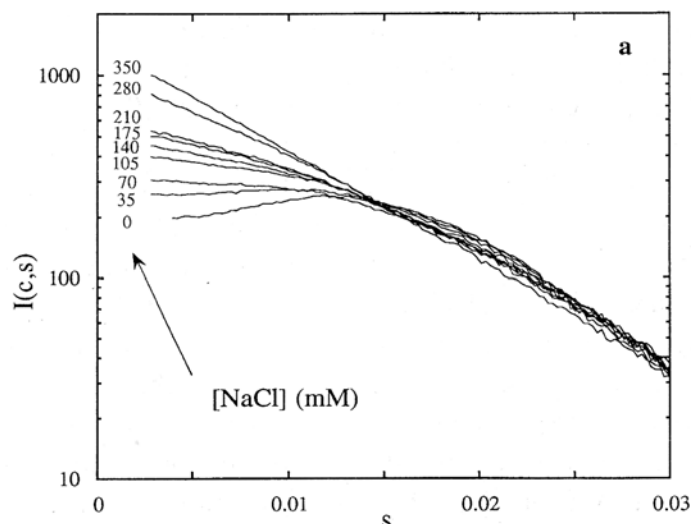


Figure I.C.5 : Intensités de rayons X aux petits angles diffusées par une solution de lysozyme (100mg/ml) à pH 4.5 et à 20°C en fonction de la concentration en NaCl. L'augmentation de l'intensité diffusée à l'origine caractérise le passage d'un régime répulsif à un régime attractif entre les molécules de lysozyme (Ducruix, Guilloteau et al. 1996).

L'un des moyens de quantifier les interactions en solution entre particule est le **second coefficient du viriel**, noté A_2 (mol.ml.g⁻²). Celui-ci correspond à l'écart à l'idéalité (sans interaction) d'une solution. Il est relié au premier ordre à la pression osmotique d'une solution suivant la relation :

$$\frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M} + A_2 c, \quad (\text{I-22})$$

où M et c sont respectivement la masse molaire et la concentration massique de la particule.

Le second coefficient du viriel est par ailleurs directement relié au potentiel de paire total isotrope $U(r)$ existant entre les particules :

$$A_2 = \frac{2\pi N_a}{M^2} \int (1 - \exp(-U(r)/k_B T)) r^2 dr \quad (\text{I-23})$$

Le second coefficient du viriel peut être déterminé par plusieurs méthodes comme la diffusion statique de lumière, la diffusion des rayons X ou des neutrons aux petits angles, les mesures de pression osmotique (Bonneté, Malfois et al. 1997), l'ultracentrifugation analytique (Solovyova, Schuck et al. 2001) ou encore la chromatographie analytique (Tessier, Lenhoff et al. 2002).

En 1994, George et Wilson (George et Wilson 1994) montraient en étudiant plusieurs protéines en condition de cristallisation, que celles-ci cristallisaient dans une zone étroite de second coefficient du viriel correspondant à des interactions faiblement attractives entre protéines : $-8,0 \cdot 10^{-4} < A_2 \text{ (mol.ml.g}^{-2}\text{)} < 0$.

Cette zone de second coefficient du viriel est à présent couramment appelée dans la littérature le « crystallization slot » (Figure I.C.6).

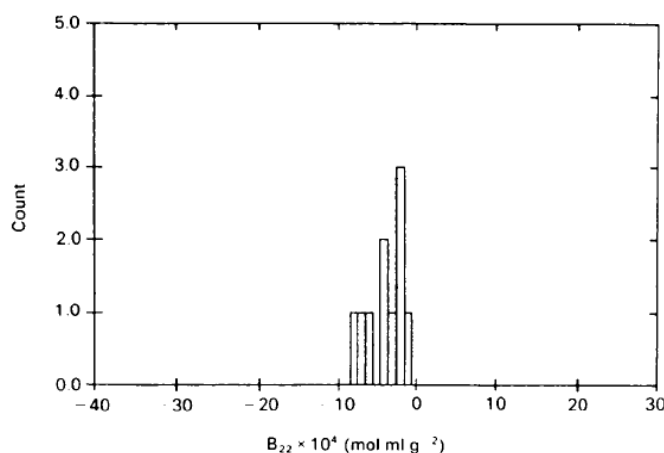


Fig. 2. Histogram representing crystallization slot obtained from second virial coefficient measurements on various proteins in crystallizing solvents.

Figure I.C.6 : Le « crystallization slot » de George&Wilson : les macromolécules cristallisent majoritairement dans une zone restreinte de second coefficient du viriel (George et Wilson 1994).

Depuis d'autres groupes ont renforcé cette corrélation entre second coefficient du viriel et cristallisation par l'étude de divers systèmes tels que le lysozyme en présence de sels (Figure I.C.7) (Bonneté, Finet et al. 1999; Finet 1999) et en présence de PEG (Kulkarni, Chatterjee et al. 2000; Kulkarni et Zukoski 2001), la chymotripsine (Velev, Kaler et al. 1998), l'apoferritine (Petsev, Thomas et al. 2000), l'ATCase (Budayova, Bonneté et al. 1999), la porine (Hitscherich, Kaplan et al. 2000), l'ovalbumine et l'albumine (Demoruelle, Guo et al. 2002), la ribonucléase (Tessier, Johnson et al. 2003) ou encore le BMV (Brome Mosaic Virus) (Casselyn, Perez et al. 2001).

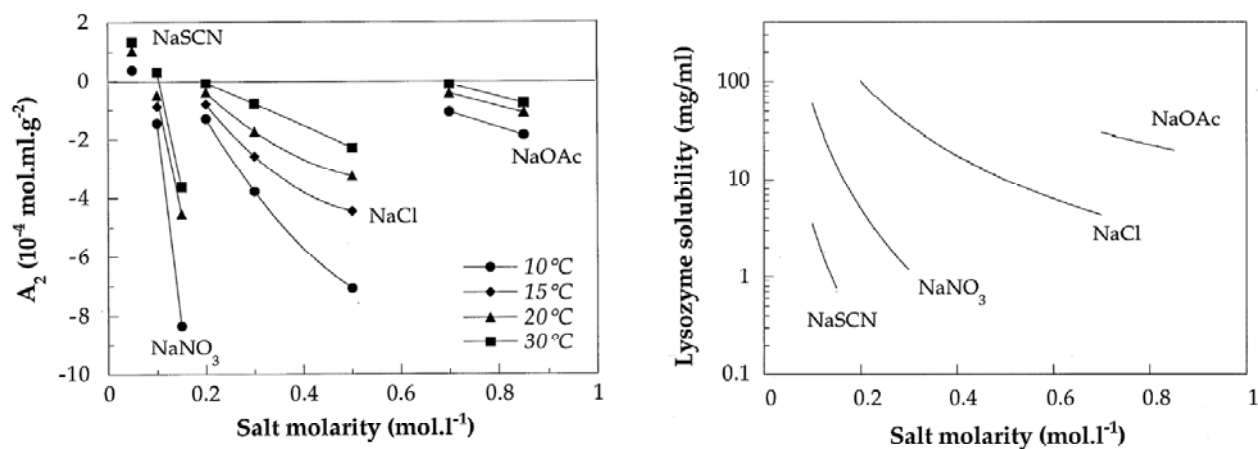


Figure I.C.7 : Corrélation entre les variations du second coefficient du viriel et la solubilité du lysozyme en fonction de l'ajout de plusieurs sels de sodium (Bonneté, Finet et al. 1999).

La détermination du second coefficient du viriel est alors apparue comme un bon moyen de prédire la cristallisation d'une protéine, l'objectif étant de se placer dans des conditions telles que le second coefficient du viriel « tombe » dans le « crystallization slot ». Renforçant cette corrélation, en utilisant un potentiel simple d'interaction entre protéines, une relation analytique entre le second coefficient du viriel et la solubilité a pu être déterminée (Haas, Drenth et al. 1999).

La solubilité et les diagrammes de séparations de phase ne sont pas seulement liés aux variations du second coefficient du viriel qui caractérise les interactions globales en solution. En effet, il a été montré que les diagrammes de phase et notamment la position de la courbe de solubilité vis-à-vis de la séparation de phase liquide-liquide sont directement fonctions du potentiel d'interaction de paire existant entre particules. De plus, la forme de la courbe de séparation de phase est aussi fonction de la nature du potentiel de paire (Malfois, Bonneté et al. 1996). Comme nous l'avons développé dans le paragraphe B.II.2, l'allure générale du diagramme de phases conditionne notamment le processus de nucléation.

Les travaux théoriques concernant cette corrélation ont montré qu'en présence d'un potentiel de paire entre particules (colloïdes ou protéines) de courte portée par rapport au diamètre de la particule, la séparation de phase liquide-liquide est métastable par rapport à la séparation de phase liquide-solide (Hagen et Frenkel 1994; ten Wolde et Frenkel 1997; Anderson et Lekkerkerker 2002). Si au contraire, le potentiel de paire entre particules a une longue portée devant le diamètre de la particule, la séparation de phase liquide-liquide devient stable (Figure I.C.8).

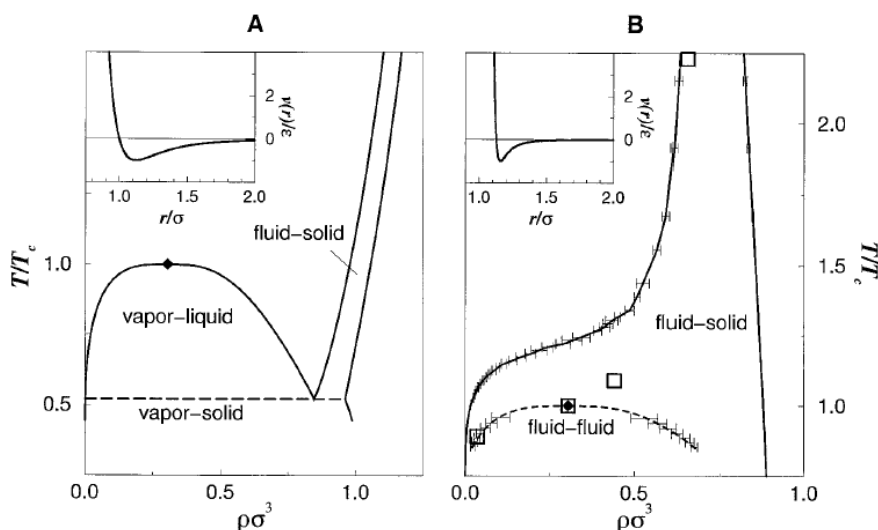


Figure I.C.8 : Diagramme de phase d'une particule dans le cas A) d'une interaction dont la portée est longue devant le diamètre de la particule (insert) ; B) d'une interaction dont la portée est courte devant le diamètre de la particule (insert). La phase fluide représente une solution de colloïdes, la phase vapeur, une solution diluée de colloïdes et la phase liquide une solution concentrée de colloïdes (ten Wolde et Frenkel 1997).

Dans le cas des mélanges colloïdes-polymères, dans le modèle simple d'Asakura-Oosawa, la portée du potentiel est égale à $2R_g$, où R_g est le rayon de gyration du polymère. La séparation de phase liquide-liquide devient métastable pour un rapport $2R_g/\sigma < 0.3$, c'est-à-dire lorsque la portée du potentiel de déplétion est suffisamment faible par rapport au diamètre de la particule σ (Lekkerkerker, Poon et al. 1992; Ilett, Orrock et al. 1995; Anderson et Lekkerkerker 2002).

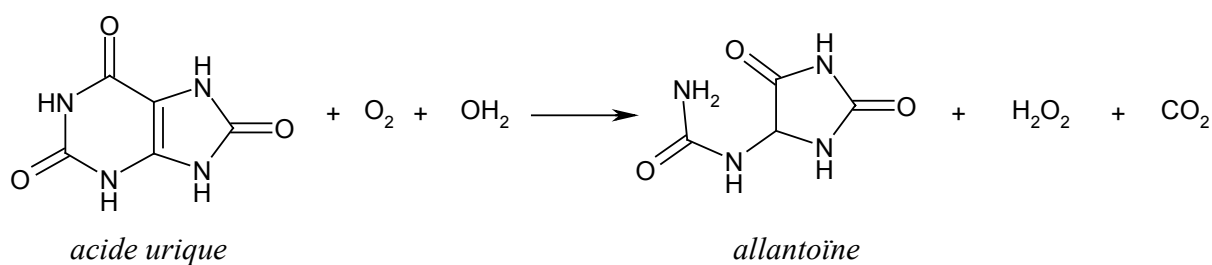
L'ensemble de ces résultats théoriques et expérimentaux obtenus en physique des colloïdes illustre le fait qu'un diagramme de phase en fonction d'un paramètre donné (température, PEG, sel etc...) est directement fonction du potentiel existant entre les particules en solution.

D. OBJET D'ETUDE ET PROBLEMATIQUE

Dans le cadre général décrit ci-dessus, nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions en solution et de la cristallisation de l'urate oxydase en fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques.

I. L'urate oxydase : fonction biologique et structure tridimensionnelle

L'urate oxydase ou uricase est une enzyme que l'on retrouve dans de nombreux organismes allant des bactéries aux mammifères. Cette protéine intervient dans la transformation de l'acide urique en allantoïne :



Son rôle métabolique dépend de l'organisme hôte. Ainsi, dans certaines plantes tropicales légumineuses, la réaction faisant intervenir l'urate oxydase est une étape essentielle du cycle de l'urée qui assure le transport d'azote au sein de la plante. Chez les mammifères, l'urate oxydase participe à l'expulsion d'excès d'azote dans l'organisme en facilitant la dégradation des purines en allantoïne composé plus soluble. Deux mutations dans sa séquence codante empêchent l'expression de l'urate oxydase chez l'Homme et d'autres primates supérieurs. Par conséquent, chez ces animaux supérieurs, l'acide urique est le produit terminal

du métabolisme des purines. L'accumulation d'acide urique au sein de l'organisme a des effets positifs et négatifs sur la santé humaine. L'acide urique a en effet des propriétés antioxydantes, sa présence réduisant celle des radicaux dans notre corps, qui seraient sources de cancers. L'absence d'urate oxydase chez les animaux supérieurs peut donc être considérée comme un avantage dû à l'évolution. Les taux élevés d'acide urique dans le sang, dus à la très faible solubilité de ce produit dans l'eau à pH physiologique, peuvent entraîner l'apparition de calculs rénaux ou encore d'inflammations articulaires telles que la goutte. Aussi, dans le cas d'une concentration anormale d'acide urique dans le sang, observée en particulier en cancérologie, l'urate oxydase est utilisée comme médicament. Sanofi-Synthelabo commercialise l'urate oxydase extraite d'*Aspergillus flavus* sous le nom *Uricozyme*® ainsi qu'à présent sa forme recombinante sous le nom de Rasburicase ou *Fasturtec*®.

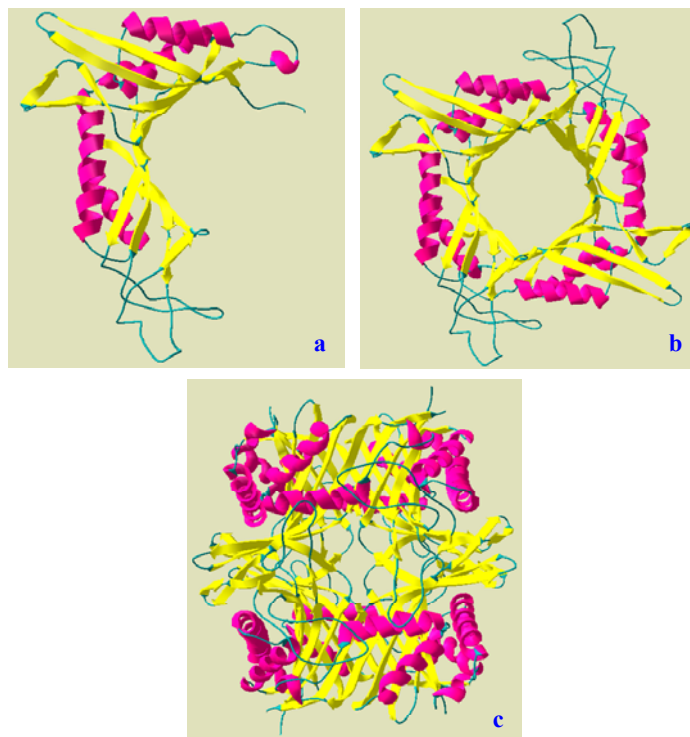


Figure I.D.1 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'urate oxydase. a) monomère ; b) dimère ; c) tétramère.

L'urate oxydase est un tétramère (Figure I.D.1), chacun des monomères ayant une masse d'environ 34kDa et étant constitué de 301 acides aminés. La structure tridimensionnelle de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* a été résolue en présence d'un inhibiteur, la 8-azaxanthine, au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris (LMCP) par Nathalie Colloc'h et coll. en 1997 (Colloc'h, El Hajji et al. 1997). L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* fournie par Sanofi-Synthelabo avait cristallisé au bout de plusieurs mois en chambre froide. Ces cristaux ont diffracté sous une forme orthorhombique I222 jusqu'à

une résolution de 2.05Å. Cette structure a confirmé que l'urate oxydase était un tétramère dont les dimensions externes sont comprises entre 60Å et 85Å.

Chacun des monomères comprend deux domaines équivalents appelés domaines T-fold. Le domaine T-fold est constitué de quatre feuillets β ainsi que d'une paire d'hélices α antiparallèles située du côté concave des feuillets. Les monomères s'assemblent en dimères, liés par un axe cristallographique d'ordre 2, qui forment alors un tonneau $\alpha_8\beta_{16}$, les hélices formant l'extérieur du tonneau. Le tunnel a une longueur d'environ 50Å et un diamètre d'environ 15Å. Le tétramère résulte de la superposition face à face des deux dimères, liés par un axe cristallographique d'ordre 2.

II. L'urate oxydase et sa cristallisation: une protéine modèle ?

Nous avons utilisé l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* en tant que protéine modèle pour étudier la cristallisation et les interactions en solution entre protéines. En effet, fournie par Sanofi-Synthelabo, nous en disposons en quantité suffisante pour étudier les interactions en solution et la cristallisation de cette protéine en fonction de différents paramètres physico-chimiques. Par ailleurs, les premières études de cristallisation entreprises lors de la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine (Colloc'h, El Hajji et al. 1997), avaient montré que cette protéine cristallisait relativement facilement.

L'urate oxydase fait partie des protéines de taille importante et les travaux effectués en vue d'étudier les interactions en solution et la cristallisation se sont jusqu'à présent focalisés sur les petites protéines comme le lysozyme, protéine la plus largement étudiée en cristallogénèse. Quelques travaux sur des systèmes de taille importante tels que l'ATCase (Budayova, Bonneté et al. 1999) ou les alpha-cristallines (Finet 1999) ont été réalisées et ont montré que ces grosses particules présentaient des interactions attractives non pas en présence de sels comme pour les petits systèmes mais en présence de PEG. Malheureusement, les alpha-cristallines ne cristallisent pas à cause de leur forte polydispersité et la cristallisation de l'ATCase n'a pas été étudiée précisément. A notre connaissance, seules quelques études, publiées au cours de cette thèse, ont permis d'élargir les connaissances sur les systèmes PEG-protéines en termes d'interaction et de cristallisation (Hitscherich, Kaplan et al. 2000; Kulkarni et Zukoski 2001; Tanaka et Ataka 2002; Tanaka, Ataka et al. 2003). Aussi, l'urate oxydase paraissait un bon candidat pour poursuivre les études d'interactions en solution et de cristallisation en fonction des différents paramètres physico-chimiques dont le PEG et pour comparer son comportement à celui des protéines de tailles diverses étudiées jusque là. Le

travail sur l'étude des interactions en solution et la corrélation avec les essais de cristallisation est présenté dans le deuxième chapitre.

Comme nous l'avons vu, la connaissance des potentiels d'interaction de paire est déterminante pour mieux comprendre et prédire la cristallisation des protéines. En effet, notamment la portée du potentiel par rapport au diamètre de la protéine conditionne l'allure générale du diagramme de phase et donc les différentes voies possibles de cristallisation (avec ou sans séparation de phase liquide-liquide). Par ailleurs, dans le contexte général des mélanges colloïdes-polymères, peu de données expérimentales ont été exploitées en vue d'obtenir les potentiels d'interaction agissant entre les molécules de colloïdes. C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer les potentiels d'interactions entre protéines en couplant nos travaux expérimentaux à des traitements numériques. De telles études avaient déjà été faites dans l'équipe d'Annette Tardieu au LMCP dans le cas des mélanges lysozyme-sels (Tardieu, Le Verge et al. 1999). Nous avons ici entrepris d'utiliser une démarche similaire mais en utilisant un modèle théorique plus complet afin de déterminer les potentiels d'interaction dans le cas des mélanges protéines-sels mais aussi protéines-PEG. Ce travail sera présenté et discuté dans le troisième chapitre.

Afin de mieux maîtriser la cristallisation et notamment la croissance cristalline de l'urate oxydase, nous avons déterminé expérimentalement son diagramme de phases dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa en caractérisant notamment la séparation de phases liquide-liquide et son influence sur la croissance cristalline. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence et caractérisé la présence d'un deuxième polymorphe. Ces résultats seront exposés dans le quatrième chapitre.

Enfin, jusqu'à présent seule la structure de l'urate oxydase en présence de la 8-azaxanthine était publiée. Nous avons alors entrepris dans le cadre d'une collaboration de cristalliser l'urate oxydase en présence de plusieurs inhibiteurs en s'aidant des études précédentes réalisées sur le complexe urate oxydase – 8-azaxanthine. Les données cristallographiques enregistrées sur les cristaux obtenus des différents complexes et traitées au LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) par Thierry Prangé et Pascal Retailleau, nous ont permis d'avancer vers l'élucidation du mécanisme d'action encore inconnu de l'urate oxydase. Ces résultats seront présentés dans le cinquième et dernier chapitre.

Chapitre 2 : Second coefficient du viriel et cristallisation

Dans cette partie, sont présentées en premier lieu les techniques biochimiques et biophysiques que nous avons utilisées afin de déterminer les interactions globales en solution entre les molécules d'urate oxydase, via le second coefficient du viriel. Les résultats obtenus en fonction des différents paramètres physico-chimiques étudiés (pH, température, sels et PEG) sont ensuite exposés.

A. METHODES EXPERIMENTALES

I. Préparation des solutions d'urate oxydase

L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* nous a été fournie sous sa forme extractive (uricozyme®) en présence d'un excès de 8-azaxanthine par Sanofi-Synthelabo. Tous les lots reçus ont été (re)purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur un système de chromatographie liquide à moyenne pression FPLC (pour Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia) au LMCP et sur un système Aktä (High Performance Liquid Chromatography), capable de fonctionner à basse, moyenne et haute pression au CRMC2. Le principe général de la chromatographie d'exclusion stérique est de séparer les composants suivant leur taille, les plus grosses particules étant éluées les premières. Nous avons utilisé deux colonnes, une colonne préparative (HiLoad 36/60 ; gel : dextran/agarose) d'un volume de 320ml et une colonne analytique (Superdex 200 32/30 ; gel : dextran/agarose) d'un volume de 2.4ml. L'élution d'un lot d'urate oxydase sur la colonne préparative nous a permis non seulement de purifier la solution de protéines mais aussi de la placer dans le tampon de pH désiré et de se débarrasser de l'excès d'inhibiteur.

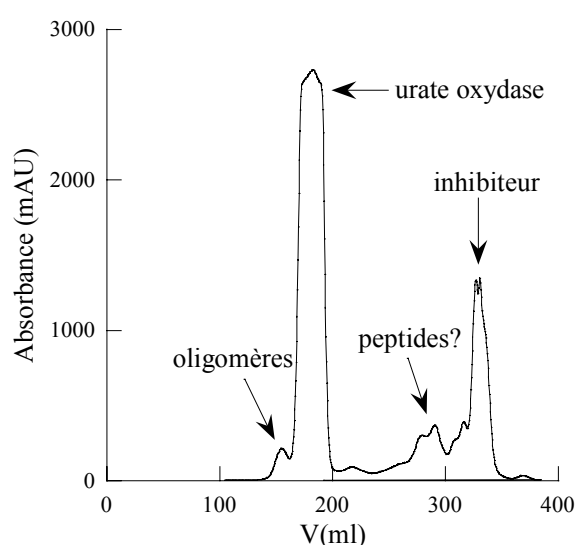


Figure II.A.1 : Profil d'élution d'une solution d'urate oxydase avant purification (la quantité de protéines initialement introduite étant importante, l'absorbance du pic relatif à l'urate oxydase sature).

La protéine en sortie de colonne (Figure II.A.1) s'identifie donc à un complexe protéique urate oxydase – 8-azaxanthine, chacun des monomères contenant une molécule d'inhibiteur. La colonne analytique a essentiellement été utilisée pour contrôler la pureté de certaines de nos préparations au cours du temps par exemple.

La solution de protéines récupérée en sortie de colonne préparative est ensuite concentrée dans des cellules d'ultrafiltration Amicon sous agitation et sous pression d'azote avec des membranes YM10 (ne laissant passer uniquement les particules dont la masse est inférieure à 10kDa).

La concentration finale d'urate oxydase est obtenue en mesurant par spectrophotométrie d'absorption la densité optique à 280nm grâce à la loi de Beer-lambert :

$$DO = \epsilon lc, \quad (II-1)$$

où l représente le trajet optique du faisceau dans la solution (en cm) et ϵ est le coefficient d'extinction massique (en $\text{ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et c la concentration de la protéine (en mg.ml^{-1}).

Le coefficient d'extinction molaire selon Conley et Priest pour l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* sans inhibiteur vaut $\epsilon_{\text{sinh}} = 1.69 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1} \approx 57600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ($M_{\text{monomère}} \approx 34110 \text{ Da}$) (Conley et Priest 1980). Dans notre cas, chaque monomère contient une molécule de 8-azaxanthine dont nous avons mesuré l'absorption à 280nm: $\epsilon_{\text{aza}} \approx 4900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ($M_{\text{inhibiteur}} \approx 153 \text{ Da}$). En supposant que les absorptions du monomère et de l'inhibiteur sont additives, nous obtenons pour le complexe urate oxydase – 8-azaxanthine : $\epsilon_{\text{complexe}} \approx 62500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \approx 1.82 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. En se basant sur des données d'activité de la protéine des différents lots fournis, nous avons dans un premier temps évalué ce coefficient à $\epsilon_{\text{complexe}} \approx 1.0 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (voir discussion en préambule des publications p.177). Vu les différences entre les deux valeurs ci-dessus, nous avons alors préféré déterminer expérimentalement le coefficient d'extinction molaire du complexe. Pour cela, une analyse d'acides aminés a été réalisée par Pascal Mansuelle du laboratoire de Biochimie-Ingénierie des protéines (UMR6560, Faculté de Médecine de Marseille). La démarche expérimentale a été la suivante. Nous avons en premier lieu mesuré une densité optique $DO = 0.900 (+/-0.050)$ pour une solution d'urate oxydase (complexée à la 8-azaxanthine) diluée au 1/5. L'analyse de la quantité nanomolaire en acides aminés a été faite sur un échantillon de volume $V = 10.0 \mu\text{l}$ de la même solution séchée sous faible courant d'azote ayant subi au préalable une hydrolyse acide de 20h. En se basant sur les acides aminés libérés au bout de 20h (Ala, Gly, Lys, Arg, Asp, Pro, His, Glu) et à partir de la composition théorique en acides aminés de l'urate oxydase, une masse moyenne en protéines $m = 20.5 (+/-1.0) \mu\text{g}$ dans notre échantillon a été calculée. Cette valeur a été confirmée par une

même analyse sur un deuxième échantillon. Nous avons ainsi pu remonter au coefficient d’extinction molaire pour le complexe urate oxydase – 8-azaxanthine (1 molécule d’inhibiteur / monomère): $\epsilon_{\text{complexe}} = \frac{5DO}{m/V} \approx (2.2 \pm 0.1) \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Nous avons conservé cette valeur déterminée expérimentalement pour les calculs de concentration en urate oxydase dans la suite. Il est important de préciser que les ordres de grandeur des interactions mesurées (second coefficient du viriel (Chapitre 2) ou paramètres des potentiels d’interaction (Chapitre 3)), les variations observées ainsi que les discussions et conclusions demeurent les mêmes en prenant $\epsilon_{\text{complexe}} \approx 1.0 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ou $\epsilon_{\text{complexe}} \approx 2.2 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

II. Caractérisation des interactions entre protéines en solution

Afin de déterminer les interactions en solution et notamment le second coefficient du viriel, nous avons majoritairement utilisé la diffusion des rayons X aux petits angles et nous avons aussi effectué en parallèle quelques expériences de diffusion de lumière.

1. La diffusion des rayons X aux petits angles

La diffusion des rayons X aux petits angles (ou DXPA) est décrite dans de plusieurs articles ou ouvrages qui en exposent les principales caractéristiques techniques et théoriques (Guinier et Fournet 1955; Lindner et Zemb 1991; Tardieu 1994; Vachette 1996). Cette méthode expérimentale permet d’étudier la structure et l’organisation de particules dispersées dans un milieu homogène, les échelles d’observation allant de quelques dizaines à quelques centaines d’Å.

1.1. Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles

1.1.1. Diffusion par la matière

Seule la diffusion élastique, c’est-à-dire sans changement de longueur d’onde entre le faisceau incident et le faisceau diffusé, est considérée. La diffusion élastique de rayons X s’identifie à la diffusion de Thomson, pour laquelle l’intensité diffusée est inversement proportionnelle à la masse au carré de l’élément diffusant. Par conséquent, au sein d’un échantillon placé sous faisceau X, seuls les électrons, vu leur faible masse, et non les noyaux des atomes, vont diffuser. Tous les électrons (électrons de cœur et électrons périphériques) diffusent de façon équivalente et l’intensité diffusée I_d à une distance r par un électron s’écrit:

$$I_d = \frac{I_0}{r^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c^2} \right)^2 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}, \quad (\text{II-2})$$

où I_0 est l'intensité incidente, m_e la masse de l'électron et 2θ l'angle de diffusion.

L'amplitude $A(\mathbf{s})$ du signal diffusé par un échantillon est la somme des amplitudes diffusées par l'ensemble des électrons qui le compose en tenant compte des déphasages entre les ondes diffusées. Elle s'écrit comme la transformée de Fourier de la densité électronique (ou nombre d'électrons par unité de volume) de la particule en un point $\mathbf{r}$, $\rho(\mathbf{r})$:

$$A(\mathbf{s}) = \int_{V_r} \rho(\mathbf{r}) \cdot \exp(-2i\pi \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}) dV_r, \quad (\text{II-3})$$

où V_r est le volume de l'échantillon et $\mathbf{s} = \mathbf{s}_1 - \mathbf{s}_0$ est le vecteur de diffusion égal à la différence entre le vecteur du faisceau incident, $\mathbf{s}_0$, et celui du faisceau diffusé $\mathbf{s}_1$ (Figure II.A.1). Notons que $s = |\mathbf{s}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \approx \frac{2\theta}{\lambda}$ est le paramètre caractéristique de la diffusion.

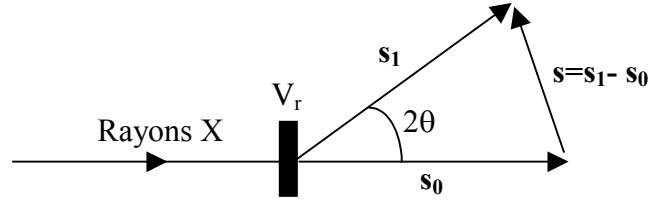


Figure II.A.2 : Diffusion de Rayons X par un échantillon de volume V_r ; $\mathbf{s}_0$ et $\mathbf{s}_1$ sont les vecteurs de diffusion caractéristiques respectivement du faisceau incident et du faisceau diffusé.

L'intensité diffusée par l'échantillon s'écrit comme le carré du module de l'amplitude $A(\mathbf{s})$:

$$I(\mathbf{s}) = |A(\mathbf{s})|^2 = \int_{V_r} p(\mathbf{R}) \cdot \exp(-2i\pi \mathbf{R} \cdot \mathbf{s}) dV_r, \quad (\text{II-4})$$

où $p(\mathbf{R}) = \int_{V_r} \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{R}) dV_r$ est la fonction d'autocorrélation de la densité électronique de la particule et $\mathbf{R}$ est la distance entre deux points quelconques de l'échantillon.

Dans le cas de particules en suspension dans un solvant (comme les colloïdes ou les macromolécules biologiques), la diffusion a pour origine le contraste électronique $\Delta\rho(\mathbf{r})$ entre la particule de densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ et le solvant homogène de densité électronique constante ρ_0 . En supposant de plus l'échantillon isotrope, on accède alors à la moyenne sphérique de l'intensité :

$$I(s) = \langle I(\mathbf{s}) \rangle = 4\pi \int_0^\infty p(R) \frac{\sin 2\pi R s}{2\pi R s} dR, \quad (\text{II-5})$$

$$\text{où } p(R) = \int_{V_r} \Delta\rho(\mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r} + \mathbf{R}) dV_r$$

1.1.2. Diffusion par une solution monodisperse idéale

Dans le cas d'une solution monodisperse idéale, c'est-à-dire sans interaction entre particules, toutes les particules diffusent indépendamment les unes des autres et l'intensité résultante notée $I(0,s)$ est simplement la somme des contributions de chacune des molécules $i_1(s)$:

$$I(0,s) = \sum_i i_1(s) \quad (\text{II-6})$$

$i_1(s)$ correspond aussi à l'intensité diffusée par la solution infiniment diluée, qu'on appelle le facteur de forme de la particule.

De plus, dans l'approximation de Guinier (Guinier et Fournet 1955), l'intensité peut être écrite aux tous petits angles:

$$I(0,s) = I(0,0) \cdot \exp\left(-\frac{4}{3}\pi^2 R_g^2 s^2\right) \text{ pour } 2\pi R_g s < 1, \quad (\text{II-7})$$

où R_g est le rayon de giration de la particule.

1.1.3. Diffusion par une solution monodisperse de particules en interactions

Dans le cas d'une solution monodisperse de particules de concentration c en interactions, l'intensité diffusée doit tenir compte non seulement des corrélations intraparticulaires mais aussi des corrélations interparticulaires. L'écart à l'idéalité peut simplement être considéré dans l'expression de l'intensité diffusée totale $I(c,s)$ par l'intermédiaire d'un facteur correctif $S(c,s)$, appelé facteur de structure:

$$I(c,s) = \sum_i i_1(s) \cdot S(c,s) = I(0,s) \cdot S(c,s) \quad (\text{II-8})$$

Le facteur de forme est expérimentalement enregistré pour des concentrations faibles en protéines. Nous avons tracé le facteur de forme expérimental de l'urate oxydase sur la Figure II.A.3. Celui-ci peut être ajusté avec l'intensité diffusée par une sphère pleine de diamètre

$$\sigma = 80 \text{ \AA} : I_{\text{théorique}}(s) = I(0) \left(3 \left(\frac{\sin(\pi s \sigma) - (\pi s \sigma) \cos(\pi s \sigma)}{(\pi s \sigma)^3} \right) \right)^2 \quad (\text{Guinier et Fournet 1955}).$$

L'urate oxydase peut donc être assimilée à une sphère dure de diamètre 80 Å ; cependant, cette comparaison n'est qu'approximative dans la mesure où la structure cristallographique de la protéine nous révèle qu'elle possède un « tunnel vide » en son centre. Nous avons de plus ajuster notre facteur de forme expérimental avec l'intensité diffusée calculée à l'aide du programme CRY SOL ((Svergun, Barberato et al. 1995) ; <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/crysol.html>). Ce programme calcule le spectre de diffusion d'une protéine en solution à partir de ses coordonnées cristallographiques

disponibles dans la PDB (Protein Data Bank). Deux paramètres sont ajustables dans le programme : r_a , le rayon atomique effectif moyen et $\Delta\rho$, qui représente le contraste de densité électronique de la couche d'eau d'hydratation de la protéine (supposée d'épaisseur 3Å) par rapport au solvant. Nous constatons que notre facteur de forme expérimental est correctement ajusté à l'aide du programme CRY SOL sur quasiment toute la gamme angulaire, contrairement au cas de la modélisation par une sphère pleine. Par ailleurs, les intensités diffusées calculées par CRY SOL pour le dimère et le monomère sont très différentes de celle calculée pour le tétramère. Au cours de nos expériences, nous avons donc pu contrôler par DXPA que nous étions bien en présence de l'urate oxydase sous sa forme tétramérique.

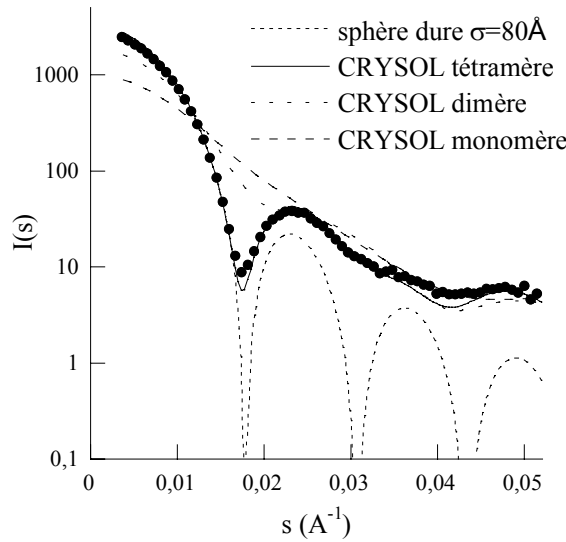


Figure II.A.3 : Ajustement du facteur de forme expérimental (points) de l'urate oxydase tétramérique avec l'intensité diffusée par une sphère dure de diamètre $\sigma=80\text{\AA}$ ainsi qu'avec l'intensité calculée par le programme CRY SOL (paramètres d'ajustement : $\Delta\rho=0.013 \text{ e.\AA}^{-3}$ et $r_a=1.8 \text{ \AA}$). Les intensités calculées avec CRY SOL pour le monomère et le dimère sont aussi tracées.

Le facteur de structure, obtenu expérimentalement en divisant l'intensité diffusée par le facteur de forme (Figure II.A.4), est relié à la transformée de Fourier de la fonction de distribution de paire $g(r)$, qui représente la probabilité de trouver deux particules à une distance r :

$$S(c,s)=1+\frac{N}{V}\int 4\pi r^2(g(r)-1)\frac{\sin 2\pi rs}{2\pi rs}dr \quad (\text{II-9})$$

Le facteur de structure est donc fonction des interactions existant entre particules en solution. Aux grands angles, le facteur de structure tend vers 1 et l'intensité diffusée s'identifie au facteur de forme. Le facteur de structure à l'origine $S(c,0)$ est supérieur (inférieur) à 1 en présence d'interactions attractives (répulsives) entre particules. Ainsi, la

variation de l'intensité diffusée avec la concentration en particules, dans une condition expérimentale donnée, nous informe sur les interactions existant en solution entre particules : en présence d'interactions attractives (répulsives), l'intensité diffusée à l'origine augmente (diminue) avec la concentration en particules.

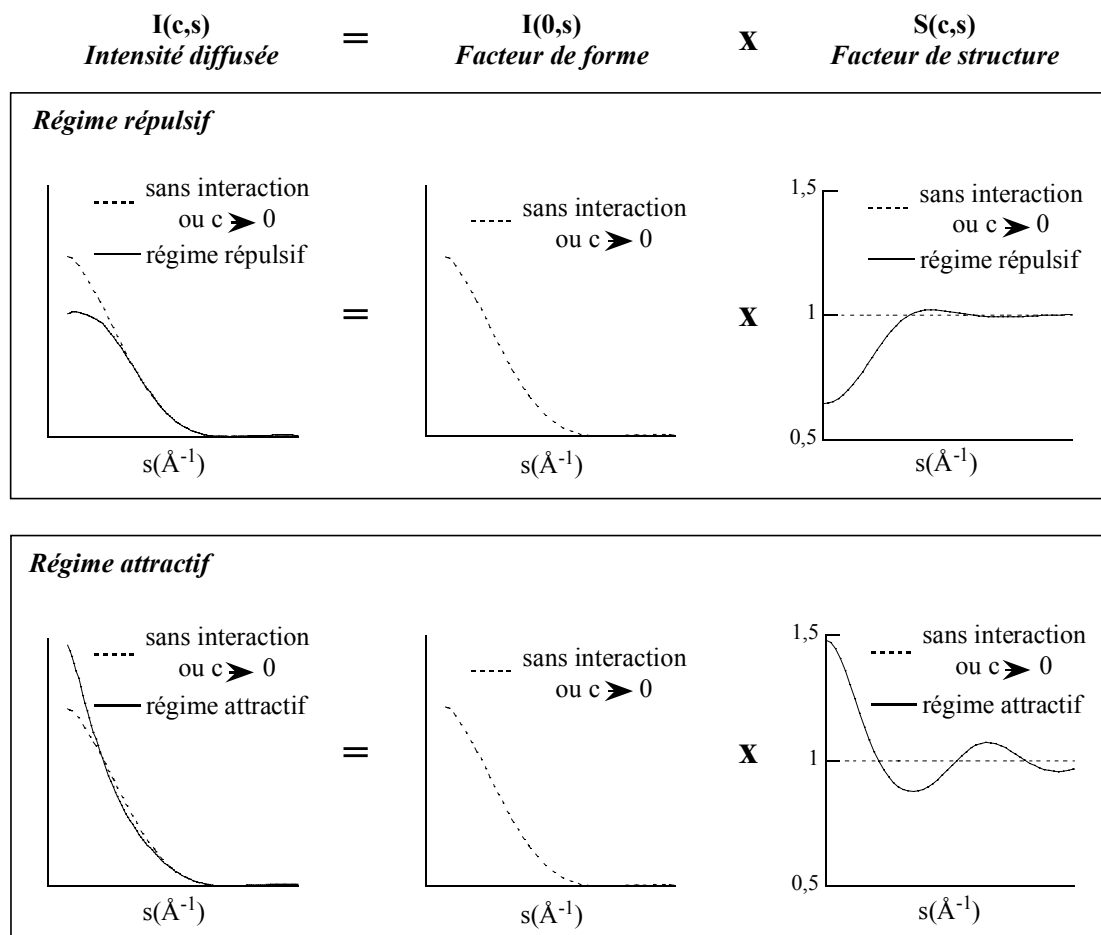


Figure II.A.4 : Intensité diffusée par une solution de particules : elle s'écrit comme le produit du facteur de forme $I(0,s)$ et du facteur de structure $S(c,s)$.

1.2. Montage expérimental

Toute les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles ont été réalisées sur le banc de diffusion D24 au LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique). Cette expérience est décrite de façon détaillée dans deux publications (Depautex, Desvignes et al. 1987; Dubuisson, Decamps et al. 1997) ainsi que sur le site internet du LURE <http://www.lure.u-psud.fr>. Le faisceau de rayons X, obtenu par rayonnement synchrotron, est rendu monochromatique (longueur d'onde : 1.488Å) par réflexion sur un cristal de germanium. Un ensemble de fentes permet de le focaliser et d'éliminer les diffusions parasites. Par ailleurs, l'ensemble du dispositif expérimental est placé sous vide pour s'affranchir de la diffusion due à l'air. L'intensité diffusée est enregistrée

à l'aide d'un détecteur linéaire à gaz. L'échantillon est placé dans une cellule en quartz thermostatée, le volume minimal d'injection étant environ de 50 μ l. La distance cellule-détecteur est modulable ainsi que le temps d'exposition aux rayons X.

Afin de traiter les données, l'intensité diffusée est normalisée au faisceau transmis grâce au signal du noir de carbone qui sert de référence. Le signal total est aussi normalisé par rapport au temps d'exposition. La diffusion due au solvant est ensuite soustraite de manière à ce que l'intensité diffusée mesurée corresponde à celle de l'objet biologique étudié.

1.3. Détermination expérimentale du second coefficient du viriel

Nous avons vu dans la premier chapitre que le second coefficient du viriel, qui caractérise l'écart à l'idéalité d'une solution, est relié au premier ordre à la pression osmotique de la solution via la relation :

$$\frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M} + A_2 c \quad (\text{II-10})$$

Par ailleurs le facteur de structure à l'origine $S(c,0)$ est aussi fonction de la pression osmotique:

$$S(c,0) = \frac{RT}{M} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)^{-1} \quad (\text{II-11})$$

Le second coefficient du viriel est alors obtenu à partir du facteur de structure à l'origine :

$$\frac{1}{S(c,0)} = \frac{I(0,0)}{I(c,0)} = 1 + 2MA_2 c \quad (\text{II-13})$$

Expérimentalement, le facteur de structure à l'origine est déterminé par le quotient :

$$S(c,0) = \frac{\lim_{s \rightarrow 0} I(c,s)}{\lim_{c \rightarrow 0} I(c,0)} \quad (\text{II-14})$$

Le second coefficient du viriel est calculé à l'aide des équations (II-13) et (II-14). Afin de tenir compte des éventuelles erreurs expérimentales, les courbes d'intensité diffusée normalisées à la concentration en protéines, obtenues pour plusieurs concentrations en protéines dans un tampon donné, sont ajustées aux grands angles ; en effet, dans ce domaine angulaire, l'intensité diffusée ne dépend plus des interactions et les courbes expérimentales normalisées à la concentration en protéines doivent se superposer.

Si A_2 est positif, les interactions entre protéines sont globalement répulsives ; si A_2 est négatif, les interactions sont globalement attractives.

2. La diffusion statique de la lumière

2.1. Principe de la diffusion statique de la lumière (Lindner et Zemb 1991)

Dans le cas de la diffusion de lumière, contrairement à la diffusion des rayons X, il ne suffit plus de compter les électrons pour connaître le pouvoir diffusant d'une particule. La diffusion dépend en effet des liaisons au sein desquelles les électrons sont engagés. On parle dans ce cas de diffusion de Rayleigh. L'intensité diffusée est exprimée en terme de facteur de Rayleigh R (en cm^{-1}), quotient de l'intensité diffusée I sur l'intensité incidente I_0 dans le vide, et son expression générale est:

$$R = \frac{I}{I_0} = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{N_a \lambda^4} c M \cdot P(s) \cdot S(c,s), \quad (\text{II-15})$$

où n est l'indice de réfraction de la solution, c et M la concentration et la masse molaire moléculaires, λ la longueur d'onde du faisceau incident et diffusé, $P(s)$ est le facteur de forme et $S(c,s)$ le facteur de structure. Ce facteur de structure $S(c,s)$ s'identifie exactement au facteur de structure présenté précédemment dans le cas de la DXPA et s'écrit en fonction du second coefficient du viriel A_2 :

$$\frac{1}{S(c,0)} = 1 + 2MA_2c \quad (\text{II-16})$$

Dans le cas où la taille des objets est petite devant la longueur d'onde (taille inférieure à $\lambda/20$), l'intensité diffusée est indépendante de l'angle de diffusion et le facteur de forme $P(s)$ est égal à 1. L'équation ci-dessus devient alors :

$$R = \frac{4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{N_a \lambda^4} c M \cdot \frac{1}{1 + 2MA_2c} \quad (\text{II-17})$$

Cette équation est souvent présentée dans la littérature sous la forme :

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} (1 + 2A_2Mc), \quad (\text{II-18})$$

où $K = \frac{4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{N_a \lambda^4}$ est souvent considérée comme une constante optique.

Pour des raisons pratiques, le facteur de Rayleigh est exprimé en comparant l'intensité diffusée I par l'échantillon étudiée à celle diffusée par un liquide de référence I_r (le toluène est souvent utilisé), de facteur de Rayleigh connu :

$$R = \frac{I - I_{\text{solvant}}}{I_{\text{ref}}} \left(\frac{n_{\text{solvant}}}{n_{\text{ref}}} \right)^2 R_{\text{ref}} \quad (\text{II-19})$$

2.2. Montage expérimental

Les expériences ont été réalisées au CRMC2 sur un appareil de diffusion de lumière SEM 633 (Sematech) avec un laser à argon ionisé produisant un faisceau de longueur d'onde 514.5nm. La puissance du laser peut varier entre 0 et 2 watts. La taille de l'urate oxydase ($R \sim 70 \text{ \AA}$) étant très inférieure à $\lambda/20$, l'intensité diffusée ne dépend pas de l'angle de diffusion ; les expériences ont été effectuées à un angle égal à 90° . L'échantillon est placé dans une cellule en verre à fond plat de contenance minimale 250 μl , elle-même placée dans une solution de cyclohexane thermostatée, qui sert non seulement de liquide de thermalisation mais qui permet aussi de corriger les éventuelles réflexions parasites sur les parois de la cellule. Le cyclohexane possède en effet le même indice de réfraction que le verre. L'intensité diffusée est détectée par l'intermédiaire d'un photomultiplicateur. Par ailleurs, afin de s'affranchir du phénomène de diffusion multiple, des échantillons suffisamment dilués ont été étudiés. Enfin, avant d'être déposé dans la cellule, chaque échantillon est filtré pour éviter toute poussière parasite qui pourrait perturber le signal de diffusion.

B. INTERACTIONS EN SOLUTION ENTRE LES MOLECULES D'URATE OXYDASE

Nous avons choisi d'étudier l'influence sur les interactions entre protéines en solution de différents paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, l'ajout de sel, l'ajout de polymère (PEG) ainsi que l'effet couplé d'ajout de polymère et de sels. Notre but était d'obtenir des interactions attractives favorables à la cristallisation des protéines. En parallèle des essais de cristallisation ont été réalisés afin de déterminer précisément dans quel domaine d'interactions, caractérisé par une gamme de valeur de second coefficient du viriel, l'urate oxydase cristallisait. Notre choix d'étude d'agents cristallisants s'est porté exclusivement sur les sels et le PEG, agents les plus utilisés en cristallographie. Les valeurs maximales des concentrations en protéines utilisées pour l'étude des interactions en solution ont souvent été limitées par l'apparition de séparation de phase solide-liquide ou liquide-liquide ainsi que par la stabilité de la protéine.

I. Effet du pH

Plusieurs valeurs de pH ont été étudiées entre 7.5 et 10.5. Les mesures se sont limitées à cette gamme de pH dans la mesure où la protéine est stable et active entre 7.0 et 10.5, son

maximum d'activité se situant autour d'un pH de 9.0 (Bayol, Dupin et al. 1995). Nous avons utilisé le tampon Tris pour les pH 7.5, 8.0 et 8.5, le tampon borate pour le pH 9.1 et le tampon carbonate pour le pH 10.5. Les variations d'intensités diffusées sont présentées sur la Figure II.B.1. L'intensité diffusée augmente lorsque le pH diminue indiquant une diminution des interactions répulsives globales. De plus, quel que soit le pH, les interactions restent répulsives, comme nous le montre la position de l'ensemble des courbes par rapport au facteur de forme, enregistré à faible concentration en protéines (invariant en fonction du pH).

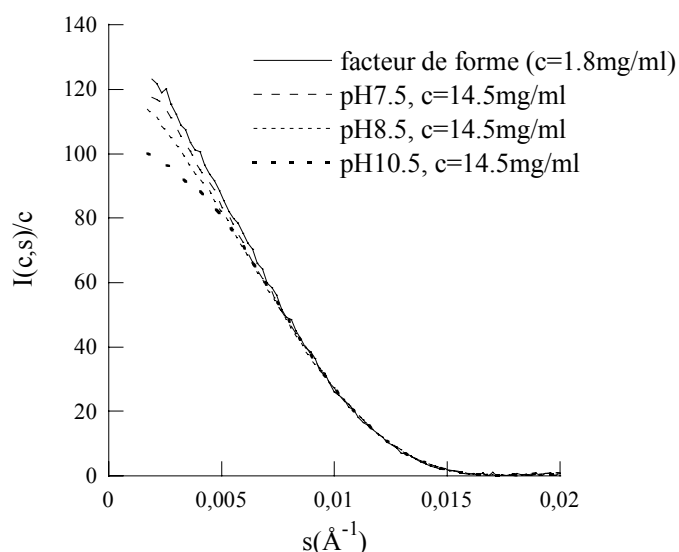


Figure II.B.1 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction du pH à T=20°C.

Ces variations peuvent aussi être caractérisées en traçant l'évolution du second coefficient du viriel en fonction du pH (Figure II.B.2).

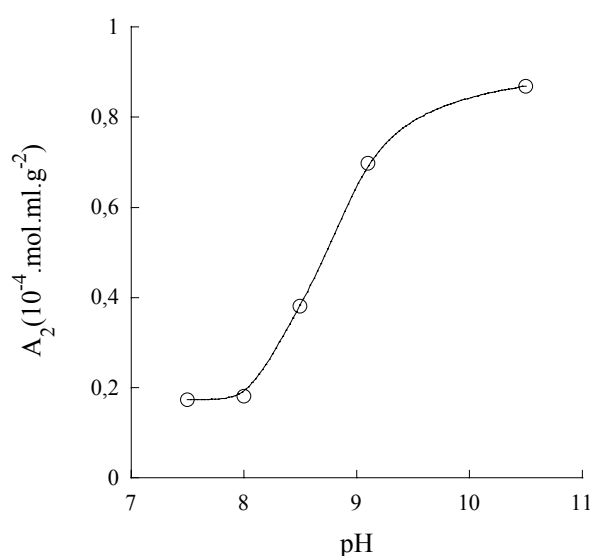


Figure II.B.2 : Variation du second coefficient du viriel en fonction du pH à 20°C. Les valeurs sont données à $\pm 0.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.ml.g}^{-2}$; la courbe liant les points ne sert que de guide pour les yeux.

Le second coefficient du viriel présente un minimum autour de pH 7.5 et ensuite augmente fortement avec le pH, les interactions étant de plus en plus répulsives.

Ces résultats sont attendus dans la mesure où le point isoélectrique est autour de 7.5 : le calcul théorique via les outils du serveur expasy (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) donne 6.6 pour le monomère tandis que celui via le serveur Infobiogen (http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/mwcalc_in.pl) donne 7.4. De très récentes expériences d'isoélectrofocalisation ont montré que le pI de l'urate oxydase recombinante sans inhibiteur était autour de 7.6, confirmant ainsi les valeurs théoriques (Bayol, Capdevielle et al. 2002).

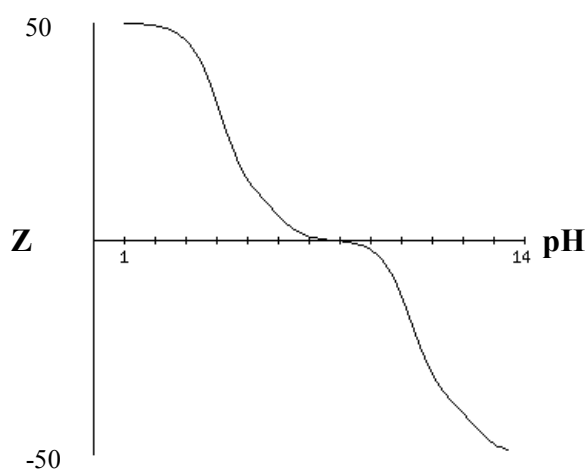


Figure II.B.3 : Courbe de titration théorique obtenue à partir du serveur aBi (http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html) pour le monomère de l'urate oxydase. La charge nette théorique du monomère est calculée en fonction du pH en prenant en compte les valeurs des pKa des résidus ionisables dont les fonctions acido-basiques sont considérées indépendamment les unes des autres.

Aussi, lorsque le pH s'éloigne du point isoélectrique, la charge de la protéine augmente comme nous le montre la courbe de titration théorique du monomère (Figure II.B.3), ce qui implique des interactions coulombiennes répulsives plus importantes, d'où une augmentation du second coefficient du viriel.

Le second coefficient du viriel uniquement dû aux interactions de sphères dures entre particules ($U(r)=+\infty$, pour $r < \sigma$ et $U(r)=0$, pour $r > \sigma$) s'écrit:

$$A_2^{SD} = \frac{2\pi N_a}{M^2} \int_0^\sigma r^2 dr = \frac{2\pi N_a}{M^2} \frac{1}{3} \sigma^3 \quad (\text{II-20})$$

En prenant, en accord avec la structure cristallographique ainsi qu'avec les traitements numériques présentés dans le chapitre suivant, $\sigma=76\text{\AA}$ et $M=137\text{kDa}$, le second coefficient du viriel correspondant uniquement à l'interaction de sphères dures vaut

$A_2^{SD}(10^{-4}\text{mol.ml.g}^{-2}) \approx +0.30$. Nous observons que la valeur du second coefficient du viriel à pH 7.5 ($A_2(10^{-4}\text{mol.ml.g}^{-2}) \approx +0.17$) est inférieure à cette valeur de +0.30. Or à ce pH voisin du point isoélectrique, les interactions coulombiennes sont négligeables et donc seules les interactions de sphères dures et de Van der Waals sont susceptibles d'agir entre les particules dans le cadre du modèle DLVO. La comparaison des seconds coefficients du viriel ci-dessus nous indique ainsi qu'en plus des interactions de sphères dures, il existe des interactions attractives que l'on peut attribuer aux interactions de Van der Waals. Ce résultat contraste avec ceux obtenus sur des protéines moins compactes et de taille plus importante pour lesquelles il a été montré que ces interactions sont négligeables (Vérétout, Delaye et al. 1989; Budayova, Bonneté et al. 1999; Finet et Tardieu 2001).

II. Effet de la température

Les expériences en fonction de la température sur l'urate oxydase ont été réalisées à pH 8.7 ainsi qu'à pH 10.5 où d'après le paragraphe précédent les interactions sont à 20°C plus répulsives. La gamme de température étudiée est comprise entre 5°C et 30°C, la protéine n'étant plus stable ni active au-delà de 50°C (Bayol, Dupin et al. 1995). Les tampons choisis ont été le tampon borate à pH 8.7 et le tampon carbonate à pH 10.5, deux tampons dont le pK_a ne varie quasiment pas avec la température ($dpK_a/dT = -0.008$ pour le borate et $dpK_a/dT = -0.009$ pour la troisième acidité de l'acide carbonique (Beynon et Easterby 1996)).

A pH 10.5, pH où les interactions sont répulsives à 20°C, l'intensité à l'origine augmente très légèrement lorsque la température diminue, ce qui indique que les interactions sont globalement moins répulsives lorsqu'on abaisse la température (Figure II.B.4).

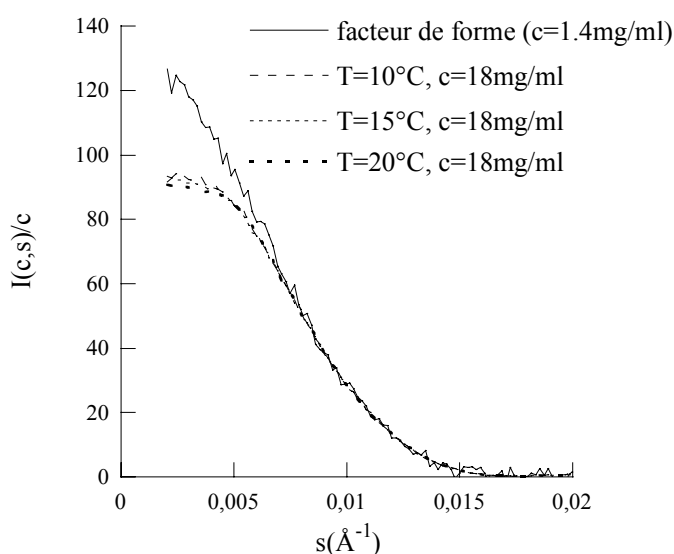


Figure II.B.4 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la température à pH10.5 (tampon carbonate).

Le même effet de température mais plus marqué qu'à pH 10.5 est observé dans le tampon borate à pH 8.7 (Figure II.B.5) : les interactions sont globalement moins répulsives lorsqu'on diminue la température.

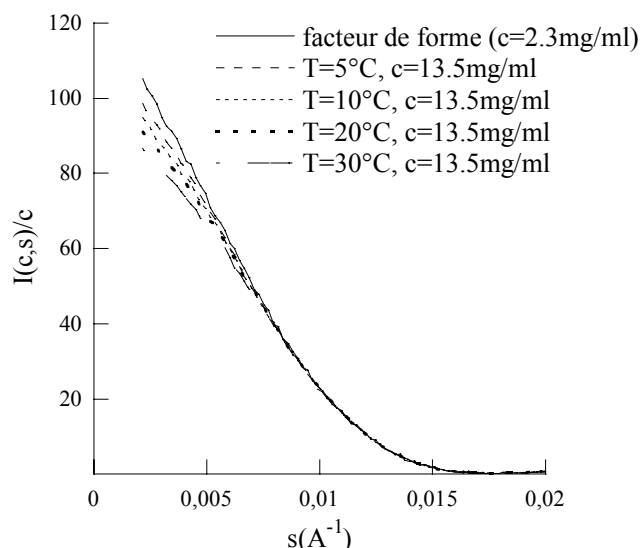


Figure II.B.5 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la température à pH 8.7 (tampon borate).

Cet effet de température est aussi visible si on trace l'évolution du second coefficient du viriel en fonction de la température à pH 8.7 (Figure II.B.6). Le second coefficient du viriel diminue en effet lorsque la température est abaissée, ce qui traduit une diminution des interactions répulsives globales. Par ailleurs, sa valeur reste positive (ou proche de zéro) quelle que soit la température, ce qui signifie que les interactions restent globalement répulsives à toute température.

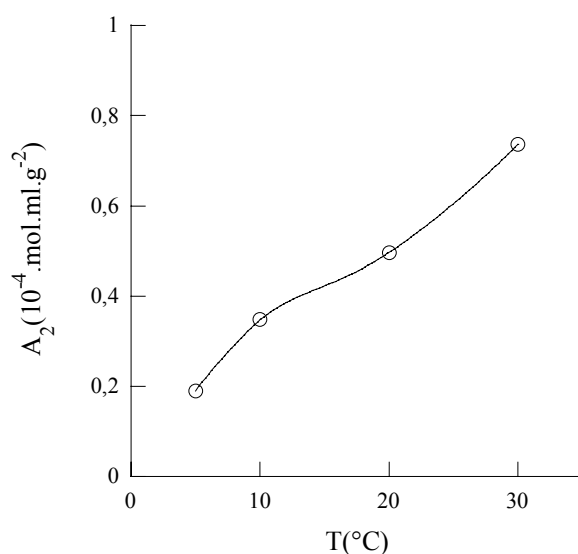


Figure II.B.6 : Variation du second coefficient du viriel en fonction de la température à pH 8.7 (tampon borate). Les valeurs sont données à $\pm 0.5 \cdot 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}^{-2}$ près ; la courbe liant les points ne sert que de guide pour les yeux.

Afin d'observer au mieux l'effet de température, il est important de travailler avec un tampon dont le pH varie peu avec la température. Ainsi, si au lieu de prendre le tampon borate, nous avons pris le tampon Tris pH 8.5 ($dpK_a/dT = -0.028$), aucun effet de température n'aurait été observé (Figure II.B.7). En effet, deux effets antagonistes se superposent : la diminution de la température entraîne celle des interactions répulsives globales comme précédemment, mais entraîne aussi une augmentation du pH du tampon Tris ce qui, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, conduit à une augmentation des interactions répulsives : par conséquent, l'effet résultant est quasi-nul.

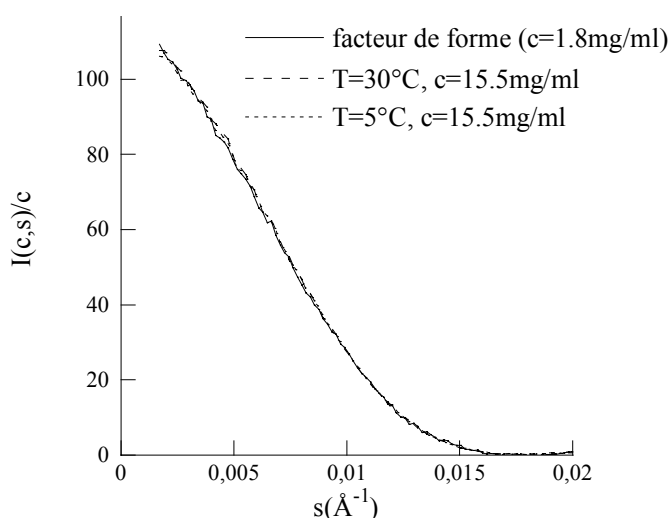


Figure II.B.7 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la température à pH 8.5.

En résumé dans le cas de l'urate oxydase, quel que soit le pH, une diminution de la température entraîne une diminution des interactions globalement répulsives. Cet effet est plus visible lorsque les interactions répulsives sont initialement moins importantes. Une modification des interactions dans ce sens en fonction de la température a déjà été mise en évidence avec le lysozyme (Bonneté, Finet et al. 1999) ou les γ -cristallines (Malfois, Bonneté et al. 1996; Finet 1999). Par contre, aucun effet de température n'a été mis en évidence avec l'ATCase (Budayova, Bonneté et al. 1999) ou les α -cristallines (Finet et Tardieu 2001). L'effet de température a été attribué à la présence ou l'absence d'interaction attractives de Van der Waals, interactions, dans un modèle simple de type DLVO, qui sont le plus sensibles à la température. Ainsi en présence d'interactions attractives de Van der Waals, comme c'est le cas pour le lysozyme, les γ -cristallines ou l'urate oxydase, une diminution de la température induit des interactions attractives. Les interactions déterminées dans le cas de l'urate oxydase sont ainsi globalement moins répulsives lorsque la température diminue. Au contraire, en absence d'interactions de Van der Waals comme c'est le cas pour l'ATCase ou les α -cristallines, aucune variation des interactions n'est observée lorsque la température varie.

III. Effet de l'ajout de sel

Ne pouvant induire des interactions globalement attractives par variations de température et/ou de pH, nous avons étudié l'influence de l'ajout de sel monovalents et divalents à 20°C à un pH proche (50mM Tris pH=8.5) et loin (10mM carbonate de sodium pH=10.5) du point isoélectrique. Des travaux sur d'autres systèmes tels que le lysozyme (Ducruix, Guilloteau et al. 1996) et les γ D-cristallines (Finet 1999) ont montré que la nature des anions jouait sur les interactions en solution entre protéines, les cations ayant moins d'influence à force ionique égale. Nous avons donc choisi d'utiliser des sels de sodium et, les pHs de travail étant supérieurs au pI, l'anion et le dianion, susceptibles d'être les plus efficaces pour induire une interaction attractive entre les molécules d'urate oxydase, sont les anions acétates et sulfates (Carbonnaux, Ries-Kautt et al. 1995). Nous avons reporté les résultats obtenus avec ces anions sous forme de second coefficient du viriel dans le Tableau II.B.1. Par ailleurs, l'effet des ions acétates sur l'intensité diffusée à pH 10.5 est illustré sur la Figure II.B.8. Nous observons que les sels monovalents ou divalents, jusqu'à des concentrations de 500mM, ne suffisent pas à induire des interactions attractives entre les molécules d'urate oxydase. En effet, les valeurs de A_2 diminuent avec l'ajout de sels quel que soit le pH mais restent positives et atteignent à haute concentration en sels, les valeurs déterminées proche du point isoélectrique (pH 7.5 et pH 8.0). Cela signifie que l'ajout de sels dans le cas de l'urate oxydase ne fait qu'écranter les interactions répulsives coulombiennes mais n'induit pas d'interaction supplémentaire attractive de type « Hofmeister ».

pH	Sans sel	+100mM NaAc	+500mM NaAc	+400mM Na ₂ SO ₄
8.5	+0.39	+0.19	+0.23	+0.29
10.5	+0.87	+0.49	+0.29	

Tableau II.B.1 : Valeurs (à $\pm 0.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.ml.g}^{-2}$ près) du second coefficient du viriel en fonction du sel ajouté à deux pH différents à 20°C.

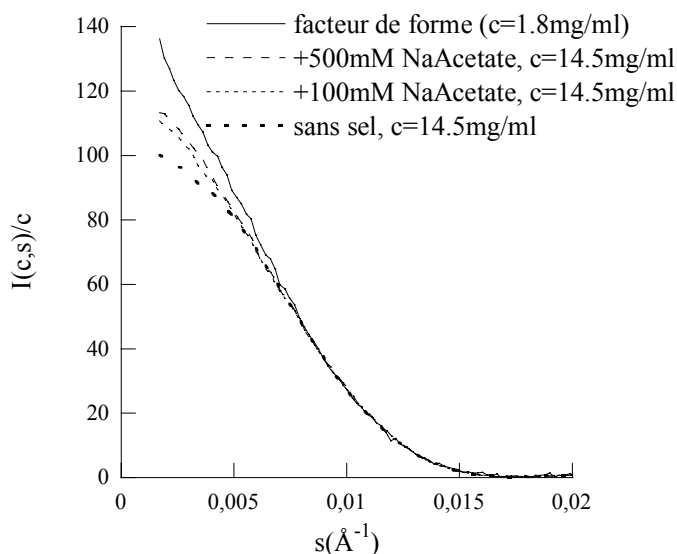


Figure II.B.8 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de l'ajout de NaAcétate à pH 10.5

L'incapacité à obtenir des interactions attractives en présence de sels a déjà été rencontrée avec d'autres systèmes tels que les α -cristallines ($M \approx 800 \text{ kDa}$; $R \sim 85 \text{ \AA}$) (Finet et Tardieu 2001), l'ATCase ($M = 306 \text{ kDa}$; $R \sim 60 \text{ \AA}$) (Budayova, Bonneté et al. 1999), l'apoferritine (en présence de NaCl) (Tanaka et Ataka 2002), et le BMV ($M \approx 4600 \text{ kDa}$; $R \sim 135 \text{ \AA}$) (Brome Mosaic Virus) (Casselyn, Perez et al. 2001), qui sont toutes trois des macromolécules de taille importante. Par contre, les sels sont connus pour être très efficaces pour les systèmes de taille plus petite comme le lysozyme (Ducruix, Guilloteau et al. 1996), le BPTI (Lafont, Veesler et al. 1997), les γ -cristallines (Finet 1999) ou encore la chymotrypsine (Velev, Kaler et al. 1998). Les sels semblent donc inefficaces pour induire des interactions attractives entre les macromolécules de taille importante (Tardieu, Finet et al. 2001; Tardieu, Bonneté et al. 2002). Il est important de préciser que cette affirmation semble vérifier pour les sels monovalents. En effet, certains systèmes de taille importante, comme l'apoferritine (Petsev, Thomas et al. 2000), présentent des interactions attractives en présence de sels multivalents, souvent à cause d'interactions plus spécifiques (pont ionique entre molécules, interactions hydrophobes, etc...).

IV. Effet de l'ajout de PEG

Face à l'inefficacité des sels à induire des interactions attractives nécessaires à la cristallisation des protéines, nous avons étudié l'effet de la taille et de la concentration en PolyEthylène Glycol ou PEG. Nous nous sommes focalisés sur les PEG 3.35 kDa, 8 kDa et 20 kDa. Le pH de travail a été fixé à 8.5 (Tampon 50mM Tris), un pH proche du point

isolélectrique afin de ne pas être « masqué » par la répulsion électrostatique devant les effets éventuels.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure II.B.9, l'ajout de PEG induit des interactions globalement attractives entre protéines : en effet, l'intensité à l'origine augmente avec la concentration en protéines.

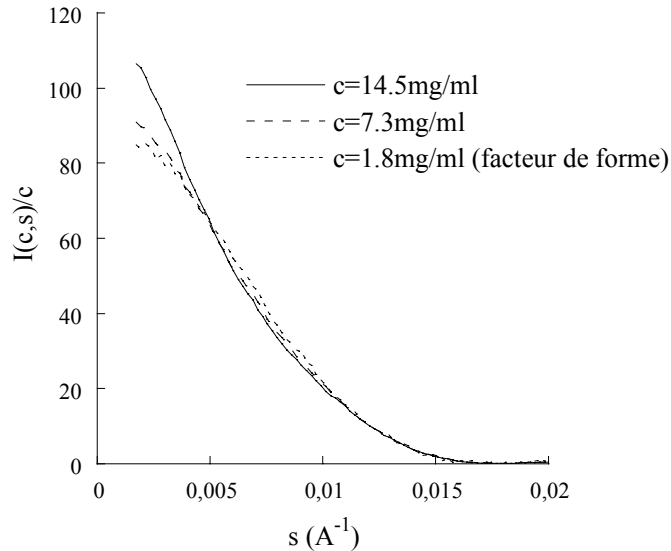


Figure II.B.9 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la concentration en protéines dans le cas d'un ajout de 8% PEG 3.35 kDa à pH 8.5.

Par ailleurs, pour une concentration en protéines donnée, l'intensité à l'origine augmente avec la concentration en PEG 8kDa ajouté (Figure II.B.10). Ceci montre que plus la concentration en PEG est importante, plus les interactions sont attractives.

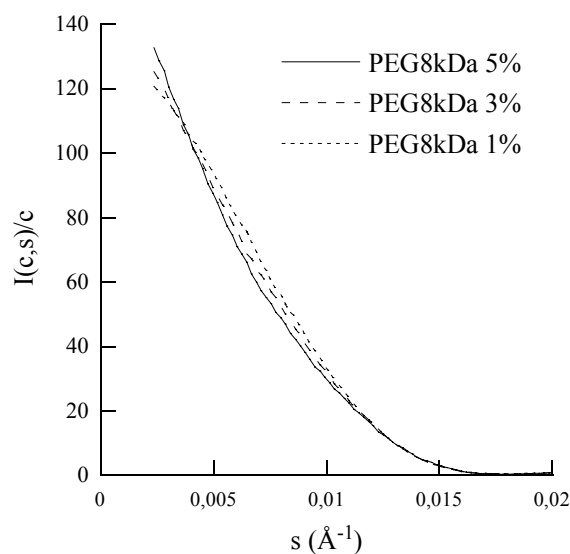


Figure II.B.10 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la concentration en PEG 8kDa pour une concentration en protéines de 14.5mg/ml à pH 8.5.

Nous avons tracé l'évolution du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en PEG ajouté pour les trois PEGs de masse différente (Figure II.B.11).

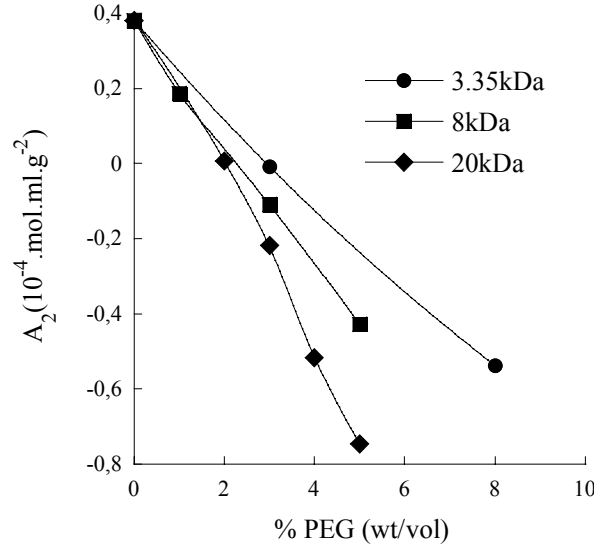


Figure II.B.11 : Evolution du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en PEG pour trois PEGs différents (PEG 8kDa, PEG 3.35kDa et PEG 20kDa) à pH 8.5.

Il faut noter que nous sommes ici en présence d'un mélange binaire protéine-polymère où à la fois la protéine et le PEG diffusent. L'intensité diffusée totale s'écrit alors (Guinier et Fournet 1955):

$$I_{\text{totale}}(s) = I_{\text{UOX}}(s) + I_{\text{UOX-PEG}}(s) + I_{\text{PEG}}(s), \quad (\text{II-21})$$

où $I_{\text{UOX}}(s)$ est l'intensité diffusée par les protéines, $I_{\text{PEG}}(s)$, l'intensité diffusée par les polymères et $I_{\text{UOX-PEG}}(s)$ un terme croisé non nul en présence d'interactions polymère-protéine.

Les intensité diffusées que nous avons tracées et utilisées pour déterminer le second coefficient du viriel sont égales à la différence entre l'intensité totale $I_{\text{totale}}(s)$ et l'intensité diffusée par le solvant $I_{\text{PEG}}^0(s)$. Par conséquent, si on considère que l'intensité diffusée par les polymères dans le mélange protéine-polymère $I_{\text{PEG}}(s)$ s'identifie à celle dans la solution de polymères purs $I_{\text{PEG}}^0(s)$, l'intensité diffusée que nous avons considéré pour déterminer le second coefficient du viriel est :

$$I(s) = I_{\text{totale}}(s) - I_{\text{PEG}}(s) = I_{\text{UOX}}(s) + I_{\text{UOX-PEG}}(s) \quad (\text{II-22})$$

En toute rigueur, le second coefficient du viriel relatif aux interactions entre protéines doit être calculé à partir de l'intensité diffusée seulement par les protéines $I_{\text{UOX}}(s)$. Nous verrons dans le chapitre suivant que la théorie prédit que, dans notre cas, le terme croisé

$I_{\text{UOX-PEG}}(s)$ peut valoir pour les concentrations en PEG les plus importantes jusqu'à 15 à 20% de l'intensité $I_{\text{UOX}}(s)$ (Figure III.A.2). Le second coefficient du viriel que l'on calcule correspond donc à un second coefficient du viriel effectif inférieur (car $I_{\text{UOX-PEG}}(s) < 0$, voir chapitre suivant et Figure III.A.2) au second coefficient du viriel caractérisant uniquement les interactions protéines-protéines.

D'après la Figure II.B.11, quelle que soit la taille du PEG, à partir d'une certaine concentration en PEG, les interactions entre protéines sont globalement attractives, comme l'indique la valeur négative du second coefficient du viriel. De plus, pour une concentration en PEG donnée, plus le PEG est de taille importante plus il est efficace pour induire des interactions attractives entre protéines. En utilisant le modèle d'Asakura-Oosawa, présenté dans la première partie, donnant une expression analytique de l'interaction de déplétion, il est possible d'expliquer nos observations expérimentales : en effet suivant ce modèle (équations (I-20) et (I-21)), la profondeur du potentiel de déplétion est directement proportionnelle à la concentration en polymères et la portée est égale au double du rayon de giration du polymère. Le potentiel de déplétion est par conséquent d'autant plus attractif que la concentration et/ou la taille du polymère est importante. Nous avons illustré notre propos en traçant le second coefficient du viriel correspondant à l'interaction de déplétion prévue par le modèle d'Asakura-Oosawa (AO) :

$$A_{2_déplétion}^{\text{AO}} = -\frac{2\pi N_a}{M^2} \int_{\sigma}^{+\infty} (1 - \exp(-U_{\text{déplétion}}^{\text{AO}}(r)/k_B T)) \cdot r^2 dr, \quad (\text{II-23})$$

$U_{\text{déplétion}}(r)$ est donné par les équations (I-21) et (I-22) dans le premier chapitre. Le diamètre de la protéine est pris égal à 76Å et les rayons de giration des trois polymères sont calculés d'après la formule établie expérimentalement (Devanand et Selser 1991) :

$$R_g(\text{Å}) = 0.215 M_w^{0.583}, \quad (\text{II-24})$$

où M_w est la masse du polymère.

Les variations du second coefficient du viriel en fonction de la concentration et de la taille du PEG ajouté sont similaires à celles observées expérimentalement (Figure II.B.12). Notons que les valeurs absolues sont par contre différentes ; les écarts au modèle d'Asakura-Oosawa seront discutés dans le chapitre suivant.

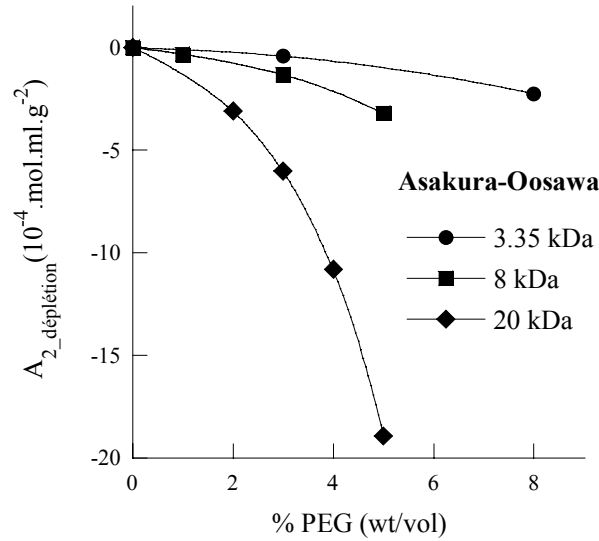


Figure II.B.12 : Evolution du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en PEG en utilisant le modèle d'Asakura-Oosawa.

Par conséquent, contrairement au sel, le PEG est un agent beaucoup plus efficace pour induire des interactions attractives entre les molécules d'urate oxydase.

Ces premiers résultats sur l'urate oxydase confirment les travaux obtenus par diffusion de lumière ou diffusion de rayons X aux petits angles sur d'autres macromolécules de taille importante telles que l'ATCase (Budayova, Bonneté et al. 1999), les alpha-cristallines (Finet et Tardieu 2001), le BMV (Casselyn, Perez et al. 2001), la porine (Hitscherich, Kaplan et al. 2000) ou encore l'apoferritine (Tanaka et Ataka 2002). Le modèle d'Asakura-Oosawa prédit en effet que les interactions attractives sont d'autant plus importantes que la taille de la macromolécule est grande (Figure II.B.13).

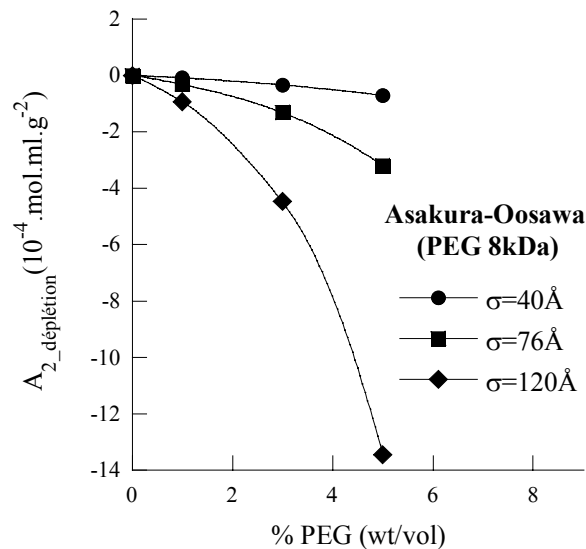


Figure II.B.13 : Evolution du second coefficient du viriel selon le modèle d'Asakura-Oosawa pour le PEG 8kDa ($R_g=40.5\text{\AA}$ selon l'équation (II-22)) et pour des macromolécules de diamètre σ différents.

Quelques références dans la littérature montrent cependant que l'ajout de PEG induit aussi des interactions attractives non négligeables sur les petites protéines comme le lysozyme (Kulkarni, Chatterjee et al. 2000), la ribonucléase (Tessier, Johnson et al. 2003) et les γ -cristallines (Finet 1999), trois protéines de masse inférieure à 20kDa. Cependant dans le cas du lysozyme, une variation non-monotone, non prédite par le modèle d'Asakura-Oosawa, des interactions en fonction de la concentration en PEG ajouté a été mise en évidence. Ainsi, l'ajout de PEG à faible concentration induit des interactions attractives mais à plus forte concentration en PEG les interactions deviennent moins attractives voire répulsives (Kulkarni, Chatterjee et al. 2000). Le minimum du second coefficient du viriel a été observé pour des concentrations en polymère égales à la concentration d'enchevêtrement C_p^* de chacun des polymères étudiés (ou concentration à partir de laquelle les molécules de polymères s'interpénètrent). Nous avons voulu déterminer, dans le cas de l'urate oxydase, l'évolution du second coefficient du viriel à des concentrations en PEG supérieures à la concentration d'enchevêtrement C_p^* . La concentration C_p^* peut être évaluée suivant la formule :

$$C_p^* = \frac{3M_w}{4\pi N_a R_g^3}, \quad (II-25)$$

où R_g est le rayon de giration du polymère.

Les rayons de giration donnés par l'équation (II-24) et les concentration critiques correspondantes pour chacun des trois PEGs étudiés sont présentés dans le Tableau II.B.2.

	3.3 kDa	8kDa	20kDa
$R_g(\text{\AA})$	24.4	40.5	69.2
$C_p^*(\%)$	9.1	4.8	2.4

Tableau II.B.2 : Valeurs des rayons de giration et des concentrations critiques pour les PEG 3.35kDa, 8kDa et 20kDa.

Sur la gamme de concentration étudiée, aussi bien pour le PEG 20kDa (Figure II.B.11) que pour le PEG 8kDa (Figure II.B.14), la variation du second coefficient du viriel est monotone même au-delà de la concentration d'enchevêtrement du polymère, contrairement à ce qui a pu être observé avec le lysozyme (Kulkarni, Chatterjee et al. 2000). Le second coefficient du viriel tend cependant à stagner à partir d'une concentration de 8% en PEG 8kDa (Figure II.B.14).

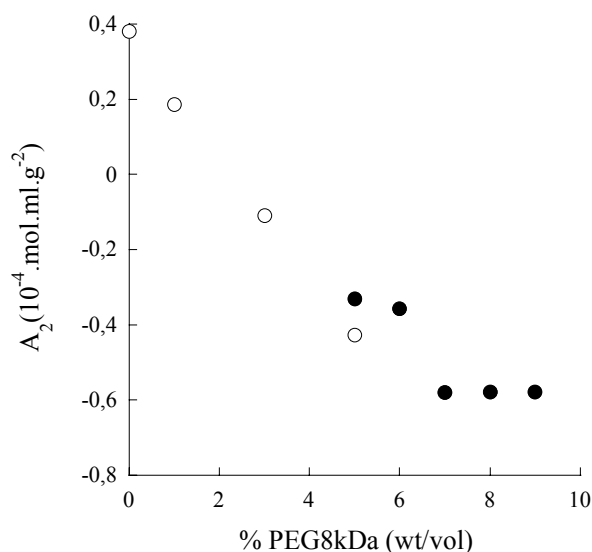


Figure II.B.14 : Evolution (●) du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en PEG 8kDa pour des concentrations au-delà de la concentration critique (5%) ; pour comparaison, les points obtenus lors d'une première expérience (Figure II.B.11) sont indiqués (○).

En parallèle, nous avons effectué des expériences de diffusion statique de lumière afin de comparer les valeurs de second coefficient du viriel obtenues avec celles déterminées par diffusion de rayons X aux petits angles.

Sur la Figure II.B.15, sont reportés les évolutions des inverses des facteurs de structure à l'origine obtenues par diffusion statique de lumière (DSL) en fonction de la concentration en protéines. Tout comme dans le traitement des expériences de DXPA, la pente de ce tracé, égale à $2MA_2$ donne le second coefficient du viriel.

Les variations du second coefficient du viriel obtenues par les deux techniques (Figure II.B.16) sont identiques jusqu'à une concentration en PEG 8kDa égale à 5%. Par ailleurs, les valeurs sans PEG et avec un ajout de 3% et 5% de PEG 8kDa, même si elles sont différentes, sont du même ordre de grandeur avec les deux techniques. Il faut préciser que des disparités importantes avaient été enregistrées lors d'un précédent travail de comparaison entre différentes techniques réalisé sur les γ -cristallines (Bonneté, Malfois et al. 1997). Cependant dans notre cas, une différence notable est obtenue pour une concentration en PEG égale à 7% ($>C_p^*$). Il faut savoir que les manipulations de DSL sont très sensibles à la présence de poussière et/ou d'agréats ce qui pourrait expliquer les disparités observées.

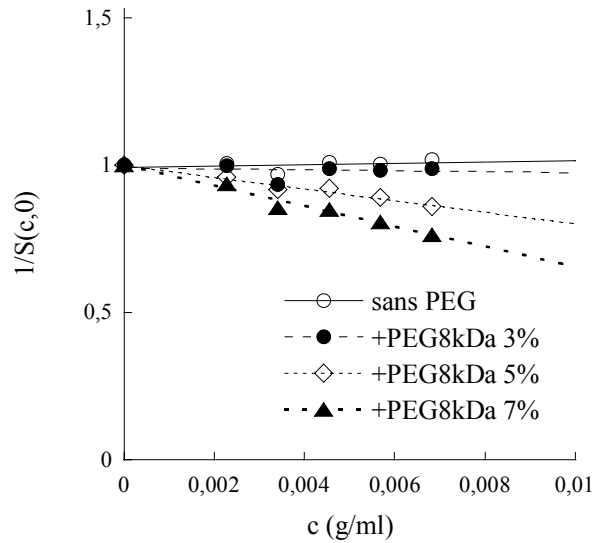


Figure II.B.15 : Evolution de $S(c,0)^{-1}$ en fonction de la concentration c en protéines obtenue par DSL à pH 8.5 (50mM Tris) ; la pente de ces droites (égale à $2MA_2$) donne le second coefficient du viriel.

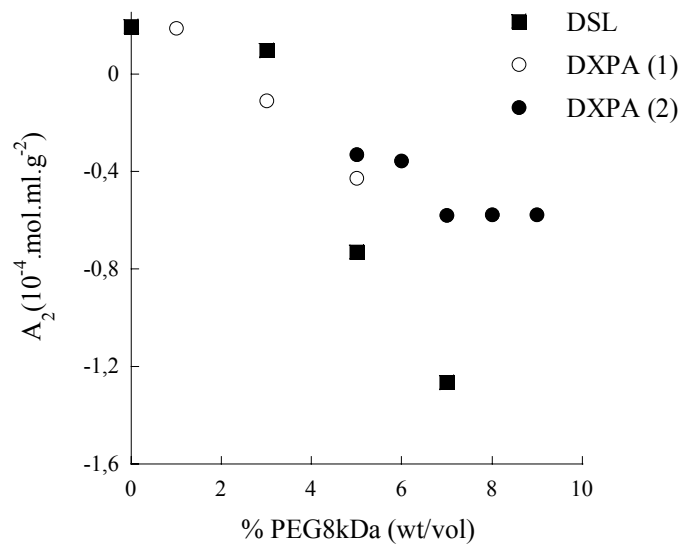


Figure II.B.16 : Comparaison entre les expériences de DXPA (deux jeux de données) et celles de DSL (pH 8.5, 50mM Tris)

V. Effets couplés : pH/PEG, sel/PEG, pH/sel/PEG

Après avoir étudié l'effet sur les interactions en solution des trois paramètres (pH, sel et PEG) indépendamment, nous avons étudié leurs effets couplés.

Pour le couplage entre un changement de pH et un ajout de PEG, nous nous sommes placés à $T=20^{\circ}\text{C}$ et à une concentration et une taille de PEG données en travaillant avec un ajout de PEG 8kDa 5%. En plus du pH 8.5 (50mM Tris) étudié ci-dessus, nous avons aussi déterminé un second coefficient du viriel à deux autres pHs : pH 9.3 (50mM Tris) et pH 10.0

(10mM NaCarbonate). Quel que soit le pH, le second coefficient du viriel en présence de PEG 8kDa 5% est inférieur à sa valeur sans PEG ajouté, ce qui prouve que l'ajout de PEG induit une interaction supplémentaire attractive de déplétion (Tableau II.B.3). Les interactions coulombiennes à pH 9.3 et pH 10.0 étant bien plus importantes qu'à pH 8.5 (car ces pHs sont plus éloignés du point isoélectrique de la protéine), en présence de PEG 8kDa 5% les interactions globales à pH 9.3 sont quasi-nulles et à pH 10.0 encore répulsives. Il faut noter qu'à pH 10.5, même en présence d'une concentration en PEG 8kDa de 10%, la valeur du second coefficient du viriel reste positive ($A_2 \sim +0.19 \cdot 10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$) (Bonneté, Vivares et al. 2001). En conclusion sur cet effet couplé pH/PEG, nous pouvons dire que pour obtenir des interactions suffisamment attractives en présence de PEG, il est préférable de se placer à un pH proche du point isoélectrique, pH pour lequel les interactions coulombiennes sont les plus faibles.

pH	8.5	9.3	10.0
sans PEG ajouté	+0.37	+0.62	+0.84
+ PEG 8kDa 5%	-0.41	-0.06	+0.56

Tableau II.B.3 : Comparaison des valeurs (à $\pm 0.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.ml.g}^{-2}$ près) du second coefficient du viriel avec et sans PEG ajouté pour trois pHs différents à 20°C. Les valeurs sans PEG ajouté pour les pH 9.3 et pH 10.0 sont évaluées à partir de la Figure II.B.2.

Nous avons également étudié l'effet couplé d'ajout de sels et de PEG à différents pHs. Sur la Figure II.B.17 sont reportées les intensités diffusées avec et sans sel à pH 8.5, pH 9.3 et pH 10.0. La concentration en PEG 8kDa est fixée à 5%. Les valeurs de seconds coefficients du viriel correspondants sont présentées sur la Figure II.B.18. A pH 10.0 et en présence de sel ajouté (NaCl), l'intensité à l'origine est supérieure à celle obtenue en absence de sel ; les interactions sont donc plus attractives en présence de sels. Par ailleurs un effet de saturation est observé à partir d'un ajout de 300mM de sel. Ces effets peuvent s'expliquer par l'écrantage des interactions coulombiennes. Cette variation se retrouve sur l'évolution du second coefficient du viriel qui diminue avec la concentration en sel ajouté. A pH 9.3, la même tendance est observée : les interactions sont plus attractives en présence de sel. Cependant, l'effet est beaucoup moins marqué, ceci étant dû au fait que le pH est plus proche du point isoélectrique et donc que les interactions coulombiennes sont plus faibles. A pH 8.5, un effet inattendu est mis en évidence : étant à un pH proche du point isoélectrique, on s'attendrait à ce que l'ajout de sel ne modifie pas les interactions ou les rende légèrement plus

attractives par écrantage des faibles interactions coulombiennes à ce pH. Une variation opposée est observée. L'ajout de sel semble induire des interactions plus répulsives, comme nous le montre l'intensité diffusée à l'origine ainsi que les déterminations du second coefficient du viriel. Il faut noter que cet effet même s'il est très faible a cependant été observé de façon reproductible.

A forte concentration en sel, les valeurs des seconds coefficient du viriel tendent vers une valeur commune quasi-nulle supérieure à celle déterminée sans sel à pH 8.5 ($A_2 \approx -0.41 \cdot 10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$). Le modèle DLVO, décrivant les interactions en solution en absence de PEG, ou celui d'Asakura-Oosawa décrivant les interactions de déplétion induites par un ajout de polymères ne permet pas d'avancer d'explication simple quant à l'origine des variations observées, probablement dues à des interactions non-DLVO plus complexes et plus spécifiques.

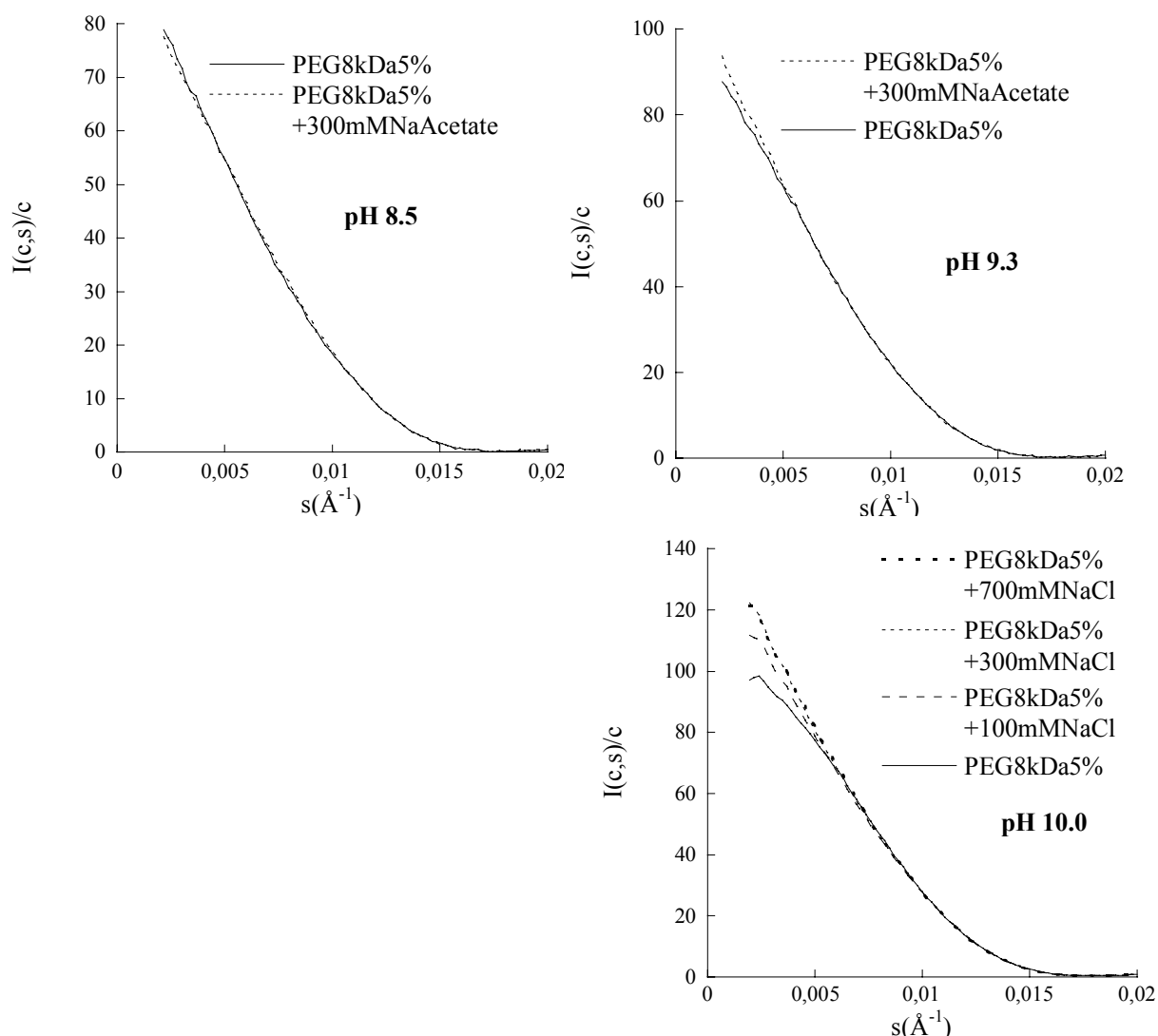


Figure II.B.17 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de l'ajout de sel pour une concentration en protéines de 9mg/ml et en PEG 8kDa de 5% pour trois pH différents : pH 8.5 (50mM Tris), pH 9.3 (50mM Tris) et pH 10.0 (10mM NaCarbonate).

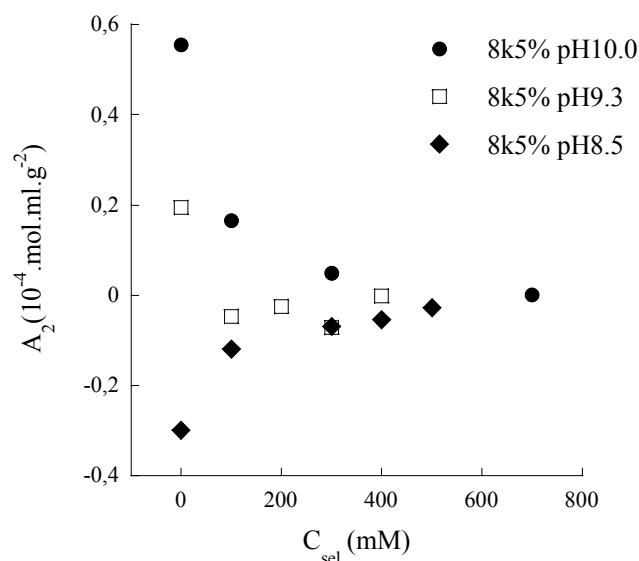


Figure II.B.18 : Evolution du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en sel ajouté à pH 8.5, pH 9.3 et pH 10.0 (NaAcetate à pH 8.5 et pH 9.3, NaCl à pH 10.0). La concentration en PEG 8kDa est fixée à 5%.

C. CORRELATION INTERACTIONS / CRISTALLISATION

Les études sur les interactions en solution entre les molécules d'urate oxydase montrent que seul le PEG permet d'induire des interactions attractives, les autres paramètres physico-chimiques étudiés (pH, T, sels) étant inefficaces. Les premières travaux réalisés sur d'autres systèmes biologiques ont mis en évidence que la cristallisation des protéines était favorisée en présence d'interactions attractives. Dans ce contexte, nous avons réalisé des essais de cristallisation en vue de les corrélérer aux interactions en solution caractérisées dans la partie précédente.

Nos premiers essais de cristallisation ont été effectués à une température contrôlée de 20°C dans des boîtes 72 puits *Microbatch Hampton Research*®. Dans cette technique, un mélange de 3µl de protéines et de 3µl d'agent cristallisant est déposé dans un puits pouvant contenir jusqu'à 10µl de solution. Les puits sont recouverts d'huile de paraffine pour éviter toute évaporation. Les concentrations en protéines et en agent cristallisant demeurent ainsi constantes en absence de tout processus de séparation de phases, ce qui n'est pas le cas avec l'autre technique, dite de diffusion de vapeur, couramment utilisée en cristallisation des protéines. Pour ces essais, la concentration initiale en protéines a été fixée à 13.5mg/ml.

Des essais de cristallisation ont été effectués en fonction du pH, de l'ajout de différents sels et de différents PEGs. A une température de 20°C, aucun cristal n'a été observé sur plusieurs mois par simple modification du pH et/ou après un ajout de sels comme NaCl,

NaAcetate, NaFormate, Na_2SO_4 . Selon le pI de la protéine et les séries de Hofmeister, les sels les plus efficaces a priori pour cristalliser l'urate oxydase sont les trois derniers cités. Rappelons que, comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la variation de ces deux paramètres physico-chimiques (pH, sels) ne permettait pas d'induire des interactions attractives entre les molécules d'urate oxydase.

Par contre, à pH 8.5 (50mM Tris) et en présence de PEG, des cristaux ont été obtenus au bout de quelques heures à quelques jours quelle que soit la masse du PEG étudié (Figure II.C.1). Rappelons que l'ajout de PEG induit des interactions attractives entre protéines.

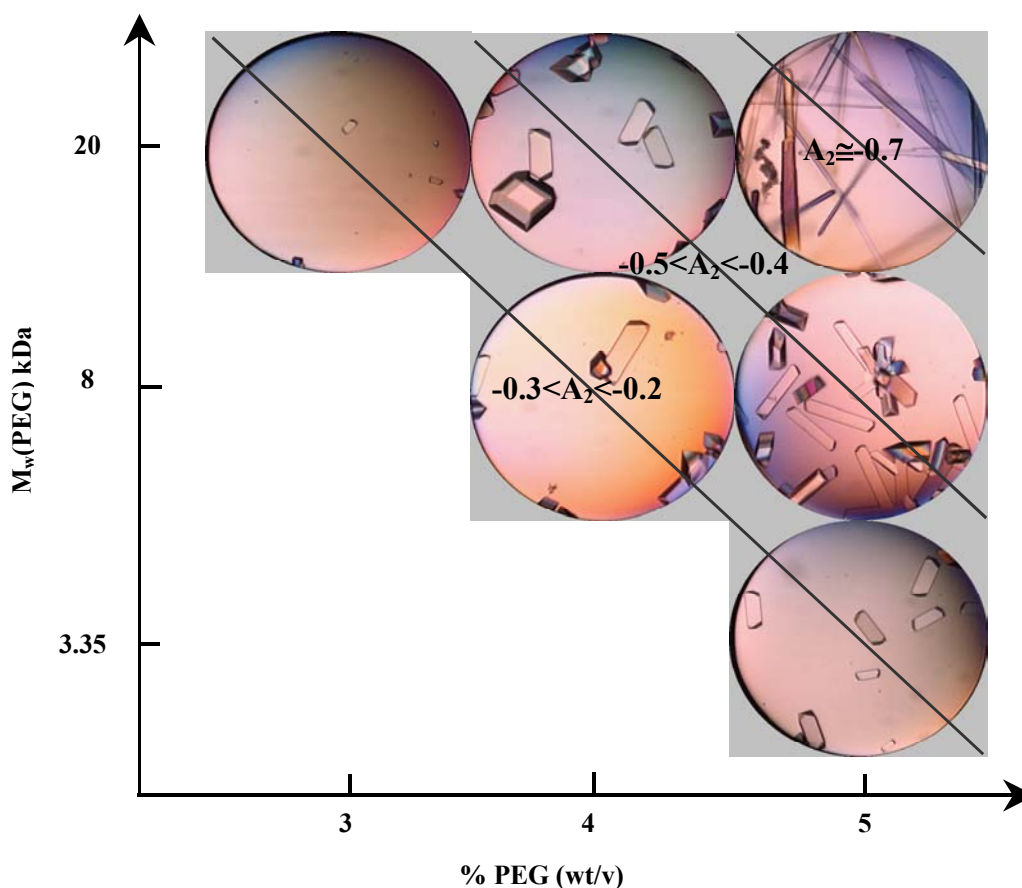


Figure II.C.1 : Cristaux d'urate oxydase obtenus dans le tampon 50mM Tris pH 8.5 pour différentes concentrations en PEG et pour trois PEG différents (3.35kDa, 8kDa et 20kDa). Le diamètre des puits est de 1300 μm . Les valeurs indiquées de second coefficient du viriel sont exprimées en unités $10^{-4} \cdot \text{mol} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}^{-2}$ et ont été déterminées à partir de la Figure II.B.11.

Plusieurs faciès apparaissent dont principalement des cristaux « massifs » et des cristaux « en aiguille ». Le taux de nucléation et la proportion de cristaux « en aiguille » sur celle de cristaux « massifs » suivent les variations du second coefficient du viriel (obtenus à partir de la Figure II.B.11) et augmentent avec la concentration et la masse en PEG ajouté.

Par ailleurs, en combinant la Figures II.B.11 avec les expériences de cristallisation, nous voyons que l'urate oxydase cristallise pour des valeurs de A_2 comprises entre -0.8 et 0 (10^{-4}

⁴.mol.ml.g⁻²) et ce pour des concentrations en protéines comprises entre 2.3mg/ml et 20mg/ml. Cette zone de cristallisation correspond à un domaine restreint de la zone de cristallisation de George et Wilson (George et Wilson 1994), défini par $-8.0 < A_2(10^{-4} \text{.mol.ml.g}^{-2}) < 0$. D'autres systèmes de taille importante semblent aussi cristalliser pour des valeurs faibles de A_2 ; c'est le cas de la porine (Hitscherich, Kaplan et al. 2000), de l'apoferritine (Petsev, Thomas et al. 2001), de la malate déshydrogénase (Ebel, Faou et al. 1999) ou encore du BMV (Casselyn, Perez et al. 2001). Ces résultats expérimentaux rejoignent les travaux théoriques de Haas et Drenth (Haas et Drenth 1998) qui en considérant que la première étape de la cristallisation est la formation de gouttes denses en protéines ont déterminé pour une protéine de masse 14kDa, une zone théorique de cristallisation de $-9.0 < A_2(10^{-4} \text{.mol.ml.g}^{-2}) < -3.5$, et pour une protéine de masse 140kDa, $-0.9 < A_2(10^{-4} \text{.mol.ml.g}^{-2}) < -0.35$. Il faut donc s'attendre dans le cas des macromolécules de taille importante à ce que la zone de cristallisation en terme de second coefficient du viriel soit bien plus réduite que le « crystallization slot » de George et Wilson. Ce résultat peut aussi être mis en évidence en compilant nos données (Figure II.C.2) sur l'urate oxydase avec celles obtenues aussi par DXPA sur le lysozyme (14.3kDa) (Bonneté, Finet et al. 1999), sur la γ -D-cristalline (20kDa) (Finet 1999) et sur le BMV (4600kDa) (Casselyn, Perez et al. 2001).

Les petits systèmes, lysozyme et γ -D-cristalline, cristallisent dans la zone de A_2 déterminée par George et Wilson ($-6.0 < A_2(10^{-4} \text{.mol.ml.g}^{-2}) < 0$) tandis que les systèmes de plus grosse taille, urate oxydase et BMV, cristallisent dans une zone de A_2 proche de zéro beaucoup plus étroite ($-1.0 < A_2(10^{-4} \text{.mol.ml.g}^{-2}) < +0.2$) (Figure II.C.2). Ce résultat n'est pas forcément surprenant dans la mesure où le second coefficient du viriel dépend de la masse M et du diamètre σ de la particule considérée:

$$A_2 = \frac{2\pi N_a}{M^2} \int_0^\infty (1 - \exp(-U(r)/k_B T)) r^2 dr$$

$$= A_2^{SD} + \frac{2\pi N_a}{M^2} \int_\sigma^\infty (1 - \exp(-U(r)/k_B T)) r^2 dr \quad , \quad (II-26)$$

où $A_2^{SD} = \frac{2\pi N_a}{M^2} \frac{1}{3} \sigma^3$ est le second coefficient du viriel dû à l'interaction de sphères dures.

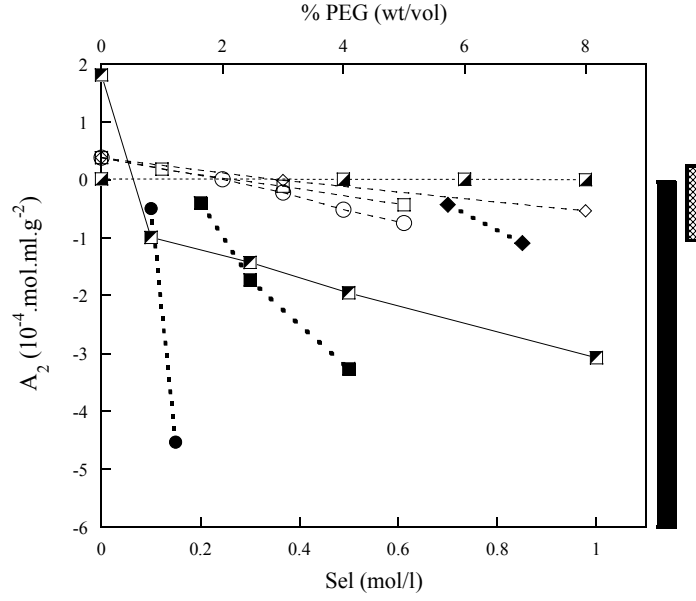


Figure II.C.2 : Second coefficients du viriel obtenus par DXPA pour le lysozyme (Bonneté, Finet et al. 1999), la gammaD cristalline (Finet 1999), l'urate oxidase et le BMV (Casselyn, Perez et al. 2001). Les différentes conditions pour chaque système sont: pour le lysozyme , à pH 4.5 NaNO_3 ($\cdots\bullet\cdots$), NaCl ($\cdots\blacksquare\cdots$), NaOAc ($\cdots\blacklozenge\cdots$); pour la gammaD cristalline à pH 4.5 NaCl ($-\blacksquare-$); pour l'urate oxidase à pH 8.5 PEG 3.35kDa ($-\diamond-$), PEG 8kDa ($-\square-$), PEG 20kDa ($-\oplus-$) ; et pour le BMV à pH 5.0 PEG 8kDa ($-\blacksquare-$). Les zones de cristallisation en terme de second coefficient du viriel sont indiquées : ■ pour le lysozyme et la gammaD cristalline ; ▨ pour l'urate oxydase et le BMV.

Ceci nous a amené à proposer l'utilisation d'un second coefficient du viriel normalisé, noté a_2 , couramment utilisé dans le cas des colloïdes ou des polymères (Rosenbaum, Zamora et al. 1996; Petsev, Thomas et al. 2000; Piazza et Pierno 2000; Poon, Egelhaaf et al. 2000; Vliegenthart et Lekkerkerker 2000). Le second coefficient du viriel normalisé est égal au rapport du second coefficient du viriel $B_2 = \frac{M^2 A_2}{N_a}$ sur le volume exclu de la particule

$V_e = \frac{\pi \sigma^3}{6}$, où σ est le diamètre de la particule :

$$a_2 = \frac{B_2}{V_e} = \frac{M^2 A_2}{N_a V_e} = \frac{12}{\sigma^3} \int_0^\infty (1 - \exp(-U(r)/k_B T)) r^2 dr \quad (\text{II-27})$$

Nous avons tracé l'évolution de a_2 en fonction des ajouts de sels ou de PEGs pour les quatre systèmes (lysozyme, γ -cristalline, urate oxydase et BMV) et mis en évidence la zone de cristallisation en terme de a_2 (Figure II.C.3).

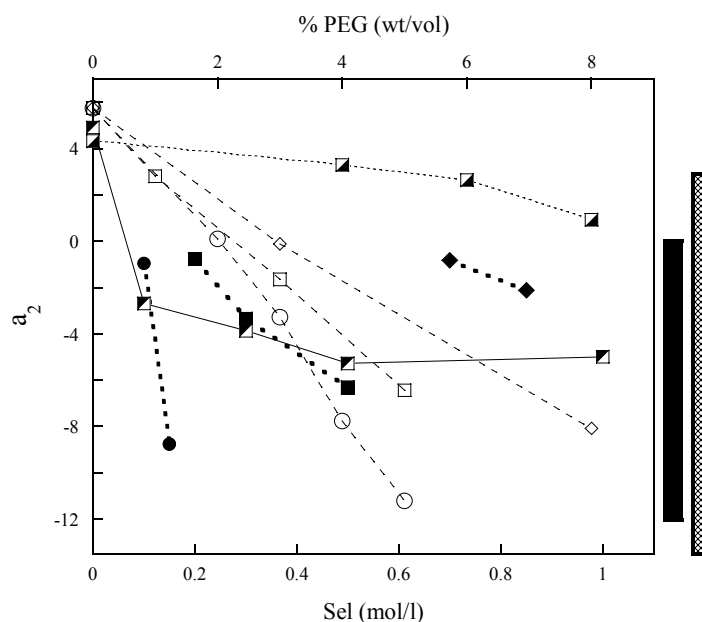


Figure II.C.3 : Second coefficients du viriel normalisé pour le lysozyme, la gammaD cristalline, l'urate oxydase et le BMV. Les conditions et les symboles sont les mêmes que sur la Figure II.C.2.

Suivant cette représentation, les quatre systèmes étudiés cristallisent pour des valeurs de second coefficient du viriel normalisés a_2 comparables (dans la même décade), ce qui nous incite à penser que les macromolécules biologiques cristallisent pour des potentiels de paire similaires. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant. Nous pouvons déjà retenir que le second coefficient du viriel normalisé, indépendant de la masse et de la taille de la particule, semble être un meilleur outil pour prédire la cristallisation des macromolécules biologiques.

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les interactions en solution entre les molécules d'urate oxydase et réalisé des essais de cristallisation en fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques (variation de pH et/ou de température ; ajout de sels et/ou de PEGs). Nous avons mis en évidence qu'à température ambiante seul le PEG, quelle que soit sa masse, induit des interactions attractives et favorise la cristallisation de l'urate oxydase. La zone de second coefficient du viriel pour laquelle l'urate oxydase cristallise a été déterminée et correspond à un domaine restreint du « crystallization slot » de George et Wilson (George et Wilson 1994), ce qui semble se généraliser pour les protéines de taille importante. Nous avons alors proposé qu'un second coefficient du viriel normalisé, indépendant de la masse et de la taille de la protéine, pourrait être un meilleur paramètre pour prédire la cristallisation des macromolécules biologiques.

Chapitre 3 : Potentiels d'interaction en solution

Dans cette partie, nous allons détailler les méthodes que nous avons utilisées afin de caractériser les potentiels d'interaction entre les molécules de protéines en solution. Il est difficile de mesurer directement un potentiel d'interaction entre protéines en solution comme cela a été fait avec des colloïdes (Verma, Crocker et al. 2000). Notre approche a été de coupler les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles présentées dans le chapitre précédent à des traitements numériques. Nous détaillerons en premier lieu les bases de ces traitements numériques puis les différents résultats obtenus dans la solution de protéine initiale dans un tampon 50mM Tris pH 8.5, puis ceux à différents pH et enfin après ajout de sel et/ou de PEG. Dans ce dernier cas, non seulement l'urate oxydase mais aussi les α et les γ -cristallines ont été étudiées afin de valider notre approche théorique. Enfin nos résultats, comparés à ceux obtenus avec des approches théoriques sensiblement différentes, sont discutés dans le contexte général de la cristallisation des protéines.

A. DESCRIPTION DES TRAITEMENTS NUMERIQUES UTILISES

Les potentiels d'interaction de paire peuvent être déterminés en couplant des expériences de diffusion de rayonnement à des traitements numériques. Ce type d'approche a déjà été utilisé dans le domaine des colloïdes (Ye, Narayanan et al. 1996; Lutterbach, Versmold et al. 1999; Lutterbach, Versmold et al. 1999) ainsi que pour les biopolymères (Vérétout, Delaye et al. 1989; Malfois, Bonneté et al. 1996; Tardieu, Le Verge et al. 1999; Tuinier, ten Grotenhuis et al. 1999; Tuinier, Dhont et al. 2000; Tanaka et Ataka 2002; Tanaka, Ataka et al. 2003; Tuinier et Brûlet 2003). En partant d'un jeu de potentiels, les traitements numériques nous permettent de calculer des courbes d'intensité de DXPA théoriques. En les comparant aux courbes expérimentales, il est alors possible de déterminer les meilleurs paramètres caractérisant les potentiels de paire. Deux modèles théoriques, dont les programmes ont été écrits par Luc Belloni (Belloni 1986; Belloni 1988; Belloni 1991) ont été utilisés: le modèle dit à « un composant » et le modèle dit à « deux composants ».

I. Le modèle à « un composant »

1. Principe du modèle

Selon le modèle simple dit à « un composant », seul le potentiel d'interaction de paire entre protéines est pris en compte. Ce potentiel tient compte uniquement de façon implicite des interactions protéine-ions ou protéine-solvant. Le modèle à un composant permet la

détermination d'un facteur de structure théorique à partir d'un jeu de potentiels protéine-protéine initial grâce aux équations intégrales issues de la mécanique statistique des liquides.

Le facteur de structure $S(c,s)$, dans un système où à la fois les objets et les interactions sont à symétrie sphérique, est relié (voir chapitre précédent) à la fonction de distribution $g(r)$ des protéines en solution :

$$S(c,s)=1+\rho\int 4\pi r^2(g(r)-1)\frac{\sin 2\pi rs}{2\pi rs}dr, \quad (\text{III-1})$$

où ρ est le nombre de particules par unité de volume. La fonction de distribution de paire $g(r)$ représente la densité de probabilité de trouver une particule à la distance r d'une autre particule. Elle donne une mesure de l'ordre local au sein de la solution et peut s'écrire $g(r)=\rho(r)/\rho_0$, où $\rho(r)$ est la densité de particules au point r et ρ_0 la densité moyenne en solution.

En vue de déterminer la fonction de distribution des particules au sein d'un liquide, on utilise l'équation exacte d'Ornstein-Zernike (OZ), qui relie les fonctions de corrélation totale $h(r)=g(r)-1$ et directe $c(r)$ et s'écrit :

$$h(r)=c(r)+\rho\int c(|r-r'|)h(r')dr', \quad (\text{III-2})$$

Le sens physique de la fonction de corrélation totale $h(r)$ est le suivant. Lorsque $r \rightarrow \infty$, la densité locale en solution $\rho(r)$ tend vers la densité moyenne ρ_0 , la fonction de distribution $g(r)$ tend donc vers 1 et la fonction de corrélation totale $h(r)$ vers 0 : les particules situées à une distance infinie l'une de l'autre ne sont plus corrélées entre elles. Si au contraire, la densité de probabilité de trouver deux particules à une distance r l'une de l'autre est importante, $g(r)>1$ et donc $h(r)>0$: les particules sont fortement corrélées entre elles.

L'équation d'Ornstein-Zernicke peut être considérée comme la définition mathématique de la fonction de corrélation directe $c(r)$. Au premier ordre, la fonction de $c(r)$ s'identifie au potentiel d'interaction de paire direct $U(r)$. L'équation d'Ornstein-Zernicke signifie donc que la corrélation totale entre deux particules ($h(r)$) est la somme de corrélations directes ($c(r)$) et de corrélations indirectes causées par la présence des autres particules ($\rho\int c(|r-r'|)h(r')dr'$).

Pour déterminer le facteur de structure $S(c,s)$, nous devons connaître $g(r)$ et pour accéder à $g(r)$ ou $h(r)=g(r)-1$, nous avons besoin de $c(r)$, fonction qui reste inconnue. Une autre équation, appelée généralement équation de fermeture, est donc nécessaire. Plusieurs équations de fermeture, toutes approchées, sont disponibles (Belloni 1991). Nous avons utilisé l'équation HNC (HyperNetted Chain), qui s'écrit sous la forme suivante :

$$g(r) = \exp[-U(r)/k_B T + h(r) - c(r)], \quad (\text{III-3})$$

où $U(r)$ est le potentiel de paire entre particules. La fonction $h(r)-c(r)$ est souvent notée $\gamma(r)$.

L'équation HNC est notamment adaptée dans le cas d'interactions attractives et/ou répulsives de forte intensité contrairement à l'équation MSA (Mean Spherical Approximation), relation de fermeture la plus simple, valable uniquement lorsque $U(r) \ll k_B T$. Dans notre cas, les résultats obtenus à partir d'équations intégrales plus précises (Percus-Yevick ou Rodgers-Young) sont identiques à ceux obtenus à partir de l'équation HNC.

En utilisant un potentiel initial $U(r)$ entre particules ainsi que les équations d'Ornstein-Zernike (OZ) et HNC, nous pouvons calculer la fonction de distribution $g(r)$ et donc le facteur de structure théorique $S(c,s)$. Pour résoudre ce problème numériquement, on utilise un programme itératif: on part d'une fonction $\gamma_0(r)=0$, les fonctions $g_0(r)$, $h_0(r)=g_0(r)-1$ et $c_0(r)$ sont ensuite calculées à l'aide de l'équation HNC. Par transformée de Fourier, la fonction $TF(c_0(r))$ est obtenue. L'équation d'Ornstein-Zernike permet à partir de $TF(c_0(r))$ de déterminer $TF(h_1(r))$ et donc $TF(\gamma_1(r))$. Par transformée de Fourier inverse, une nouvelle fonction $\gamma_1(r)$ est alors calculée. Un cycle suivant est entamé avec une fonction $\gamma(r)$, combinaison linéaire de $\gamma_0(r)$ et $\gamma_1(r)$. Le calcul est achevé lorsque la différence entre deux valeurs consécutives de $\gamma(r)$ est inférieure à une valeur seuil rentrée initialement dans le programme. Dans les calculs, chaque fonction est calculée sur N points, le pas d'échantillonnage dans l'espace réel Δr fixant celui dans l'espace réciproque Δs : $\Delta s=1/(N\Delta r)$. Pour l'ensemble de nos traitements numériques, nous avons fixé $N=1024$ et $\Delta r=2\text{\AA}$.

Le principe de l'étude est de calculer un facteur de structure théorique à partir d'un potentiel protéine-protéine choisi et de le comparer au facteur de structure expérimental. Tant que ces deux facteurs de structure sont différents, le potentiel initialement introduit dans le programme est modifié (Figure III.A.1). L'accord entre les deux facteurs de structure indique que le potentiel initial choisi rend compte des données expérimentales et peut donc être considéré comme le potentiel agissant entre les particules dans la condition expérimentale étudiée.

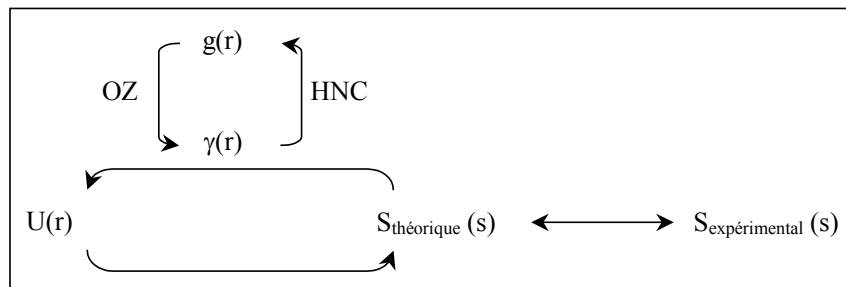


Figure III.A.1 : Principe des traitements numériques dans le cas du modèle à « un composant ».

2. Choix du potentiel initial

Nous avons utilisé le modèle à un composant dans le cas des solutions d'urate oxydase étudiées expérimentalement à différents pHs, en absence et en présence de sels.

Le potentiel initial choisi est le potentiel DLVO, somme d'un potentiel de sphères dures, d'un potentiel coulombien et d'un potentiel de Van der Waals.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, le potentiel de sphères dures ne dépend que du diamètre σ de la particule et s'écrit :

$$U(r)=+\infty, \text{ pour } r < \sigma \quad (\text{III-4})$$

$$U(r)=0, \text{ pour } r > \sigma.$$

Le potentiel coulombien selon le modèle DLVO s'écrit :

$$U_{\text{coul}}(r)=\frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r}\frac{Z^2}{\left(1+\kappa\frac{\sigma}{2}\right)^2}\frac{\exp(-\kappa(r-\sigma))}{r} \text{ pour } r > \sigma. \quad (\text{III-5})$$

Ce potentiel dépend du diamètre de la particule σ , de la charge de la particule Z et de la constante d'écrantage κ . κ est égale à l'inverse de la longueur de Debye λ_D , qui, à 300K, est fonction de la force ionique I de la solution : $\lambda_D = \frac{1}{\kappa} = \frac{3}{\sqrt{I}}$, où λ_D est exprimée en Å et I en mol.l⁻¹. Le potentiel coulombien dépend donc de trois paramètres accessibles σ , Z et I . La charge Z est une charge effective tenant compte de l'éventuelle adsorption des ions sur la protéine.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, le potentiel de Van der Waals peut s'exprimer à partir de la théorie de Lifshitz-Hamaker. Dans le cadre des traitements numériques, il est plus facile numériquement d'expliciter ce potentiel attractif sous la forme d'un potentiel de Yukawa, dont l'expression mathématique est similaire à celle du potentiel coulombien :

$$U_{\text{vdw}}(r)=-J_{\text{vdw}}\frac{\sigma}{r}\exp\left[-(r-\sigma)/d_{\text{vdw}}\right], \quad (\text{III-6})$$

où J_{vdw} (en unité $k_B T$) est la profondeur et d_{vdw} la portée du potentiel de Van der Waals. L'équivalence entre cette expression est celle issue de la théorie de Lifshitz-Hamaker a été montrée par Malfois et coll. (Malfois, Bonneté et al. 1996). Le potentiel de Van der Waals dépend donc de deux paramètres J_{vdw} et d_{vdw} .

Le potentiel DLVO résultant de la somme des trois potentiels ci-dessus dépend par conséquent de cinq paramètres : le diamètre de la particule σ , la charge de la particule Z , la force ionique de la solution I , la profondeur J_{vdw} et la portée d_{vdw} du potentiel attractif. Le

but des traitements numériques couplés aux expériences de DXPA sera de déterminer l'ensemble de ces paramètres pour décrire au mieux le potentiel existant entre les molécules de protéines en solution.

II. Le modèle à deux composants

1. Principe du modèle

Pour traiter les mélanges protéine-PEG, nous avons utilisé un modèle à deux composants qui tient explicitement compte des interactions protéine-protéine, protéine-polymère et polymère-polymère.

Au sein d'un mélange binaire colloïde ou protéine (C)-polymère(P), l'intensité totale diffusée aux petits angles s'écrit (Guinier et Fournet 1955) :

$$I(s) = c_c I_c^0(s) S_{cc}(s) + 2\sqrt{c_c c_p} \sqrt{I_c^0(s) I_p^0(s)} S_{cp}(s) + c_p I_p^0(s) S_{pp}(s) = I_c(s) + I_{cp}(s) + I_p(s), \quad (\text{III-7})$$

où c_i sont les concentrations des particules respectives, $I_i^0(s)$ sont les facteurs de forme de chacune des particules et $S_{ij}(s)$ sont les facteurs de structure partiels. Il faut noter que cette expression et plus particulièrement l'expression de $I_p(s)$ n'est pas strictement valable à cause de l'interpénétration des polymères à haute concentration. Cependant elle constitue, dans notre cas, une bonne approximation dans la mesure où les études ont été réalisées pour des concentrations en polymère inférieures ou égales à leur concentration d'enchevêtrement C_p^* .

Il est important de noter que dans le cas des mélanges protéines-polymères, nous avons tenu compte de l'intensité diffusée par les polymères. En effet, $I_p(s)$ et surtout $I_{cp}(s)$, représentant le terme « croisé » de l'intensité, ne sont pas négligeables devant $I_c(s)$ (Figure III.A.2).

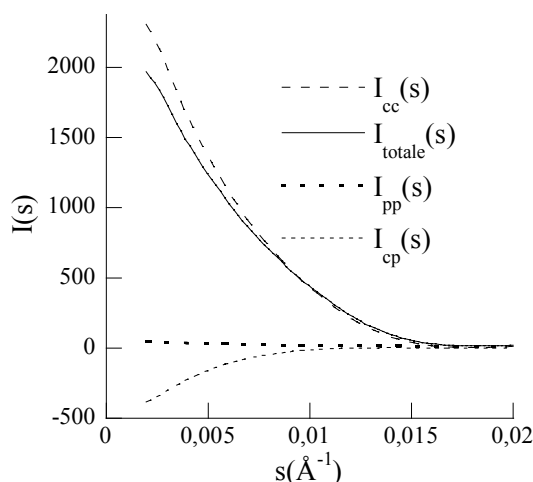


Figure III.A.2 : Comparaison entre I_{pp} , I_{cp} , I_{cc} et I_{totale} dans le cas d'un mélange urate oxydase (14.5mg/ml) – PEG 8kDa (5%) ; ces intensités sont calculés à partir des traitements numériques avec les meilleurs paramètres d'ajustement de la Figure III.B.5 décrits dans la suite.

Par extension du modèle à « un composant », les facteurs de structure partiels s'écrivent :

$$S_{ij}(s) = \delta_{ij} + \sqrt{c_i c_j} \int 4\pi r^2 (g_{ij}(r) - 1) \frac{\sin 2\pi r s}{2\pi r s} dr \quad (\text{III-8})$$

où $i, j=1, 2$ et δ_{ij} est le symbole de Kronecker ($\delta_{ij}=0$ pour $i \neq j$ et $\delta_{ij}=1$ pour $i=j$).

Les fonctions de distribution partielles $g_{ij}(r)$ sont déterminées à partir des équations Ornstein-Zernike et HNC, qui font intervenir les fonctions de corrélations totales $h_{ij}(r)=g_{ij}(r)-1$ et directes $c_{ij}(r)$. L'équation HNC s'écrit notamment :

$$g_{ij}(r) = \exp\left[-U_{ij}(r)/k_B T + h_{ij}(r) - c_{ij}(r)\right] \text{ avec } \gamma_{ij}(r) = h_{ij}(r) - c_{ij}(r) \quad (\text{III-9})$$

Par analogie avec le modèle à un composant, le principe des simulations (Figure III.A.3) est alors de partir d'un jeu de trois potentiels directs $U_{cc}(r)$, $U_{cp}(r)$ et $U_{pp}(r)$ et de calculer itérativement les trois fonctions de distributions partielles $g_{ij}(r)$ et ainsi les trois facteurs de structure partiels $S_{ij}(r)$. Connaissant alors les facteurs de formes $I_c^0(s)$ et $I_p^0(s)$, l'intensité diffusée théorique totale $I(s)$ est calculée puis comparée à l'intensité expérimentale.

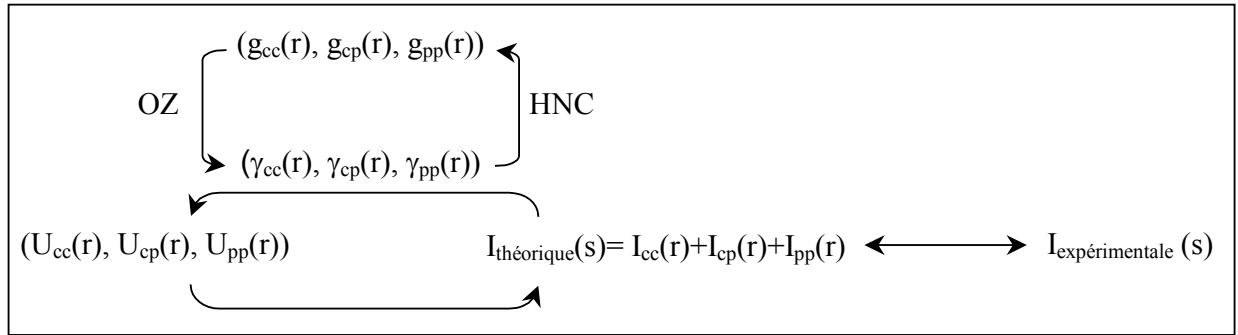


Figure III.A.3 : Principe des traitements numériques dans le cas du modèle à « deux composants ».

Une fois réalisé l'ajustement entre intensités expérimentales et théoriques, on peut accéder à la fonction de distribution relative aux protéines, $g_{cc}(r)$, et donc au potentiel « effectif » interprotéique U_{cc}^{eff} via la relation :

$$U_{cc}^{\text{eff}} = -k_B T \ln g_{cc}(r) + k_B T \gamma_{cc}^{\text{eff}}(r) \quad (\text{III-10})$$

$U_{cc}^{\text{eff}}(r)$ correspond au potentiel qui donnerait avec le modèle à « un composant » la même fonction de distribution $g_{cc}(r)$ que celle obtenue avec le modèle à deux composants. Il représente par conséquent le potentiel existant entre protéines moyenné sur l'ensemble des interactions protéine-protéine, protéine-polymère, polymère-polymère. Dans notre cas, la concentration en protéine est suffisamment faible pour négliger la fonction $\gamma_{cc}^{\text{eff}}(r)$. Le potentiel effectif est alors directement relié à la fonction de distribution partielle $g_{cc}(r)$:

$$U_{cc}^{eff}(r) \cong -k_B T \ln g_{cc}(r) \quad (III-11)$$

Le potentiel attractif de déplétion, $U_{déplétion}(r)$, induit par les molécules de polymère, peut simplement s'écrire :

$$U_{déplétion}(r) = U_{cc}^{eff}(r) - U_{cc}(r), \quad (III-12)$$

où $U_{cc}(r)$ est le potentiel direct (en absence de polymères) entre les molécules de protéines.

Il est important de noter que si l'intensité diffusée par les polymères I_{pp} ainsi que l'intensité « croisée » I_{cp} étaient négligeables devant l'intensité diffusée par les molécules de protéines I_{cc} , on pourrait utiliser le modèle à « un composant » et accéder plus facilement au potentiel de déplétion par l'intermédiaire des deux équations ci-dessus. Cependant, même dans ce cas-là, le modèle à deux composants présente un intérêt important car il nous donne des informations sur les interactions directes protéine-polymère et par ailleurs, il présente un caractère plus prédictif que le modèle à un composant. En effet, en décrivant en amont correctement les potentiels directs protéine-protéine, protéine-polymère et polymère-polymère, ce modèle peut nous fournir directement c'est-à-dire sans comparaison avec l'expérience, le potentiel de déplétion, ce que ne peut faire le modèle à un composant.

2. Détermination des facteurs de forme

Afin de mener à bien les simulations à deux composants, nous avons besoin de connaître les facteurs de forme $I_c^0(s)$ de la protéine et $I_p^0(s)$ du polymère.

Pour la protéine, nous avons déterminé le facteur de forme $I_c^0(s)$ à faible concentration en protéines comme dans le cas des simulations à un composant ($c_c = 1.8 \text{ mg/ml}$).

Pour le polymère, nous aurions pu aussi adopter une démarche similaire, c'est-à-dire évaluer le facteur de forme à faible concentration en polymère. Cependant, le signal de DXPA étant très faible, l'incertitude sur le facteur de forme aurait été trop importante. Nous avons donc décidé de considérer le facteur de forme des polymères égal au facteur de forme de Debye, valable pour une chaîne gaussienne (Debye 1946) :

$$I_p^0(s) = I_p^0(0) \cdot \frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x) \quad (III-13)$$

avec $x = 4\pi^2 s^2 R_g^2$, où R_g est le rayon de giration du polymère. $I_p^0(0)$ est fonction du contraste de densité électronique associé au polymère. Les paramètres R_g et $I_p^0(0)$ ont été déterminés en modélisant le signal DXPA des solutions de polymères avec le facteur de forme

de Debye. Pour un polymère de taille donnée, afin d'ajuster au mieux les courbes expérimentales, il a été nécessaire de faire varier ces deux paramètres en fonction de la concentration en PEG ajouté (voir paragraphe B.II.1). La modélisation du facteur de forme du PEG suivant le modèle de Debye a déjà été réalisée avec succès par d'autres auteurs (Abbott, Blankschtein et al. 1992; Branca, Faraone et al. 2000).

3. Modèles de potentiels choisis

Nous allons dans ce paragraphe présenter les potentiels directs choisis pour modéliser les interactions protéine-protéine ($U_{cc}(r)$), protéine-polymère ($U_{cp}(r)$) et polymère-polymère ($U_{pp}(r)$).

Tout comme pour le modèle à un composant, le potentiel direct protéine-protéine, caractérisant les interactions entre protéines en absence de polymères, a été modélisé par un potentiel DLVO fonction de cinq paramètres : le diamètre σ de la protéine, la charge Z de la protéine, la force ionique I de la solution, la profondeur J_{vdW} et la portée d_{vdW} du potentiel de Van der Waals.

Les interactions polymère-polymère sont parfois décrites dans la littérature comme la « somme » de multiples interactions entre les monomères de chacun des polymères. Cependant une telle approche devient rapidement non triviale dès que l'on considère des solutions concentrées où les molécules de polymères interagissent entre elles et s'interpénètrent. Une autre alternative est de décrire les solutions de polymères dans le cadre d'une approche colloïdale et de considérer les polymères comme des sphères caractérisées par leur rayon, comme l'ont proposé, dès les années 50, Flory et Krigbaum (Flory et Krigbaum 1950). L'interaction polymère-polymère se simplifie et devient simplement une interaction entre deux sphères comme dans le cas de la description des interactions protéine-protéine. Cependant contrairement aux colloïdes ou aux protéines, les molécules de polymère sont flexibles et susceptibles de s'interpénétrer. Aussi, une première approche est de modéliser l'interaction polymère-polymère comme une interaction entre deux sphères dures de rayon inférieur au rayon externe des polymères, pour symboliser leur interpénétration. Un tel modèle a été employé dans la littérature dans le cas du PEG mais n'a pas donné de résultats entièrement satisfaisants (Abbott, Blankschtein et al. 1992). Par conséquent, nous nous sommes inspirés d'une approche représentant les molécules de polymère comme des colloïdes « mous » (ou « soft colloid ») (Figure III.A.4) récemment développée par Bolhuis, Louis, Meijer et Hansen (Bolhuis, Louis et al. 2001). Il a ainsi été montré qu'une solution de

polymères pouvait être décrite comme une solution de colloïdes mous interagissant suivant un potentiel gaussien de la forme :

$$U_{pp}(r) = J_p \cdot \exp\left(-\left(\frac{r}{R_p}\right)^2\right), \quad (\text{III-14})$$

où R_p est la portée du potentiel de l'ordre du rayon de giration du polymère et J_p est un préfacteur de l'ordre de $2k_B T$.

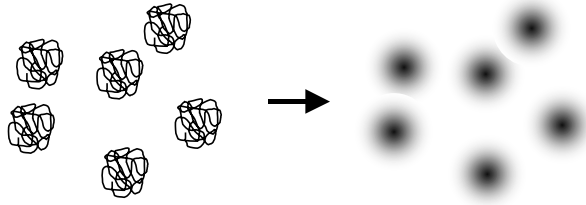


Figure III.A.4 : Modélisation des chaînes polymériques par des « colloïdes mous ».

Pour caractériser le potentiel direct protéine-polymère $U_{cp}(r)$, nous avons adopté une approche similaire. Le potentiel répulsif entre la protéine et le polymère a été modélisé par un potentiel mou entre le centre de masse du polymère et la surface de la protéine (Bolhuis, Louis et al. 2001; Bolhuis et Louis 2002). Nous avons choisi de modéliser cette interaction répulsive par un potentiel de Yukawa dépendant seulement de deux paramètres :

$$U_{cp}(r) = +\infty \text{ pour } r \leq \sigma/2 \quad (\text{III-15})$$

$$U_{cp}(r) = J_{cp} \cdot \frac{\sigma}{2r} \cdot \exp\left(-\frac{r - \sigma/2}{d_{cp}}\right) \text{ pour } r > \sigma/2$$

où J_{cp} et d_{cp} sont respectivement l'intensité et la portée du potentiel protéine-polymère.

Il faut noter que très récemment Bolhuis et Louis ont montré qu'on pouvait rendre compte des simulations numériques en modélisant les interactions polymère-polymère et colloïde sphérique-polymère sous la forme d'une somme de gaussiennes dont les coefficients dépendent de la concentration en polymères (Bolhuis et Louis 2002). Nous avons choisi les potentiels décrits ci-dessus par souci de simplification et en vue de décrire les interactions polymère-polymère et protéine-polymère avec le minimum de paramètres.

B. RESULTATS

Nous avons utilisé les modèles « à un composant » et à « deux composants » pour caractériser les potentiels d'interaction entre protéines en solution. Tous les résultats exceptés ceux présentés dans le paragraphe B.II.6 ont été obtenus sur l'urate oxydase. Dans le paragraphe B.II.6, les résultats obtenus sur l'urate oxydase sont comparés à ceux obtenus sur deux autres protéines la γ -crystalline et l' α -crystalline.

I. Solutions de protéines dans leur tampon avec et sans sel

Afin de déterminer les potentiels d'interaction entre les protéines en solution dans leur tampon à différents pHs, avec et sans sel ajouté, nous avons utilisé le modèle à un composant. Selon ce traitement théorique décrit dans la partie précédente, le facteur de structure théorique est calculé à partir du modèle DLVO et dépend de cinq paramètres : le diamètre σ de la protéine, la charge effective Z de la protéine, la force ionique I de la solution, la profondeur J_{vdw} et la portée d_{vdw} du potentiel de Van der Waals.

La structure cristallographique de l'urate oxydase nous indique que ses dimensions externes sont comprises entre 60Å et 85Å, avec une moyenne autour de 70Å. La comparaison du facteur de forme expérimental à l'intensité théorique diffusée par une sphère pleine de densité électronique uniforme et de diamètre σ a montré que l'urate oxydase est assimilable à une sphère pleine de diamètre 80Å (voir Chapitre II, Figure II.A.3). La molécule d'urate oxydase possédant un tunnel en son centre, cette comparaison n'est qu'indicative. Dans nos traitements numériques, nous avons fait varier la valeur du diamètre de l'urate oxydase autour de cette valeur de 80Å. Les variations observées sur les facteurs de structure expérimentaux en fonction du pH avec et sans sels ne sont pas suffisamment significatives pour distinguer sans ambiguïté les ajustements réalisés avec une valeur de diamètre comprise entre 70Å et 85Å. Par contre, les courbes expérimentales réalisées avec un ajout de PEG présentées dans la suite sont ajustées au mieux avec un diamètre de 76Å à moins de 2Å près. Par conséquent, la valeur de $\sigma=76Å$ (en accord avec les dimensions données par la structure cristallographique) a été conservée pour l'ensemble des traitements numériques qui suivent.

Nous avons vu dans la seconde partie qu'il existait un potentiel attractif de Van der Waals non nul entre les molécules d'urate oxydase. En considérant l'urate oxydase comme une protéine compacte, approximation raisonnable dans la mesure où son « tunnel » ne représente qu'une petite fraction de son volume total, il est possible a priori d'avoir une idée du potentiel de Van der Waals entre les molécules d'urate oxydase. En effet, pour une

protéine compacte, la constante de Hamaker dans l'eau vaut environ $3k_B T$ (Malfois, Bonneté et al. 1996; Roth, Neal et al. 1996). Le potentiel de Van der Waals s'identifie alors à un potentiel de Yukawa avec une profondeur $J_{vdW}=2.5k_B T$ et une portée $d_{vdW}=3\text{\AA}$ (Malfois, Bonneté et al. 1996). Malfois et coll. ont par ailleurs montré sur l'exemple des γ -cristallines que le potentiel attractif rendant compte des données expérimentales avait une portée très courte par rapport au diamètre de la protéine ($d_{vdW}\approx\sigma/12$). Dans notre cas plusieurs couples (par exemple ($J_{vdW}=1.7k_B T$, $d_{vdW}=6\text{\AA}$), ($J_{vdW}=2.5k_B T$, $d_{vdW}=3\text{\AA}$) et ($J_{vdW}=3.1k_B T$, $d_{vdW}=1\text{\AA}$)) peuvent rendre compte des résultats expérimentaux. En accord avec les travaux de Malfois et coll., nous avons choisi de fixer la profondeur et la portée du potentiel de Van der Waals à $J_{vdW}=2.5k_B T$ et $d_{vdW}=3\text{\AA}$ ($\approx\sigma/20$).

La force ionique I de la solution est imposée par le tampon et éventuellement les sels utilisés. Par conséquent, le seul paramètre restant que nous avons considéré comme variable est la charge effective de la protéine Z . Cette charge ne peut être calculée aisément dans la mesure où elle tient compte non seulement de l'ionisation des groupements acido-basiques de la protéine mais aussi de l'éventuelle adsorption des ions sur la protéine. Dans le cas du lysozyme, cette charge effective a été correctement évaluée par une approche de type Poisson-Boltzmann (Retailleau, Riès-Kautt et al. 1999). Dans le cas de l'urate oxydase, ce calcul devient plus complexe pour deux raisons. La première est que cette protéine est un tétramère : on peut donc difficilement connaître la charge du tétramère en évaluant celle du monomère dans la mesure où certains résidus chargés se trouvent aux interfaces dimériques ou tétramériques et se « neutralisent » par pont ionique. D'autre part, la structure tridimensionnelle de l'urate oxydase présente un tunnel. Par conséquent, certains résidus chargés se trouvent exposés dans ce tunnel et non à l'extérieur de la protéine. Il est donc fort probable qu'ils ne participent pas de la même façon aux interactions répulsives coulombiennes que les autres résidus chargés.

En laissant uniquement cette charge effective variable, nous avons pu ajuster les facteurs de structure expérimentaux en fonction du pH (Figure III.B.1). A un pH de 7.5, une charge effective nulle est trouvée ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où nous avons vu dans le chapitre précédent que le point isoélectrique était voisin de 7.5 (voir courbe de titration Chapitre II, Figure II.B.3) et que le second coefficient du viriel en fonction du pH présentait un minimum à ce même pH.

Les valeurs de charge effective déterminées à l'aide du programme à un composant sont inférieures aux valeurs théoriques calculées à partir de la séquence de la protéine (Chapitre II,

Figure II.B.3). Ainsi à un pH de 10.5, nous trouvons une charge effective de -16.5 , alors qu'à partir de la courbe de titrage du monomère nous évaluons une charge de -80 pour le tetramère. Plusieurs explications peuvent être avancées. Tout d'abord, le pH de 10.5 est très proche des pKas des résidus lysine et tyrosine et donc la charge théorique calculée à partir de la séquence de la protéine est forcément approximative. De plus rappelons que les charges effectives déterminées avec le modèle à un composant tiennent compte de l'adsorption des ions sur les protéines et de l'«annulation» de certaines charges à l'interface entre deux monomères et entre deux dimères.

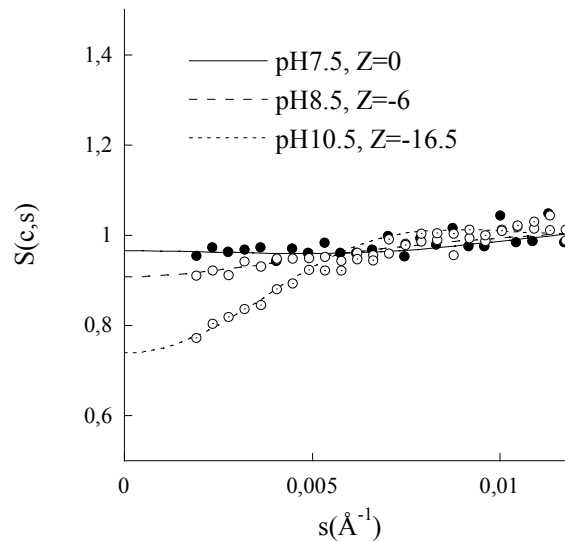


Figure III.B.1 : Facteurs de structure expérimentaux (points) et facteurs de structure théoriques en fonction du pH pour une concentration en protéine de 14.5mg/ml. Pour plus de clarté sur cette figure et sur les suivantes, seulement la moitié des points expérimentaux a été représentée.

Par ailleurs pour confirmer la valeur des paramètres déterminés, nous avons utilisé le même modèle pour ajuster les courbes expérimentales après ajout de sel (NaAc) à pH 8.5 et pH 10.5. Si comme nous l'a montré l'étude sur les interactions dans la deuxième partie, le rôle du sel dans le cas de l'urate oxydase est uniquement d'écranter la charge de la protéine, seule la force ionique, calculable à partir de la concentration en sel ajouté, doit varier. Nous avons réalisé ainsi les ajustements des courbes expérimentales (Figure III.B.2) et nous pouvons voir que les courbes expérimentales peuvent être correctement ajustées sans faire varier aucun paramètre ce qui valide le modèle utilisé (DLVO) ainsi que les paramètres que l'on a déterminés.

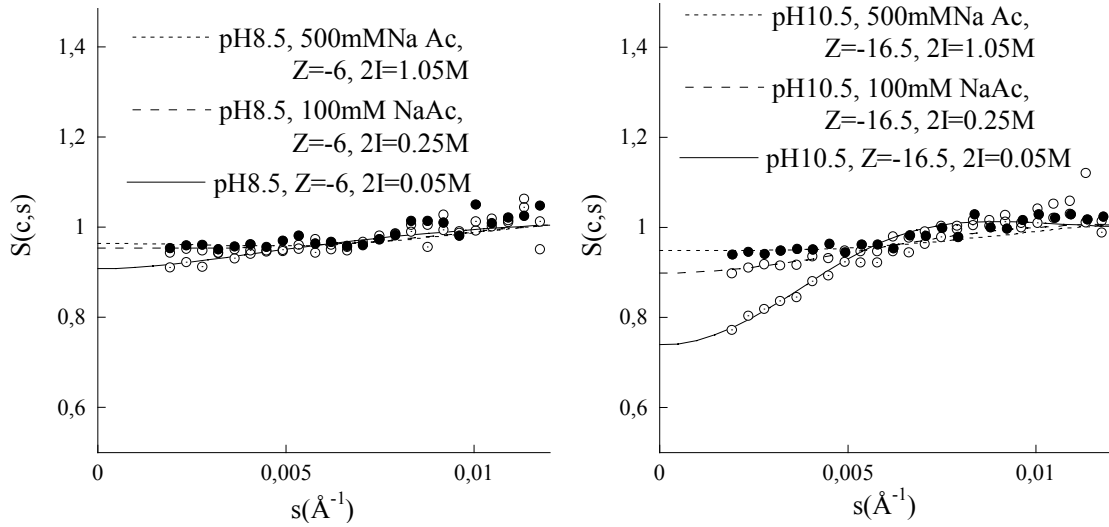


Figure III.B.2 : Facteurs de structure expérimentaux (points) et théoriques en fonction de l'ajout de sel (NaAc) à deux pHs différents (pH 8.5 et pH 10.5) pour une concentration en protéine de 14.5mg/ml.

II. Solutions de protéines en présence de PEG

1. Solutions pures de protéines et de polymères : détermination de $U_{cc}(r)$, $U_{pp}(r)$ et $I_p^0(s)$

Nous avons modélisé les courbes de diffusion expérimentales à pH 8.5 en présence de PEG à l'aide du modèle « à deux composants ». Nous avons en premier lieu caractérisé les potentiels directs PEG-PEG, protéine-protéine ainsi que les facteurs de forme relatifs au PEG et à la protéine. Rappelons que nous faisons l'hypothèse que les potentiels directs protéine-protéine $U_{cc}(r)$ et polymère-polymère $U_{pp}(r)$ sont identiques au sein du mélange et dans les solutions pures de chacun des constituants. Nous avons donc déterminé les potentiels directs $U_{cc}(r)$ et $U_{pp}(r)$ respectivement dans la solution de protéines pures et dans celle de PEG pur en utilisant le modèle à un composant.

La caractérisation de $U_{cc}(r)$ a été présentée dans le paragraphe précédent, les paramètres du potentiel DLVO résultant étant à pH 8.5: $\sigma=76\text{\AA}$, $Z=-6$, $2I=0.05\text{M}$, $J_{vdW}=2.5k_B T$ et $d_{vdW}=3\text{\AA}$.

L'étude des solutions de polymères purs a été réalisée pour différentes concentrations de deux PEGs différents : 1%, 3% et 8% pour le PEG 3.35kDa ; 0.5%, 1%, 3% et 5% pour le PEG 8kDa. Considérant que les solutions de polymères sont idéales, c'est-à-dire sans interactions à faible concentration en polymères, nous avons tout d'abord ajusté (Figure III.B.3) les courbes expérimentales à l'aide de la relation : $I_p(s)=c_p \cdot I_p^0(s)$ ($S_{pp}(s)=1$), où $I_p^0(s)$ est le facteur de forme donné par l'expression de Debye. Selon l'expression de Debye (eq. (III-13)), $I_p^0(s)$ dépend de deux paramètres : $I_p^0(0)$ l'intensité à l'origine, considérée ici comme

un facteur multiplicatif, et R_g le rayon de giration du polymère. Les rayons de giration obtenus ainsi pour le PEG 8kDa (0.5% et 1%) et pour le PEG 3.35kDa (1%) sont respectivement égaux à 34Å et 20Å. Ces valeurs sont en accord avec des études précédentes (Vincent, Luckham et al. 1980; Devanand et Selser 1991; Abbott, Blankschtein et al. 1992; Kawaguchi, Imai et al. 1996).

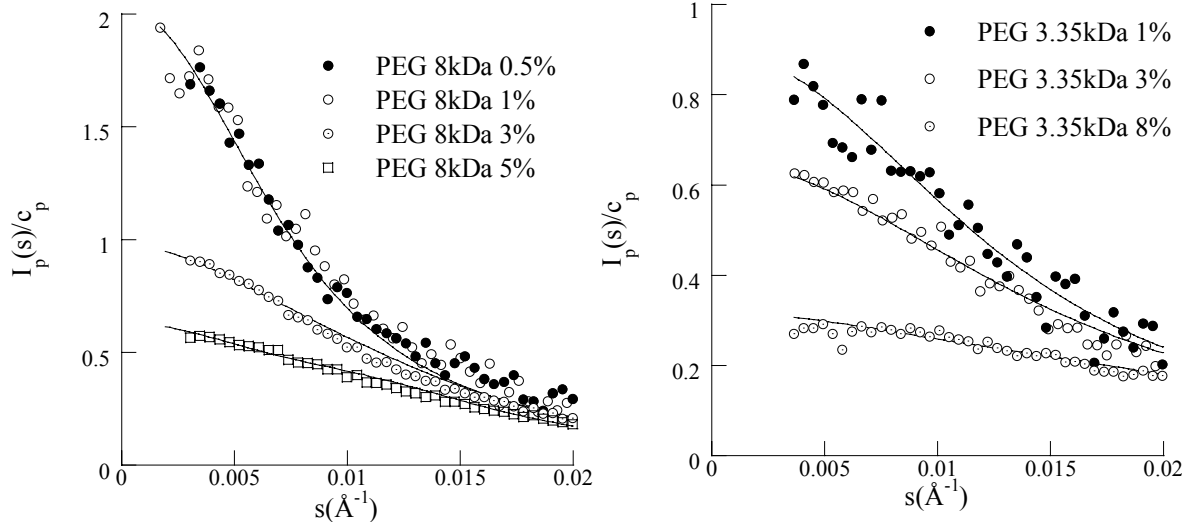


Figure III.B.3 : Courbes expérimentales et théoriques des intensités diffusées par les solutions de polymères purs. Les paramètres d'ajustement sont répertoriés sur le Tableau III.B.1.

Le fait qu'on puisse ajuster la courbe obtenue à une concentration de 1% dans le cas du PEG 8kDa avec simplement un facteur de forme, comme pour une concentration de 0.5%, montre l'absence d'interactions (détectables) à cette concentration. Pour les autres concentrations en PEG, les courbes de DXPA expérimentales ont été ajustées en considérant que l'intensité s'écrit : $I_p(c,s) = c \cdot I_p^0(s) \cdot S_{pp}(s)$. Le facteur de structure $S_{pp}(s)$ est déterminé à partir du modèle à un composant en utilisant comme potentiel direct, le potentiel gaussien de

sphères molles précédemment décrit : $U_{pp}(r) = J_p \exp\left(-\left(\frac{r}{R_p}\right)^2\right)$ (eq.(III-14)). Nous avons fixé

le préfacteur de ce potentiel J_p à $2k_B T$, en accord avec les récents travaux théoriques de Bolhuis et coll. (Bolhuis, Louis et al. 2001). Le seul paramètre variable reste alors la portée du potentiel R_p . Il faut noter que, dans notre cas, ce paramètre R_p n'est pas constant et dépend de la concentration en polymères. L'ajustement des courbes de DXPA expérimentales est donnée sur la Figure III.B.3 et les paramètres déterminés lors d'ajustement sont répertoriés sur le Tableau III.B.1. Nous pouvons notamment remarquer que la portée du potentiel direct R_p est de l'ordre du rayon de giration R_g du polymère et augmente avec la concentration en polymères.

PEG	% (wt/v)	$R_g(\text{\AA})$	$R_p(\text{\AA})$
8kDa	0.5	34	-
	1	34	-
	3	34	37
	5	38	39
3.35kDa	1	20	-
	3	20	20
	8	22	23.5

Tableau III.B.1 : Paramètres permettant d'ajuster les courbes expérimentales et théoriques dans le cas des solutions de PEG purs.

2. Mélanges protéine-polymère : détermination de $U_{cp}(r)$

Nous avons étudié les mélanges d'urate oxydase à pH 8.5 en présence de PEG 8kDa à 1%, 3% et 5% et de PEG 3.35kDa à 3% et 8%. Pour ajuster les courbes expérimentales, nous avons utilisé le modèle à deux composants en considérant que les potentiels directs $U_{cc}(r)$ et $U_{pp}(r)$ s'identifiaient à ceux déterminés dans les solution pures de protéines et de polymères. Aussi, afin d'ajuster les courbes expérimentales, nous avons considéré comme variable le potentiel protéine-polymère $U_{cp}(r)$, fonction de deux paramètres caractérisant son intensité J_{cp} et sa portée d_{cp} .

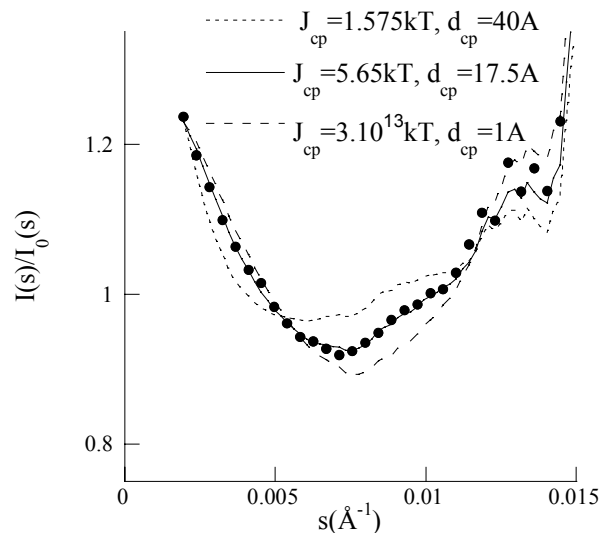


Figure III.B.4 : Courbes expérimentales (points) et théoriques du rapport $I(s)/I_0(s)$, où $I(s)$ est l'intensité totale diffusée et $I_0(s)$ est l'intensité diffusée par la solution de protéines en absence de PEG ($c=14.5\text{mg/ml}$; PEG 8kDa 5%).

Nous avons en premier lieu ajusté les courbes montrant le plus d'interactions attractives : ($c=14.5\text{mg/ml}$, PEG 8kDa 5%) pour le PEG 8kDa et ($c=14.5\text{mg/ml}$, PEG 3.35kDa 8%) pour le PEG 3.35kDa. La Figure III.B.4, sur laquelle est tracée l'intensité diffusée totale $I(s)$ sur l'intensité diffusée en absence de PEG $I_0(s)$, illustre le résultat de l'ajustement dans le cas du PEG 8kDa 5%. Nous pouvons remarquer que si plusieurs couples (J_{cp}, d_{cp}) peuvent rendre compte du rapport $I(s)/I_0(s)$ à l'origine, « un » seul de ces couples permet d'ajuster la courbe sur toute la gamme de angulaire. L'incertitude sur les courbes expérimentales étant inférieure à 1%, le couple (J_{cp}, d_{cp}) peut être caractérisé avec suffisamment de précision.

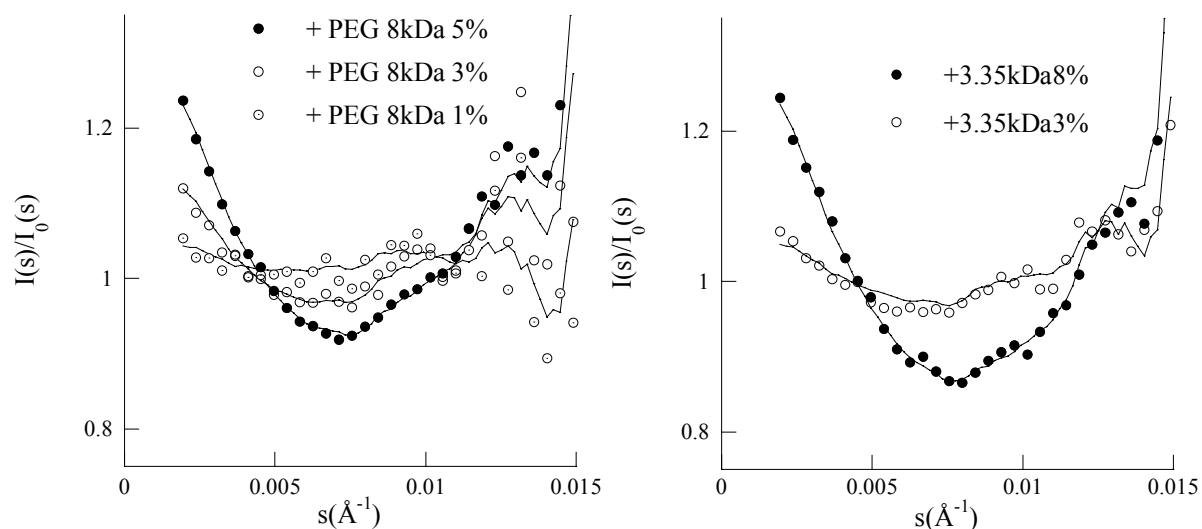


Figure III.B.5 : Courbes expérimentales et théoriques du rapport $I(s)/I_0(s)$ dans le cas du PEG 8kDa 1%, 3% et 5%, et du PEG 3.35kDa 3% et 8% pour une concentration en protéines de 14.5mg/ml. Les couples de paramètres (J_{cp}, d_{cp}) permettant d'ajuster les courbes sont cités dans le texte.

Les valeurs permettant d'assurer le meilleur ajustement des courbes sont : ($J_{cp}=5.65k_B T$ et $d_{cp}=17.5\text{\AA}$) pour le PEG 8kDa 5% et ($J_{cp}=5.25k_B T$ et $d_{cp}=10\text{\AA}$) pour le PEG 3.35kDa 8%. Nous avons par ailleurs contrôlé qu'une modification de $\pm 2.5\text{\AA}$ sur d_{cp} , et un changement correspondant sur J_{cp} pour ajuster les courbes, ne modifiaient pas la suite des résultats obtenus.

Les courbes avec un ajout de PEG 8kDa 1% et 3% et PEG 3.35 kDa 3% ont pu être correctement modélisées en ne modifiant que la concentration en polymères et en conservant les mêmes couples de paramètres (J_{cp}, d_{cp}) cités ci-dessus (Figure III.B.5). Il faut cependant préciser que pour ces expériences, réalisées à plus faibles concentrations en PEG, les interactions sont moins attractives et par conséquent les variations des rapports $I_0(s)/I(s)$ en

fonction de l'angle de diffusion s sont moins significatives. Il est donc plus difficile de distinguer plusieurs couples (J_{cp}, d_{cp}) comme pour les conditions les plus attractives.

Quelle que soit la concentration en PEG, nous trouvons que le potentiel protéine-polymère est donc quasiment constant (Figure III.B.6). Ce résultat est attendu dans la mesure où le potentiel direct représente un potentiel entre deux particules isolées et ne doit pas dépendre de la concentration de l'une ou l'autre des particules.

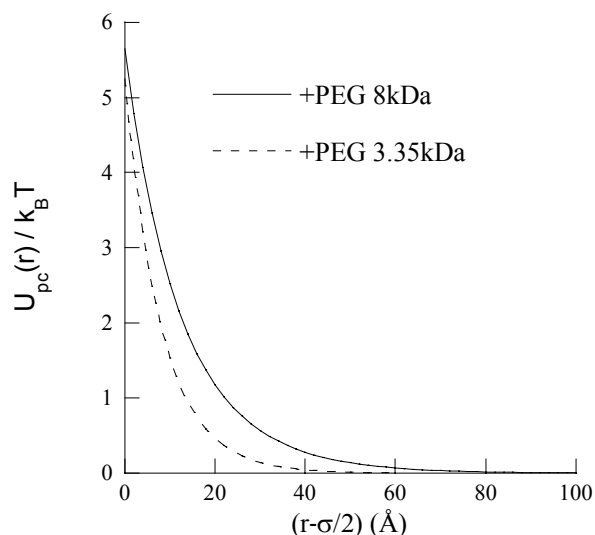


Figure III.B.6 : Représentation des potentiels directs protéine-polymère $U_{pc}(r)$ utilisés pour ajuster les courbes expérimentales en présence de PEG 8kDa et de PEG 3.35kDa. en fonction de $(r-\sigma/2)$.

De façon similaire, pour une concentration et une taille de PEG données, en ne modifiant aucun paramètre mis à part la concentration en protéines, les courbes de diffusion expérimentales peuvent être modélisées (Figure III.B.7).

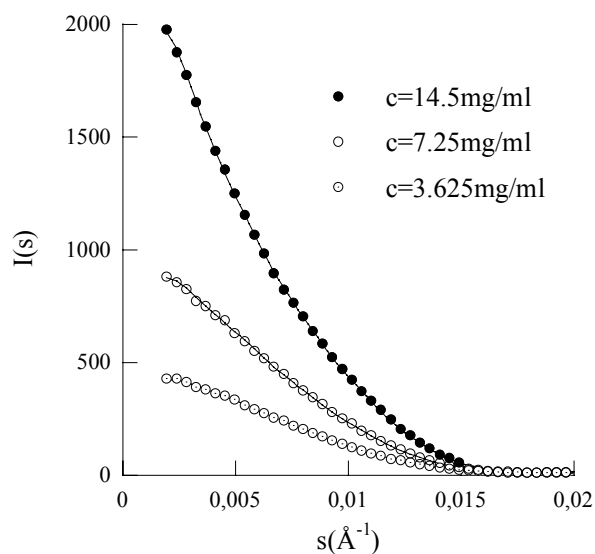


Figure III.B.7 : Intensités diffusées expérimentales et théoriques pour différentes concentrations en protéines dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 5%.

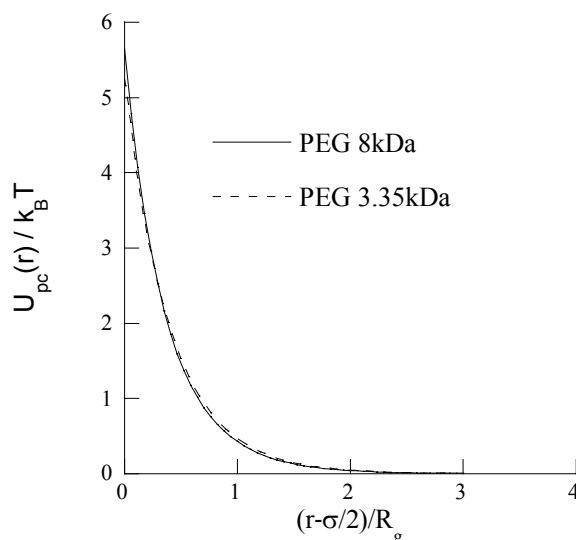


Figure III.B.8 : Représentation des potentiels directs protéine-polymère $U_{pc}(r)$ utilisés pour ajuster les courbes expérimentales en présence de PEG 8kDa et de PEG 3.35kDa en fonction de $(r-\sigma/2)/R_g$.

Nous avons par ailleurs tracé sur la Figure III.B.8, les potentiels directs protéine-polymère en fonction de $(r-\sigma/2)$ normalisé par rapport au rayon de giration R_g de chacun des PEGs.

Suivant cette représentation le potentiel direct protéine-polymère ne dépend que très peu de la concentration et de la taille du polymère ajouté. Ce résultat est particulièrement intéressant car il signifierait que l'on puisse prédire le potentiel PEG –urate oxydase, quelle que soit la masse du PEG.

De plus, ce potentiel est non nul à la surface de la protéine, ce qui montre que le centre de masse peut se trouver au cœur de la protéine et que le polymère peut éventuellement s'enrouler autour de la protéine. Cette observation n'est pas surprenante dans la mesure où les tailles des polymères et de la protéine sont comparables. Ces résultats confirment les prédictions théoriques de Bolhuis et Louis (Bolhuis et Louis 2002).

3. Détermination de l'interaction attractive de déplétion

A partir des traitements numériques (voir partie A.), nous pouvons caractériser la fonction de distribution interprotéique $g_{cc}(r)$ et ainsi déterminer le potentiel effectif résultant : $U_{cc}^{eff}(r) \cong -k_B T \ln g_{cc}(r)$ (eq.(III-11)). Nous voyons que la portée et la profondeur du potentiel effectif augmente avec l'ajout de PEG (Figure III.B.9).

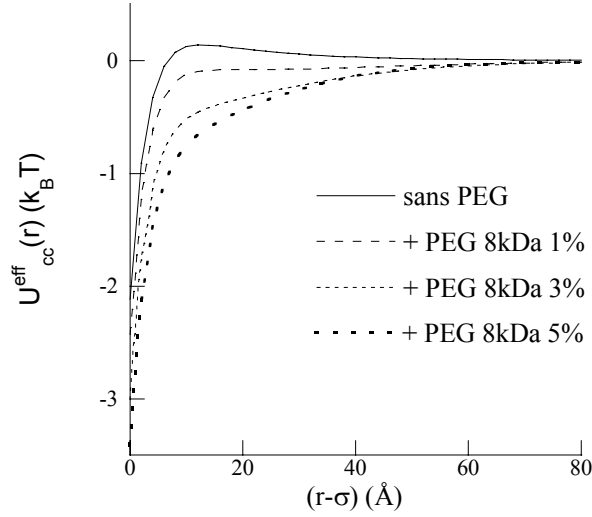


Figure III.B.9 : Potentiel effectif $U_{cc}^{eff}(r)$ protéine-protéine en fonction de la concentration en PEG ajouté dans le cas du PEG 8kDa.

Le potentiel de déplétion se calcule à partir du potentiel effectif en présence de PEG et du potentiel direct protéine-protéine (déterminé en absence de PEG) :

$$U_{\text{déplétion}}(r) = U_{cc}^{eff}(r) - U_{cc}(r) \text{ (eq.(III-12))}.$$

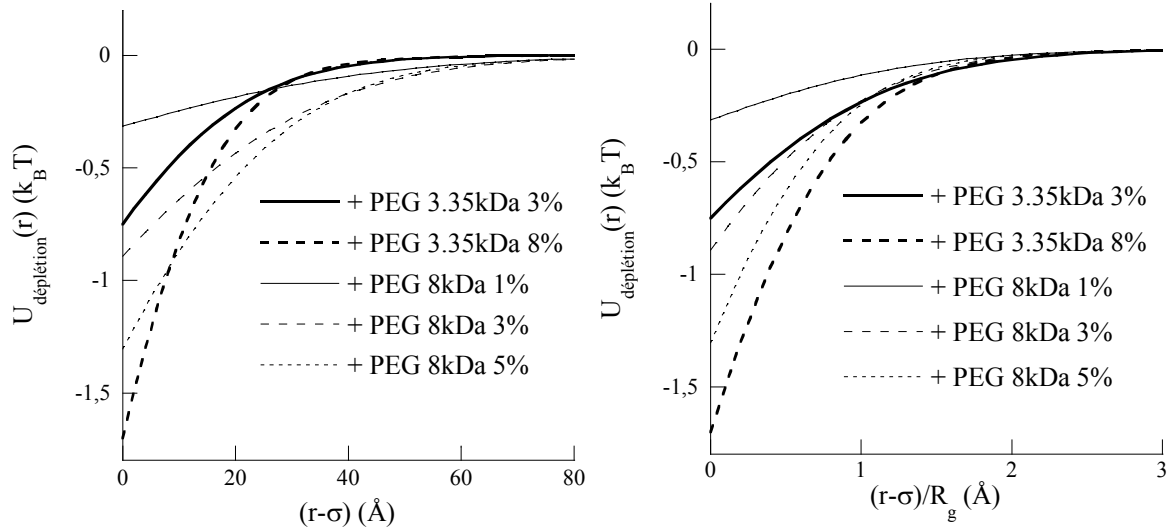


Figure III.B.10 : Représentation des potentiels de déplétion $U_{\text{déplétion}}(r)$ en présence de PEG 8kDa 1%, 3% et 5%, et de PEG 3.35kDa 3% et 8%. a) en fonction de $(r-\sigma)$; b) en fonction de $(r-\sigma)/R_g$.

Les potentiels de déplétion résultants sont représentés sur la Figure III.B.10. La profondeur du potentiel attractif de déplétion augmente avec la concentration en polymères quelle que soit la taille du polymère étudié. La portée du potentiel de déplétion obtenue augmente avec la taille du PEG ajouté et est approximativement égale au double du rayon de giration du polymère comme nous pouvons le voir en traçant le potentiel de déplétion en fonction de $(r-\sigma)/R_g$ (Figure III.B.10.b).

4. Importance du choix du potentiel direct protéine-polymère sur le potentiel de déplétion

Dans ce paragraphe, nous avons désiré vérifier l'influence du choix des potentiels directs polymère-polymère $U_{pp}(r)$ et protéine-polymère $U_{cp}(r)$ sur le potentiel de déplétion résultant. Si on néglige l'interaction répulsive polymère-polymère ($J_{pp}=0$) et donc que l'on considère la solution de polymère idéale, les courbes expérimentales ne peuvent être ajustées (données non montrées) car le potentiel de déplétion est surestimé (Figure III.B.11). Par conséquent, le potentiel répulsif polymère-polymère ne peut être négligé pour rendre compte de nos résultats expérimentaux. L'influence du potentiel direct protéine-polymère sur le potentiel de déplétion est aussi très importante. Nous avons déjà remarqué qu'en prenant un potentiel de sphères dures ($J_{cp}=3.10^{13}k_B T$, $d_{cp}=1\text{\AA}$) ou un potentiel trop « mou » ($J_{cp}=1.575k_B T$, $d_{cp}=40\text{\AA}$), les données expérimentales ne pouvaient être ajustées correctement sur toute la gamme angulaire étudiée (Figure III.B.4).

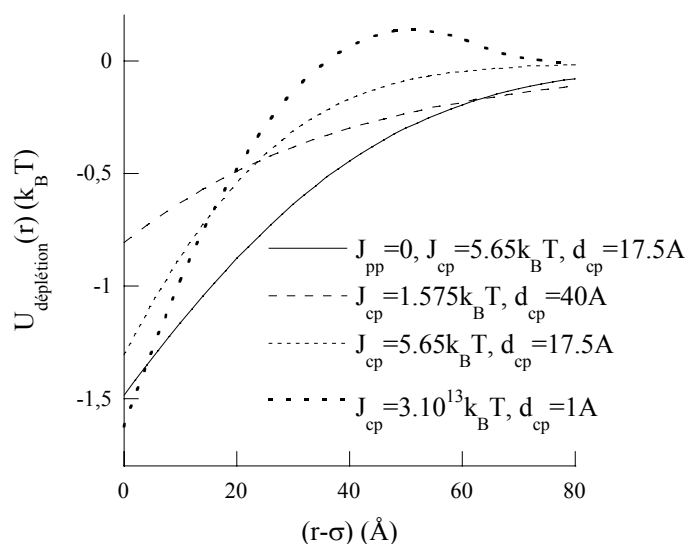


Figure III.B.11 : Influence des potentiels polymère-polymère (à travers J_{pp}) et protéine-polymère (à travers J_{cp} et d_{cp}) sur le potentiel de déplétion $U_{\text{déplétion}}(r)$ en présence de PEG 8kDa 5%.

Le potentiel de sphères dures caractérisé par le couple ($J_{cp}=3.10^{13}k_B T$, $d_{cp}=1\text{\AA}$) correspond à une interaction de sphères dures entre la protéine de diamètre $\sigma=76\text{\AA}$ et un polymère de rayon effectif $R\sim 32-33\text{\AA}$. Nous voyons sur la Figure III.B.11, que le potentiel de déplétion est profondément modifié : en effet, si le potentiel protéine-polymère est trop « dur », la profondeur du potentiel de déplétion est plus importante, sa portée plus faible et une faible composante répulsive apparaît pour $r\sim R_g$. Nous retrouvons ici l'allure caractéristique du potentiel de déplétion pour un mélange de sphères dures. Des variations opposées sont observées en prenant un potentiel protéine-polymère trop « mou ».

5. Comparaison avec les modèles analytiques

Nous allons comparer dans ce paragraphe, dans le cas de l'ajout du PEG 8kDa dans une solution d'urate oxydase, nos résultats avec les potentiels de déplétion obtenus avec deux modèles analytiques : le modèle d'Asakura-Oosawa et le modèle PRISM (Polymer Reference Interaction Site Model) développé plus récemment. Nous avons donné dans le premier chapitre l'expression du potentiel de déplétion selon le modèle d'Asakura-Oosawa :

$$\begin{aligned}
 U_{\text{déplétion}} &= +\infty \quad \text{pour } r \leq 2R_p \\
 U_{\text{déplétion}} &= -\frac{4}{3}\pi N_a c_p (R+R_p)^3 \left(1 - \frac{3r}{4(R+R_p)} + \frac{1}{2} \left[\frac{r}{2(R+R_p)} \right]^3 \right) \quad \text{pour } \sigma < r \leq \sigma + 2R_p \\
 U_{\text{déplétion}} &= 0 \quad \text{pour } r > \sigma + 2R_p,
 \end{aligned}
 \tag{III-16}$$

Suivant ce modèle la solution de polymère est considérée comme idéale et les interactions polymère-polymère nulles. Par ailleurs, l'interaction protéine-polymère est supposée être une interaction de sphères dures entre les protéines de diamètre σ et les polymères de rayon effectif de sphères dures R_p . Une bonne approximation dans le cas de solutions diluées de polymères est de considérer R_p égal au rayon de giration du polymère R_g . Nous avons trouvé, en utilisant le modèle de Debye (voir paragraphe B.II.1), que le rayon de giration du PEG 8kDa le plus adapté pour ajuster nos courbes expérimentales était égal à 34Å. Nous avons tracé sur la Figure III.B.12a le potentiel de déplétion prédit par Asakura-Oosawa (AO) en considérant $R_p=34\text{Å}$. Pour une concentration en PEG 8kDa de 1%, la profondeur du potentiel de déplétion prédite par le modèle AO est similaire à celle que nous trouvons, par contre la portée est légèrement inférieure. Pour les concentrations en PEG 8kDa de 3% et 5%, les profondeurs déterminées avec le modèle AO sont surestimées par rapport à nos valeurs. En laissant varier le rayon effectif de polymères avec la concentration en polymères, nous pouvons ajuster au mieux les profondeurs des potentiels calculés selon le modèle AO avec les potentiels déterminés selon le modèle « à deux composants » (Figure III.B.12b). Cependant pour une concentration en PEG 8kDa de 5%, si la profondeur est correctement ajustée, la portée du potentiel déterminée avec le modèle AO est plus courte. Des différences avec le modèle d'Asakura-Oosawa notamment à forte concentration en polymères ont déjà été mises en évidence dans la littérature (Ye, Narayanan et al. 1996; Weiss, Hörner et al. 1999), le modèle AO étant connu pour donner de bons résultats dans le cas de solutions diluées en polymères.

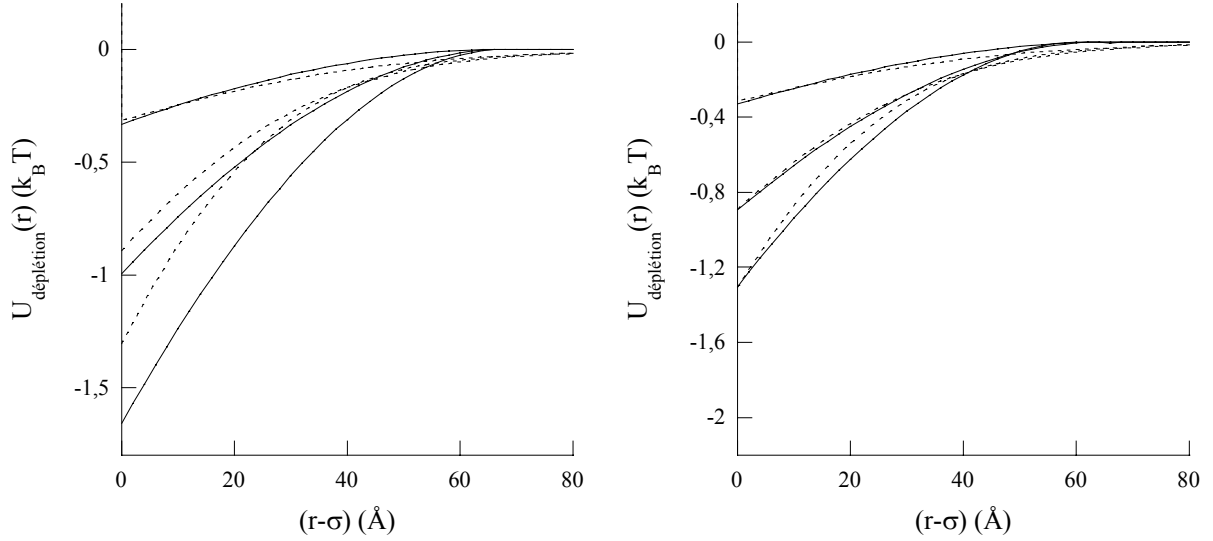


Figure III.B.12 : Comparaison avec le modèle analytique d'Asakura-Oosawa dans le cas du PEG 8kDa 1%, 3% et 5% (de haut en bas) ; en pointillés, les résultats obtenus avec le modèle à « deux composants ». a) avec un rayons de polymère effectif $R_p=34\text{\AA}$ b) avec un rayon de polymère effectif variable : $R_p=34\text{\AA}$ (PEG 8kDa 1%), $R_p=32.5\text{\AA}$ (PEG 8kDa 3%) et $R_p=30.7\text{\AA}$ (PEG 8kDa 5%).

Nous avons aussi comparé nos résultats de traitements numériques avec le modèle PRISM (Polymer Reference Interaction Site Model) récemment revisité par Chatterjee et Schweizer dans le cas des mélanges sphères dures – polymères (Chatterjee et Schweizer 1998). Ce modèle, qui a été utilisé pour décrire les interactions au sein du mélange PEG-lyzosome (Kulkarni, Chatterjee et al. 2000), considère le polymère comme une succession de segments (monomères) et calcule l'ensemble des corrélations segments-segments ainsi que segments-sphères dures (la sphère dure représentant le colloïde ou la protéine). Il prédit l'interaction attractive de déplétion suivante:

$$U_{\text{déplétion}} = +\infty \text{ pour } r < \sigma \quad (\text{III-17})$$

$$U_{\text{déplétion}}(r)/k_B T = -\ln \left(1 + \frac{\pi z}{3} \left(\frac{R}{r} \right) \left(\frac{R}{\sigma_p} \right) e^{-(r-\sigma)/\xi} \right) \text{ pour } r \geq \sigma,$$

où σ_p est la longueur effective statistique des segments donnée par $\sigma_p = \sqrt{\frac{6}{N}} R_g$ lorsque la concentration en polymère est inférieure à la concentration d'enchevêtrement, R_g étant le rayon de giration du polymère et N le nombre de segments (monomères) ; $z = N N_a c_p \sigma_p^3$ représente la densité de segments du polymère ; enfin ξ est la longueur de corrélation du polymère et son expression est la suivante : $\xi = \sigma \frac{1}{\sqrt{1-T/T_s}} \frac{1}{\sqrt{\frac{12}{N} + \frac{\pi z}{3}}}$.

T_s représente la température de décomposition spinodale relative à la séparation de phase polymère-solvant. T_s peut être considérée dans une première approximation égale à la température minimale à laquelle les mélanges polymère-solvant subissent une séparation de phase liquide-liquide. Cette température a déjà été déterminée pour différents PEGs dans l'eau et vaut environ 389K pour le PEG 8kDa (Saeki, Kuwahara et al. 1976; Kulkarni, Chatterjee et al. 2000). Par ailleurs, pour le calcul de l'interaction de déplétion à partir du modèle PRISM, on a considéré que cette température ne variait pas avec la concentration en polymère. Il est important de noter que seul la portée et non la profondeur du potentiel de déplétion dépend de T_s .

Nous avons représenté sur la Figure III.B.13, les potentiels de déplétion calculés à partir du modèle PRISM. Nous observons que contrairement au modèle d'Asakura-Oosawa, la portée du potentiel prédite par le modèle PRISM est similaire à celle que nous trouvons. Nous avons contrôlé qu'une variation de $\pm 20K$ sur T_s ne modifiait pas de manière significative la portée du potentiel PRISM. Par contre, quelle que soit la concentration en PEG 8kDa, la profondeur du potentiel de déplétion calculée par le modèle PRISM est inférieure à celle que nous avons déterminée.

L'intérêt du modèle PRISM par rapport au modèle d'Asakura-Oosawa est qu'il n'est fonction d'aucun paramètre variable. En effet, le modèle d'Asakura-Oosawa dépend du rayon effectif de sphères dures du polymère qu'il est nécessaire d'ajuster. Le modèle PRISM semble donc être un meilleur modèle pour prédire analytiquement le potentiel de déplétion induit par l'addition de polymères dans une solution colloïdale même si dans notre cas nous trouvons des différences concernant la profondeur du potentiel de déplétion.

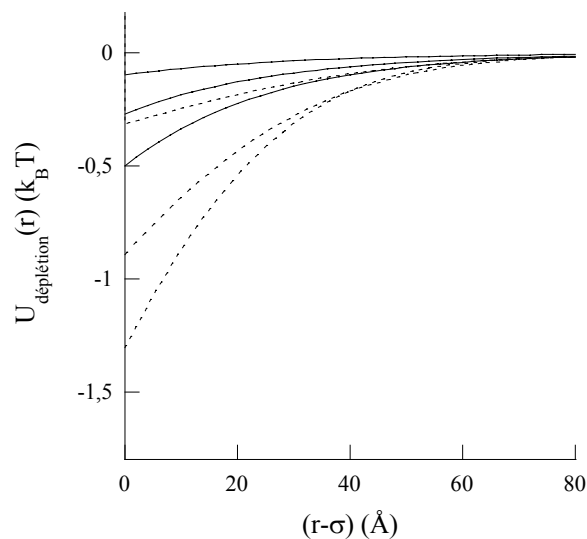


Figure III.B.13 : Comparaison avec le modèle analytique PRISM dans le cas du PEG 8kDa 1%, 3% et 5% (de haut en bas) ; en pointillés, les résultats obtenus avec le modèle à « deux composants ».

6. Etude d'autres protéines

Nous avons étudié suivant la même approche, basée sur le couplage des expériences de DXPA avec les modèles à « un composant » ou « deux composants », deux autres protéines : la γ S-cristalline, une protéine plus petite que l'urate oxydase ($M=20\text{kDa}$, $R\approx 20\text{\AA}$) et l' α -cristalline, une protéine plus grosse que l'urate oxydase ($M\approx 900\text{kDa}$, $R\approx 70\text{\AA}$). Ces protéines ont été extraites à partir de cristallins d'yeux de veaux, purifiées et concentrées au LMCP par T.Putilina et F.Skouri-Panet suivant le protocole décrit dans la thèse de S.Finet (Finet 1999). Les γ S-cristallines sont placées dans un tampon 50mM NaAcetate pH 4.5 ($pI\approx 7$), les α -cristallines étant pour leur part dans un tampon 150mM phosphate pH 6.8 ($pI\approx 5$).

Pour ces deux protéines, nous avons suivi la même approche que pour l'urate oxydase : nous avons déterminé les potentiels directs protéine-protéine dans les solutions de protéines pures ; les potentiels directs polymère-polymère ne dépendant pas de la protéine ajoutée ont été conservés égaux à ceux déterminés dans le cas de l'urate oxydase ; enfin pour chacune des protéines, le potentiel direct protéine-polymère a été considéré comme variable afin d'ajuster au mieux les courbes expérimentales. Une fois l'accord entre traitements numériques et expériences effectué, le potentiel effectif puis le potentiel de déplétion protéine-protéine ont été caractérisés. Ce travail a été réalisé dans quatre conditions précédemment étudiées avec l'urate oxydase : PEG 3.35kDa 3% et 8%, PEG 8Da 3% et 5%.

6.1. Etude des γ S-cristallines : détermination des potentiels directs protéine-protéine et protéine-polymère

Tout comme dans le cas de l'urate oxydase, nous avons assimilé le potentiel direct protéine-protéine au potentiel DLVO dépendant de cinq paramètres : le diamètre de la protéine σ , la charge effective de la protéine Z , la force ionique de la solution I ainsi que la profondeur J_{vdW} et la portée d_{vdW} du potentiel attractif de Van der Waals. La majorité de ces paramètres a déjà été déterminée pour les γ -cristallines à l'aide du modèle à un composant (Malfois, Bonneté et al. 1996). En reprenant les valeurs trouvées dans le travail de Malfois et coll., nous avons fixé à $36\text{\AA}$ le diamètre de la protéine et le potentiel de Van der Waals a été caractérisé par une profondeur de $2.5k_B T$ et une portée de $3\text{\AA}$. Seules restaient alors à fixer la force ionique et la charge de la protéine. La force ionique imposée par le tampon est égale à 0.05M. Le meilleur ajustement a été obtenu à l'aide du modèle à un composant pour une charge effective de $Z=+5$ (Figure III.B.14).

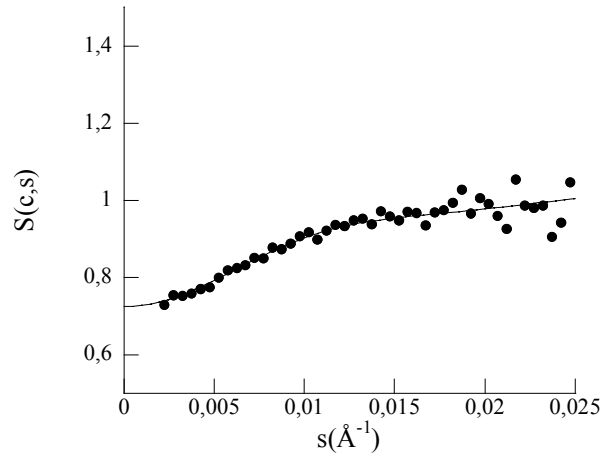


Figure III.B.14 : Facteur de structure expérimental (points) et théorique dans le cas des γ S-cristallines à une concentration de 40mg/ml dans le tampon 50mM NaAcetate pH 4.5. Les paramètres du potentiel DLVO correspondant sont indiqués dans le texte.

En présence de PEG, l'intensité diffusée à l'origine augmente légèrement comme nous pouvons le voir sur la Figure III.B.15. Cette légère variation est l'image d'interactions attractives induites par l'addition de polymères.

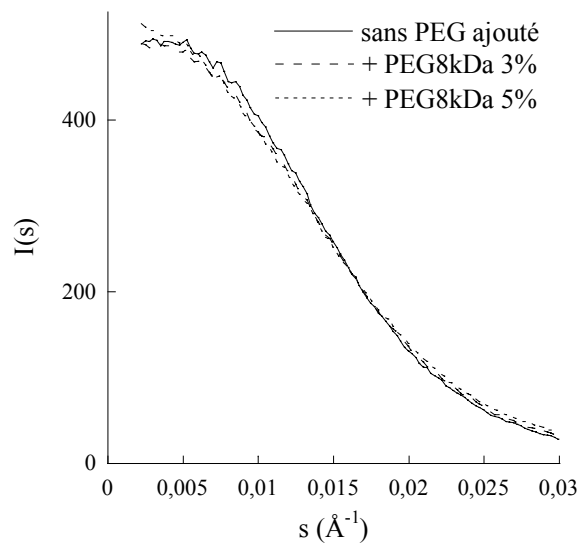


Figure III.B.15 : Intensités diffusées fonction de la concentration en PEG 8kDa par un mélange PEG 8kDa- γ S-cristallines pour une concentration en protéines de 40mg/ml (pH 4.5).

Le potentiel direct polymère-polymère a été conservé identique à celui déterminé lors de l'étude des mélanges PEG-urate oxydase. Le potentiel direct protéine-polymère a été ajusté à partir des courbes de diffusion des mélanges PEG - γ S-cristallines. Les résultats sont présentés sur la Figure III.B.16. Même si les intensités diffusées et les variations d'intensité en fonction de la concentration en PEG ajouté sont plus faibles que dans le cas de l'urate oxydase, nous avons pu déterminer avec suffisamment de précision les paramètres du potentiel direct protéine-polymère pour les concentrations en PEG et en protéines les plus importantes (PEG

8kDa 5% et PEG 3.35kDa 8%). En ce qui concerne les concentrations en PEG les plus faibles (PEG 8kDa 3% et PEG 3.35kDa 3%), pour lesquelles les variations sont encore moins visibles, nous avons conservé fixe la portée du potentiel direct protéine-polymère et déterminé la profondeur en ajustant les courbes expérimentales. Nous observons ainsi que la profondeur varie peu mais diminue avec la concentration en polymères ajouté.

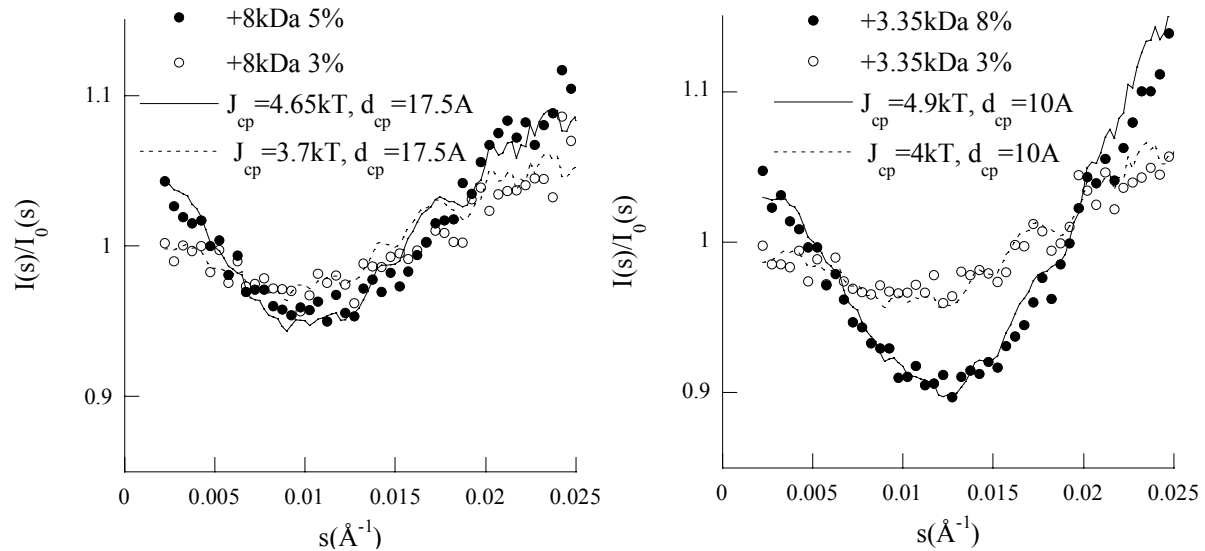


Figure III.B.16 : Courbes expérimentales et théoriques du rapport $I(s)/I_0(s)$ pour les γ S-cristallines dans le cas du PEG 8kDa 3% et 5%, et du PEG 3.35kDa 3% et 8%. Les meilleurs couples de paramètres (J_{cp}, d_{cp}) permettant d'ajuster les courbes sont indiqués.

6.2. Etude des α -cristallines : détermination des potentiels directs protéine-protéine et protéine-polymère

Le potentiel direct protéine-protéine type DLVO pour les α -cristallines a déjà été déterminé dans le tampon phosphate pH 6.8 en utilisant le modèle à un composant par S.Finet dans l'équipe d'A.Tardieu (Finet 1999; Finet et Tardieu 2001). Il a notamment été montré que le potentiel de Van der Waals dû à la faible compacité des α -cristallines pouvait être négligé. Par ailleurs, la force ionique étant relativement importante ($I=0.15M$), la charge effective est quasiment écrantée et peut être fixée à $Z=+40$, valeur déterminée lors d'une étude à deux forces ioniques (Vérétout, Delaye et al. 1989). Seul le diamètre de la protéine restait à ajuster. Il faut savoir que les α -cristallines sont des protéines polydisperses : le nombre de sous-unités et donc la masse et le diamètre de la protéine peuvent varier légèrement d'une préparation à l'autre. Dans une étude précédente, en utilisant aussi le modèle à un composant basé sur l'équation HNC, S.Finet a ajusté le diamètre à $\sigma=170\text{\AA}$ pour une masse de 911kDa (Finet et Tardieu 2001). En utilisant la même masse, nous avons trouvé dans notre cas (Figure III.B.17) que la valeur du diamètre qui convenait le mieux était $\sigma=176\text{\AA}$, valeur très proche de $170\text{\AA}$.

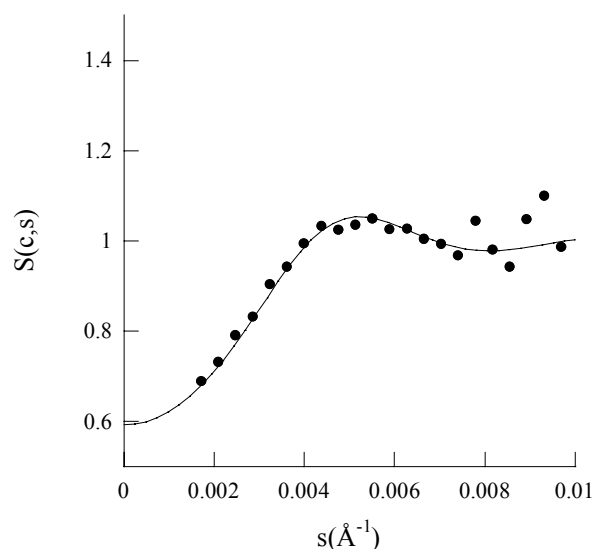


Figure III.B.17 : Facteur de structure expérimental (points) et facteur de structure théorique dans le cas des α -cristallines à une concentration de 34mg/ml dans le tampon 150mM Phosphate pH 6.8. Les paramètres du potentiel DLVO correspondant sont indiqués dans le texte.

En présence de PEG, l'intensité à l'origine augmente pour une concentration en protéines donnée, illustrant la présence d'interactions attractives entre les molécules d' α -cristallines en solution (Figure III.B.18).

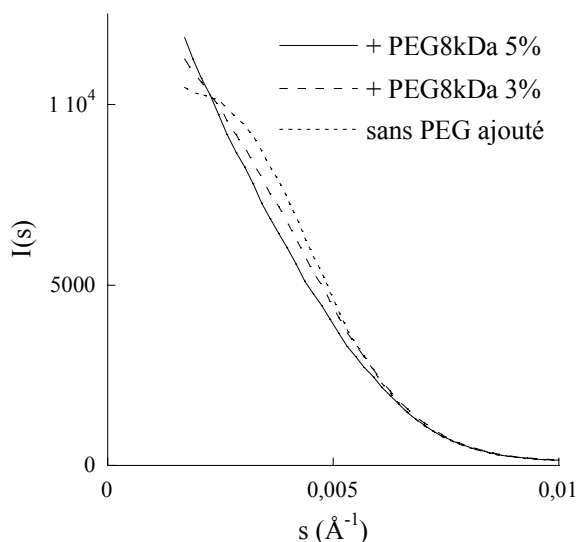


Figure III.B.18 : Intensités diffusées fonction de la concentration en PEG 8kDa par un mélange PEG 8kDa - α -cristallines, pour une concentration en protéines de 34mg/ml (pH 6.8).

Afin de déterminer le potentiel direct protéine-polymère, nous avons alors utilisé le modèle à deux composants. Dans le cas des α -cristallines, non seulement les paramètres du potentiel protéine-polymère (J_{cp}, d_{cp}) sont considérés comme des variables mais aussi le diamètre de la protéine. En effet, d'une part les α -cristallines sont polydisperses et d'autre

part les molécules flexibles de polymère peuvent s'introduire dans les cavités de cette protéine réduisant ainsi son diamètre effectif (Finet et Tardieu 2001). Dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 5%, nous avons représenté sur la Figure III.B.19, les meilleurs couples (J_{cp}, d_{cp}) obtenus pour plusieurs valeurs de diamètres afin de rendre compte des courbes expérimentales sur la plus large gamme angulaire possible. Seule une valeur de diamètre précise (à 2Å près), en l'occurrence $\sigma=156\text{\AA}$, permet d'ajuster les intensités diffusées expérimentales sur l'ensemble de la gamme angulaire. Par conséquent, pour les α -cristallines, l'ajustement des points expérimentaux à partir du modèle à deux composants n'est possible que pour un trio de paramètres (σ, J_{cp}, d_{cp}) .

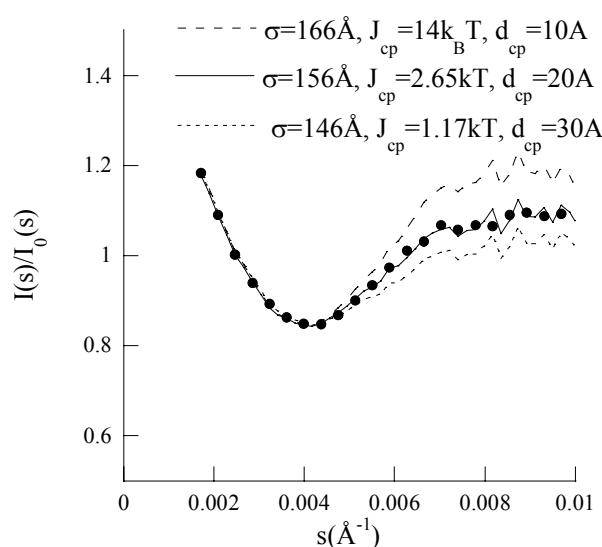


Figure III.B.19 : Courbes expérimentales (points) et théoriques du rapport $I(s)/I_0(s)$ pour les α -cristallines dans le cas du PEG 8kDa 5% : meilleur couples de paramètres (J_{cp}, d_{cp}) obtenus pour différentes valeurs de diamètres.

Le même travail a été effectué pour les autres conditions étudiées : PEG 8kDa 3%, PEG 3.35kDa 3% et 8% (Figure III.B.20). Les variations observées sur les intensités expérimentales diffusées sont suffisamment significatives pour ajuster de manière précise les paramètres (σ, J_{cp}, d_{cp}) quelle que soit la concentration en polymères.

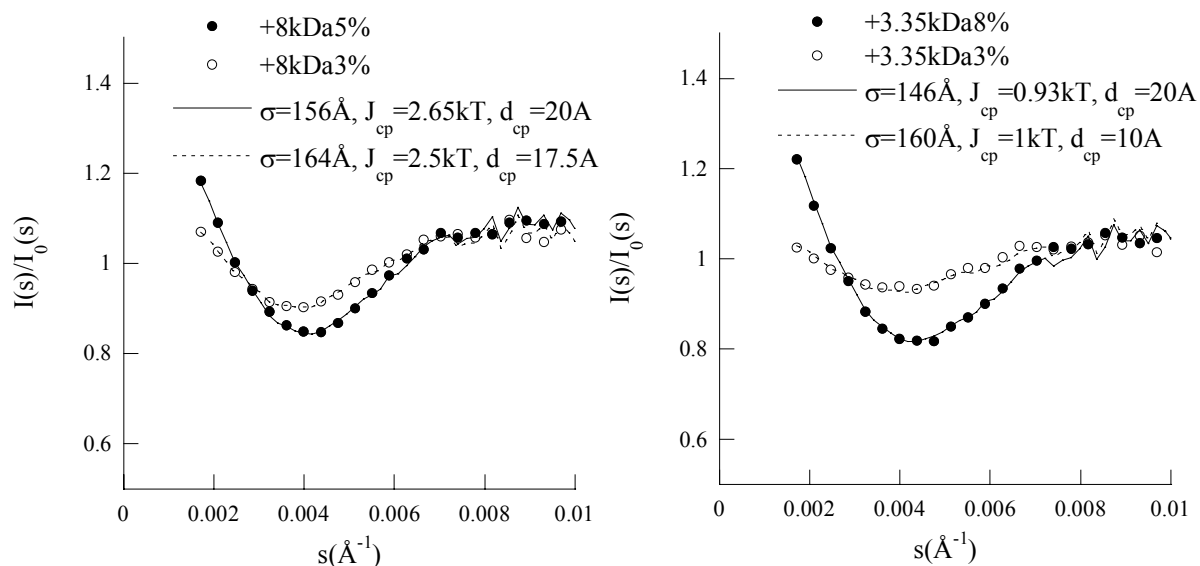


Figure III.B.20 : Courbes expérimentales et théoriques du rapport $I(s)/I_0(s)$ pour les α -cristallines dans le cas du PEG 8kDa 3% et 5%, et du PEG 3.35kDa 3% et 8%. Les meilleurs trios de paramètres (σ, J_{cp}, d_{cp}) permettant d'ajuster les courbes sont indiqués.

Nous observons à nouveau que le potentiel direct protéine-polymère varie peu lorsque la concentration en PEG est modifiée : les profondeurs de ce potentiel sont notamment quasiment inchangées. Nous retrouvons comme pour les γ S-cristallines que ce potentiel est moins répulsif lorsque la concentration en polymère ajouté est plus faible. Par ailleurs, plus la concentration en polymère est faible et plus la valeur du diamètre à ajuster est grande. Cela peut se concevoir dans la mesure où plus la concentration en polymère est importante, plus les polymères sont susceptibles de pénétrer dans les cavités de la protéine et donc plus le diamètre effectif de la protéine est faible. Enfin, l'intensité de ce potentiel direct à l'origine est quelle que soit la masse du polymère inférieure à celle déterminée dans le cas de la γ S-cristalline et l'urate oxydase. Les α -cristallines étant bien plus grosses que les deux polymères étudiés, ces derniers ne peuvent s'enrouler autour de la protéine et on s'attendrait donc à un potentiel plus répulsif. Ce résultat obtenu peut aussi s'expliquer en considérant que le polymère est capable de pénétrer dans les cavités de l' α -cristalline.

6.3. Comparaison des potentiels de déplétion obtenus pour les trois systèmes

Nous avons tracé sur la Figure III.B.21 les potentiels de déplétion résultants dans le cas de la γ S-cristalline, l'urate oxydase et l' α -cristalline dans les quatre conditions expérimentales étudiées (PEG 3.35kDa 3% et 8% ; PEG 8kDa 3% et 5%). Par ailleurs, l'ensemble des paramètres d'ajustement est regroupé dans le Tableau III.B.2. En premier lieu, nous pouvons affirmer que le modèle à deux composants que nous avons utilisé pour décrire les mélanges

binaires protéines-PEG nous a permis de modéliser l'ensemble des courbes expérimentales quelles que soient la protéine et la nature ou la concentration du polymère ajouté. Ce modèle semble donc être un bon moyen de déterminer le potentiel de déplétion induit par l'ajout de polymère au sein d'une solution de protéines.

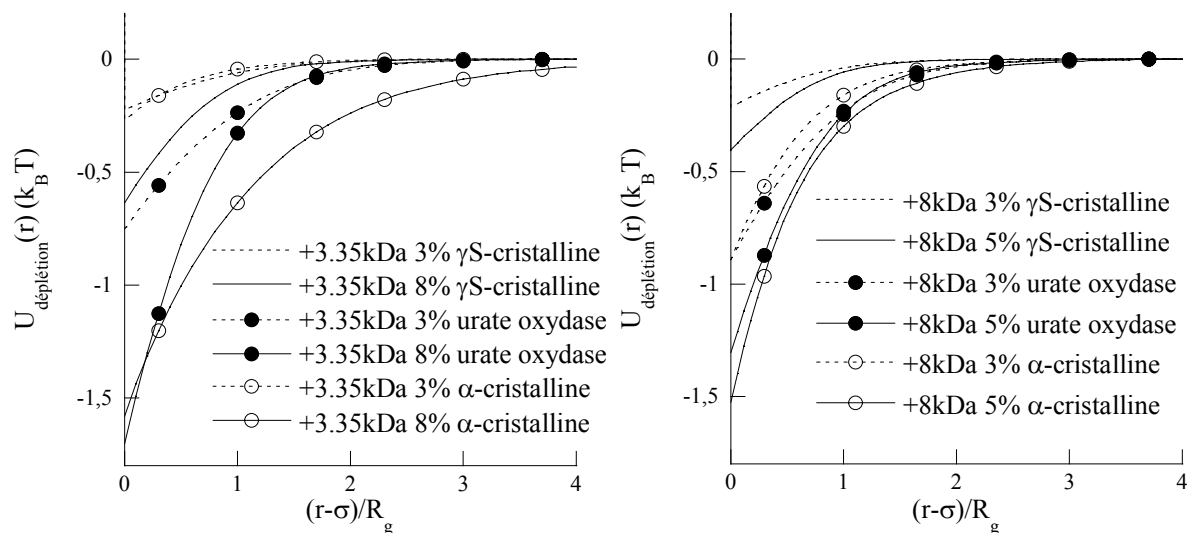


Figure III.B.21 : Représentation des potentiels de déplétion $U_{\text{déplétion}}(r)$ en fonction de $(r-\sigma)/R_g$ pour la γ S-crystalline, l'urate oxydase et l' α -crystalline. a) en présence de PEG 3.35kDa 3% et 8% ; b) en présence de PEG 8kDa 3% et 5%. Les diamètres σ utilisés pour la représentation graphique (calcul de $(r-\sigma)/R_g$) des potentiels de déplétion pour les α -crystallines sont ceux reportés dans le Tableau III.B.2.

En se basant sur les modèles d'Asakura-Oosawa et PRISM (Figure III.B.22), on s'attendrait à ce que la profondeur du potentiel de déplétion soit d'autant plus grande que la protéine est de taille importante.

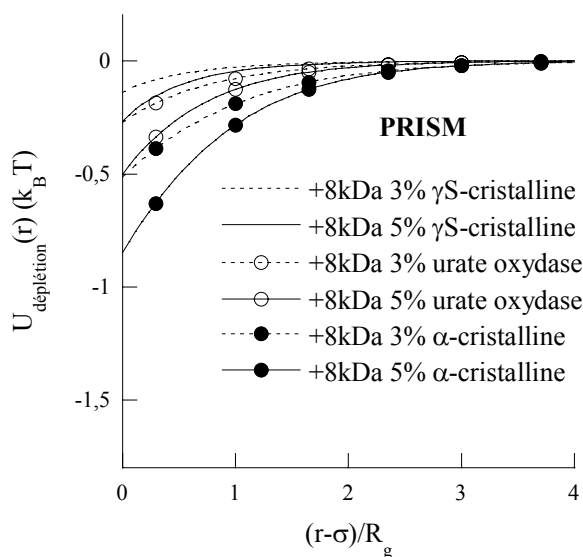


Figure III.B.22 : Représentation des potentiels de déplétion $U_{\text{déplétion}}(r)$ calculés à l'aide du modèle analytique PRISM en fonction de $(r-\sigma)/R_g$ pour la γ S-crystalline, l'urate oxydase et l' α -crystalline en présence de PEG 8kDa 3% et 5%.

Nous trouvons effectivement ce type de variations lorsque l'on compare les potentiels de déplétion pour les γ S-cristallines et pour l'urate oxydase. Ceci est un peu moins vrai lorsque l'on considère les α -cristallines : en effet le potentiel de déplétion déterminé en présence des α -cristallines est moins attractif que ceux déterminés avec l'urate oxydase pour les faibles concentrations en PEG et est légèrement supérieur pour les plus fortes concentrations en PEG. Il est à ce stade difficile de trouver des explications à ces observations non prévues par les modèles analytiques, même si leur origine tient très probablement du fait que les α -cristallines présentent des cavités au sein desquelles peuvent pénétrer les polymères. Nous retrouvons malgré tout que le PEG est plus efficace pour induire des interactions attractives entre protéines de taille importante.

Par ailleurs, la portée du potentiel de déplétion est quasiment constante et égale au double du rayon de giration du polymère considéré quelle que soit la protéine étudiée (sauf dans le cas d'un ajout de PEG 3.35kDa 8% avec les α -cristallines). Ces résultats sont attendus car ils sont prédits par la théorie simple d'Asakura-Oosawa, par le modèle PRISM (Figure III.B.22), ainsi que par des calculs récents de simulations numériques (Louis, Bolhuis et al. 2002). De plus, tout comme dans le cas de l'urate oxydase, nous retrouvons avec les deux autres systèmes que la profondeur du potentiel de déplétion n'est pas simplement proportionnelle à la concentration en polymères, comme le prédit la théorie d'Asakura-Oosawa, mais à plutôt tendance à « saturer ». Cet écart à la théorie d'Asakura-Oosawa semble donc se généraliser.

En conclusion, en dépit de certains écarts aux modèles analytiques, on peut dire que l'étude des trois systèmes γ S-cristallines, urate oxydase et α -cristalline nous a permis de valider notre approche permettant de déterminer le potentiel de déplétion en couplant les expériences de DXPA avec les traitements numériques et en considérant les polymères comme des colloïdes mous. Il a été récemment montré que le traitement des polymères comme des colloïdes mous était valable tant que la concentration en polymère n'est pas trop élevée et notamment lorsqu'elle est inférieure ou égale à la concentration d'enchevêtrement des polymères (Louis, Bolhuis et al. 2002). Rappelons que nous nous sommes limités à ces cas là pour les deux polymères étudiés. La méthode semi-expérimentale développée ici représente une alternative aux différents modèles analytiques ainsi qu'aux études purement théoriques afin de caractériser le potentiel de déplétion dans le cas de mélanges protéines-polymères ou plus largement de mélanges colloïdes-polymères.

γS-cristalline				
	3.35k3%	3.35k8%	8k3%	8k5%
potentiel protéine-protéine	$\sigma=36\text{\AA}$; $I=0.05\text{M}$; $Z=+5$; $(J_{vdW}, d_{vdW})=(-2.5k_B T, 3\text{\AA})$			
potentiel polymère-polymère	(2kT, 20 $\text{\AA}$)	(2kT, 23.5 $\text{\AA}$)	(2kT, 37 $\text{\AA}$)	(2kT, 39 $\text{\AA}$)
potentiel protéine-polymère	(4kT, 10 $\text{\AA}$)	(4.9kT, 10 $\text{\AA}$)	(4.65kT, 17.5 $\text{\AA}$)	(3.7kT, 17.5 $\text{\AA}$)

Urate oxydase				
	3.35k3%	3.35k8%	8k3%	8k5%
potentiel protéine-protéine	$\sigma=76\text{\AA}$; $I=0.025\text{M}$; $Z=-6$; $(J_{vdW}, d_{vdW})=(-2.5k_B T, 3\text{\AA})$			
potentiel polymère-polymère	(2kT, 20 $\text{\AA}$)	(2kT, 23.5 $\text{\AA}$)	(2kT, 37 $\text{\AA}$)	(2kT, 39 $\text{\AA}$)
potentiel protéine-polymère	(5.25kT, 10 $\text{\AA}$)		(5.65kT, 17.5 $\text{\AA}$)	

α-cristalline				
	3.35k3%	3.35k8%	8k3%	8k5%
potentiel protéine-protéine	$I=0.15\text{M}$; $Z=-40$; $(J_{vdW}, d_{vdW})=(0k_B T, 1\text{\AA})$			
	$\sigma=160\text{\AA}$	$\sigma=146\text{\AA}$	$\sigma=164\text{\AA}$	$\sigma=156\text{\AA}$
potentiel polymère-polymère	(2kT, 20 $\text{\AA}$)	(2kT, 23.5 $\text{\AA}$)	(2kT, 37 $\text{\AA}$)	(2kT, 39 $\text{\AA}$)
potentiel protéine-polymère	(1kT, 10 $\text{\AA}$)	(0.93kT, 20 $\text{\AA}$)	(2.5kT, 17.5 $\text{\AA}$)	(2.65kT, 20 $\text{\AA}$)

Tableau III.B.2 : Ensemble des paramètres permettant d'ajuster les courbes expérimentales et théoriques à partir du modèle à deux composants pour la γ S-cristalline, l'urate oxydase et l' α -cristalline.

7. Caractérisation des potentiels d'interaction en condition de cristallisation

Nous avons dans les paragraphes précédents montré comment nous pouvions déterminer les potentiels effectifs entre les protéines en solution. Les diagrammes de phase, et notamment la position d'une éventuelle séparation de phase liquide-liquide vis à vis de la courbe de séparation de phase solide-liquide, sont directement fonction du potentiel d'interaction interagissant entre les particules (voir Chapitre I, Figure I.C.8) (ten Wolde et Frenkel 1997).

Dans ce contexte nous avons comparé les potentiels d'interaction existant entre les protéines en solution en condition de cristallisation pour deux protéines : le lysozyme (Tardieu, Le Verge et al. 1999) et l'urate oxydase (Figure III.B.23). Nous observons que l'ajout de sel pour le lysozyme ou l'ajout de PEG pour l'urate oxydase induit un potentiel d'interaction dont la profondeur est similaire. Les portées des deux potentiels sont très différentes (Figure III.B.23.a) mais si elles sont ramenées au diamètre de la protéine, elles sont alors comparables (Figure III.B.23.b). Ceci semble confirmer que les protéines cristallisent pour des potentiels d'interaction similaires. Cette observation est à rapprocher des études théoriques montrant que la cristallisation des protéines se produirait très probablement via une séparation de phase liquide-liquide métastable par rapport à la séparation de phase liquide-solide. Cette métastabilité est assurée uniquement si la portée du potentiel d'interaction correspond à une faible fraction du diamètre de la protéine (Malfois, Bonneté et al. 1996; ten Wolde et Frenkel 1997).

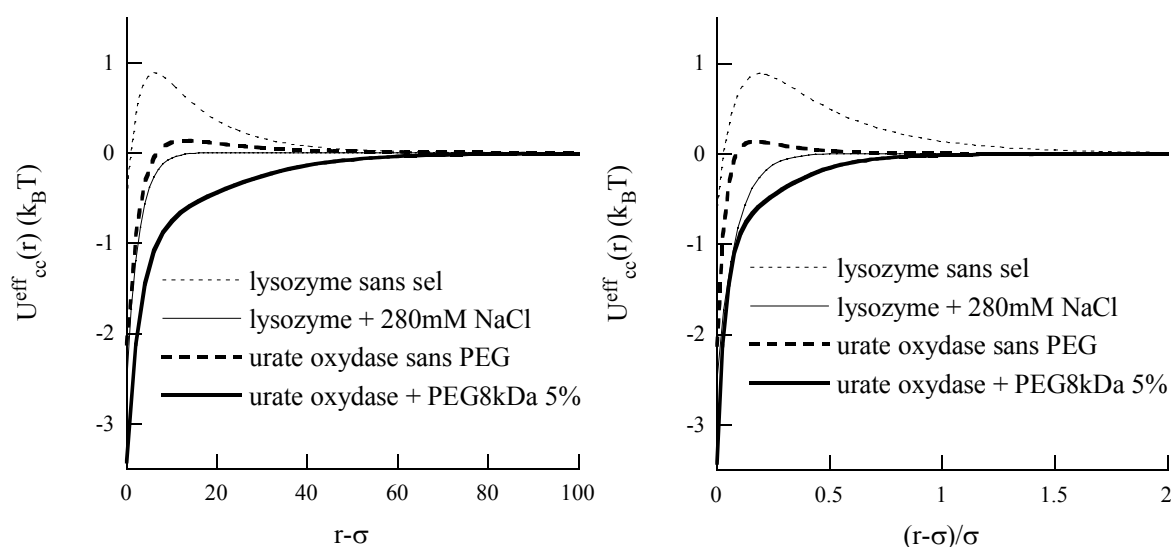


Figure III.B.23 : Représentation des potentiels effectif protéine-protéine pour le lysozyme (Tardieu, Le Verge et al. 1999) et l'urate oxydase dans leur solution tampon (50mM NaAcétate pH 4.5 pour le lysozyme et 50mM Tris pH 8.5 pour l'urate oxydase) et en condition de cristallisation en fonction de : a) $(r-\sigma)$; b) $(r-\sigma)/\sigma$.

Nous avons détaillé dans ce chapitre une méthode couplant des expériences de diffusion de rayons X aux petits angles avec des traitements numériques basés sur les équations de physique du liquide Ornstein-Zernicke et HNC. En absence de PEG, nous avons utilisé le modèle dit « à un composant » et en présence de PEG, le modèle dit « à deux composants » afin de décrire le mélange binaire protéine-polymère. Dans ce dernier cas, nous avons considéré les polymères comme des colloïdes « mous ». Cette approche a été validée en

étudiant différents systèmes protéiques de tailles variées. Enfin nous avons mis en évidence que le potentiel d'interaction gouvernant la cristallisation des protéines était sensiblement le même quelle que soit la masse de la protéine étudiée. Ceci nous pousse donc à penser que si on arrive à déterminer l'effet d'un agent cristallisant sur le potentiel effectif interprotéique, il sera alors possible de mieux prédire la cristallisation de la protéine étudiée voire de tracer son diagramme de phase.

Plusieurs équipes s'intéressent aux mélanges colloïdes-polymères, l'une des nombreuses applications étant l'étude des systèmes protéines-polysaccharides en vue de mieux prédire et comprendre la structure, la texture et la stabilité des produits alimentaires (Doublier, Garnier et al. 2000; de Kruif et Tuinier 2001). L'aspect théorique des mélanges colloïdes-polymères suscitent notamment actuellement beaucoup d'intérêts. Dans ce contexte, la méthode présentée dans ce chapitre ouvre une nouvelle voie semi-expérimentale qui pourrait permettre de valider les modèles théoriques proposés dans la littérature.

Chapitre 4 : Séparations de phases de l'urate oxydase

Dans le deuxième chapitre, nous avons mis en évidence que l'urate oxydase cristallisait en présence de PEG 3.35kDa, 8kDa et 20kDa. Nous avons notamment corrélié ces observations avec une valeur négative de second coefficient du viriel, caractérisant un régime globalement attractif entre les molécules d'urate oxydase en solution. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons plus spécifiquement sur la cristallisation de l'urate oxydase en présence de PEG 8kDa et sur la détermination du diagramme de phases en fonction de l'ajout de PEG 8kDa. Certaines protéines, comme l'apoferritine (Tanaka et Ataka 2002) ou les α -cristallines (Finet&Tardieu en préparation), peuvent subir en présence de PEG une séparation de phases liquide-liquide; l'addition de PEG dans une solution de BMV (Brome Mosaic Virus) induit l'apparition de précipités microcristallins (Casselyn, Perez et al. 2001; Casselyn, Finet et al. 2002). Dans le cas de l'urate oxydase, nous allons dans ce chapitre mettre en évidence et caractériser des séparations de phases solide-liquide et liquide-liquide et montrer l'influence de la position dans le diagramme de phases sur la croissance cristalline.

A. TRACE DU DIAGRAMME DE PHASES DE L'URATE OXYDASE

I. Méthode expérimentale

La solubilité d'une protéine définie comme la concentration des protéines en solution en équilibre avec le cristal peut être déterminée simplement de deux manières différentes : soit par cristallisation d'une solution sursaturée, soit par dissolution de cristaux dans une solution sous-saturée. Il faut noter qu'il existe des méthodes physiques plus récentes permettant de travailler sur de plus faibles volumes (quelques μ l) comme des études d'interférométrie (Sazaki, Kurihara et al. 1996) ou de spectroscopie Raman (Schwartz et Berglund 1999).

Nous avons étudié les séparations de phases du mélange urate oxydase/ PEG8kDa à 20°C dans le tampon Tris 50mM pH8.5 en présence de 100mM NaCl. L'intérêt de rajouter 100mM de chlorure de sodium est de s'affranchir d'une faible variation éventuelle du pH selon les essais. Afin de déterminer la courbe de solubilité, nous avons choisi de partir d'une solution sursaturée en urate oxydase ($100\mu\text{l} < V < 200\mu\text{l}$) et d'ensemencer le mélange urate oxydase - PEG avec des cristaux d'urate oxydase préalablement broyés. Les concentrations en PEG 8kDa étudiées pour ces études de solubilité étaient comprises entre 4% et 10%. Les variations de concentration en protéines ont été suivies sur plusieurs mois (jusqu'à trois mois) par spectrophotométrie d'absorption à $\lambda=280\text{nm}$. Lorsque l'équilibre entre la solution et la phase cristalline est atteint, généralement en quelques jours voire quelques semaines selon les

conditions, la concentration résiduelle en protéine est égale à la solubilité. Rappelons que sans ensemencement les cristaux d'urate oxydase apparaissent au bout d'un ou plusieurs jours.

Pour des concentrations en PEG importantes, il apparaît une séparation de phases liquide-liquide, que nous avons caractérisée pour des concentrations en PEG 8kDa comprises entre 8% et 19% sans avoir préalablement ensemencé les mélanges. Afin de déterminer la concentration en urate oxydase et en PEG dans chacune des phases, nous avons centrifugé la solution peu après l'avoir mélangée évitant ainsi toute apparition de cristaux. Le volume de la phase dense (riche en protéine) étant très faible, il a été très difficile d'évaluer avec précision les concentrations en PEG et en protéine au sein de cette phase. Par contre, la phase légère (pauvre en protéine) a pu être entièrement caractérisée. La concentration en protéines a été mesurée par spectrophotométrie UV. Une fois la concentration en protéines connue, la concentration en PEG dans la phase légère a été estimée par réfractométrie. Pour cela, nous avons déterminé les indices de réfraction de solutions à différentes concentrations en PEG et dont la concentration en protéines était égale à celle dans la phase légère. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue et comparée à la valeur de l'indice de réfraction de la phase légère nous a permis d'estimer la concentration en PEG au sein de cette phase.

II. Diagramme de phases en présence de PEG 8kDa

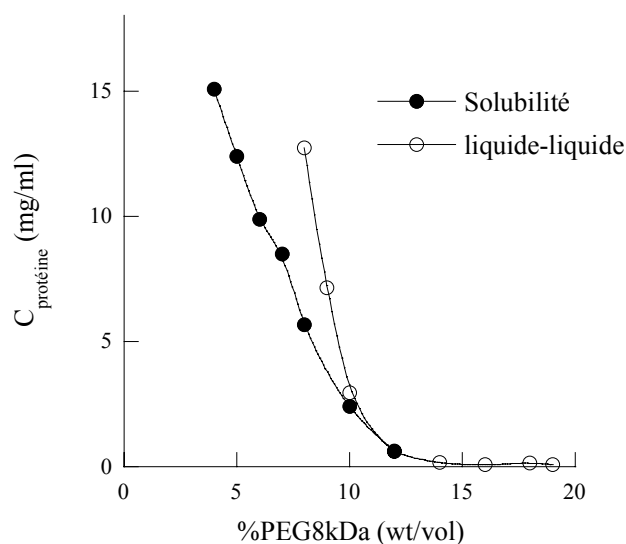


Figure IV.A.1 : Diagramme de phases de l'urate oxydase en présence de PEG 8kDa à pH8.5 et en présence de 100mM NaCl.

La Figure IV.A.1 représente le diagramme de phases de l'urate oxydase en fonction de la concentration en PEG 8kDa ajouté. La courbe de séparation de phases liquide-liquide

correspond uniquement à la phase diluée en protéine, l'autre partie de la courbe (hautes concentrations en protéines) n'ayant pu être caractérisée avec suffisamment de précision. Nous avons pu cependant déterminer que la concentration en protéines dans la phase dense était au minimum de 100mg/ml, la valeur maximale étant très difficile à évaluer (probablement au moins 500mg/ml). Cette concentration correspond à une fraction volumique de 10%, en considérant un diamètre de 76Å pour l'urate oxydase. Dans le groupe d'espace I222, la fraction volumique occupée par les molécules d'urate oxydase dans le cristal est de l'ordre de 50%. Par conséquent, les phases riches en protéines, issues d'une séparation de phases liquide-liquide, semblent pour certaines s'identifier à des phases amorphes aussi ou voire même plus compactes que la phase cristalline.

Comme attendu, la solubilité de l'urate oxydase diminue avec la concentration en PEG 8kDa ajouté. Ces résultats rejoignent les précédentes études expérimentales menées sur la solubilité des protéines en présence de PEG (Atha et Ingham 1981; Haire, Tisel et al. 1984; Odahara, Ataka et al. 1994; Gaucher, Riès-Kautt et al. 1997; Casselyn, Perez et al. 2001) et confirment la corrélation entre la solubilité et le second coefficient du viriel, qui diminuent tous deux de façon monotone lorsque la concentration en PEG augmente (voir Figure II.B.11). Par ailleurs, quelle que soit la concentration en PEG 8kDa, nous observons que la séparation de phases liquide-liquide est métastable et que la phase la plus stable est la phase cristalline. Ce phénomène a pu être observé pour des concentrations en PEG 8kDa comprises entre 8% et 10% : la séparation de phases liquide-liquide précédait la cristallisation. A la fin de l'étude, seule une phase liquide en équilibre avec la phase cristalline était présente. Ce résultat contraste avec celui obtenu sur l'apoferritine par exemple, où les cristaux coexistent avec les deux phase liquides (Tanaka et Ataka 2002). Nos observations seront confirmées dans la seconde partie en étudiant plus en détail la croissance cristalline de l'urate oxydase.

Le diagramme de phases d'un mélange colloïde-polymère dépend du ratio R_g/R , où R_g est le rayon de gyration du polymère et R celui du colloïde (Lekkerkerker, Poon et al. 1992; Ilett, Orrock et al. 1995). Ainsi, il a été montré que, pour une solution de polymères diluée sans interaction, si $R_g/R < 0.3$, seule une séparation de phases solide-liquide est observée alors que si $R_g/R > 0.3$, en plus des phases liquide et solide, une zone stable caractérisée par deux phases liquides de compositions différentes apparaît dans le diagramme de phases colloïdal (voir Chapitre I, Figure I.C.8). Dans notre cas d'étude, le polymère (PEG 8kDa) et la protéine ont des tailles similaires : $R_g/R \sim 1 > 0.3$. On s'attendrait donc à ce que la séparation de phases liquide-liquide soit stable sur un domaine de concentrations (c_p, c_c) où c_p est la concentration en polymères et c_c la concentration en protéines. Pour des concentrations en polymères

comprises entre 0% et 12%, la séparation de phases est métastable comme nous l'indique le diagramme de phases ainsi que les expériences de cristallisation. Au-delà d'une concentration de 12%, les concentrations en protéines sont si faibles qu'il est difficile de caractériser à partir du diagramme de phases, la phase la plus stable. Les expériences de cristallisation ne sont par ailleurs pas facile à interpréter et à observer. Par conséquent, nos résultats ne sont pas forcément en contradiction avec les prédictions théoriques présentées ci-dessus.

B. ETUDE DE LA SEPARATION DE PHASE LIQUIDE-LIQUIDE

I. Eléments de théorie sur la séparation de phase liquide-liquide

Dans le domaine des mélanges colloïdes-polymères, qu'elle soit stable ou métastable, la séparation de phases liquide-liquide est susceptible d'intervenir via un mécanisme de nucléation-croissance ou un mécanisme de décomposition spinodale. Le mécanisme de nucléation-croissance s'apparente à celui de la cristallisation : le système est stable vis-à-vis de faibles fluctuations de concentrations jusqu'à ce que les gouttes formées riches en colloïdes n'excèdent un rayon critique. Les gouttes croissent alors par mûrissement d'Ostwald et/ou coalescence. Dans le cas de la décomposition spinodale, les fluctuations de concentrations croissent cette fois-ci spontanément. La décomposition spinodale ne se manifeste pas par l'apparition de gouttes mais plutôt par l'apparition d'une phase « bicontinue ».

Le mécanisme de nucléation-croissance est observé lorsque le système se trouve entre la binodale (courbe de séparations de phases) et la spinodale (Figure IV.B.1). Lorsque le système se trouve au-delà de la spinodale, il subit une décomposition spinodale. Ces deux mécanismes ont été observés expérimentalement (van Bruggen, Dhont et al. 1999; Koenderink, Aarts et al. 2003). Par ailleurs, pour des rapports R_g/R faibles ($R_g/R \leq 0.2$) et pour de plus fortes concentrations en polymère, la décomposition spinodale évolue vers la formation de gel transitoire dont la structure est aussi bicontinue (Poon, Pirie et al. 1995; Verhaegh, Asnaghi et al. 1997; Verhaegh, Asnaghi et al. 1999).

A l'aide de deux méthodes expérimentales, la vidéo-microscopie optique et la diffusion de rayons X aux petits angles, nous avons voulu caractériser la séparation de phases liquide-liquide métastable dans le cas du mélange PEG 8kDa-urate oxydase.

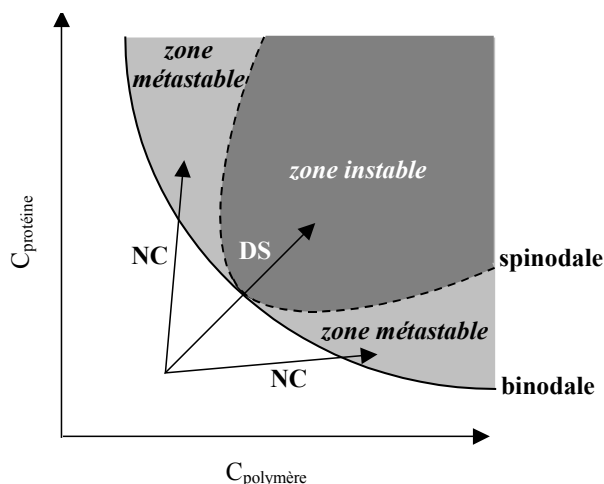


Figure IV.B.1 : Représentation schématique d'une séparation de phase liquide-liquide dans un mélange protéine-polymère. Selon le déplacement dans le diagramme de phases, la séparation de phase a lieu via un mécanisme de nucléation-croissance (NC) ou via un mécanisme de décomposition spinodale (DS).

II. Caractérisation par vidéo-microscopie optique

Au CRMC2, nous disposons d'un microscope optique inverse (Nikon TE-300) équipé d'une caméra vidéo, elle-même reliée à un ordinateur. L'acquisition d'image est donc réalisée informatiquement à l'aide d'un logiciel (Microvision-Replay) pouvant enregistrer les images à intervalles de temps choisis.

Sur les Figure IV.B.2 et IV.B.3, nous avons représenté des planches de photos d'expériences réalisées en *Microbatch*® à température ambiante (20°C). Nous voyons qu'avec un ajout de PEG 8kDa 8% ($c_{\text{protéine}}=13.6\text{mg/ml}$), une séparation de phases apparaît sous la forme de gouttes de quelques μm de diamètres. Au cours du temps, certaines de ces gouttes coalescent avant de décanter au fond du puits. Ces gouttes représentent la phase dense, riche en protéines. Par conséquent un ajout de PEG 8kDa 8% ($c_{\text{protéine}}=13.6\text{mg/ml}$) induit une séparation de phases liquide-liquide suivant un mécanisme de nucléation-croissance. Dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 9% et pour la même concentration initiale en protéines (donc pour une sursaturation plus importante), nous observons plutôt un réseau tridimensionnel évoluant au cours du temps ; la phase riche en protéines se trouvant à l'intérieur de ce réseau constitue la phase la plus dense. Ce réseau correspond à la texture bicontinue décrite dans le paragraphe précédent. Nous sommes donc ici très vraisemblablement en présence d'une décomposition spinodale, qui n'évolue pas, au moins sur le temps de l'expérience, vers la formation de gouttes comme cela a été observé sur d'autres systèmes (van Bruggen, Dhont et al. 1999). Aucun gel ne semble aussi se former, ce qui n'est pas surprenant puisque dans notre cas le rapport $R_g/R \approx 1$ et que les gels sont majoritairement observés lorsque $R_g/R \leq 0.2$.

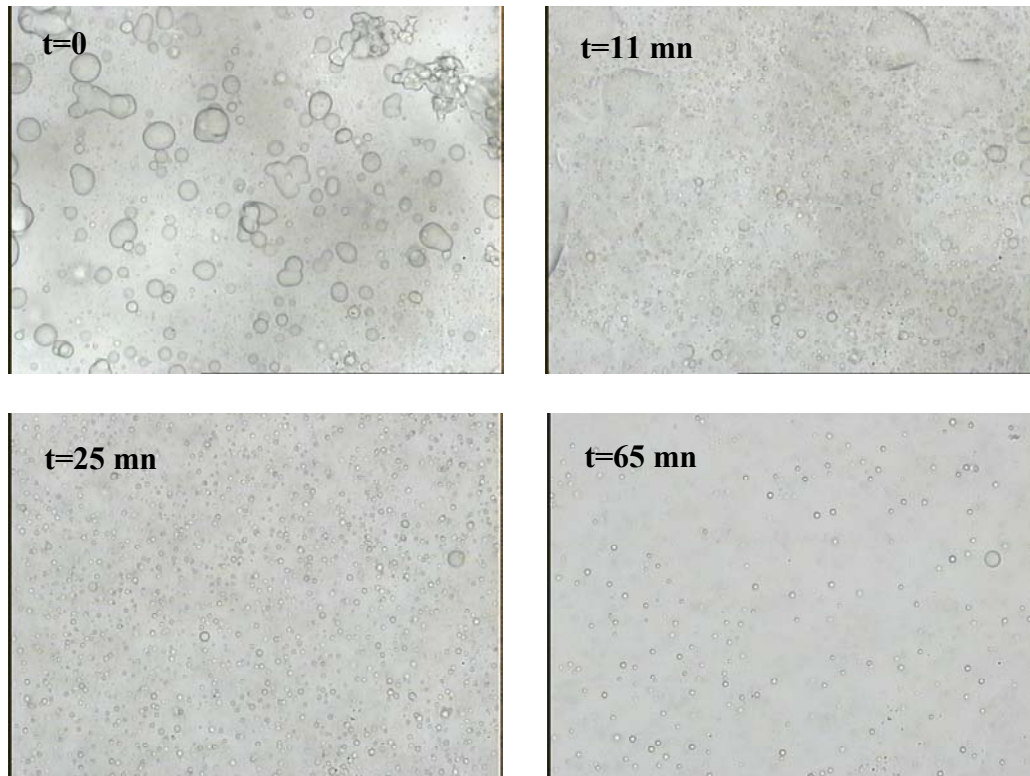


Figure IV.B.2 : Cinétique de transition de phase observée par vidéo-microscopie optique pour un ajout de PEG 8kDa 8%+100mMNaCl et une concentration initiale en protéine de 13.6mg/ml. Les dimensions de la figure sont 220 μ m x 165 μ m.

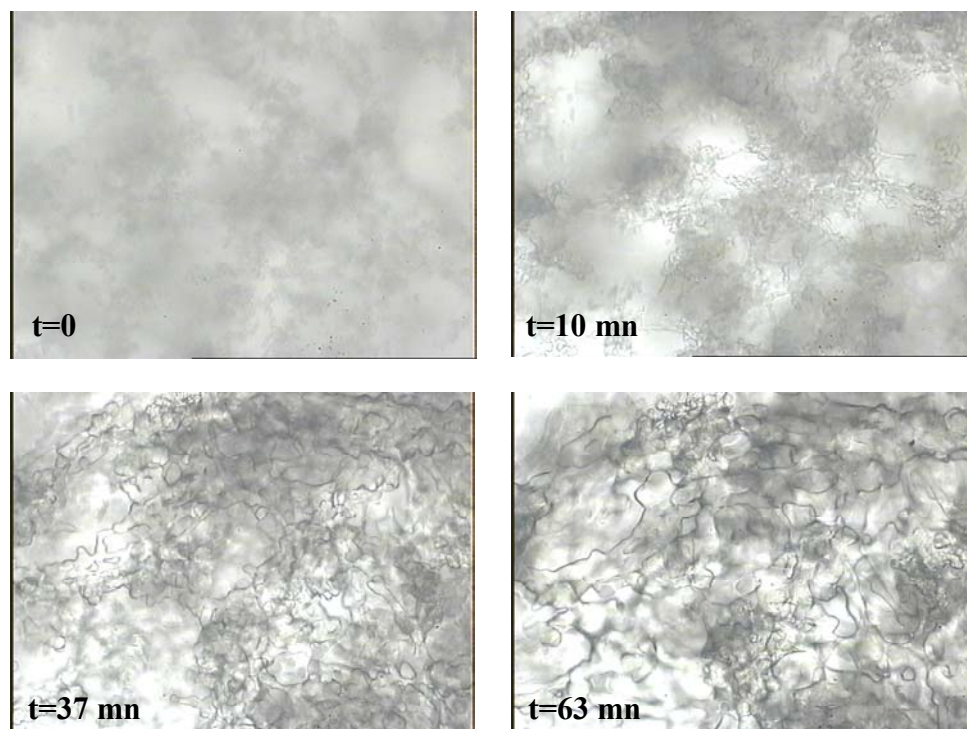


Figure IV.B.3 : Cinétique de transition de phase observée par vidéo-microscopie optique pour un ajout de PEG 8kDa 9%+100mMNaCl et une concentration initiale en protéines de 13.6mg/ml. Les dimensions de la figure sont 220 μ m x 165 μ m.

III. Caractérisation par diffusion de rayons X aux petits angles

Nous avons réalisé les expériences de DXPA au LURE sur la ligne D24. Les échantillons ont été préparés en mélangeant les quantités requises de PEG, tampon Tris 50mM pH 8.5 et de solution stock d'urate oxydase. Une fois mélangée, la solution finale est injectée dans le capillaire sur le banc de diffusion, les temps d'exposition au faisceau variant entre 100 et 200s. L'intensité diffusée est normalisée au signal du carbone et le signal du tampon PEG correspondant est soustrait. Le signal de diffusion restant ne représente pas simplement l'intensité diffusée par la solution de protéines, il tient aussi compte du terme croisé protéine-polymère (voir Chapitre II, eq. (II-21)). Deux PEGs différents ont été étudiés, le PEG 8kDa ainsi que le PEG 3.35kDa.

La Figure IV.B.4 représente l'effet de l'ajout du PEG 8kDa sur l'intensité diffusée d'une solution de protéines à une concentration de 13mg/ml. Nous avons représenté la variation logarithmique de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion s ainsi que le rapport de l'intensité diffusée par le mélange sur l'intensité diffusée par la solution de protéines pures (Figure IV.B.4a et b). Pour les faibles concentrations en PEG 8kDa en absence de séparation de phases ($c_{\text{PEG}} \leq 8\%$), les courbes d'intensité diffusée se superposent sur quasiment tout le domaine angulaire et l'intensité diffusée à l'origine augmente (légèrement) avec la concentration en PEG 8kDa ajouté. Ces variations sont caractéristiques d'une augmentation des interactions attractives entre protéines en solution induites par l'ajout de PEG (voir Chapitre II, Figure II.B.9 par exemple). La transition de phases pour une concentration initiale en protéines de 13mg/ml est visuellement observée à partir d'une concentration en PEG 8kDa de 9%. A partir de cette concentration, l'intensité diffusée ne suit plus les mêmes variations que précédemment : le signal remonte plus fortement aux petits angles, les courbes se creusent aux angles intermédiaires ($0.003 \text{ \AA}^{-1} < s < 0.012 \text{ \AA}^{-1}$) et il apparaît un pic autour de $0.015 \text{ \AA}^{-1}$. Ces trois effets sont d'autant plus importants que la concentration en PEG 8kDa ajouté est grande. De plus, les courbes se superposent aux grands angles ($0.018 \text{ \AA}^{-1} < s < 0.035 \text{ \AA}^{-1}$), ce qui montre que le nombre de particules présent sous le faisceau de rayons X est toujours le même quelle que soit la concentration en PEG. Autrement dit, sur l'ensemble des courbes diffusées aucune décantation, qui conduirait à une diminution de la quantité de protéines sous faisceau, n'a lieu. Par ailleurs, le processus observé ici est réversible comme nous le montre la Figure IV.B.4c : en procédant par dilution successive d'un échantillon à haute concentration en PEG (PEG 8kDa 14%) ayant transité, nous

retrouvons des courbes d'intensité diffusée similaires à celles enregistrées individuellement (Figure IV.B.4a).

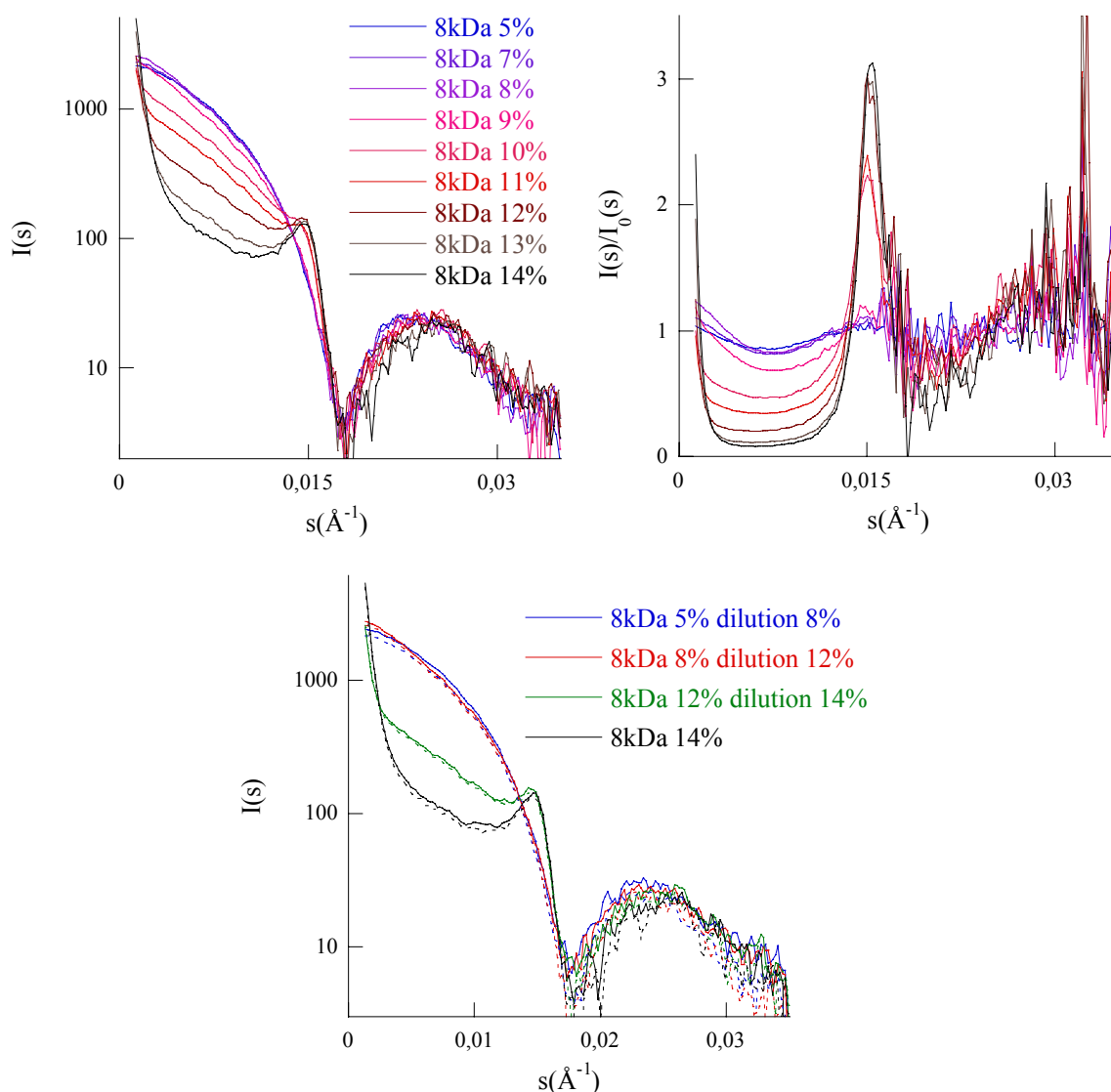


Figure IV.B.4 : Intensité diffusée par le mélange protéine-polymère pour différentes concentrations de PEG 8kDa et pour une concentration initiales en protéines de 13mg/ml. a) $I(s)$ b) rapport $I(s)/I_0(s)$ où $I_0(s)$ est l'intensité diffusée par la solution de protéines à la même concentration de 13mg/ml sans ajout de PEG c) échantillons préparés par dilutions successives ; les intensités diffusées mesurées individuellement sont indiquées en pointillées.

Enfin, nous avons réalisé les mêmes expériences avec le PEG 3.35kDa (Figure IV.B.5). Les mêmes tendances qu'avec le PEG 8kDa sont observées : une fois la transition de phase présente (à partir d'une concentration en PEG 3.35kDa de 10.8%), l'intensité à l'origine augmente fortement, les courbes se creusent aux angles moyens et se superposent aux grands angles, et un pic apparaît pour un angle de diffusion approximativement égal à $0.015 \text{ \AA}^{-1}$. Ces variations sont d'autant plus marquées que la concentration en PEG 3.35kDa est importante.

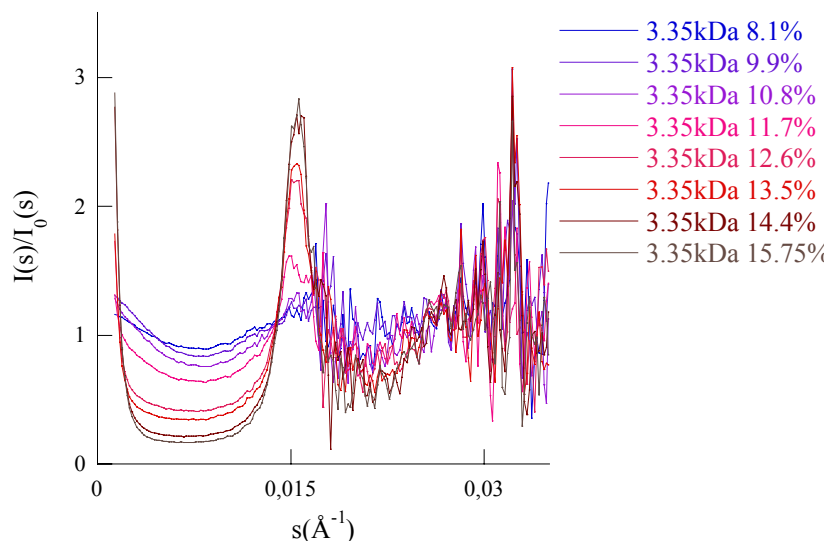


Figure IV.B.5 : Rapport de l'intensité diffusée par le mélange protéine-polymère sur l'intensité diffusée de la solution de protéines seules pour différentes concentrations de PEG 3.35kDa et pour une concentration initiale en protéines de 13mg/ml.

Par ailleurs, sur la Figure IV.B.6, nous avons représenté dans le cas d'une concentration initiale en protéines de 13mg/ml et en PEG 8kDa de 13%, le signal DXPA brut, le signal du surnageant enregistré après centrifugation, ainsi que le signal différence. Ces courbes sont représentatives de celles obtenues quelles que soient la nature et la concentration en PEG ajouté. Elles montrent que le signal aux angles moyens est en grand majorité dû à la diffusion du surnageant et que le pic autour de $0.015\text{\AA}^{-1}$ est dû uniquement à la diffusion de la phase concentrée en protéines. La forte remontée aux très petits angles est dû soit à la transition de phases elle-même soit caractérise aussi la phase dense en protéines.

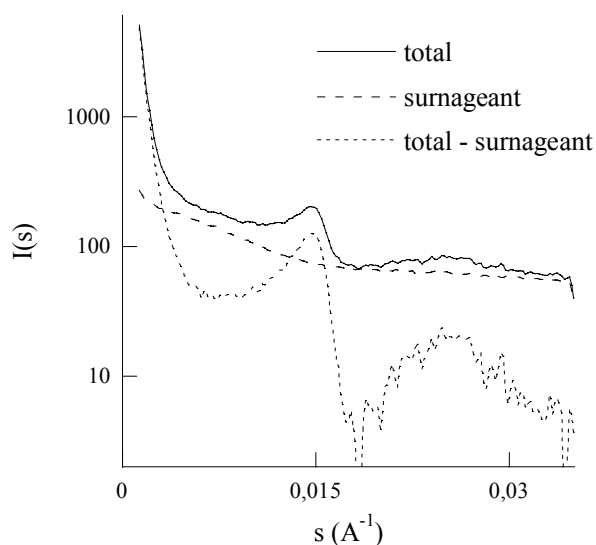


Figure IV.B.6 : Représentation de l'intensité diffusée par le mélange urate oxydase ($c_{\text{protéine}}=13\text{mg/ml}$) – PEG 8kDa 14%, par le surnageant après centrifugation ainsi que de la différence entre les deux.

Le creusement des courbes d'intensité diffusée aux angles moyens ainsi que l'apparition d'un pic de corrélation à un angle donné différent de zéro est caractéristique d'une solution très concentrée constituée de particules en interactions répulsives. Ces variations sont rencontrées dans le cas de solutions colloïdales concentrées, la présence d'un pic indiquant de fortes corrélations entre les particules pour une distance caractéristique. Cette distance moyenne entre particules est approximativement égale à l'inverse de la position angulaire du pic : $d = \frac{1}{s}$. Aussi bien pour le PEG 8kDa que pour le PEG 3.35kDa et quelle que soit la concentration en PEG ajouté, la position du pic ne change quasiment pas et se situe autour de $0.0153 \text{ \AA}^{-1}$. Ceci correspond à une distance moyenne entre particules d'environ de $65 \text{ \AA}$, grandeur approximativement identique au diamètre de l'urate oxydase, qui vaut environ $70 \text{ \AA}$. Cela signifie par conséquent qu'au sein de la phase riche en protéines, phase qui contribue au signal du pic de corrélation, les particules sont au contact les unes des autres. La remontée aux très petits angles apparaissant dès qu'il y a séparation de phases doit être distinguée des variations dues aux interactions attractives entre protéines qui ne se manifestent pas sur le même domaine angulaire. Cette remontée aux très petits angles signifie que de fortes corrélations interviennent dans ce domaine angulaire. Ces corrélations pourraient être caractéristiques de la taille des domaines apparaissant lors de la séparation de phases : des gouttes dans le cas d'un mécanisme de séparation de phases type nucléation-croissance ou une phase bicontinue si la séparation de phases a lieu via une décomposition spinodale. Afin de confirmer ces hypothèses et de mieux caractériser les phénomènes apparaissant dans ce domaine angulaire, il serait nécessaire de procéder à des études de DXPA aux très petits angles (USAXS pour Ultra Small-Angle X-ray Scattering) ou encore à des expériences de diffusion de lumière en s'affranchissant des problèmes de diffusions multiples (Butler 2002; Koenderink, Aarts et al. 2003).

Des courbes de diffusion présentant un pic de corrélation ainsi qu'une forte remontée aux petits angles ont déjà été observées sur d'autres mélanges PEG-protéines avec l'ATCase (Budayova, Bonneté et al. 1999) et l' α -crystalline (Finet&Tardieu, en préparation). Nous avons représenté sur la Figure IV.B.7 le rapport $I(s)/I_0(s)$ pour ces systèmes ainsi que pour l'urate oxydase en condition de séparation de phases. L'allure générale des trois courbes est similaire, la principale différence se situant dans la position du pic de corrélation : ainsi si pour l'urate oxydase ($\sigma \approx 70 \text{ \AA}$) il se trouve à un angle de diffusion égal à $s \approx 0.0153 \text{ \AA}^{-1}$, pour l'ATCase ($\sigma \approx 120 \text{ \AA}$) il se situe à $s \approx 0.0109 \text{ \AA}^{-1}$ et pour l' α -crystalline ($\sigma \approx 170 \text{ \AA}$) à $s \approx 0.0083 \text{ \AA}^{-1}$. Par conséquent, plus la protéine est de taille importante, plus le pic de corrélation est déplacé

vers les petits angles. Cette évolution est attendue car les angles de diffusion correspondants aux pics de corrélation sont associés à des distances moyennes ($d = \frac{1}{s}$) entre particules respectivement de 65Å, 92Å et 120Å pour l'urate oxydase, l'ATCase et l' α -cristalline. En supposant que les particules dans la phase concentrée sont en contact, les valeurs attendues de longueur de corrélation sont autour de 70Å pour l'urate oxydase, de 120Å pour l'ATCase et de 170Å pour l' α -cristalline. Les valeurs obtenues ici à partir des courbes de diffusion sont inférieures aux diamètres respectifs des particules considérées mais rappelons que la correspondance entre s et d donne seulement un ordre de grandeur de la distance moyenne entre particules ; nous pouvons donc conclure que dans chacune des solutions, les solutions sont très concentrées en protéines et les particules sont au contact.

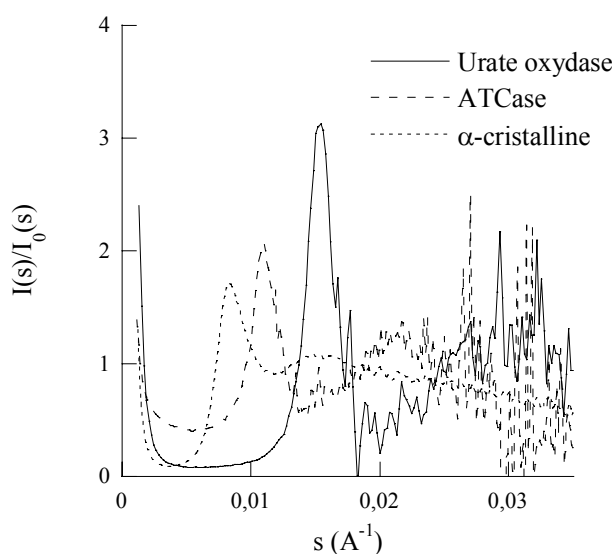


Figure IV.B.7 : Rapport de l'intensité diffusée par le mélange protéine-polymère sur l'intensité diffusée de la solution de protéines seules pour trois systèmes différents : urate oxydase (PEG 8kDa 14%, 100mM NaCl, $c_{\text{protéine}}=13\text{mg/ml}$, 50mM Tris pH8.5), α -cristalline (PEG 8kDa 15%, $c_{\text{protéine}}=40\text{mg/ml}$, 150mM Phosphate pH6.8) (Finet&Tardieu, en préparation), ATCase (PEG 8kDa 10%, 100mM NaAcetate, $c_{\text{protéine}}=30\text{mg/ml}$, 10mM NaBorate pH8.3) (Budayova, Bonneté et al. 1999).

Nous avons examiné plus en détail le mélange urate oxydase ($c_{\text{protéine}}=13\text{mg/ml}$ – PEG 8kDa 14%) en essayant de modéliser le signal de diffusion. Cette solution, parmi tous les mélanges ayant donné lieu à une séparation de phases, est celle dont le surnageant diffuse le moins. Ce mélange est par conséquent celui qui a le plus transité, la quasi-totalité des protéines se trouvant dans la phase dense. Il nous est malheureusement impossible d'avoir une idée de la concentration en PEG 8kDa au sein de cette phase dense (voir partie précédente). Nous avons malgré tout considéré cette concentration négligeable en supposant que le

polymère se trouvait dans la phase diluée en protéines. Cette approximation repose sur l'allure théorique d'un diagramme de phases colloïde-polymère (Lekkerkerker, Poon et al. 1992; Ilett, Orrock et al. 1995) ainsi que sur le tracé expérimental du diagramme de phases PEG-protéine (Annunziata, Asherie et al. 2002; Annunziata, Ogun et al. 2003). Si la concentration en PEG est négligeable dans la phase dense, le terme croisé (eq. (II-21)) peut aussi être négligé et la soustraction de l'intensité diffusée totale par l'intensité diffusée par le surnageant peut simplement s'écrire comme le produit d'un facteur de forme et d'un facteur de structure caractérisant la phase dense: $I(c,s)=I(0,s).S(c,s)$. Nous avons modélisé (Figure IV.B.8) le facteur de structure expérimental à l'aide du modèle à un composant présenté dans le chapitre précédent. Les fractions volumiques expérimentales en protéines évaluées grossièrement dans la phase dense étant très élevées, nous avons préféré utiliser l'équation de fermeture de Percus-Yevick plutôt que l'équation HNC moins précise pour de telles concentrations (Hansen et McDonald 1976). Les différences finales observées sur les facteurs de structure théoriques en utilisant l'une ou l'autre de ces équations sont malgré tout relativement faibles. Pour le traitement numérique nous avons conservé les paramètres des potentiels coulombiens et de Van der Waals déterminés dans le chapitre précédent. Le facteur de structure expérimental a ainsi pu être ajusté avec une fraction volumique de 58% (Figure IV.B.8). Ces traitements numériques caractérisant une phase concentrée de protéines ne rendent évidemment pas compte de la remontée à l'origine due à la formation de la phase bicontinue et/ou des gouttes.

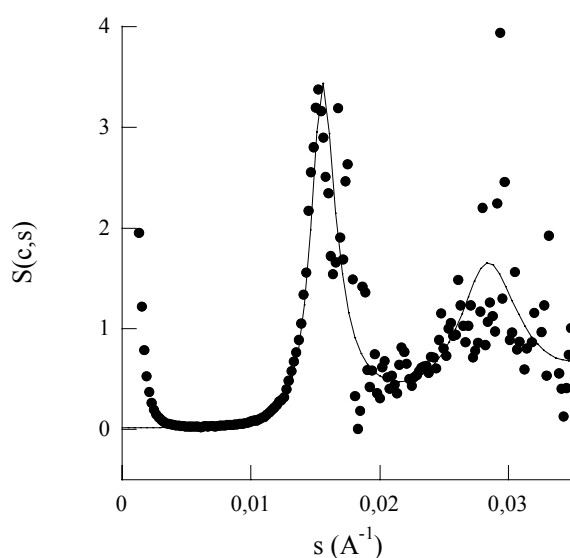


Figure IV.B.8 : Facteur de structure expérimental (points) et théorique (trait continu) dans le cas du mélange d'urate oxydase ($c_{\text{protéine}}=13\text{mg/ml}$) et de PEG 8kDa 14%.

C. CROISSANCE, MORPHOLOGIES, FACIES ET POLYMORPHISME

Dans le second chapitre, nous avons mis en évidence lors de premiers essais de cristallisation que les cristaux d'urate oxydase présentaient différents faciès : pour une taille de PEG et une concentration en protéines données, à faible concentration en PEG, un faciès de type « massif » est observé alors qu'à plus forte concentration en PEG, les cristaux sont sous forme d'« aiguilles » (Figure II.C.1). Nous avons désiré dans ce paragraphe étudier plus en détail la croissance cristalline de l'urate oxydase à diverses concentrations en PEG et en protéines dans le cas du PEG 8kDa.

Les essais ont été réalisés dans un tampon 50mM Tris pH8.5 en présence d'un ajout de 100mM NaCl, soit sur de faibles volumes (inférieurs à 10 μ l) grâce à la technique de *Microbatch*® à température ambiante, soit dans des cellules en verre dans lesquelles nous avons placé environ 50 μ l de solution, recouverte d'huile de paraffine et d'une lame de verre. Ces cellules ont été utilisées sur des platines à effet Peltier permettant de contrôler la température de travail à 0.1°C près. La cristallisation de l'urate oxydase a été suivie dans le temps à l'aide du système d'acquisition d'images décrit dans le paragraphe précédent. Afin de s'affranchir du temps aléatoire de nucléation, toutes les solutions ont été ensemencées à partir de cristaux poussés au sein d'une solution de PEG 8kDa 7% + 100mMNaCl avec une concentration en protéines initiale de 13.6mg/ml. Avant d'être introduits en très faibles quantités dans la solution d'étude, ces cristaux sont auparavant broyés.

I. Croissance cristalline

1. Effet de la concentration en PEG 8kDa

Nous avons en premier lieu étudié l'effet de la concentration en PEG 8kDa sur la croissance cristalline de l'urate oxydase. La concentration en protéines est fixée à 13.6mg/ml. D'après le diagramme de phases tracé sur la Figure IV.A.1, la solution étudiée est sursaturée et susceptible de cristalliser à partir d'une concentration en PEG 8kDa de 5% (en présence de 100mM NaCl). Les concentrations d'étude en PEG ont par conséquent été de 5% à 9%, cette valeur maximale étant limitée par les concentrations stocks en PEG et en protéines. Les résultats de suivi de croissance cristalline pour des concentrations en PEG 8kDa de 5%, 6%, 7%, 8% et 9% sont représentés sur les Figures IV.C.1 à IV.C.5.

En se basant sur la courbe de solubilité (Figure IV.A.1) déterminée précédemment, les sursaturations ($\beta = C/C_s$) sont égales à $\beta = 1.10$ pour le PEG 8kDa 5%, $\beta = 1.38$ pour le PEG

8kDa 6%, $\beta=1.60$ pour le PEG 8kDa 7%, $\beta=2.40$ pour le PEG 8kDa 8% et $\beta=5.66$ pour le PEG 8kDa 9%.

Nous retrouvons comme pour les premières expériences (Figure II.C.1) que pour de faibles sursaturations (PEG 8kDa 5%), les cristaux sont massifs et que pour de plus fortes sursaturations (PEG 8kDa 6%), ils sont sous forme d'aiguilles. Pour des concentrations encore plus élevées de 7%, 8% et 9%, un troisième faciès cristallin est observé : les cristaux sont sous forme de plaquettes. Il est important de préciser que les faciès et les cinétiques ci-dessus sont indépendants du faciès d'origine des microcristaux (broyés) ayant servi à l'ensemencement. En accord avec le diagramme de phases présenté sur la Figure IV.A.1, ainsi qu'avec les expériences réalisées sans ensemencement (Figures IV.B.2 et IV.B.3), le processus de cristallisation pour les conditions PEG8kDa 8% et PEG8kDa 9% est précédé d'une séparation de phases via la formation de gouttes (cas du PEG8kDa 8%) ou d'une phase bicontinue (cas du PEG8kDa 9%). La séparation de phases liquide-liquide est métastable et apparaît la première tandis que la phase cristalline s'identifie à la phase d'équilibre thermodynamique (Figures IV.C.4 et IV.C.5).

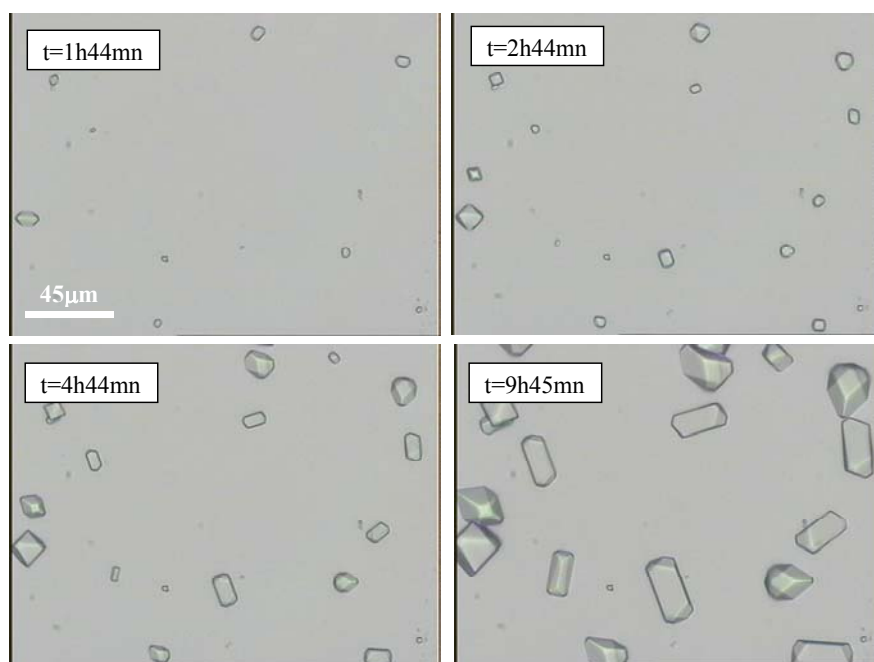


Figure IV.C.1 : Croissance cristalline pour une concentration initiale en PEG 8kDa de 5% ($c_{\text{protéine}}=13.6$ mg/ml).

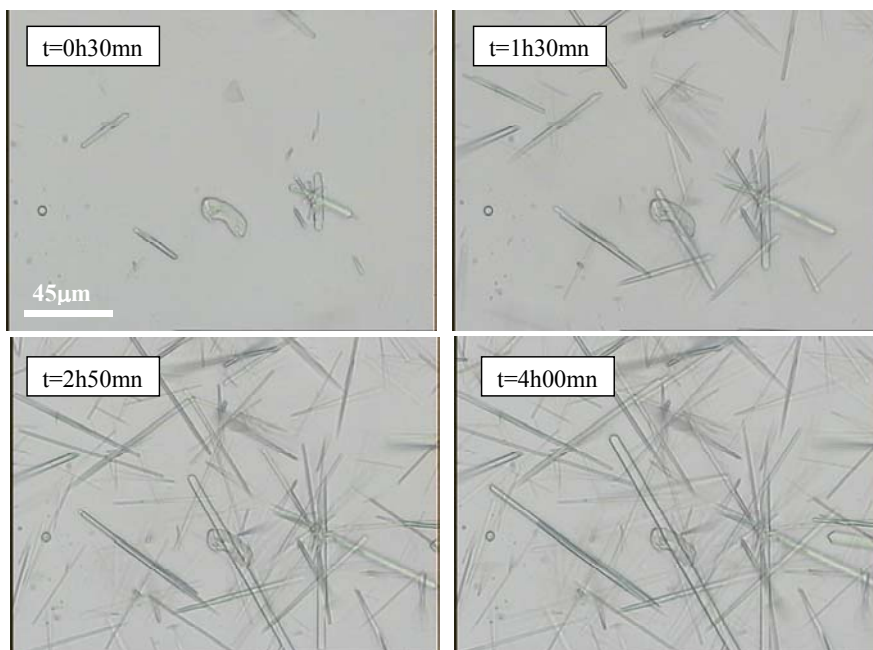


Figure IV.C.2 : Croissance cristalline pour une concentration initiale en PEG 8kDa de 6% ($c_{\text{protéine}}=13.6 \text{ mg/ml}$).

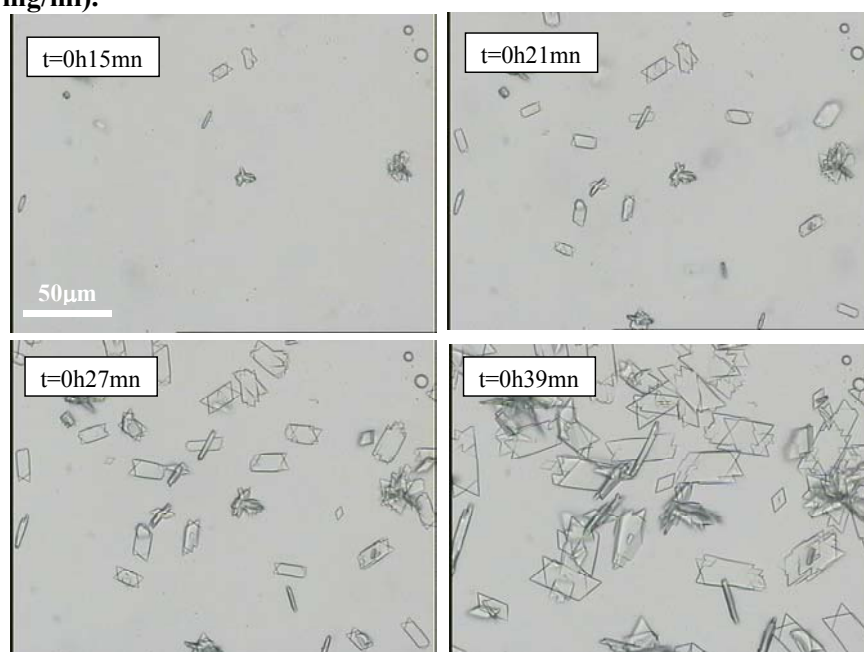


Figure IV.C.3 : Croissance cristalline pour une concentration initiale en PEG 8kDa de 7% ($c_{\text{protéine}}=13.6 \text{ mg/ml}$).

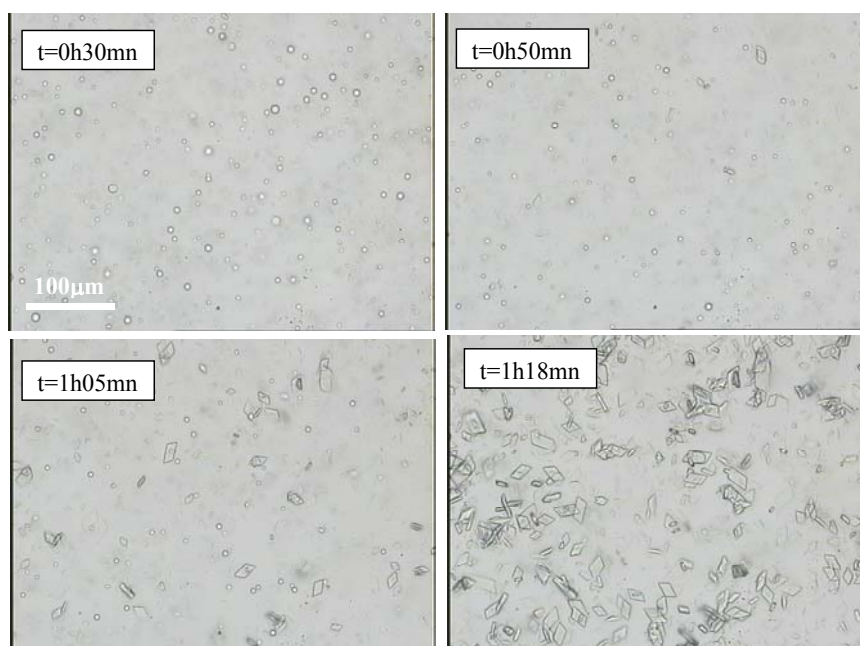


Figure IV.C.4 : Croissance cristalline pour une concentration initiale en PEG 8kDa de 8% ($c_{\text{protéine}}=13.6$ mg/ml).

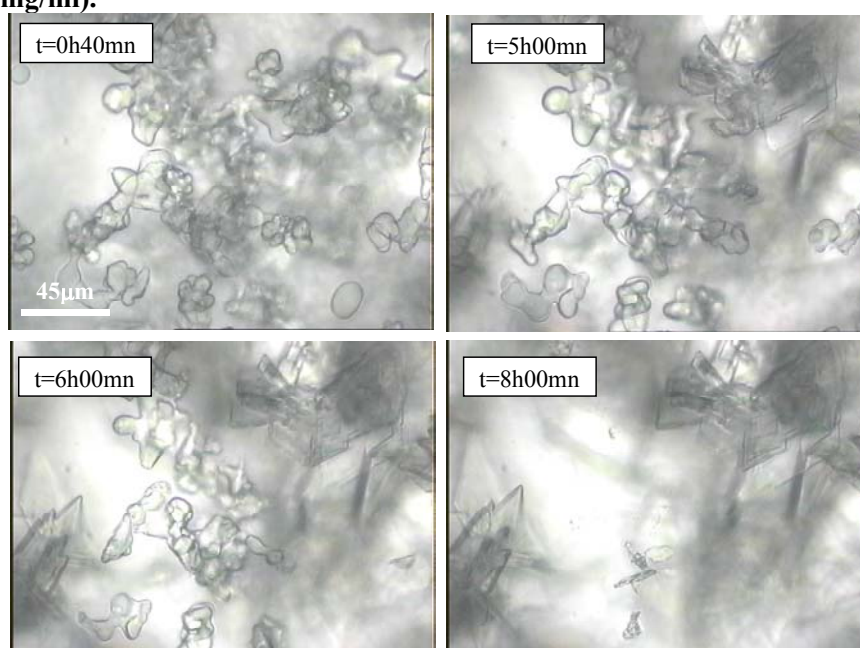


Figure IV.C.5 : Croissance cristalline pour une concentration initiale en PEG 8kDa de 9% ($c_{\text{protéine}}=13.6$ mg/ml).

Les expériences réalisées avec un ajout de PEG 8kDa de 8% et 9% nous montrent donc que la séparation de phases liquide-liquide précède et donc retarde la croissance cristalline. Ainsi avec un ajout de 9% en PEG, l'apparition des premiers cristaux observables par microscopie optique se fait au bout de plusieurs heures. A l'issue de cette séparation de phases, les conditions de cristallisation sont totalement modifiées : une zone riche en protéine et probablement pauvre en PEG (comme nous l'a montré l'ajustement du facteur de structure Figure IV.B.8) est créée ainsi qu'une zone pauvre en protéine et probablement riche en PEG.

D'après le diagramme de phases (Figure IV.A.1), la séparation de phases liquide-liquide est métastable par rapport à la cristallisation sur la gamme de concentration en PEG 8kDa étudiée. Par conséquent, la phase diluée, dont la concentration en PEG 8kDa est égale à la concentration initiale introduite, est sursaturée et peut cristalliser. Quant à la phase dense en protéines ($c_{\text{protéine}} > 100\text{mg/ml}$), même si la concentration en PEG 8kDa présente est inconnue, nous savons que sa fraction volumique est très importante voire comparable à celle que l'on trouve dans les cristaux. Par conséquent, il est légitime de penser que cette phase est aussi sursaturée. Expérimentalement, il nous a été très difficile de distinguer au sein de quelle phase les cristaux apparaissaient.

En résumé, la présence d'une séparation de phases liquide-liquide semblent dans notre cas ralentir le processus de cristallisation. Ces résultats expérimentaux sur l'urate oxydase sont à rapprocher de ceux obtenus sur le lysozyme où pour de fortes sursaturations, la cristallisation était précédée et retardée par une séparation de phases « classique » liquide-liquide (formation de gouttes) ou par un gel (Muschol et Rosenberger 1997; Galkin et Vekilov 2000).

2. Effet de la concentration en protéines

Nous nous sommes aussi déplacés dans le diagramme de phases en étudiant l'effet de la concentration en protéines pour une concentration en PEG 8kDa ajouté de 7%, 8% et 9%. A ces concentrations et pour une concentration initiale en protéines de 13.6mg/ml, rappelons que les cristaux adoptaient une forme de plaquettes. Plusieurs essais ont été réalisés et seuls sont présentés ici les essais effectués au voisinage de la courbe de solubilité ($\beta \approx 1$) en-dessous de la courbe de séparation de phases. Dans le cas d'un ajout en PEG 8kDa de 9%, les cristaux sont toujours sous forme de plaquettes mais ils sont cette fois-ci bien facétés et « isolés » (Figure IV.C.6), contrairement aux cristaux issus d'une séparation de phases bicontinue. Pour un ajout de 7% (Figure IV.C.7) ou 8% (Figure IV.C.8) en PEG 8kDa, un phénomène nouveau est observé. Les cristaux poussent tout d'abord sous forme de plaquettes pour ensuite évoluer vers une forme massive. L'orientation finale du cristal semble lié à son orientation initiale par un axe d'ordre 2 situé dans le plan des photos. A notre connaissance, il n'existe aucune référence dans la littérature à un tel processus macroscopique de croissance cristalline pour les protéines. Les images montrent que les cristaux poussent sur la surface d'une couche déjà présente. Notre suggestion est que nous sommes ici en présence d'un phénomène d'épitaxie, la plaquette cristalline servant de support initial ayant une forme cristalline différente du cristal en croissance. Il est important de noter que dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 8%,

tous les cristaux n'adoptent pas un faciès de type massif en fin de croissance, certains d'entre eux demeurant sous forme de plaquettes (Figure IV.C.7).

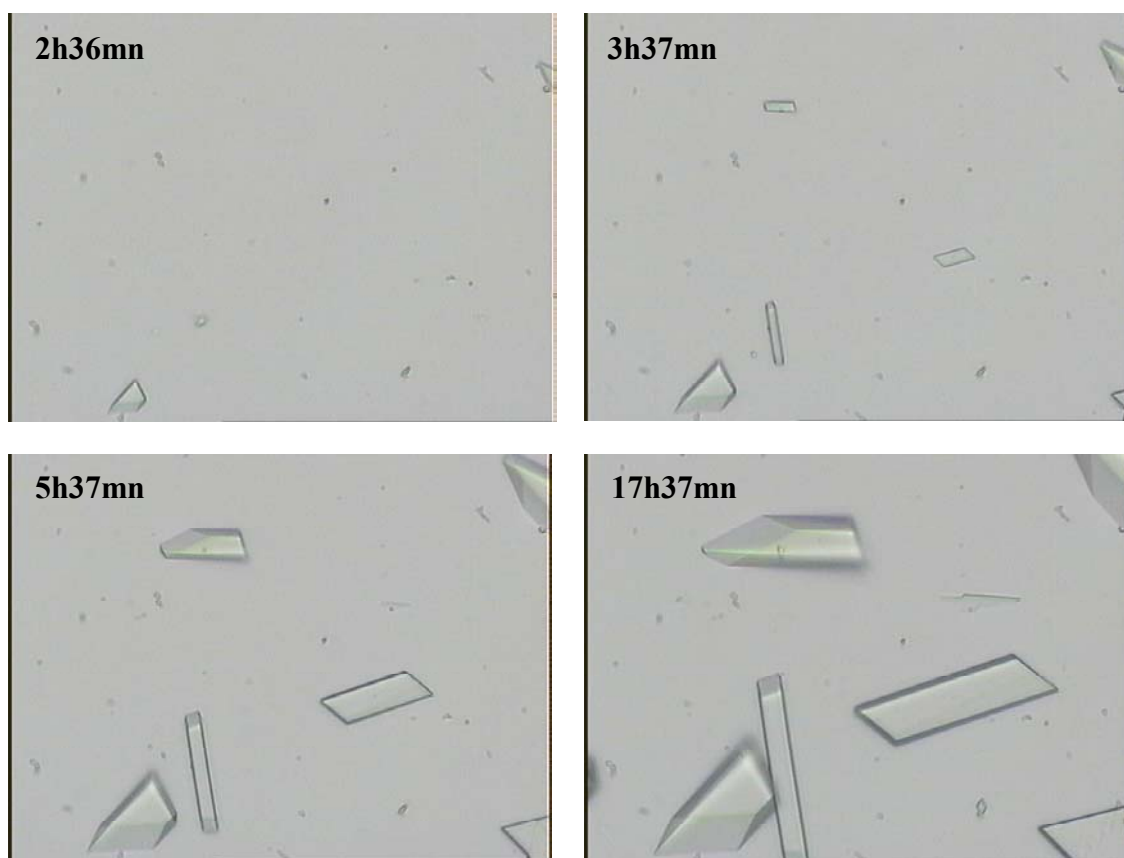


Figure IV.C.6 : Suivi de la croissance cristalline d'une solution d'urate oxydase à une concentration en protéines de 3.6mg/ml et en PEG 8kDa de 9%. Dimensions de chaque photo : 220 μ m x 165 μ m.

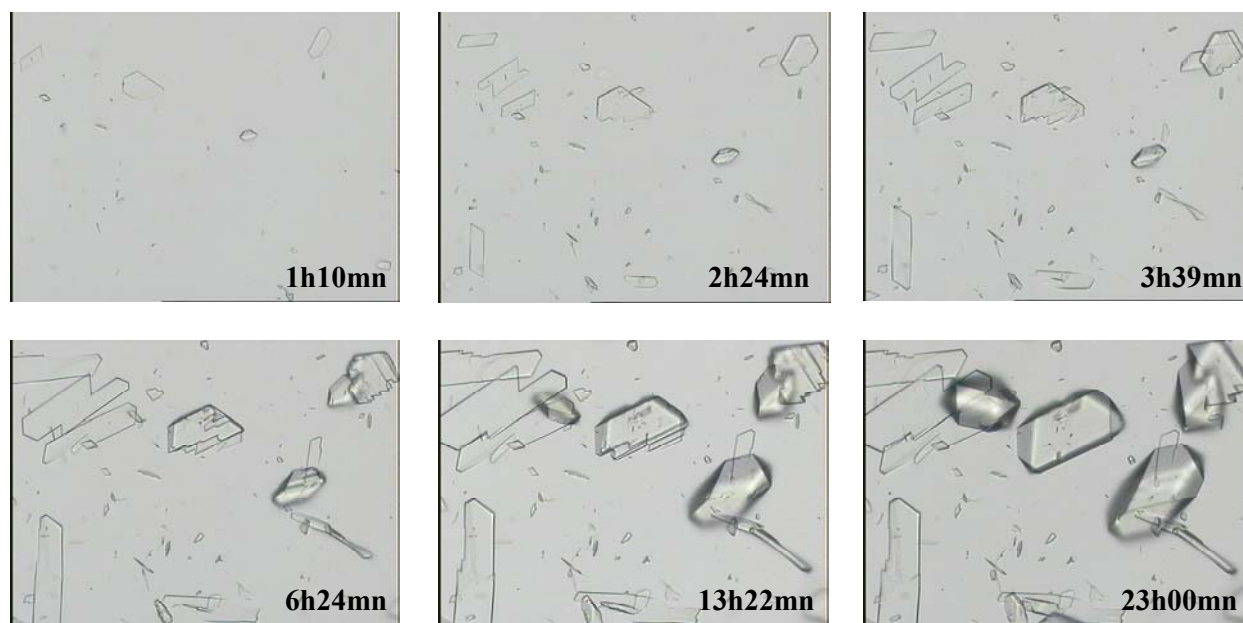


Figure IV.C.7 : Suivi de la croissance cristalline d'une solution d'urate oxydase à une concentration en protéines de 5.9mg/ml et en PEG 8kDa de 8%. Dimensions de chaque photo : 430 μ m x 320 μ m.

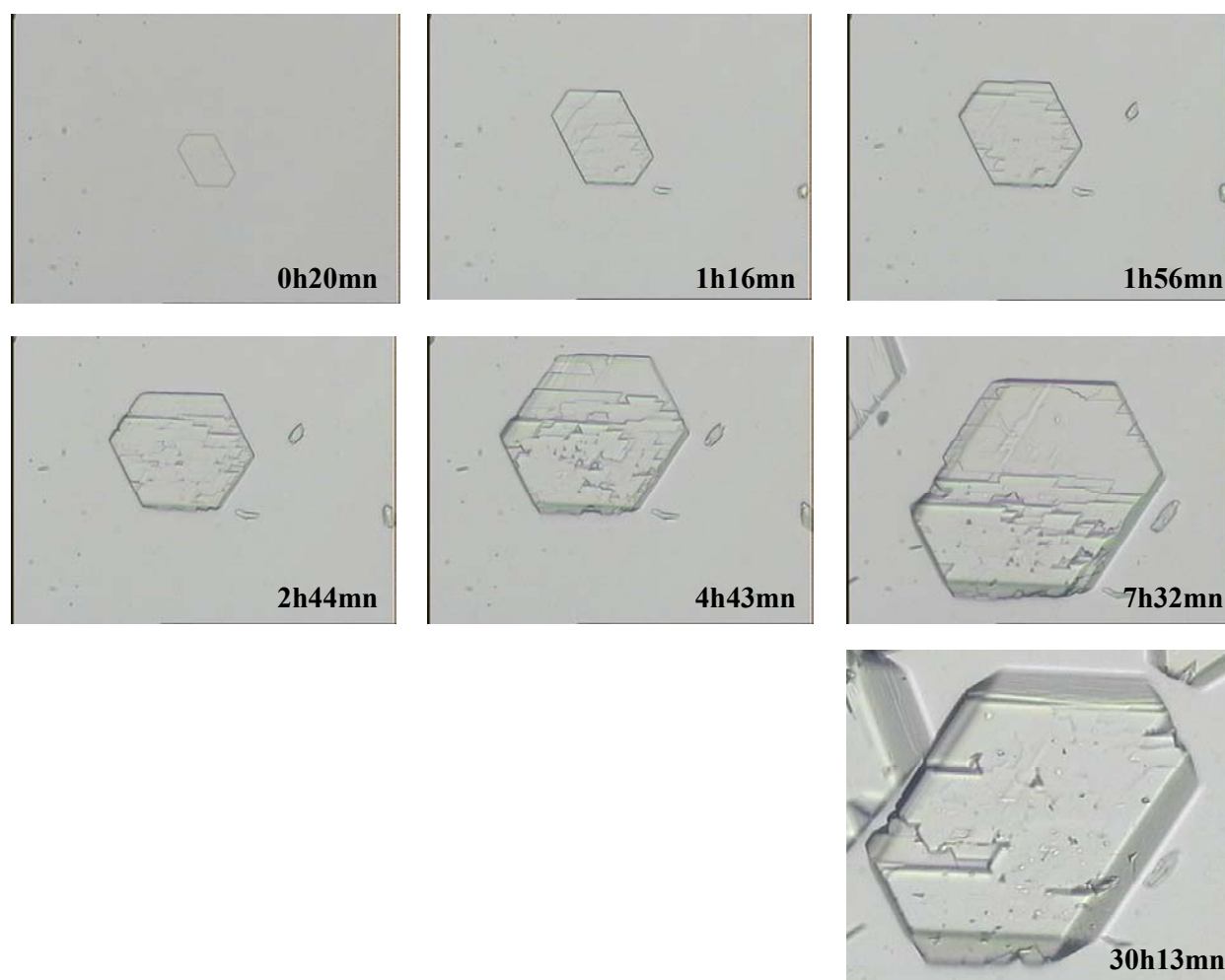


Figure IV.C.8 : Suivi de la croissance cristalline d'une solution d'urate oxydase à une concentration en protéines de 8.6mg/ml et en PEG 8kDa de 7%. Dimensions de chaque photo : 430 μ m x 320 μ m.

II. Caractérisation des différents faciès observés

Il est possible de caractériser deux polymorphes par des expériences de croissance cristalline en fonction de la température (Boistelle, Astier et al. 1992). Nous avons désiré savoir si les trois faciès observés précédemment (massif, aiguille et plaquette) appartenaient à la même variété polymorphique. Nous avons réalisé pour cela des expériences de croissance cristalline régulées en température à pH 8.5 dans un tampon Tris 50mM en présence de 100mM NaCl. Trois concentrations de PEG 8kDa ont été étudiées : 5%, 7% et 9%. Pour chaque concentration, nous nous sommes placés au voisinage de la courbe de solubilité ($\beta \approx 1$) (voir Figure IV.A.1). Les solutions ont étéensemencées avec des cristaux macroscopiques (non broyés) sous forme de massifs, de plaquettes ou d'aiguilles. Nous avons alors déterminé la température de dissolution (à 1°C près) pour chacune des solutionsensemencées en les

plaçant sur une platine à effet Peltier. Le principe de l'expérience est illustré par la Figure IV.C.9 : la température de dissolution est déterminée par des expériences de croissance-dissolution successives. A cette température, la solubilité des cristaux introduits est égale à la concentration initiale en protéine, respectivement 11.4mg/ml pour le PEG 8kDa 5%, 7.7mg/ml pour le PEG 8kDa 7% et 2.7mg/ml pour le PEG 8kDa 9%.

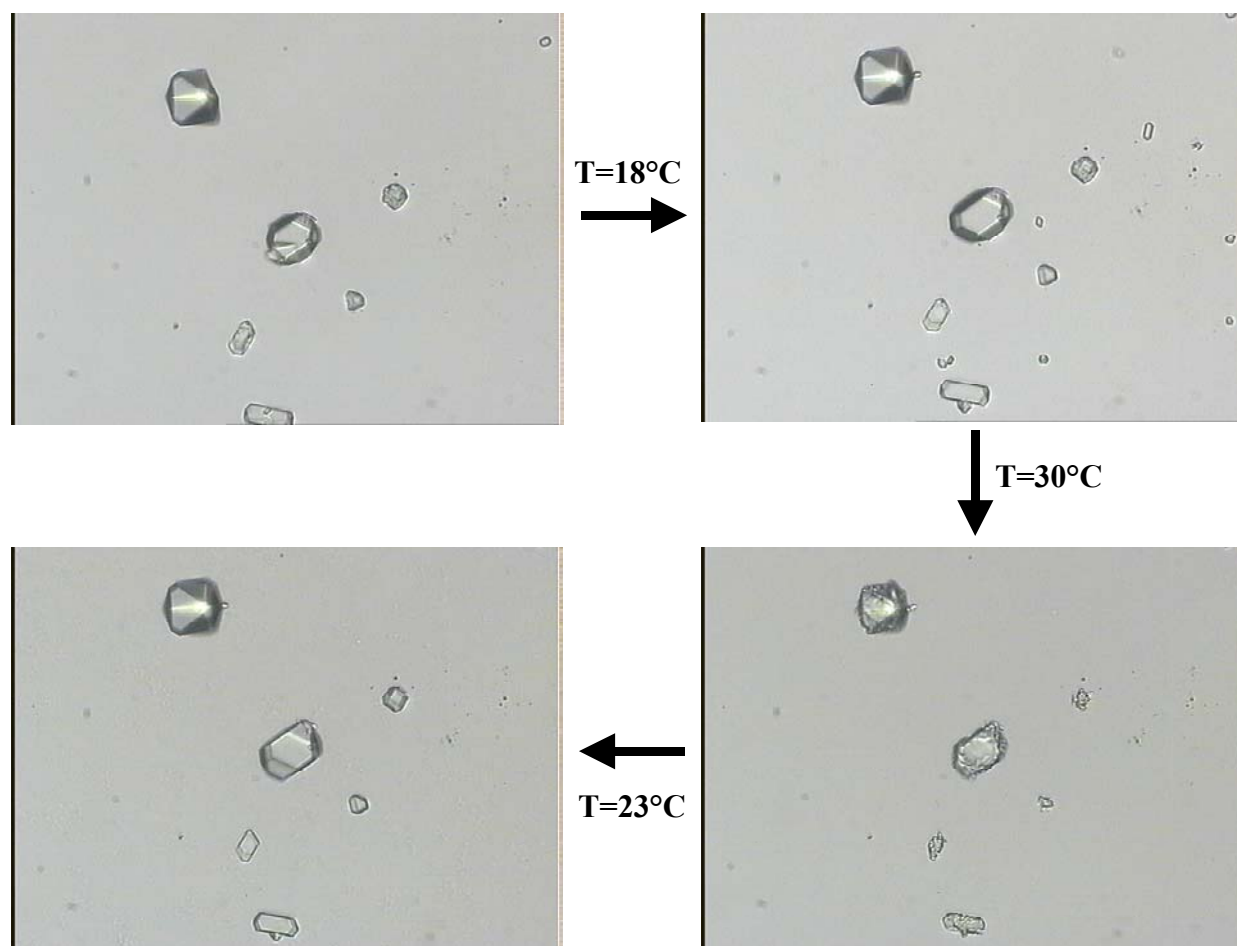


Figure IV.C.9 : Détermination de la température de dissolution pour les cristaux « massifs » dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 5% et pour une concentration en protéines de 11.4mg/ml. Dimensions de chaque photo : 430µm x 320µm.

Les résultats obtenus pour les trois faciès sont rassemblés sur le Tableau IV.C.1. Quelle que soit la concentration en PEG 8kDa, la température de dissolution des massifs et des aiguilles est identique ; ceci signifie que ces deux faciès ont exactement la même solubilité pour une concentration en PEG 8kDa de 5%, 7% et 9% à des températures respectives de 26°C (pour 5%) et 31°C (pour 7% et 9%). Les massifs et les aiguilles correspondent donc au même polymorphe.

Il n'en est pas de même pour les cristaux sous forme de plaquettes. Ainsi, pour un ajout de PEG 8kDa 5% et pour une concentration initiale en protéine de 11.4mg/ml, il est

impossible de les stabiliser quelle que soit la température (jusqu'à 5°C). Cela signifie qu'à 5°C par exemple, la solubilité des plaquettes est supérieure à 11.4mg/ml. Pour un ajout de 7% et 9%, il est possible de déterminer une température de dissolution qui est différente des celle obtenue pour les deux autres faciès pour 7% et presque identique pour 9%. Ces expériences montrent clairement que les plaquettes correspondent à un polymorphe différent de celui des massifs et des aiguilles.

	« massifs »	« aiguilles »	« plaquettes »
PEG 8kDa 5% $c_{\text{protéine}}=11.4\text{mg/ml}$	26°C	26°C	<5°C
PEG 8kDa 7% $c_{\text{protéine}}=7.7\text{mg/ml}$	31°C	31°C	19°C
PEG 8kDa 9% $c_{\text{protéine}}=2.7\text{mg/ml}$	31°C	31°C	30°C

Tableau IV.C.1 : Températures de dissolution des cristaux d'urate oxydase à différentes concentrations de PEG 8kDa et de protéines. Ces températures sont données à +/- 1°C.

Nous l'avons prouvé d'une autre manière en nous plaçant dans la condition PEG 8kDa 7%, $c_{\text{protéine}}=7.7\text{mg/ml}$ et à une température de 17°C (Figure IV.C.10).

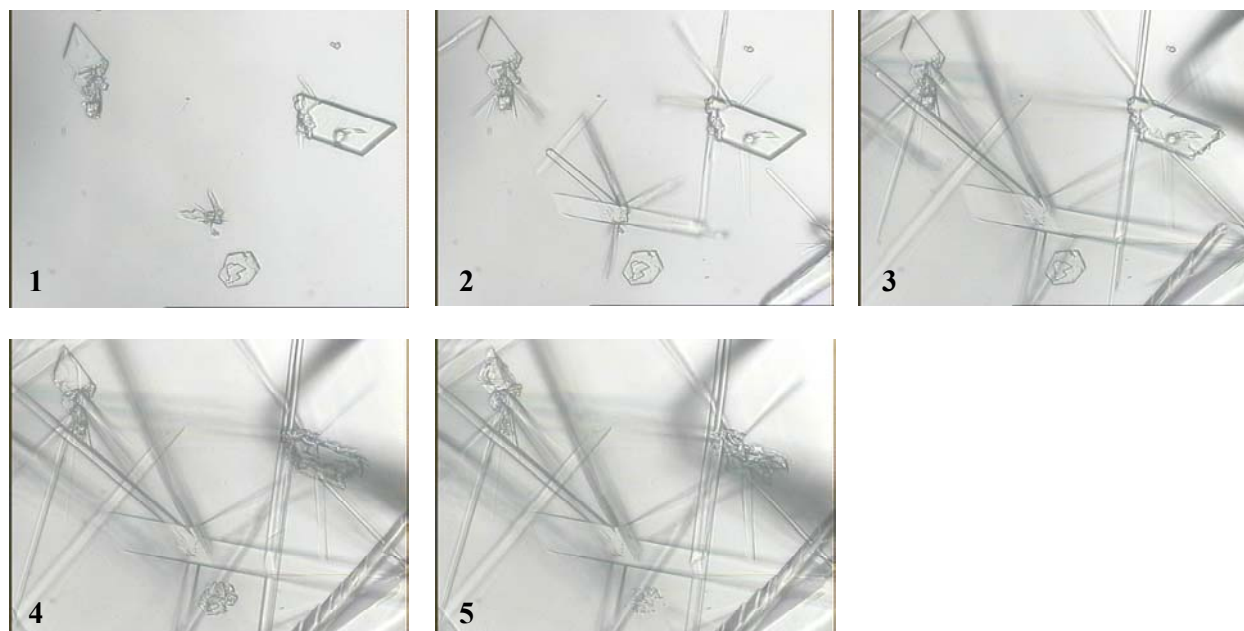


Figure IV.C.10 : Dissolution de « plaquettes » et croissance de « massifs/aiguilles » à une température de 17°C, dans le cas d'un ajout de PEG 8kDa 7% et pour une concentration en protéines de 7.7mg/ml. Dimensions de chaque photo : 430µm x 320µm.

A cette température inférieure à la température de dissolution de 19°C, les plaquettes croissent très légèrement. Nous observons, qu'au bout d'un certain temps (environ une heure),

des aiguilles apparaissent au sein de la solution ainsi que sur les plaquettes. La température de dissolution des aiguilles étant de 31°C dans cette condition, ces cristaux croissent. Un processus de dissolution des plaquettes débute alors au bout de quelques heures tandis que les aiguilles ainsi que les massifs poursuivent leur croissance. L'explication de ce processus est la suivante : la croissance des aiguilles/massifs provoque une diminution de la concentration en protéines au sein de la solution (initialement de 7.7mg/ml). La concentration en protéine devient alors inférieure à la solubilité des plaquettes à 17°C (égale environ à 7.7mg/ml) mais reste supérieure à la solubilité des aiguilles/massifs, ce qui entraîne une dissolution des plaquettes et une croissance des aiguilles/massifs. Cette expérience renforce l'idée que les plaquettes et les aiguilles/massifs correspondent à deux variétés polymorphiques différentes. Des essais de cristallisation sont actuellement en cours afin d'obtenir des cristaux exploitables de ce deuxième polymorphe en vue de le caractériser par diffraction des rayons X.

Au bout de plusieurs mois les cristaux ayant poussé dans les solutions après ajout de PEG 8kDa 4%, 5%, 6% et 7% ont un faciès de type massifs ou aiguilles, ceux ayant poussé dans une solution de PEG 8kDa 8% un faciès de type massifs, aiguilles ou plaquettes, et ceux qui ont poussé dans une solution de PEG 8kDa égale à 10% et 12%, un faciès de type plaquettes. Ces formes cristallines s'identifient aux formes à l'équilibre. D'après ces observations nous avons proposé le diagramme de phases des deux polymorphes (polymorphe I : massif/aiguille ; polymorphe II : plaquette) (Figure IV.C.11).

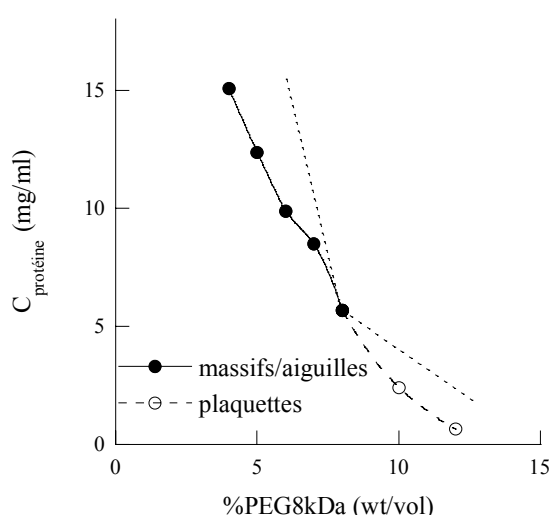


Figure IV.C.11 : Schématisation des courbes de solubilité des deux polymorphes observés. Les courbes en pointillés courts correspondent aux prolongements théoriques des deux courbes de solubilité.

Dans ce chapitre, nous avons étudié les processus de séparations de phase que peut rencontrer une solution d'urate oxydase en présence d'un ajout de PEG 8kDa. Pour cela nous avons tout d'abord tracé le diagramme de phases de l'urate oxydase : celui-ci présente une courbe de solubilité, ou courbe de séparation de phases solide-liquide, ainsi qu'une courbe de séparation de phase liquide-liquide métastable par rapport à la courbe de solubilité (sur toute la gamme de concentration en PEG 8kDa étudiée). La séparation de phase liquide-liquide a été caractérisée par video-microscopie et par Diffusion des rayons X aux Petits Angles. La phase dense (gouttelettes ou phase bicontinue) a notamment pu être modélisée par une solution en protéines très concentrée. Nous avons montré que le passage par une séparation de phase liquide-liquide ralentit le processus de cristallisation. De plus, selon la position dans ce diagramme, trois faciès différents de cristaux ont été mis en évidence : des cristaux « massifs », des cristaux « en aiguilles » ainsi que des cristaux sous forme de « plaquettes ». Des études en température ont démontré que les cristaux « massifs » et en « aiguilles » correspondent au même polymorphe tandis que les cristaux sous forme de plaquettes appartiennent à une autre variété polymorphique.

Chapitre 5 : Cristallisation et structure de complexes d'urate oxydase

Le mécanisme d'action de l'urate oxydase est encore partiellement inconnu. Dans la continuité des premiers travaux réalisés par Colloc'h et coll. (Colloc'h, El Hajji et al. 1997), nous avons entrepris, dans le cadre d'une étroite collaboration avec Mohamed El Hajji et Bertrand Castro de Sanofi-Synthelabo, Nathalie Colloc'h de l'Université de Caen (UMR 6551), Pascal Retailleau et Thierry Prangé du LURE, de cristalliser plusieurs complexes d'urate oxydase avec différents inhibiteurs, présentant des analogies structurales avec le substrat. Notre but était de résoudre ainsi par diffraction des rayons X les structures de ces complexes en vue d'apporter des éléments de réponse quant au mécanisme d'action de l'urate oxydase.

Dans ce chapitre, après avoir rappelé l'état actuel des recherches sur le mécanisme d'action de l'urate oxydase, seront présentées les études de cristallisation menées sur plusieurs complexes de l'urate oxydase en présence de différents inhibiteurs. L'apport des structures de ces complexes sur le mécanisme d'action sera ensuite discuté.

A. ETAT DES LIEUX SUR LE MECANISME D'ACTION

Depuis de nombreuses décennies, il a été suggéré que le produit de la réaction enzymatique de l'urate oxydase n'était pas l'allantoïne (Bentley et Neuberger 1952). Plusieurs métabolites ont été proposés mais c'est seulement ces dernières années que le groupe de Tipton a montré de manière définitive par des expériences de cinétique couplées à des études RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) que le vrai produit de la réaction catalysée par l'urate oxydase est le 5-hydroxyisourate, qui ensuite, s'hydrolyse spontanément en allantoïne (Kahn, Serfozo et al. 1997) (Figure V.A.1).

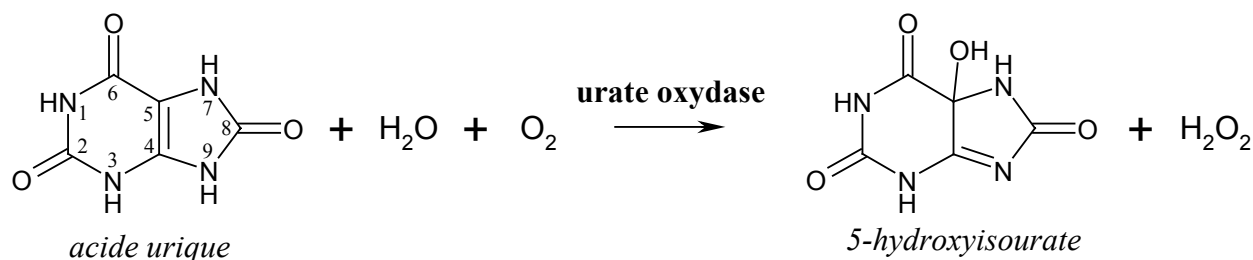


Figure V.A.1 : Bilan de la réaction de l'urate oxydase sur l'acide urique.

Le groupe de Tipton a aussi contribué à montrer que cette réaction enzymatique ne fait intervenir aucun cofacteur, au contraire des réactions impliquant d'autres oxydases. Pour la plupart des oxydases, c'est en effet le cofacteur qui oxyde le substrat, le dioxygène réagissant avec le cofacteur pour le réoxyder. Dans le cas de l'urate oxydase, le dioxygène agit directement sur l'acide urique (Kahn et Tipton 1997). Par ailleurs, dans les conditions d'action de l'urate oxydase, l'acide urique se fixe sous forme de monoanion, la déprotonation étant effectuée sur l'azote 3 (Kahn, Serfozo et al. 1997; Kahn et Tipton 1997), le groupe hydroxyle fixé sur le carbone 5 du produit provenant de l'eau (Kahn, Serfozo et al. 1997). Il est connu depuis longtemps que les atomes

d'oxygène présents dans le peroxyde d'oxygène (produit par la réaction) proviennent du dioxygène réactif (Bentley et Neuberger 1952). En interprétant des expériences d'absorption et de fluorescence UV-visible, Tipton et coll. ont proposé que la réaction transformant l'acide urique en 5-hydroxyisourate se produit via trois intermédiaires qu'ils ont identifiés respectivement comme l'acide urique sous forme dianionique (en N3 et N9), le 5-hydroperoxyisourate et le déhydrourate (Kahn et Tipton 1998; Sarma et Tipton 2000) (Figure V.A.2).

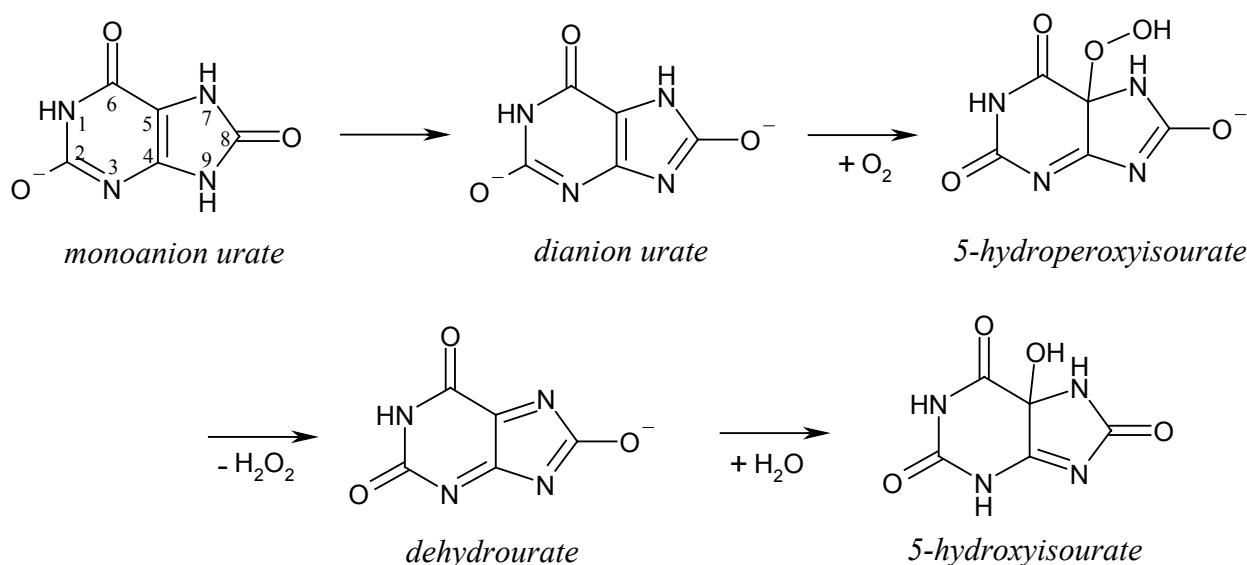


Figure V.A.2 : Mécanisme d'action de l'urate oxydase en plusieurs étapes proposé par Kahn et Tipton.

Simultanément à la publication des travaux de Tipton et coll., la structure tridimensionnelle de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* a été résolue en présence d'un inhibiteur, la 8-azaxanthine, au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris (LMCP) par Nathalie Colloc'h et coll. (Colloc'h, El Hajji et al. 1997). L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* avait cristallisé dans son tampon au bout de plusieurs mois en chambre froide. Ces cristaux appartenant au groupe orthorhombique I222 ont diffracté jusqu'à une résolution de 2.05Å. Cette structure a confirmé qu'il n'y avait pas de cofacteur visible dans le site actif et que l'urate oxydase était un tétramère. Elle a de plus révélé que l'inhibiteur et donc le site actif (au nombre d'une unité par monomère) sont situés dans une poche à l'interface dimérique. L'inhibiteur est stabilisé en particulier par la glutamine 228 et l'arginine 176. Par ailleurs, une molécule d'eau est située à la verticale de la liaison C4-C5. Tenant compte de ces observations, Colloc'h et coll. ont proposé un mécanisme sensiblement différent de celui décrit par Tipton et coll. : la transformation de l'acide urique en 5-hydroxyisourate se déroulerait en une seule étape à partir du dianion de l'urate, véritable substrat de la réaction enzymatique (Figure V.A.3). La position de la molécule d'eau incite en effet à penser qu'elle se fixe sur le carbone C5 pour donner l'hydroxyde correspondant sans passer par l'urate hydroperoxyde. Enfin, simultanément à cette attaque nucléophile de l'eau sur le dianion urate,

Colloc'h et coll. proposent que la formation du peroxyde d'hydrogène résulterait d'un transfert d'électrons du dianion urate vers le dioxygène (Figure V.A.3).

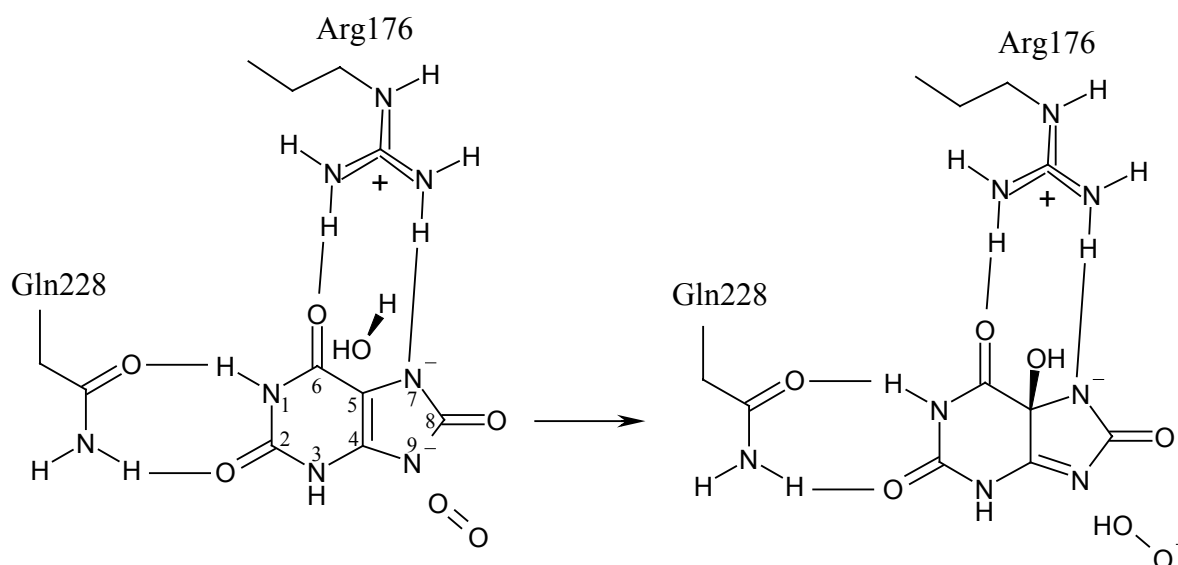


Figure V.A.3 : Mécanisme en une seule étape proposé par Colloc'h et coll (Colloc'h, El Hajji et al. 1997).

B. CRISTALLISATION DE COMPLEXES DE L'URATE OXYDASE

Dans la continuité des travaux de Colloc'h et coll. (Colloc'h, El Hajji et al. 1997), nous avons entrepris de cristalliser plusieurs complexes de l'urate oxydase. Il est en effet très difficile de cristalliser l'urate oxydase avec son substrat, l'acide urique, la réaction enzymatique ayant lieu spontanément en solution en présence d'eau et d'oxygène. L'étude a porté sur des analogues structuraux de l'acide urique, l'objectif étant d'obtenir la structure des complexes inhibiteur-urate oxydase et de pouvoir apporter des éléments de réponse sur le mécanisme d'action de l'urate oxydase.

I. Choix des inhibiteurs et cristallisation des complexes

La résolution de 2.05Å de la première structure du complexe urate oxydase – 8-azaxanthine (Colloc'h, El Hajji et al. 1997) étant légèrement insuffisante pour caractériser sans ambiguïté la structure du site actif et notamment la position de l'inhibiteur et des molécules d'eau, notre première volonté était d'obtenir des cristaux du même complexe à une meilleure résolution. Par la suite, afin d'avoir confirmation du mode de fixation de l'inhibiteur et de la présence éventuelle de molécules d'eau « fonctionnelles » dans le site actif, nous avons alors entrepris de cristalliser et d'obtenir la structure du complexe avec l'acide 9-méthyl urique, dont la structure est encore plus proche de celle du substrat (Figure V.B.1). Les structures avec la 8-azaxanthine et l'acide 9-méthyl urique (voir la partie C suivante) nous ont montré que l'inhibiteur se fixait préférentiellement via son cycle à 6. Afin de définitivement valider cette observation, nous avons voulu résoudre la

structure de l'urate oxydase en présence d'inhibiteurs monocycliques l'acide oxonique, l'uracile et le 5,6-diaminouracile (Figure V.B.1). Notons que la 8-azaxanthine (Laboureur et Langlois 1968), l'acide 9-méthyl urique (Kahn et Tipton 1997) ainsi que l'acide oxonique (Fridovich 1965) sont connus pour être des inhibiteurs de l'urate oxydase ; ils sont par conséquent susceptibles de se fixer au sein du site actif de la protéine. Par contre, il n'existe pas de référence dans la littérature quant à l'influence de l'uracile ou du 5,6-diaminouracile sur la cristallisation et la cinétique d'action de l'urate oxydase. Enfin, nous avons désiré obtenir la structure de la protéine sans inhibiteur en vue notamment de décrire le site actif et de déterminer si les molécules d'eau observées dans les autres structures en présence d'inhibiteur sont toujours présentes ; leur absence montrerait notamment qu'elles sont en interaction avec les inhibiteurs.

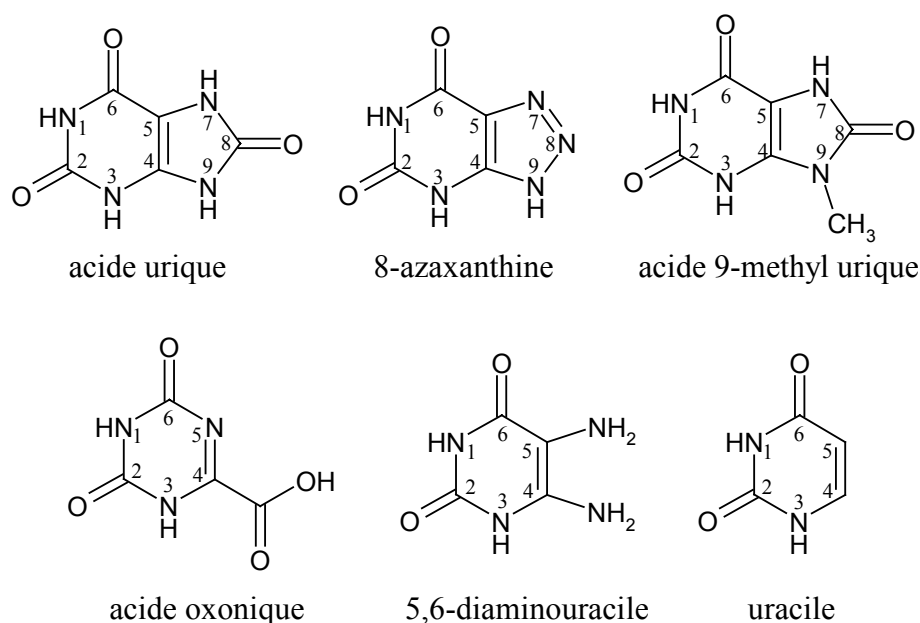


Figure V.B.1 : Structure de l'acide urique et des inhibiteurs utilisés pour la cristallisation des différents complexes.

Les complexes d'urate oxydase ont été préparés en mélangeant une solution d'urate oxydase sans inhibiteur avec les différentes solutions d'inhibiteurs. Les solutions ainsi préparées contenaient une concentration en protéines entre 5 et 10 mg/ml selon les lots et une concentration en inhibiteurs autour 1-2 mg/ml. Les solutions étaient donc en excès d'inhibiteurs dans un tampon Tris pH 8.5. Si l'on se réfère au diagramme de phases présenté dans le chapitre précédent et tracé pour une solution d'urate oxydase dans un tampon 50mM Tris pH8.5 en présence de 100mM NaCl (Figure IV.A.1), il serait possible d'obtenir des cristaux de bonne qualité pour des concentrations de PEG 8kDa comprises entre 5% et 8%, c'est-à-dire en se plaçant au voisinage de la courbe de solubilité. En se plaçant dans cette zone de concentration en PEG 8kDa, nous avons en effet obtenu des cristaux au pouvoir de diffraction élevé (Figure V.B.2).

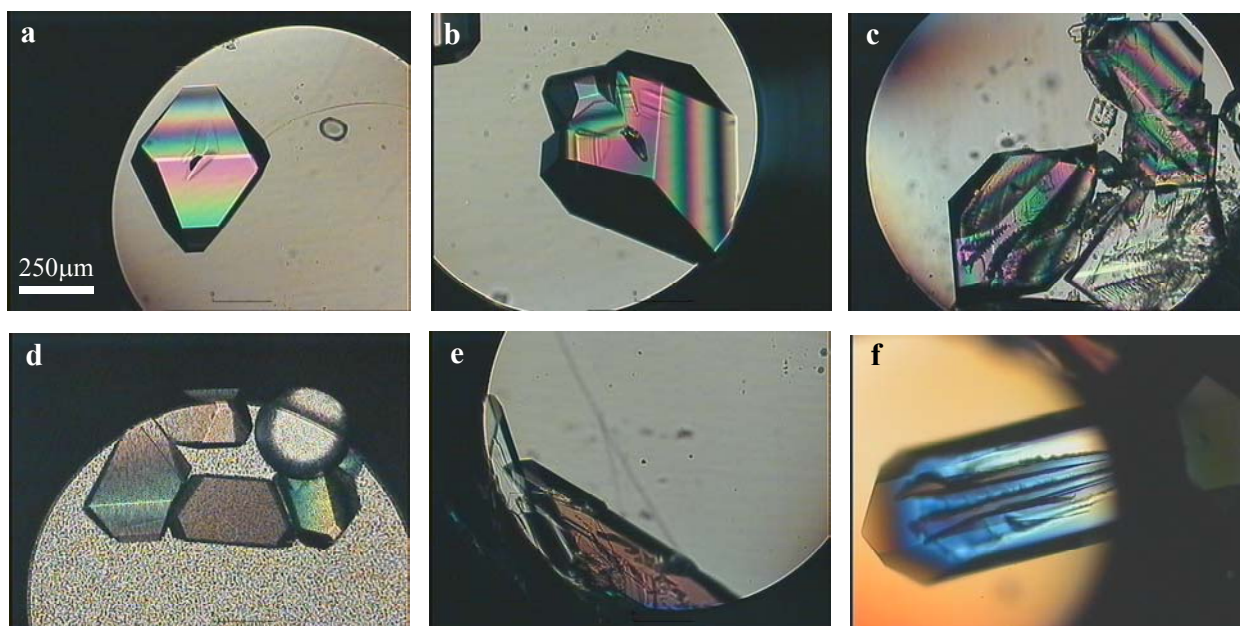


Figure V.B.2 : Cristaux obtenus en présence de a) 8-azaxanthine (+PEG 8kDa 5%) ; b) acide 9-méthyl urique (+PEG 8kDa 5%); c) acide oxonique (+PEG 8kDa 5.5%); d) 5,6-diamino uracile (+PEG 8kDa 5%); e) uracile (+PEG 8kDa 6%) f) sans inhibiteur (+PEG 8kDa 5.5%). L'échelle identique pour toutes les images est indiquée sur la première photo.

II. Données cristallographiques

Les données cristallographiques, enregistrées au LURE sur la ligne W32 et traitées par Pascal Retailleau et Thierry Prangé sont regroupées dans le Tableau V.B.1. Les cristaux en présence de 8-azaxanthine, d'acide 9-méthyl urique, d'acide oxonique (sous forme d'ion oxonate au pH de travail) et de 5,6-diamino uracile ont cristallisé dans le groupe d'espace orthorhombique I222 et ont diffracté jusqu'à une résolution de 1.7Å. Les paramètres de maille pour le complexe avec la 8-azaxanthine sont identiques à ceux déterminés lors des premières études (Colloc'h, El Hajji et al. 1997) mais les données sont obtenues avec une meilleure résolution (<1.8Å contre 2.05Å). Le complexe avec le 5,6-diamino uracile a aussi cristallisé dans un nouveau groupe d'espace hexagonal P3₁21, tout comme le complexe avec l'uracile. Ces cristaux ont diffracté à des résolutions nettement inférieures aux précédentes (autour de 3Å). Enfin, nous avons pu tester des cristaux d'urate oxydase sans inhibiteur, de diffraction intermédiaire moyenne (2.3Å), qui ont cristallisé dans un groupe d'espace monoclinique P2₁. Par conséquent trois groupes d'espace différents ont été mis en évidence par cristallographie.

Inhibiteur	Groupe d'espace	Résolution limite	Paramètres de maille
8-azaxanthine ((1997).Nat. Struct. Biol. 4(11): 947-952)	I222	2.05Å	a=81.3Å b=96.3Å c=105.6Å
8-azaxanthine	I222	1.70Å	a=81.3Å ; b=96.3Å ; c=105.6Å
acide 9-méthyl urique	I222	1.80Å	a=80.1Å ; b=96.5Å ; c=105.7Å
acide oxonique	I222	1.65Å	a=79.9Å ; b=96.1Å ; c=105.6Å
"5,6-diamino uracile"	I222	1.65Å	a=80.4Å ; b=96.5Å ; c=106.1Å
	P3 ₁ 21	2.70Å	a=140.2Å ; b=140.2Å ; c=151.2Å
Uracile	P3 ₁ 21	3.20Å	a=140.6Å ; b=140.6Å ; c=151.1Å
sans inhibiteur	P2 ₁	2.30Å	a=82.6Å ; b=141.8Å ; c=135.0Å ; β=92.7°

Tableau V.B.1 : Données cristallographiques pour les différents complexes d'urate oxydase.

Les données pour les groupes d'espace I222 et P3₁21 ont été suffisantes pour mettre en évidence la différence d'empilement et de contact des molécules d'urate oxydase au sein du cristal (Figures V.B.3 et V.B.4). Ainsi dans le groupe I222, toutes les molécules d'urate oxydase sont orientées de manière identique alors que dans le groupe P3₁21, un axe de symétrie d'ordre 3 existe entre les tétramères. Si on examine plus en détail, les zones de contact au sein du cristal dans chacun des groupes, on remarque que ces contacts font majoritairement intervenir des « stacking » π (Figure V.B.5). Aussi bien pour le groupe I222 que pour le groupe P3₁21, les résidus Trp160 et Trp174 participent aux contacts. Dans le cas du groupe I222, ces deux résidus interagissent avec le résidu Gln195 tandis que selon l'empilement P3₁21, le contact se réalise avec l'Histidine 95 elle-même en interaction avec les acides glutamiques 41 et 136. Des interactions ioniques stabilisent aussi la structure cristalline : Lys48 avec Arg198 et Asn71 pour le groupe I222, et Asn223 avec Gly137 et Lys138 pour le groupe P3₁21. Enfin, la structure cristalline sous une forme P3₁21 est aussi stabilisée par la partie C-terminale (résidus 296, 297 et 298) d'un monomère venant interagir avec le monomère d'une autre molécule (Figure V.B.4). Il en résulte que la structure du segment C-

terminal, non visible dans la forme orthorhombique I222, devient visible dans la forme hexagonale P3₁21 au-delà du résidu 295, malgré une moindre résolution. Cependant même sous la forme P3₁21, la diffraction des rayons X ne visualisent pas tous les acides aminés dans la mesure où le monomère de l'urate oxydase possède 301 résidus.

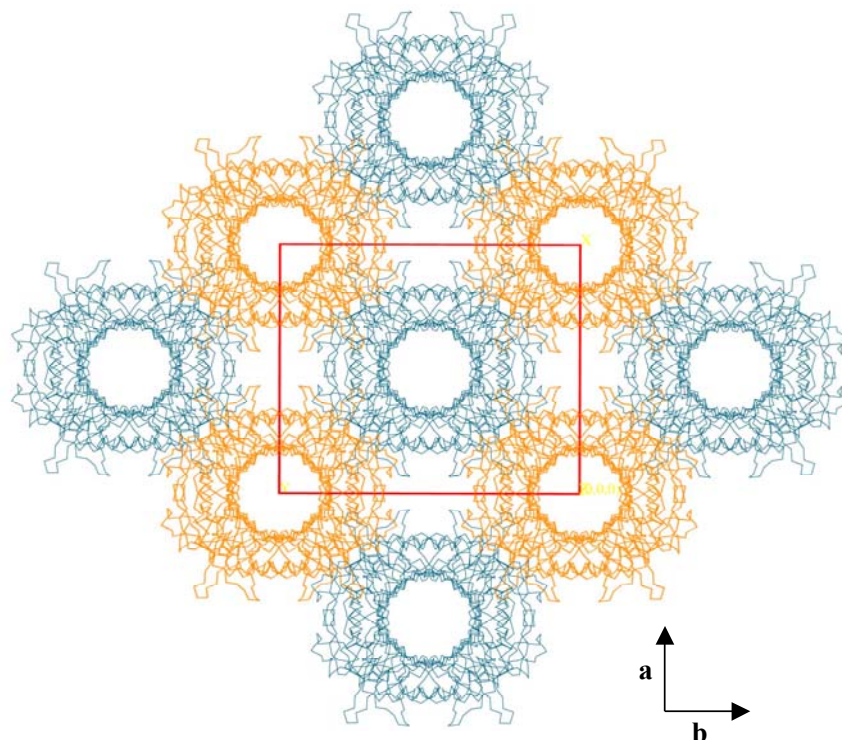


Figure V.B.3 : Empilement vu suivant le plan (a,b) des molécules d'urate oxydase dans le groupe I222. Les molécules dans le même plan sont représentées par la même couleur (Figure P.Retailleau).

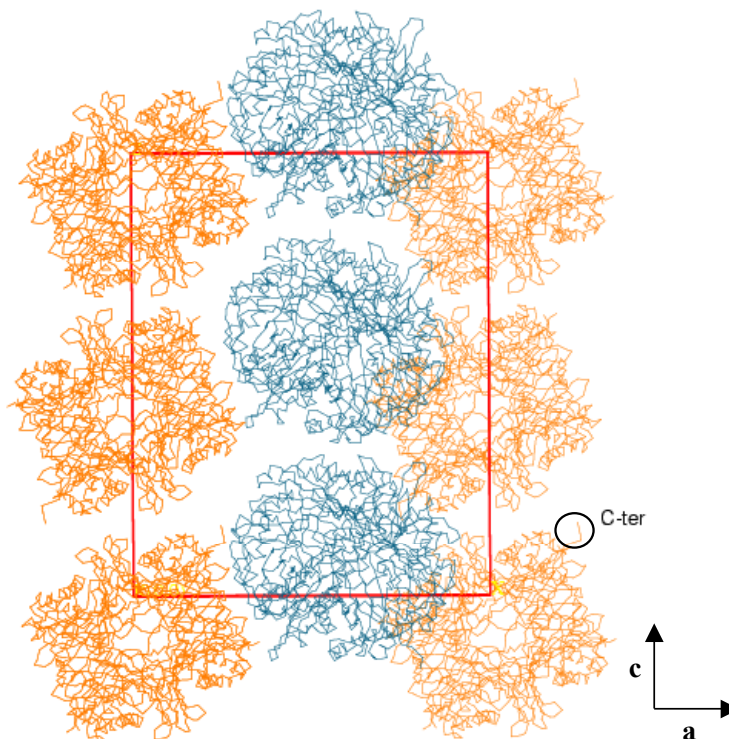


Figure V.B.4 : Empilement vu suivant le plan (a,c) des molécules d'urate oxydase dans le groupe P3₁21 (Figure P.Retailleau).

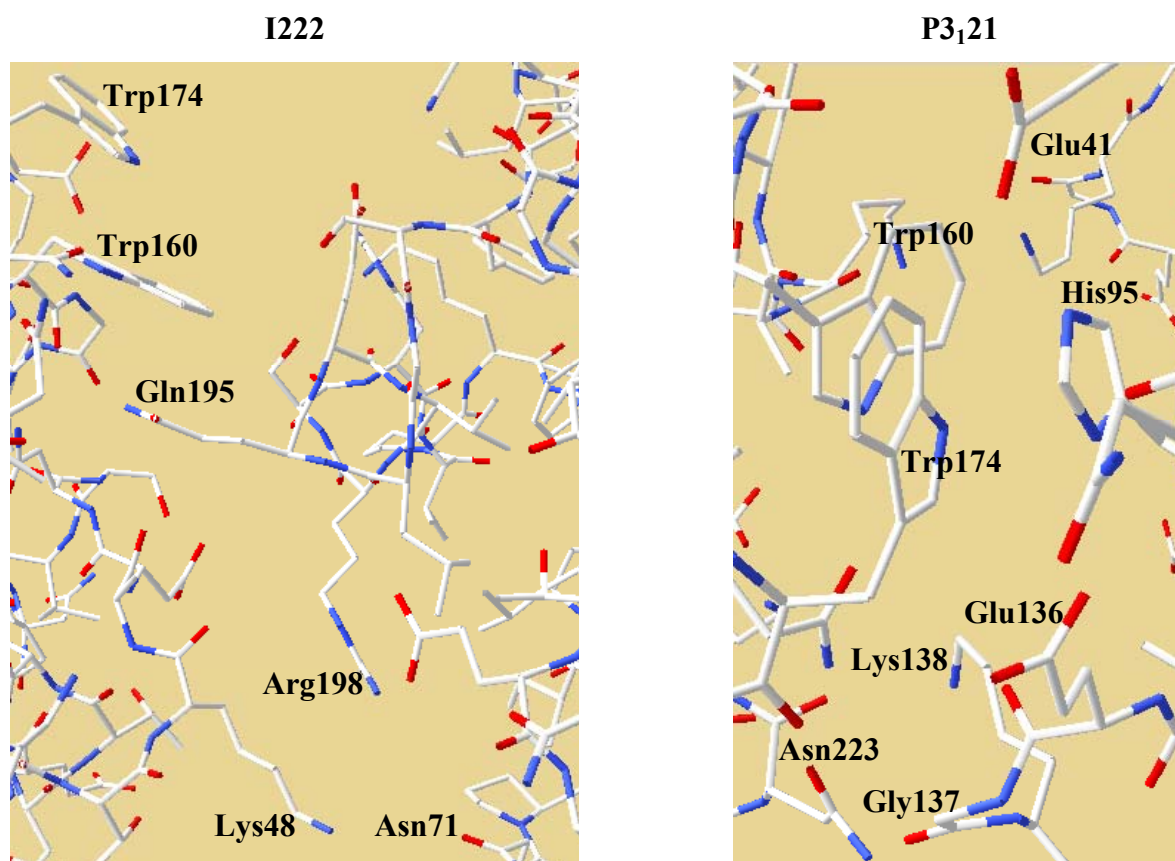


Figure V.B.5 : Représentation des contacts entre acides aminés entre deux tétramères d'urate oxydase dans les groupes I222 et P3₁2₁.

C. STRUCTURES DES COMPLEXES ET IMPLICATIONS SUR LE MECANISME D'ACTION

Nous allons dans cette partie détailler la structure du site actif en présence des inhibiteurs 8-azaxanthine, 9-mehtyl acide urique et acide oxonique ainsi que la structure sans inhibiteur en vue de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'urate oxydase. Les données obtenues avec les autres inhibiteurs (5,6-diamino uracile et uracile) dans le groupe hexagonal P3₁2₁ ne sont pour l'instant pas suffisamment précises. Celles obtenues avec le 5,6-diamino uracile dans le groupe d'espace orthorhombique I222 jusqu'à une résolution de 1.65Å, ne sont pas détaillées ici, la densité électronique autour de l'inhibiteur nous montrant sans ambiguïté qu'un produit monocyclique autre que le 5,6-diamino uracile est présent au sein du site actif.

I. Description du site actif de l'urate oxydase : positionnement de l'inhibiteur

Les structures des sites actifs (situés à l'interface dimérique) autour des molécules d'inhibiteur sont représentées sur la Figure V.C.1. Les deux inhibiteurs bicycliques analogues de l'acide urique, 8-azaxanthine et 9-mehtyl acide urique, se fixent de manière identique : ils sont

maintenus au sein du site actif via leur cycle à 6 par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes avec l'arginine 176 et la glutamine 228 ainsi que par un « stacking » π aromatique avec la phenyl-alanine 159. L'unique liaison avec leur cycle à 5 se fait via l'azote N7 en interaction avec le groupement amide de la thréonine 57. Nous pouvons donc légitimement supposer que l'acide urique est positionné de la même manière au sein du site actif. La structure avec l'acide oxonique nous confirme que l'interaction se fait principalement via le cycle à 6 : cet inhibiteur monocyclique, tout comme les deux inhibiteurs bicycliques, interagit dans le site actif majoritairement avec les trois mêmes résidus (Arg176, Gln228 et Phe159). La structure sans inhibiteur (Figure V.C.1) montre un site actif plus « flexible » ce qui confirme le rôle structurant de l'inhibiteur, en interaction forte avec les résidus voisins au sein du site actif.

Par ailleurs, deux molécules d'eau en interaction directe avec la 8-azaxanthine (annotées W1 et W2) sont visibles par diffraction de rayons X donc fixes dans le site actif. Une première molécule d'eau W1 se situe à la verticale de la liaison C5-C6, stabilisée par la présence de l'asparagine 254 et celle de la thréonine 57. Cette molécule d'eau est retrouvée avec l'acide 9-méthyl urique et avec l'acide oxonique, ce qui nous incite à penser qu'elle est aussi présente avec l'acide urique. Une seconde molécule d'eau W2 liée à l'azote N9 est identifiée avec la 8-azaxanthine. Cette molécule disparaît logiquement avec l'acide 9-méthyl urique à cause du groupement méthyle. On peut par contre supposer qu'on la retrouve avec l'acide urique. Les deux molécules d'eau W1 et W2 ne sont plus visibles en absence d'inhibiteur ce qui montre qu'elles sont en interaction forte avec l'inhibiteur et donc très probablement avec l'acide urique.

Les 8 résidus (Lys10, Thr57, Asp58, Lys61, Phe159, Arg176, Gln228 et Asn254) que l'on retrouve pour les trois structures dans le site actif sont conservés dans l'ensemble de la famille des urates oxydases (Figure V.C.2). Ceci montre que leur rôle dans le mécanisme d'action de l'urate oxydase est primordial. De récentes expériences de mutagenèse dirigée sur la thréonine 57, la lysine 10 (Imhoff, Power et al. 2003) ou encore sur l'acide aspartique 58 et l'arginine 176 (données Sanofi-Synthelabo) ont montré que l'activité de l'urate oxydase était considérablement réduite en l'absence de ces acides aminés confirmant ainsi leur rôle essentiel dans le mécanisme d'action. Par ailleurs, l'arginine 176 est un des deux résidus dont le codon est muté en un codon STOP dans le gène humain, ce qui entraîne la non-expression de l'urate oxydase chez l'Homme.

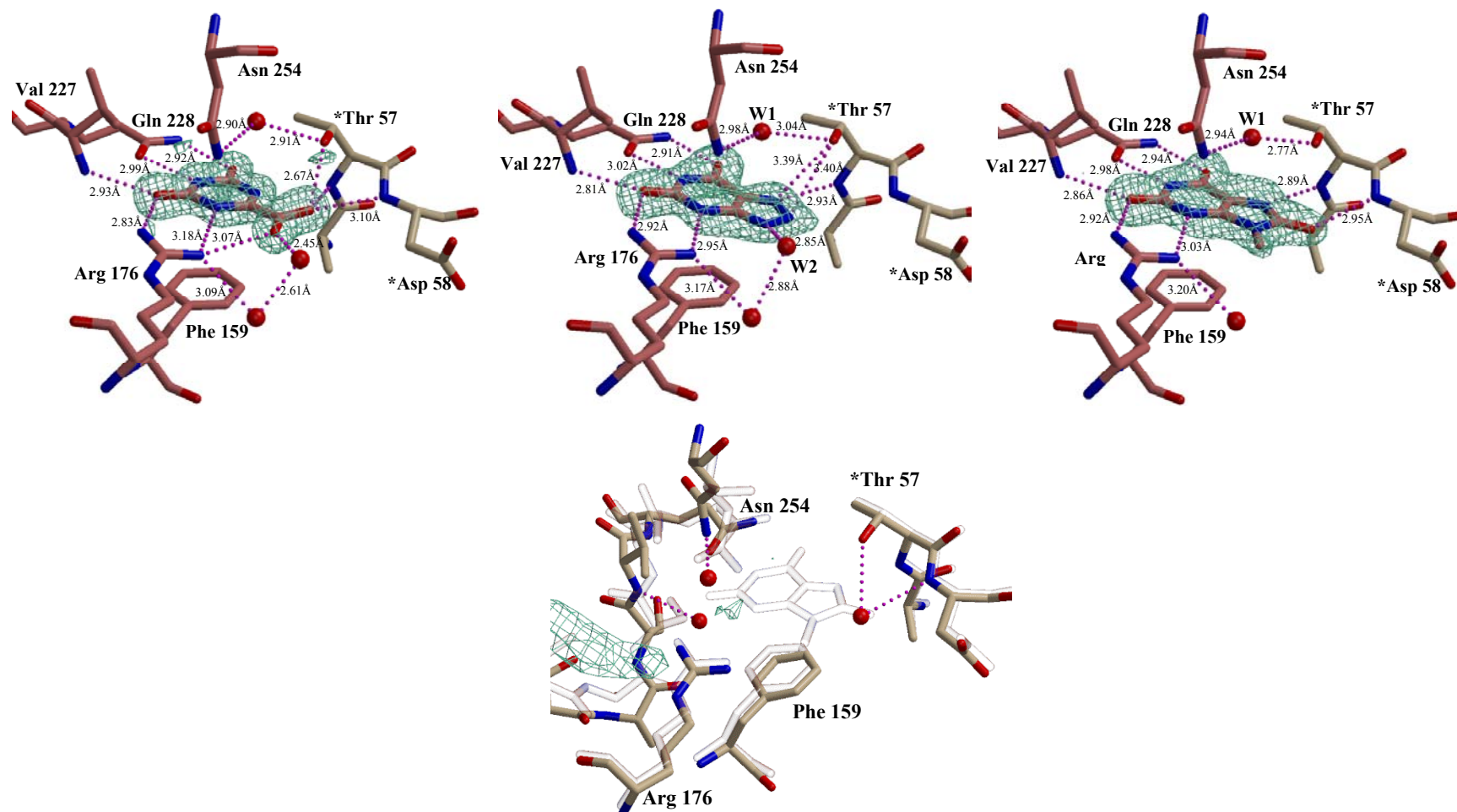


Figure V.C.1 : Représentation du site actif ainsi que de la densité électronique autour des inhibiteurs 8-azaxanthine (en haut à gauche), acide 9-méthylurique (en haut au centre) et acide oxonique (en haut à droite) ainsi que du site actif sans inhibiteur (en bas au centre). Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges ainsi que par les labels W1 et W2. En pointillés, sont indiqués les liaisons hydrogènes. Les résidus précédés par un astérisque appartiennent à un monomère différent des autres résidus, les deux monomères étant par ailleurs distingués par la couleur différente des chaînes des carbones α (sauf pour la structure sans inhibiteur). La lysine 10 en interaction avec la thréonine 57 ainsi que la lysine 61 en interaction avec l'acide aspartique 58 ne sont pas représentées (Figure P.Retailleau).

	1		50		100
URIC_ASPFL	SA----	VKAARYGKDNVRVYKVHK-DEKT-GVQTVYE-----	MTVCVLLLEG-EIETSYTKADNSVIVATDSIKNTIYITAKQ-NPVTPELFGSILGTHFIEKYNHIIHAHVNIIVCHRWTRMDI		
URIC_EMENI	ST----	VAAARYGKDNVRVYKVHK-DPKT-GVQTVTE-----	MTVCVLLLEG-EIDTSYTKADNSVIVATDSIKNTIFILAKQ-NPVTPELFGSILGTHFINKYKIHVAHTNIITHRWTRLNI		
URIC_PICJA	TT----	LSSSTYGGKDNVFLKVKK-DPQNPKQEVME-----	ATVTCLEEG-GFDTSYTEADNSSIVPTDVTNKNTILVLAKT-TEIWPIERFAAKLATHFVEKYSHVSGSVKIVQDRWVKYAV		
URIC_DROPS	YE----	ITDHGYGKDAVKVLHVS-RGP---VHTIQE-----	FEVGTHLKL-YSKKDYQGNNSDIVATDSQKNTVYLLAKK-YGIESPEKFALMLGQHFLNKYSHVVEEAHVHETYPWQVRVCQ		
URIC_ARATH	IR----	L-EQRHGKARVRVGRVWRHAHD--GSHHFVE-----	WNVSISLLS-HCLSSYRLDSDNSDIVATDTIKNTVYVKAKECGDRLSVEEFALIGKHFCSFYQVTAIVNIEKPERVRSI		
URIC_RAT	VE----	FVRTGYGKDMVKVLHIQR-DGK---YHSIKE-----	VATSVQLTL-RSKKDYLGHDNSDIIPDTIKNTVHVHLAKF-KGIKSIEFTFAMNICEHFLSSFSHVTRAHVVEEVPWKRFEK		
URIC_CANLI	FK----	F-DQRHGKERVQVARVWK-TKQ---GWYFIVE-----	WRVGNLSLLS-DCVNSYVRDDNSDIVATDTMKNNTVYAKAKECEILSVEDFAILLAKHFIISFYKQVTAIAIVNIEKPERVRSV		
URIC_DROVI	YE----	ITNKGYGKDAVKVMHINR-KGP---VHSIQE-----	LEVGTHLKL-YSNKDYMLGHDNSDVVATDSQKNTVYLLAKK-HGIESPEKFALILAKHFLSTYAHVEEVHVHVEAYPWQRMTO		
URIC_DROSU	YE----	ITDHGYGKDAVKVLHVS-RGP---VHTIQE-----	FEVGTHLKL-YSKKDYQGNNSDIVATDSQKNTVYLLAKK-YGIESPEKFALLGQHFLNKYSHVVEEAHVHETYPWQVRVCQ		
URIC_PAPHA	LE----	FVRTGYGKDMVKVLHIQR-DGK---YHSIKE-----	VATSVQLTL-SSKDYLGHDNSDIIPDTIKNTVHVHLAKF-KGIKSIEAFGVNICEYFLSSFNHVIRAQVYVEEIPWKRLEK		
URIC_DROME	YE----	ITDHGYGKDAVKVLHVS-RGP---VHAIQE-----	FEVGTHLKL-YSKKDYQGNNSDIVATDSQKNTVYLLAKK-HGIESPEKFALLARHFINKYSHVVEEAHVHVEAYPWQVRVCQ		
URIC_SOYBN	FK----	F-EQRHGKERVVRARVWK-TRQ---GQHFIVE-----	WRVGITLFS-DCVNSYLRDDNSDIVATDTMKNNTVYAKAKECSDILSAEEFAILLAKHFSFYKQVTAIAIVNIEKPERVTV		
URIC_RABIT	VE----	FVRTGYGKDMVKVLHIQR-DGK---YHSIKE-----	VATSVQLTL-SSKQDYVYGDNSDIIPDTIKNTVHVHLAKF-KGIKSIEFTFAMNICEHFLSSFNHVTRAHVVEEVPWKRFEK		
URIC_MOUSE	VE----	FVRTGYGKDMVKVLHIQR-DGK---YHSIKE-----	VATSVQLTL-RSKKDYLGHDNSDIIPDTIKNTVHVHLAKF-RGIRNIETFAMNICEHFLSSFNHVTRAHVVEEVPWKRFEK		
URIC_PHAVU	FK----	F-EQRHGKERVVRARVWR-TPQ---GRHFVVE-----	WRVGITLFS-DCVNSYLRDDNSDIVATDTMKNNTVYAKAKECSDILSVEDFAILLAKHFSFYKQVTAIAIVNIEKPERVIV		
URIC_PIG	VE----	FVRTGYGKDMIKVLHIQR-DGK---YHSIKE-----	VATSVQLTL-SSKDYLGHDNSDIVIPDTIKNTVNVHLAKF-KGIKSIEFTFAMNICEHFLSSFKHVIRAQVYVEEVPWKRFEK		
URIC_BACSB		SMTKHKERVMYYGKGDVFAYRTYK-PLTG-VRTIPESPFSGRDHILFGVNVKISVGGTKLLTSFTKGDNSLVVATDSMKNFIQKHLAS-YGTTTIEGFLEVVATSFLLKKYSHIEKISLIGEEIPFETTTA			
			150		
URIC_ASPFL	DGKP-----	HPHSF-----	IRDSEERKRVQ-----	VDVVEGKG-IDI---	KSSLSGLTVLKSTNSQFWGFLRDEYTTLKETWDRILSTDVDATWQWKNF--
URIC_EMENI	DGKP-----	HSFSF-----	VRDSEETRNQV-----	VDVTEGVG-IDI---	KSSINKLTVLKSTGSGFWGFLRDEYTTLPEVWDRILSTDVEATWAWKRF--
URIC_PICJA	DGKP-----	HDHSF-----	IHEGGEKRITD-----	LYYKRSQD-YKL---	SSAIKDLTVLKSTGSGMFYGYNKCDFTTLQPTTDRILSTDVDATWWDNKKI
URIC_DROPS	EETKSVNN----	QGQSGCENNFTSIDNRSLHNHAF----	IFTPTAVHYCD----	VVIR-RTPKQTV----	ITGIKGLRVLLKTTQSSFVNFVNDEFRLPDQYDRIFSTVVDCEWSYSD--
URIC_ARATH	DGKP-----	HLHGF-----	KLGSENHTTE-----	ARVEKSGA-LNL---	TSIGIGLALLKTTQSGFERFVRDKYITLPETREMLATEVNASWRYSYESV
URIC_RAT	NGVK-----	HVHAF-----	IHTPTGTHFCD-----	VEQVRNGP-PII---	HSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTTLPEVKDRCFATQVYCKWRYQ---
URIC_CANLI	DGQP-----	HEHGF-----	KLGSERHTAE-----	AIQKSGA-LQL---	TSIGIEGLSVLKTTQSGFEGFIRDKYTALPETHERMLATEVTALWRYSYESL
URIC_DROVI	DVSDNIGKGYC----	ENNC-NSRSNGNCQLHNHAF----	IFTPTAHYCD----	VILTRQDPKQTV----	ISGIGLRLVLLKTTQSSFVNFVNDEFRLADQYDRIFSTVVECSWEYS--
URIC_DROSU	EETKASTT----	VGQSGC-NFSSIDNRSLHNHAF----	IFTPTALHYCD----	VVIXRQDPKQTV----	ITGIKGLRVLLKTTQSSFVNFVNDEXSLPDQYDRIFSTVVDCEWSYSD--
URIC_PAPHA	NGVK-----	HVHAF-----	IHTPTGTHFCE-----	VEQLRSGP-PVI---	TSIGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTTLPEVKDRCFATQVYCKWRYQ---
URIC_DROME	EETRTNVNGKCEGVQGNCD-DFSSIDNRSLHNHAF----	IFTPTALHYCD----	VVIRRTDPKQTV----	ITGIKGLRVLLKTTQSSFVNFVNDEFRLPDQYDRIFSTVVDCEWSYSD--	
URIC_SOYBN	DGQP-----	HEHGF-----	KLGESEKHTTE-----	AIQKSGS-LQL---	TSIGIEGLSVLKTTQSGFVNFIRDKYTALPDTRERMVATEVTALWRYSYESL
URIC_RABIT	NGVQ-----	HVHAF-----	IHTPTGTHFCE-----	VEQRRSGP-PVI---	HSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTTLPEVKDRCFATQVYCKWRYQ---
URIC_MOUSE	NGIK-----	HVHAF-----	IHTPTGTHFCE-----	VEQMRNGP-PVI---	HSGIKDLKVLKTTQSGFEGFLKDQFTTLPEVKDRCFATQVYCKWRYQ---
URIC_PHAVU	DGQP-----	HQHGF-----	TLGESEKHTTE-----	AIQKSGS-LQL---	TSIGIEGLSVLKTTQSGFENFIRNKYTALPDTRERILATEVTALWRYSYESL
URIC_PIG	NGVK-----	HVHAF-----	IYPTGTGTHFCE-----	VEQIRNGP-PVI---	HSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTTLPEVKDRCFATQVYCKWRYQ---
URIC_BACSB	VKNG-----	NRAASELVF--	KKSRNEYATAYLNMVRNEDN-TLNITEQOSGLAGLQLIKVSNGS	FVGFIRDEYTTLPEDSNRPLFVYLLNIKWKYKN--	
	200		250		301
URIC_ASPFL	SGLQEVRSHPV----	KFDATWATAREVTLKTFEAD-----	NSASVQATMYKMAEQILARQQLIETVEYSLPNKHYYFEIDLSSHKGLQNTGKNAEVFAPQSDPNGLIKCTVGRSSLSKSL		
URIC_EMENI	SGLDEVGRNVP----	KFDETWAAARNITLKTFAEE-----	ESASVQATMYKMGQILAYQPLLETVEYSLPNKHYYFEIDLSSHKGLKNTGKDAEVFPQTNPNGLIKCTVGRKS-KAKL		
URIC_PICJA	GSVYDIAKAADKGFIDNVYNQAREITLTTFEAL-----	NSPSVQATMFNMATQILEKACSVSVSYALPNKHYYFLIDLKWKW-LE---	NDNELFYSPHPNGLIKCTVVRKE-KTKL		
URIC_DROPS	-----	TETV--NFSRAWQTVKNIILRNFAQDPQGVSSPSVQHTLYLSEKQVLDVIPQVSVISMTMPNKHYYFNFDTKPFQKI-VPGDNNVEFIPVDKPHGTIYAQLARKNISSHL			
URIC_ARATH	-----	ASIPTKGL--YFSEKFMVKKVLMDFTFGPPETGVYSPSVQRTLYLMGSAVLKRFADVSSIHLMKPNHIFLVPNLSTKENPSMYKFKDDVYLPDDEPHGSIATLSR--ITSKL			
URIC_RAT	-----	NRDV--DFEATWGAVRDIVLKKFAGPYDRGEYSPSVQKTLYDIQVLTLSQLPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGILI---	NKEEVLLPLDNPYKGTITGVRRK-LPSRL		
URIC_CANLI	-----	YSIPQKPL--YFTDKYLEVKKVLADNFFGPPNVGVYSPSVQNTLYLMAKAALNRFPEIASIQLKMPNIHFLPVNISNKGDP-IVKFEDDVYLPDDEPHGSIQASLRR--LWSKL			
URIC_DROVI	-----	TESV--NFLTAWETVKDIVRNFAQDPQGVSSPSVQHTLYLSEKQVLDVIPQVSVISMTMPNKHYYFNFDTKPFQQL-VPGENNEVFIPDTPHGTIYAQLSRKSLKSHL			
URIC_DROSU	-----	TDTV--NFSRAWQVQVKNIIILRNFAQDPQGVSSPSVQHTLYLSEKQVLDVIPQVSVISMTMPNKHYYFNFDTKPFQKI-VPGDNNVEFIPVDKPHGTIYAQLARKNLNSHL			
URIC_PAPHA	-----	CRDV--DFEATWGTIRDLVLEKFAQPYDKGEYSPSVQKTLYDIQVLSLRVPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGILI---	NKEEVLLPLDNPYKGTITGVRRK-LSSRL		
URIC_DROME	-----	TENL--DFLRRAWQTVKNIILRNFAQDPQGVSSPSVQHTLYLSEKQVLDVIPQVSVISMTMPNKHYYFNFDTKPFQKI-APGDNNVEFIPVDKPHGTIYAQLARKNINSHL			
URIC_SOYBN	-----	YSLPQKPL--YFTEKYQEVKKVLADTFGPPKGGVYSPSVQNTLYLMAKATLNRFPDIAYVSLKLPNLHFLIPVNISNKGDP-IVKFEDDVYLPDDEPHGSIQASLRR--LWSKL			
URIC_RABIT	-----	SQDV--DFEATWDIVRDTVLEKFAQPYDKGEYSPSVQKTLYDIQVLTLSRVPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGILI---	NKEEVLLPLDNPYKGTITGVRRK-LSSRL		
URIC_MOUSE	-----	RRDV--DFEATWGAVRDIVLQKFAQPYDKGEYSPSVQKTLYDIQVLSQLPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGILI---	NKEEVLLPLDNPYKGTITGVRRK-LPSRL		
URIC_PHAVU	-----	YNLPQKPL--YFTDKYLEVKKVLADTFGPPNRRGVYSPSVQNTLYLMAKATLNRFPDIAYVHLKMPNLHFLIPVNISNKGDP-IVKFEDDVYLPDDEPHGSIQASLRR--VWSKL			
URIC_PIG	-----	GRDV--DFEATWDTVRSIVLQKFAQPYDKGEYSPSVQKTLYDIQVLTGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMGILI---	NKEEVLLPLDNPYGRITGVRRK-LTSRL		
URIC_BACSB	-----	TEDS--FGTNPENYVAAEQIRDIATSVFHEHETLSIQHLIYLIGRRILERFPQLQEVYFESQNHWDKIVE-----	IPESGKVVYETPRPPYGFQCFVTQEDLPHEN		

Figure V.C.2 : Alignement des séquences dans la famille des urates oxydases ; en bleu, l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* ; en rouge les résidus du site actif présentés dans la Figure IV.C.8 (K(Lys)10 ; T(Thr)57 ; D(Asp)58 ; K(Lys)61 ; F(Phe)159 ; R(Arg)176 ; Q(Gln)228 ; N(Asn)254).

II. Nature du substrat dans le site actif: l'acide urique sous forme dianionique

Les trois inhibiteurs se fixant au sein du site actif de la même manière via leur cycle à 6, il en serait très probablement de même avec l'acide urique, substrat de la réaction enzymatique. Il faut noter que lors de la publication de la première structure de l'urate oxydase en présence de la 8-azaxanthine, la résolution de 2.05Å n'avait pas suffi pour distinguer la position exacte de l'inhibiteur (Figure V.A.3).

La liaison hydrogène entre l'azote N3 des inhibiteurs et l'arginine 176 d'une part ainsi que celle entre l'azote N7 (dans le cas des inhibiteurs bicycliques) et le groupement NH de Thr57 sont autour de 3Å ce qui ne laisse la place qu'à un seul atome d'hydrogène. L'atome d'hydrogène étant porté par Arg176 et le groupement NH de Thr57, la 8-azaxanthine et l'acide 9-méthyl urique sont par conséquent dans le site actif sous forme dianionique, les charges négatives étant sur les azotes N3 et N7. Bentley et Neuberger avaient déjà suggéré il y a 50 ans que l'acide urique réagissait très probablement sous forme anionique ou dianionique (Bentley et Neuberger 1952). Il a depuis été montré que l'acide urique seul (sans protéine) s'oxyde plus facilement sous forme dianionique (Imhoff, Power et al. 2003). Les pKas des deux acidités de l'acide urique ont été estimées expérimentalement à 5.4 et 10.6. A pH 8.5, pH de nos solutions de travail, l'acide urique se trouve par conséquent sous forme monoanionique. En s'appuyant sur des expériences de RMN ainsi que sur des calculs de chimie quantique réalisés sur l'acide urique seul, les études cinétiques de Kahn et Tipton (Kahn et Tipton 1998) ont suggéré que le premier intermédiaire dans le mécanisme enzymatique était le dianion en N3 et N9 (Figure V.A.2). La première détermination de la structure de l'urate oxydase en présence de la 8-azaxanthine (Colloc'h, El Hajji et al. 1997) avait aussi amené leurs auteurs à proposer un substrat sous forme dianionique mais en N7 et N9. D'après les structures à plus haute résolution déterminées ici avec la 8-azaxanthine et l'acide 9-méthyl urique, il a été montré que l'inhibiteur s'oriente différemment et nous pouvons proposer que le substrat est effectivement sous forme dianionique mais en N3 et N7. Des calculs très récents réalisés par Altarsha&Monard (Université Nancy, UMR 7565), ont confirmé que le dianion N3,N7 ne serait pas le dianion le plus stable mais serait le plus réactif. Il est important de préciser que les calculs de Kahn&Tipton ou de l'équipe de Gerald Monard ont jusqu'à présent été réalisés sur l'acide urique seul sans tenir compte du rôle éventuel des acides aminés du site actif sur l'ionisation de l'acide urique.

III. Implications sur le mécanisme d'action : rôle des molécules d'eau fonctionnelles et réactives

Deux molécules d'eau sont mises en évidence au voisinage des inhibiteurs (annotées W1 et W2 sur la Figure V.C.1). Pour chaque inhibiteur, une molécule d'eau W1 se trouve à la verticale de la liaison C4-C5, stabilisée par deux résidus, Asn254 et Thr57, résidu lui-même en interaction avec la lysine 10. Ce résultat est en accord avec les premières données structurales sur le complexe urate oxydase - 8-azaxanthine (Figure IV.C.3) (Colloc'h, El Hajji et al. 1997). Nous confirmons donc l'hypothèse avancée par Colloc'h et coll. selon laquelle le 5-hydroxyisourate, véritable produit de la réaction enzymatique, se formerait suite à l'attaque nucléophile de la molécule d'eau W1 sur le carbone C5. Ceci ne contredit pas les suggestions de Tipton et coll. qui proposent aussi l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau pour mener au 5-hydroxyisourate, cette attaque ne se faisant pas sur l'acide urique mais sur un intermédiaire, le déhydrourate (Figure V.A.2). Tipton et coll. proposent en effet deux intermédiaires entre le dianion urate et le 5-hydroxyisourate. Selon eux, la fixation du dioxygène réactif sur le même carbone C5 du dianion donnerait le 5-hydroperoxyisourate qui après libération du peroxyde d'hydrogène conduirait à la formation du déhydrourate. Expérimentalement, ils ont seulement mis en évidence le 5-hydroperoxyisourate (et non le déhydrourate). Dans le site actif, quel que soit l'inhibiteur aucune molécule d'oxygène n'a été mis en évidence notamment au voisinage de la liaison C4-C5 pouvant corroborer l'étude de Tipton et coll. Seule la molécule d'eau, qui se distingue sans ambiguïté par cristallographie d'une molécule de dioxygène, était présente. Ceci nous a amené à suggérer une autre voie mécanistique sans passer par la fixation du dioxygène sur l'atome de carbone C5. Bertrand Castro (Sanofi-Synthelabo) et Gerald Monard (Université Nancy, UMR 7565) ont notamment proposé que le peroxyde d'hydrogène se formerait à la suite d'un transfert électronique entre le dianion et la molécule d'oxygène en faisant intervenir une molécule d'eau. En se basant sur les données cristallographiques de la 8-azaxanthine, nous voyons qu'il existe une deuxième molécule d'eau W2 lié à l'atome N9, qui pourrait effectivement assister le transfert électronique en protonant le dioxygène.

Les études structurales en présence de trois inhibiteurs et en absence d'inhibiteur, présentées dans ce chapitre, ont permis de mieux préciser et de confirmer les premières conclusions amenées à la suite de la résolution de la première structure par Colloc'h et coll (Colloc'h, El Hajji et al. 1997). Ainsi, le substrat est maintenu essentiellement au sein du site

actif via son cycle à 6 par l'arginine 176, la glutamine 228 et la phenyl-alanine 159, la thréonine 57 se liant aussi au cycle à 5. La présence de la thréonine 57 ainsi que de l'arginine 176 implique que le substrat est sous forme dianionique, les charges se trouvant sur les atomes N3 et N7. Par ailleurs, deux molécules d'eau visibles dans le site actif au voisinage du substrat semblent jouer un rôle primordial dans le mécanisme enzymatique : la molécule d'eau, placée à la verticale de la liaison C4-C5 et stabilisée par l'asparagine 254 et la thréonine 57, assurerait l'hydroxylation du substrat et la molécule d'eau au voisinage de l'azote N9 participerait au transfert électronique entre le dianion et le dioxygène donnant le peroxyde d'hydrogène.

Conclusion et perspectives

Lorsque nous avons démarré il y a quelques années, l'étude sur l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus*, nous étions très loin de nous douter que ma thèse ne porterait, presque en totalité, que sur cette protéine. C'est pourtant ce qui est arrivé car nous avons eu la chance de pouvoir aborder et traiter un grand nombre de problèmes, des plus fondamentaux aux plus appliqués, avec cette protéine.

Dans la continuité des travaux réalisés dans l'équipe du LMCP, notre but était au départ d'étudier l'urate oxydase en tant que protéine modèle, en matière d'interactions en solution et de cristallisation, en vue de comparer son comportement à celui d'autres protéines et d'en tirer des règles générales.

Nous avons caractérisé les interactions en solution de l'urate oxydase en fonction des principaux facteurs physico-chimiques afin de trouver une zone d'interaction favorable à sa cristallisation. Nous avons pu mesurer dans diverses conditions, principalement par Diffusion des Rayons X aux Petits Angles, le second coefficient du viriel qui caractérise les interactions globales en solution entre protéines. Nous avons montré que quelle que soit la température (entre 5°C et 30°C) ou le pH, les sels monovalents ou divalents (jusqu'à des concentrations de 1M environ) étaient inefficaces pour promouvoir des interactions attractives et cristalliser l'urate oxydase. Cette tendance a déjà été rencontrée avec d'autres macromolécules de taille importante, tout du moins en absence d'interactions plus spécifiques. Le PEG, quelle que soit sa masse (≥ 3.35 kDa), s'est au contraire révélé être un agent particulièrement efficace pour induire des interactions attractives et cristalliser l'urate oxydase. En effectuant en parallèle des essais de cristallisation, nous avons déterminé la zone de cristallisation de l'urate oxydase, en terme de second coefficient du viriel, qui s'est avérée correspondre à un domaine restreint du « crystallization slot » de George et Wilson, souvent cité comme référence en cristallogénèse. Ce résultat semble aussi être commun à l'ensemble des protéines de taille importante. Nous avons dans ce contexte proposé l'utilisation d'un second coefficient du viriel normalisé indépendant de la masse et de la taille de la protéine en vue de mieux prédire la cristallisation des protéines quelle que soit leur masse.

A l'aide de traitements numériques, nous avons aussi pu, avec l'urate oxydase, déterminer les potentiels d'interaction en absence de PEG comme cela avait déjà été réalisé avec d'autres protéines (lysozyme, α et γ -cristallines en particulier). L'originalité de ce travail est que nous avons aussi caractérisé, à l'aide du modèle dit « à deux composants », le potentiel attractif de déplétion induit par l'addition de PEG en solution. Ce travail s'inscrit dans la thématique générale des mélanges colloïdes-PEG particulièrement étudiés depuis quelques années. Il peut aussi s'avérer prédictif pour la cristallisation des protéines dans la mesure où

les diagrammes de phases de protéines dépendent du potentiel d'interaction existant entre les protéines. Cependant, un travail important reste à faire tant expérimentalement que théoriquement. En effet, afin de confirmer les résultats de nos traitements numériques, il serait intéressant de réaliser des expériences de variations de contraste par diffusion de rayons X ou de neutrons aux petits angles. On pourrait ainsi accéder aux facteurs de structure partiels protéine-protéine, protéine-polymère et polymère-polymère, ce qui nous permettrait de déterminer les potentiels directs correspondants et de les comparer aux potentiels caractérisés dans ce travail. Il faut cependant préciser que dans ce type d'expériences, le milieu des solutions protéiques est modifié (par un ajout de D₂O pour les neutrons ou de sucre par exemple pour les rayons X), ce qui peut induire une modification des interactions en solution. Par ailleurs, nous essayons actuellement de généraliser nos résultats pour des concentrations en PEG plus importantes, concentrations pour lesquelles les polymères s'interpénètrent et peuvent être modélisés par des sphères dont le diamètre correspond à leur longueur de corrélation. Enfin, l'utilisation de ces traitements avec d'autres protéines a débuté avec l'étude des α et γ -crystallines. L'étude systématique de nouvelles protéines permettrait d'obtenir des lois générales sur la forme et l'intensité de l'interaction de déplétion pour les mélanges polymères-protéines.

Nous avons aussi réalisé une étude de la cristallisation et de la croissance cristalline de l'urate oxydase. Lors de nos premiers essais de cristallisation, nous avons mis en évidence plusieurs faciès cristallins. Nous avons ensuite réussi à les caractériser à l'aide d'expériences de croissance cristalline et nous avons mis en évidence la présence d'un deuxième polymorphe. Des expériences sont en cours afin d'obtenir des cristaux exploitables de ce deuxième polymorphe en vue de le caractériser par diffraction des rayons X. Par ailleurs, il serait sans doute intéressant de déterminer les diagrammes de phase complets des deux polymorphes en fonction de différents paramètres physico-chimiques tels que le pH et/ou l'ajout de sels (en plus de l'ajout de PEG nécessaire pour cristalliser les deux polymorphes). Enfin, nous avons mis en évidence un phénomène de croissance cristalline original dans le domaine des protéines, que nous avons assimilé à de l'épitaxie. Des études supplémentaires seraient là aussi nécessaires. Des expériences d'AFM (Microscopie à Force Atomique) permettraient de caractériser ce phénomène à l'échelle nanométrique. Il faut préciser que nous avons commencé des expériences d'AFM avec l'urate oxydase qui ont donné de premiers résultats très satisfaisants (Figure VI.1). Cet outil s'avèrerait donc particulièrement utile pour étudier la croissance cristalline de l'urate oxydase maintenant que nous maîtrisons sa cristallisation et que nous connaissons son diagramme de phases en présence de PEG.

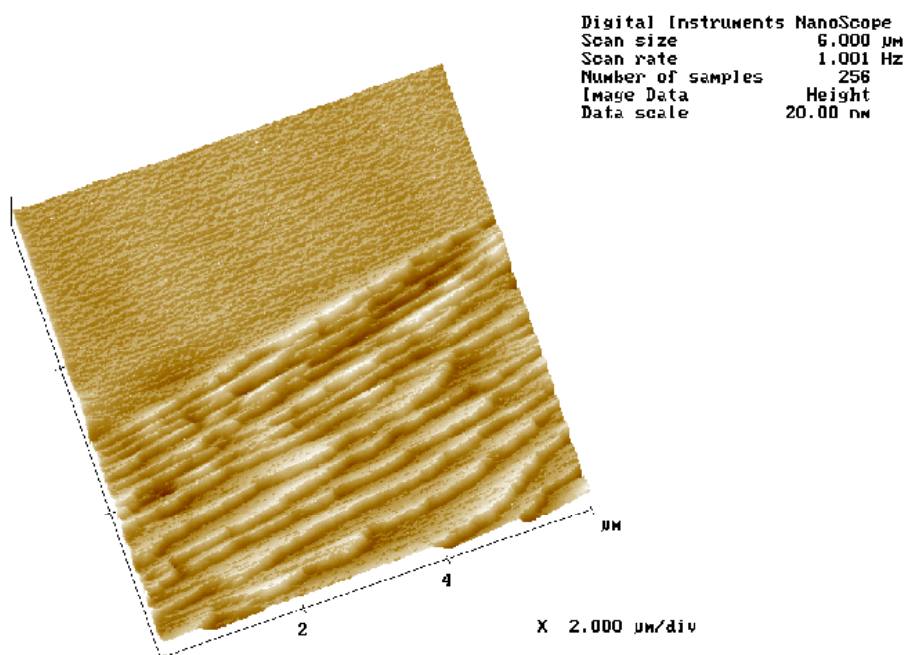


Figure VI.1 : Caractérisation de la croissance cristalline en surface de l'urate oxydase par AFM.

Par ailleurs, nous avons dans ce travail aussi mis en évidence une séparation de phases liquide-liquide en présence de PEG. Selon la concentration en PEG ajouté, sa texture était sous la forme de gouttelettes ou d'une phase bicontinue. Des expériences de DXPA (Diffusion des rayons-X aux Petits Angles) très encourageantes nous ont permis de mieux caractériser cette séparation de phases en modélisant notamment la phase dense en protéines. Ce travail assez original car très peu référencé dans la littérature nécessite des expériences additionnelles. Des expériences de DXPA aux très petits angles (USAXS : Ultra-Small Angle X-ray Scattering) résolues en temps (Finet&Tardieu, en préparation), sont notamment prévues pour caractériser au mieux la remontée aux petits angles que nous avons observée et attribuée à la formation des gouttelettes ou de la phase bicontinue.

Enfin, en parallèle à ces études portées sur la cristallogénèse fondamentale, nous avons eu la chance d'aborder une partie plus appliquée dans le cadre d'une collaboration avec Sanofi-Synthelabo et avec des cristallographes. Ainsi, nous avons pu cristalliser plusieurs complexes de l'urate oxydase ainsi que la protéine sans inhibiteur et les structures résolues nous ont permis d'avancer un peu plus vers l'élucidation du mécanisme d'action de l'urate oxydase. Par ailleurs, à ce jour, trois groupes d'espace ont pu être caractérisés. Certaines de ces structures sont encore en cours d'affinement. De plus, certains cristaux n'ont pas diffracté à une résolution suffisante pour obtenir des informations structurales précises. Nous désirons progresser dans la cristallisation de ces complexes afin d'améliorer la résolution des cristaux. Une étude comparative des différentes structures dans chacun des groupes d'espace est aussi

en cours, le but étant notamment de caractériser les zones de contact. Enfin, la réussite que nous avons eu, nous incite à poursuivre dans la voie structurale et mécanistique de l'urate oxydase, l'un des principaux projets à venir étant la cristallisation de l'urate oxydase en D₂O. La structure obtenue par diffraction de neutrons nous permettrait de « voir » les hydrogènes et nous donnerait ainsi une image à haute résolution du site actif. La diffraction des neutrons est une technique exigeant des cristaux de taille significative (~1mm dans chacune des dimensions), aussi nous prévoyons auparavant de réaliser une étude précise de la solubilité de l'urate oxydase en D₂O (et en présence de PEG). Il faut noter que nous avons déjà obtenu lors de premiers essais, des cristaux en D₂O, mais dont la taille n'était pas suffisante. Il serait de plus particulièrement intéressant d'obtenir la structure de l'urate oxydase avec son substrat l'acide urique mais pour cela il faudra se placer en absence de dioxygène.

Références bibliographiques

- Abbott, N. L., Blankschtein, D. et Hatton, T. A. (1992). "Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems. 2. On the Free Energy of Mixing Globular Colloids and Flexible polymers." Macromolecules **25**: 3917-3931.
- Abbott, N. L., Blankschtein, D. et Hatton, T. A. (1992). "Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems. 3. A Neutron Scattering Investigation of the Polymer Solution Structure and Protein-Polymer Interactions." Macromolecules **25**: 3932-3941.
- Anderson, V. J. et Lekkerkerker, H. N. W. (2002). "Insights into phase transition kinetics from colloid science." Nature **416**: 811-815.
- Annunziata, O., Asherie, N., Lomakin, A., Pande, J., Ogun, O. et Benedek, G. B. (2002). "Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions." PNAS **99**(22): 14165-14170.
- Annunziata, O., Ogun, O. et Benedek, G. B. (2003). "Observation of liquid-liquid phase separation for eye lens gammaS-crystallin." PNAS **100**(3): 970-974.
- Asakura, S. et Oosawa, F. (1954). "On the interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules." J. Chem. Phys. **22**: 1255-1256.
- Astier, J. P., Bokern, D., Lapena, L. et Veesler, S. (2001). " α -amylase crystal growth investigated by in situ atomic force microscopy." J. Crystal Growth **226**: 294-302.
- Astier, J. P., Veesler, S. et Boistelle, R. (1998). "Protein crystals orientation in a magnetic field." Acta Cryst **D54**: 703-706.
- Atha, D. H. et Ingham, K. C. (1981). "Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols." J. Biol. Chem. **256**(23): 12108-12117.
- Balavoine, F., Schultz, P., Richard, C., Mallouh, V., Ebbesen, T. W. et Moiskowski, C. (1999). "Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of biosensors." Angew. Chem. Int. Ed. **38**(13/14): 1912-1915.
- Bayol, A., Capdevielle, J., Malazzi, P., Buzy, A., Bonnet, M. C., Colloc'h, N., Mornon, J. P., Loyaux, D. et Ferrara, P. (2002). "Modification of a reactive cysteine explains differences between rasburicase and uricozyme, a natural *Aspergillus flavus* uricase." Biotechnol. Appl. Biochem. **36**: 21-31.
- Bayol, A., Dupin, P., Boe, J. F., Claudy, P. et Létoffé, J. M. (1995). "Study of pH and temperature-induced transitions in urate oxidase (Uox-EC1.7.3.3) by microcalorimetry (DSC), size exclusion chromatography (SEC) and enzymatic activity experiments." Biophysical Chemistry **54**: 229-235.
- Belloni, L. (1986). "Electrostatic interactions in colloidal solutions : comparison between primitive and one-component models." J. Chem. Phys. **85**(1): 519-526.
- Belloni, L. (1988). "Self-consistent integral equation applied to the highly charged primitive model." J. Chem. Phys. **88**(8): 5143-5148.

- Belloni, L. (1991). Interacting monodisperse and polydisperse spheres. Neutron, X-ray and light scattering. N.-H. D. Series. Amsterdam-Oxford-NewYork-Tokyo, Elsevier Science Publishers B.V.: 135-155.
- Benas, P., Legrand, L. et Riès-Kautt, M. (2002). "Strong and specific effects of cations on lysozyme chloride solubility." Acta Cryst **D58**: 1582-1587.
- Bentley, R. et Neuberger, A. (1952). "The mechanism of the action of uricase." Biochem. J. **52**: 694-699.
- Beynon, R. J. et Easterby, J. S. (1996). Theory of buffer action. Oxford.
- Boistelle, R., Astier, J., MArchis-Mouren, G., Desseaux, V. et Haser, R. (1992). "Solubility, phase transition, kinetic ripening and growth rates of porcine prncreatic α -amylase isoenzymes." J. Crystal Growth **123**: 109-120.
- Boistelle, R. et Astier, J. P. (1988). "Crystallization mechanisms in solution." J. Crystal Growth **90**: 14-30.
- Bolhuis, P. G. et Louis, A. A. (2002). "How to derive and parametize effective potentials in colloid-polmer mixtures." Macromolecules **35**: 1860-1869.
- Bolhuis, P. G., Louis, A. A., Hansen, J. P. et Meijer, E. J. (2001). "Accurate effective pair potential for polymer solutions." J.Chem.Phys. **114**(9): 4296-4311.
- Bonneté, F., Finet, S. et Tardieu, A. (1999). "Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions." J. Crystal Growth **196**: 403-414.
- Bonneté, F., Malfois, M., Finet, S., Tardieu, A., Lafont, S. et Veessler, S. (1997). "Differents tools to study interaction potentials in γ -crystallin solutions: relevance to crystal growth." Acta Cryst. **D53**: 438-447.
- Bonneté, F., Vivares, D., Robert, C. et Colloc'h, N. (2001). "Interactions in solution and crystallization of *Aspergillus flavus* urate oxidase." J. Crystal Growth **232**: 330-339.
- Boström, M., Williams, D. R. M. et Ninham, B. W. (2001). "Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems." Phys. Rev. Lett. **87**(16): 168103.
- Branca, C., Faraone, A., Magazu, S., Maisano, G., Migliardo, P., Triolo, A., Triolo, R. et Villari, V. (2000). "Anomalous conformational properties of PEO in H₂O and D₂O by SANS, PCS and Raman scattering." J.Appl.Cryst. **33**: 709-713.
- Budayova, M. (1998). Cristallisation et caractérisation de protéines en solution : diagrammes de phases, cinétiques de croissance et associations moléculaires. Marseille, Université d'Aix Marseille II.
- Budayova, M., Bonneté, F., Tardieu, A. et Vachette, P. (1999). "Interactions in solution of a large oligomeric protein." J. Crystal Growth **196**: 210-219.

- Budayova-Spano, M., Bonnete, F., Astier, J. P. et Veessler, S. (2002). "Investigation of aprotinin (BPTI) solutions during nucleation." J. Crystal Growth **235**: 547-554.
- Budayova-Spano, M., Lafont, S., Astier, J. P., Ebel, C. et Veessler, S. (2000). "Comparison of solubility and interactions of aprotinin (BPTI) solutions in H₂O and D₂O." J. Crystal Growth **217**(3): 311-319.
- Bugg, C. E. (1986). "The future of protein crystal growth." J. Crystal Growth **76**: 535-544.
- Butler, M. F. (2002). "Mechanism and kinetics of phase separation in a gelatin/maltodextrin mixture studied by small-angle light scattering." Biomacromolecules **3**: 676-683.
- Cacace, M. G., Landau, E. M. et Ramsden, J. J. (1997). "The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena." Q. Rev. Biophys. **30**: 241-277.
- Carbonnaux, C., Ries-Kautt, M. et Ducruix, A. (1995). "Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic Hypoderma lineatum collagenase at pH 7.2." Protein Sci. **4**(10): 2123-8.
- Casselynn, M., Finet, S., Tardieu, A. et Delacroix, H. (2002). "Time-resolved scattering investigations of brome mosaic virus microcrystals appearance." Acta Cryst. D **58**: 1568-1570.
- Casselynn, M., Perez, J., Tardieu, A., Vachette, P., Witz, J. et Delacroix, H. (2001). "Spherical plant viruses: interactions in solution, phase diagrams and crystallization of brome mosaic virus." Acta Cryst. D **57**: 1799-1812.
- Chatterjee, A. P. et Schweizer, K. S. (1998). "Microscopic theory of polymer-mediated interactions between spherical particles." J. Chem. Phys. **109**(23): 10464-10476.
- Chernov, A. A. et DeLucas, L. J. (2002). "View on biocrystallization from Jena, 2002." Acta Cryst. D **58**: 1511-1513.
- Collins, K. D. et Washabaugh, M. W. (1985). "The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces." Q. Rev. Biophys. **18**(4): 323-422.
- Colloc'h, N., El Hajji, M., Bachet, B., L'Hermite, G., Schiltz, M., Prangé, T., Castro, B. et Mornon, J. P. (1997). "Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution." Nat. Struct. Biol. **4**(11): 947-952.
- Conley, T. G. et Priest, D. G. (1980). "Thermodynamics and stoichiometry of the binding of substrate analogues to uricase." Biochem. J. **187**: 727-732.
- Costenaro, L., Zaccai, G. et Ebel, C. (2001). "Understanding the crystallisation of an acidic protein by dilution in the ternary NaCl-2-methyl-2,4-pentanediol-H₂O system." J. Crystal Growth **232**: 102-113.
- Curtis, R. A., Ulrich, J., Montaser, A., Prausnitz, J. M. et Blanch, H. W. (2002). "Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions." Biotechnol. Bioeng. **79**(4): 367-380.

- Debye, P. (1946). J.Chem.Phys. **14**: 636-646.
- de Kruijff, C. G. et Tuinier, R. (2001). "Polysaccharide protein interactions." Food Hydrocoll. **15**: 555-563.
- Delaye, M. et Tardieu, A. (1983). "Short range order of crystallin proteins account for eye lens transparency." Nature **302**: 415-417.
- Demoruelle, K., Guo, B., Kao, S., McDonald, H. M., Nikic, D. B., Holman, S. C. et Wilson, W. W. (2002). "Correlation between the osmotic second virial coefficient and solubility for equine serum albumin and ovalbumin." Acta Cryst. **D58**(1544-1548).
- Depautex, C., Desvignes, C., Feder, P., Lemonnier, M., Bosshard, R., Leboucher, P., Dageaux, D., Benoit, J. P. et Vachette, P. (1987). LURE: rapport d'activité pour la période Août 1985-1987, edited by documentation CEN Saclay.
- Devanand, K. et Selser, J. C. (1991). "Asymptotic behavior and long-range interactions in aqueous solutions of poly(ethylene glycol)." Macromolecules **24**: 5943-5947.
- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D. et Sanchez, C. (2000). "Protein-polysaccharide interactions." Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **5**: 202-214.
- Dubuisson, J. M., Decamps, T. et Vachette, P. (1997). "Improved signal-to-background ratio in small angle X-ray scattering experiments with synchrotron radiation using an evacuated cell for solutions." J. Appl. Cryst. **30**: 49-54.
- Ducruix, A. et Giégé, R. (1999). An introduction to the crystallogenesi s of biological macromolecules. Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach. A. Ducruix and R. Giegé. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press: 1-16.
- Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M. et Tardieu, A. (1996). "Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesi s." J. Crystal Growth **168**: 28-39.
- Durbin, S. D. et Feher, G. (1996). "Protein crystallization." Annu. Rev. Phys. Chem. **47**: 171-204.
- Ebel, C., Faou, P. et Zaccai, G. (1999). "Protein-solvent and weak protein-protein interactions in halophilic malate dehydrogenase." J. Crystal Growth **196**(2-4): 395-402.
- Farnum, M. et Zukoski, C. (1999). "Effect of glycerol on the interactions and solubility of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor." Biophys.J. **76**: 2716-2726.
- Feigelson, R. S. (1986). "Preface." J. Crystal Growth **76**: 529-532.
- Finet, S. (1999). Interactions entre protéines en solution : étude par diffusion des rayons X aux petits angles du lysozyme et des protéines du cristallin ; application à la cristallisation. Paris, Université Paris6.

- Finet, S. et Tardieu, A. (2001). " α -crystallin interaction forces studied by small angle X-ray scattering and numerical simulations." J. Crystal Growth **232**(1-4): 40-49.
- Flory, P. J. et Krigbaum, W. R. (1950). "Statistical mechanics of dilute polymer solutions." J. Chem. Phys. **18**: 1086-1094.
- Frenkel, D. (1999). "Entropy driven phase transition." Physica A **263**: 26-38.
- Fridovich, I. (1965). "The Competitive Inhibition of Uricase by Oxonate and by Related Derivatives of s-Trazines." J. Biol. Chem. **240**: 2491.
- Galkin, O. et Vekilov, P. G. (2000). "Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary." PNAS **97**(12): 6277-6281.
- Gasser, U., Weeks, E. R., Schofield, A., Pusey, P. N. et Weitz, D. A. (2001). "Real-space imaging of nucleation and growth in colloidal crystallization." Science **292**: 258-262.
- Gaucher, J. F., Riès-Kautt, M., Reiss-Husson, F. et Ducruix, A. (1997). "Solubility diagram of the Rhodobacter sphaeroides reaction center as a function of PEG concentration." FEBS Lett. **401**(2-3): 113-116.
- George, A. et Wilson, W. W. (1994). "Predicting protein crystallization from a dilute solution property." Acta Cryst. **D50**: 361-365.
- Guilloteau, J. P. (1991). *Cristallogénèse des macromolécules biologiques: influence de la nature des sels et de la température sur la solubilité du lysozyme et sur les interactions protéine-protéine*. Strasbourg, Université Louis Pasteur.
- Guinier, A. et Fournet, G. (1955). Small angle scattering of X-rays. New York, Wiley.
- Haas, C. et Drenth, J. (1998). "The protein-water diagram and the growth of protein crystals from aqueous solution." J. Phys. Chem. B **102**: 4226-4232.
- Haas, C., Drenth, J. et Wilson, W. W. (1999). "Relation between the solubility of proteins in aqueous solutions and the second virial coefficient of the solution." J. Phys. Chem. B **103**(14): 2808-2811.
- Hagen, M. H. J. et Frenkel, D. (1994). "Determination of phase diagrams for the hard-core attractive yukawa system." J. Chem. Phys. **101**(5): 4093-4097.
- Haire, R. N., Tisel, W. A., White, J. G. et Rosenberg, A. (1984). "On the precipitation of proteins by polymers : the Hemoglobin-Polyethylene glycol system." Biopolymers **23**: 2761-2779.
- Hansen, J. P. et McDonald, I. R. (1976). Theory of simple liquids. London - New York - San Francisco, Academic Press.
- Hitscherich, C. J., Kaplan, J., Allaman, M., Wiencek, J. et Loll, P. J. (2000). "Static light scattering studies of OmpF porin : implications for integral membrane protein crystallization." Protein Sci. **9**: 1559-1566.

- Hofmeister, F. (1888). "Zur lehre von der wirkung der salze." Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **24**: 247-260.
- Ilett, S. M., Orrock, A., Poon, W. C. K. et Pusey, P. N. (1995). "Phase behaviour of a model colloid-polymer mixture." Phys. Rev. E **51**(2): 1344-1352.
- Imhoff, R. D., Power, N. P., Borrok, M. J. et Tipton, P. A. (2003). "General base catalysis in the urate oxidase reaction: evidence for a novel Thr-Lys catalytic diad." Biochemistry **42**: 4094-4100.
- Ishimoto, C. et Tanaka, T. (1977). "Critical Behavior of a Binary Mixture of Protein and Salt Water." Phys. Rev. Lett. **39**: 474-477.
- Israelachvili, J. (1994). Intermolecular and surface forces. New York.
- Israelachvili, J. et Wennerström, H. (1996). "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions." Nature **379**: 219-225.
- Kahn, K., Serfozo, P. et Tipton, P. A. (1997). "Identification of the true product of the urate oxidase reaction." J. Am. Chem. Soc. **119**: 5435-5442.
- Kahn, K. et Tipton, P. A. (1997). "Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase." Biochemistry **36**: 4731-4738.
- Kahn, K. et Tipton, P. A. (1998). "Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction." Biochemistry **37**: 11651-11659.
- Kawaguchi, S., Imai, G., Suzuki, J., Miyahara, A., Kitano, T. et Ito, K. (1996). "Aqueous solution properties of oligo and poly(ethylene oxide) by static light scattering and intrinsic viscosity." Polymer **38**(12): 2885-2891.
- Koenderink, G. H., Aarts, D. G. A. L., de Villeneuve, V. W. A., Philipse, A. P., Tuinier, R. et Lekkerkerker, H. N. W. (2003). "Morphology and kinetics of phase separating transparent xanthan-colloid mixtures." Biomacromolecules **4**: 129-136.
- Kulkarni, A. et Zukoski, C. F. (2001). "Depletion interactions and protein crystallization." J. Crystal Growth **232**: 156-164.
- Kulkarni, A. M., Chatterjee, A. P., Schweizer, K. S. et Zukoski, C. F. (2000). "Effects of polyethyleneglycol on protein interactions." J. Chem. Phys. **113**(21): 9863-9873.
- Laboureur, P. et Langlois, C. (1968). "Urate oxydase d'*Aspergillus flavus*. II. Métabolisme, inhibitions, spécificité." Bulletin de la société de chimie biologique **50**(4): 827-841.
- Lafont, S. (1996). Interactions des molécules de protéines en solution ; application à la cristallogénèse. Marseille, Université Aix-Marseille III.
- Lafont, S., Veessler, S., Astier, J. P. et Boistelle, R. (1997). "Comparison of solubilities and molecular interactions of BPTI molecules giving different polymorphs." J. Crystal Growth **173**: 132-140.

- Lekkerkerker, H. N. W., Poon, W. C. K., Pusey, P. N., Stroobants, A. et Warren, P. B. (1992). "Phase behaviour of colloid+polymer mixtures." Europhysics Letters **20**(6): 559-564.
- Lindner, P. et Zemb, T. (1991). Neutron, X-ray and light scattering: introduction to an investigative tool for colloidal and polymeric systems. Amsterdam: North-Holland.
- Lorber, B. (2002). "The crystallization of biological macromolecules under microgravity: a way to more accurate three-dimensional structures ?" Biochim. Biophys. Acta. **1599**(1-2): 1-8.
- Louis, A. A., Bolhuis, P. G., Meijer, E. J. et Hansen, J. P. (2002). "Polymer induced depletion potentials in polymer-colloid mixtures." J. Chem. Phys. **117**(4): 1893-1907.
- Lutterbach, N., Versmold, H., Reus, V., Belloni, L. et Zemb, T. (1999). "Charge-stabilized liquidlike ordered binary colloidal suspensions. 1. Ultra-Small-Angle X-ray Scattering characterization." Langmuir **15**: 337-344.
- Lutterbach, N., Versmold, H., Reus, V., Belloni, L., Zemb, T. et Lindner, P. (1999). "Charge-stabilized liquidlike ordered binary colloidal suspensions. 2. Partial structure factors determined by Small-Angle Neutron Scattering." Langmuir **15**: 345-352.
- Malfois, M. (1995). Caractérisation et modélisation des interactions en solution entre protéines du cristallin de l'oeil. Paris, Université Paris-Sud.
- Malfois, M., Bonneté, F., Belloni, L. et Tardieu, A. (1996). "A model of attractive interactions to account for liquid-liquid phase separation of protein solutions." J. Chem. Phys. **105**(B): 3290-3300.
- Marcelja, S. (1997). "Hydration in electrical double layers." Nature **38**: 689-690.
- Marcq, S. (1995). Croissance cristalline de protéines: Méthodologie expérimentale. Marseille, Université Aix-Marseille III.
- McMillan, R. A., Paavola, C. D., Howard, J., Chan, S. L., Zaluzec, N. J. et Trent, J. D. (2002). "Ordered nanoparticle arrays formed on engineered chaperonin protein templates." Nat. Mater. **1**(4): 247-252.
- McPherson, A. (1976). "Crystallization of proteins from polyethylene glycol." J. Biol. Chem. **251**(20): 6300-6303.
- McPherson, A. (1991). "A brief history of protein crystal growth." J. Crystal Growth **110**: 1-10.
- McPherson, A., Malkin, A. J. et Kuznetsov, Y. G. (2000). "Atomic Force Microscopy in the study of macromolecular crystal growth." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **29**: 361-410.
- Melander, W. et Horvath, C. (1977). "Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series." Arch. Biochem. Biophys. **183**(1): 200-215.

- Muschol, M. et Rosenberger, F. (1995). "Interactions in under- and supersaturated lysozyme solutions. Static and dynamic light scattering results." J. Chem. Phys. **103**(24): 10424-10432.
- Muschol, M. et Rosenberger, F. (1997). "Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization." J. Chem. Phys. **107**(6): 1953-1962.
- Odahara, T., Ataka, M. et Katsura, T. (1994). "Phase diagram determination to elucidate the crystal growth of the photoreaction center from *Rhodobacter sphaeroides*." Acta Cryst **D50**: 639-642.
- Pande, A., Pande, J., Asherie, N., Lomakin, A., Ogun, O., King, J. et Benedek, G. B. (2001). "Crystal cataracts: human genetic cataract caused by protein crystallization." PNAS **98**(11): 6116-6120.
- Patel, S., Cudney, B. et McPherson, A. (1995). "Polymeric Precipitants for the Crystallization of Macromolecules." Biochem. Biophys. Res. Commun. **207**(2): 579-583.
- Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S.-T., Tsekova, D., Nanev, C., Wilson, W. W. et Vekilov, P. G. (2001). "Temperature-independent solubility and interactions between apoferritin monomers and dimers in solution." J. Crystal Growth **232**: 21-29.
- Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S.-T. et Vekilov, P. G. (2000). "Interactions and Aggregation Molecules in Solution : Effects of Added Elctrolytes." Biophys. J. **78**: 2060-2069.
- Piazza, R. et Pierno, M. (2000). "Protein interactions near crystallization: a microscopic approach to the Hofmeister series." J. Phys. Condens. Matter **12**: A443-A449.
- Poon, W. C. K., Egelhaaf, S. U., Beales, P. A., Salonen, A. et Sawyer, L. (2000). "Protein crystallization: scaling of charge and salt concentration in lysozyme solutions." J. Phys. Condens. Matter **12**: L569-L574.
- Poon, W. C. K., Pirie, A. D. et Pusey, P. N. (1995). "Gelation in colloid-polymer mixtures." Faraday Discuss. **101**: 65-76.
- Retailleau, P., Riès-Kautt, M., Ducruix, A., Belloni, L., Candau, S. J. et Munch, J. P. (1999). "Coulombic interactions and ion-protein macroion coupled diffusion evidenced by light scattering." Eurphysics Lett. **46**(2): 154-159.
- Ries-Kautt, M. et Ducruix, A. (1989). "Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme." J. Biol. Chem. **264**(2): 745-748.
- Riès-Kautt, M. et Ducruix, A. (1999). From solution to crystals with a physico-chemical aspect. Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach. A. Ducruix and R. Giegé. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press.
- Robert, M.-C., Vidal, O., Garcia-Ruiz, J.-M. et Otalora, F. (1999). Crystallization in gels and related methods. Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach.

- A. Ducruix and R. Giegé. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press: 149-175.
- Rosenbaum, D., Zamora, P. C. et Zukoski, C. F. (1996). "Phase behavior of small attractive colloidal particles." Phys. Rev. Lett. **76**(1): 150-153.
- Rosenberger, F., Howard, S. B., Sowers, J. W. et Nyce, T. A. (1993). "Temperature dependence of solubility - determination and application to crystallization in X-Ray capillaries." J. Crystal Growth **129**(1-2): 1-12.
- Rosenberger, F., Vekilov, P. G., Muschol, M. et Thomas, B. R. (1996). "Nucleation and crystallization of globular proteins - what we know and what is missing." J. Crystal Growth **168**: 1-27.
- Roth, C. M., Neal, B. L. et Lenhoff, A. M. (1996). "Van der Waals interactions between proteins." Biophys. J. **70**: 977-987.
- Saeki, S., Kuwahara, N., Nakata, M. et Kaneko, M. (1976). "Upper and lower critical solution temperature in poly(ethylene glycol) solutions." Polymer **17**: 685-689.
- Sarma, A. D. et Tipton, P. A. (2000). "Evidence for urate hydroperoxide as an intermediate in the urate oxidase reaction." J. Am. Chem. Soc. **122**: 11252-11253.
- Sazaki, G., Kurihara, K., Nakada, T., Miyashita, S. et Komatsu, H. (1996). "A novel approach to the solubility measurement of protein crystals by two-beam interferometry." J. Crystal Growth **169**(2): 355-360.
- Sazaki, G., Nagatoshi, Y., Suzuki, Y., Durbin, S. D., Miyashita, S., Nakada, T. et Komatsu, H. (1999). "Solubility of tetragonal and orthorhombic lysozyme crystals under high pressure." J. Crystal Growth **196**: 204-209.
- Schwartz, A. M. et Berglund, K. A. (1999). "The use of Raman spectroscopy for in situ monitoring of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop." J. Crystal Growth **203**(4): 599-603.
- Seeman, N. C. (2003). "DNA in a material world." Nature **421**: 427-431.
- Solovyova, A., Schuck, P., Costenaro, L. et Ebel, C. (2001). "Non-ideality by sedimentation velocity of halophilic malate dehydrogenase in complex solvents." Biophys. J. **81**(4): 1868-1880.
- Suzuki, Y., Sazaki, G., Visuri, K., Tamura, K., Nakajima, K. et Yanagiya, S. (2002). "Significant decrease in the solubility of glucose isomerase crystals under high pressure." Cryst. Growth & Des. **2**(5): 321-324.
- Svergun, D., Barberato, C. et Koch, M. H. J. (1995). "CRY SOL-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates." J. Appl. Cryst. **28**: 768-773.

- Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J. P. et Aubry, A. (2001). "Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field." J. Crystal Growth **232**(1-4): 250-255.
- Tanaka, S. et Ataka, M. (2002). "Protein crystallization induced by polyethylene glycol: a model study using apoferritin." J. Chem. Phys. **117**(7): 3504-3510.
- Tanaka, S., Ataka, M., Onuma, K. et Kubota, T. (2003). "Rationalization of membrane protein crystallization with polyethylene glycol using a simple depletion model." Biophys. J. **84**: 3299-3306.
- Taratuta, V. G., Holschbach, A., Thurston, G. M., Blankschtein, D. et Benedek, G. B. (1990). "Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions - effects of pH and salt density." J. Phys. Chem. **94**(5): 2140-2144.
- Tardieu, A. (1994). Thermodynamics and structure - concentrated solutions - structured disorder in vision. HERCULES. **3**: 145-160.
- Tardieu, A., Le Verge, A., Riès-Kautt, M., Malfois, M., Bonneté, F., Finet, S. et Belloni, L. (1999). "Proteins in solution : from X-ray scattering intensities to interaction potentials." J. Crystal Growth **196**: 193-203.
- Tardieu, A., Bonneté, F., Finet, S. et Vivarès, D. (2002). "Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules." Acta Cryst **D58**: 1549-1553.
- Tardieu, A., Finet, S. et Bonneté, F. (2001). "Structure of the macromolecular solutions that generate crystals." J. Crystal Growth **232**: 1-9.
- ten Wolde, P. R. et Frenkel, D. (1997). "Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations." Science **277**: 1975-1978.
- Tessier, P. M., Johnson, H. R., Pazhianur, R., Berger, B. W., Prentice, J. L., Bahnson, B. J., Sandler, S. I. et Lenhoff, A. M. (2003). "Predictive crystallization of ribonuclease A via rapid screening of osmotic second virial coefficients." Proteins **50**(2): 303-311.
- Tessier, P. M., Lenhoff, A. M. et Sandler, S. I. (2002). "Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography." Biophys. J. **82**(3): 1620-1631.
- Timasheff, S. N. et Arakawa, T. (1988). "Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents." J. Crystal Growth **90**: 39-46.
- Thomson, J. A., Schurteberger, P., Thurston, G. M. et Benedek, G. B. (1987). "Binary-liquid phase-separation and critical phenomena in a protein water solution." PNAS **84**(20): 7079-7083.
- Tuinier, R. et Brûlet, A. (2003). "On the long range attraction between proteins due to nonadsorbing polysaccharide." Biomacromolecules **4**: 28-31.

- Tuinier, R., Dhont, J. K. G. et de Kruif, C. G. (2000). "Depletion-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide." Langmuir **16**: 1497-1507.
- Tuinier, R., ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P. A. et de Kruif, C. G. (1999). "Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide." Phys.Rev. E **60**(1): 848-856.
- Vachette, P. (1996). "Small angle X-ray scattering by solutions of biological macromolecules." Proceedings of the International school of physics "Enrico Fermi" Course CXXVIII: 269-292.
- van Bruggen, M. P. B., Dhont, J. K. G. et Lekkerkerker, H. N. W. (1999). "Morphology and kinetics of the isotropic-nematic phase transition in dispersions of hard rods." Macromolecules **32**: 2256-2264.
- Veesler, S. et Boistelle, R. (1999). Diagnostic of pre-nucleation and nucleation by spectroscopic methods and background on the physics of crystal growth. Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach. A. Ducruix and R. Giegé. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press: 313-340.
- Vekilov, P. G., Ataka, M. et Katsura, T. (1995). "Growth processes of protein crystals revealed by laser Michelson interferometry investigation." Acta Cryst. D **51**: 207-219.
- Vekilov, P. G., Feeling-Taylor, A. R., Petsev, D. N., Galkin, O., Nagel, R. L. et Hirsch, R. E. (2002). "Intermolecular interactions, nucleation, and thermodynamics of crystallization of hemoglobin C." Biophys. J. **83**(2): 1147-1156.
- Velev, O. D., Kaler, E. W. et Lenhoff, A. M. (1998). "Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering : comparison of lysozyme and chymotrypsinogen." Biophys. J. **75**(6): 2682-2697.
- Vérétout, F., Delaye, M. et Tardieu, A. (1989). "Molecular basis of eye lens transparency. Osmotic pressure and X-ray analysis of alpha-crystallin solutions." J. Mol. Biol. **205**(4): 713-728.
- Verhaegh, N. A. M., Asnaghi, D. et Lekkerkerker, H. N. W. (1999). "Transient gels in colloid-polymer mixtures studied with fluorescence confocal scanning laser spectroscopy." Physica A **264**: 64-74.
- Verhaegh, N. A. M., Asnaghi, D., Lekkerkerker, H. N. W., Giglio, M. et Cipelletti, L. (1997). "Transient gelation by spinodal decomposition in colloid-polymer mixtures." Physica A **242**: 104-118.
- Verma, R., Crocker, J. C., Lubensky, T. C. et Yodh, A. G. (2000). "Attractions between hard colloidal spheres in semiflexible polymer." Macromolecules **33**: 177-186.
- Vincent, B., Luckham, P. F. et Waite, F. A. (1980). "The effect of free polymer on the stability of sterically stabilized dispersions." J.Colloid Interface Sci. **73**(2): 508-521.

- Vliegenthart, G. A. et Lekkerkerker, H. N. W. (2000). "Predicting the gas-liquid critical point from the second virial coefficient." J.Chem.Phys. **112**(12): 5364-5369.
- Vrij, A. (1976). "Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions." Pure Appl. Chem. **48**(4): 471-483.
- Wakayama, N. I. (2003). "Effects of a strong magnetic field on protein crystal growth." Cryst. Growth & Des. **3**(1): 17-24.
- Webb, J. N., Waghmare, R. Y., Carpenter, J. F., Glatz, C. E. et Randolph, T. W. (1999). "Pressure effect on subtilisin crystallization and solubility." J. Crystal Growth **205**(4): 563-574.
- Weiss, A., Hörner, K. D. et Ballauff, M. (1999). "Analysis of attractive interactions between latex particles in the presence of nonadsorbing polymers by turbidimetry." J. Colloid Interface Sci. **213**: 417-425.
- Yau, S.-T. et Vekilov, P. G. (2000). "Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization." Nature **406**: 494-497.
- Ye, X., Narayanan, T., Tong, P., Huang, J. S., Lin, M. Y., Carvalho, B. L. et Fetters, L. J. (1996). "Depletion interactions in colloid-polymer mixtures." Phys. Rev. E **54**(6): 6500-6510.
- Yip, C. M., DeFelippis, M. R., Frank, B. H., Brader, M. L. et Ward, M. D. (1998). "Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by Atomic Force Microscopy: Evidence of hydrophobically driven assembly." Biophys. J. **75**: 1172-1179.

Publications

Le travail réalisé au cours de cette thèse a donné lieu à plusieurs publications. La première publication concerne les résultats obtenus sur la caractérisation des interactions en solution à l'aide du second coefficient du viriel et la corrélation avec les essais de cristallisation de l'urate oxydase [D.Vivares et F.Bonneté, *Acta Cryst. D* **58**, 472-479 (2002)]. La seconde publication rend compte de la détermination des potentiels d'interaction à partir des traitements numériques [D.Vivares, L.Belloni, A.Tardieu et F.Bonneté, *Eur. Phys. J. E* **9**, 15-25 (2002)]. La troisième publication illustre l'intérêt de l'utilisation d'un second coefficient du viriel normalisé afin de mieux prédire la cristallisation des protéines [F.Bonneté et D.Vivares, *Acta Cryst. D* **58**, 1571-1575 (2002)].

Pour ces publications, la concentration en urate oxydase a été déterminée avec un coefficient d'extinction molaire relatif au complexe urate oxydase – 8-azaxanthine égal à $1.0 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Nous avons évalué ce coefficient en se basant sur les données d'activité (qui correspond à la quantité de substrat formé par unité de temps au cours de la réaction enzymatique) des lots de protéine fournis et en supposant que les pertes en protéines lors de la purification de la protéine, pour éliminer l'excès d'inhibiteur, étaient négligeables. En effet, connaissant l'activité de la solution d'urate oxydase (en U/ml), l'activité spécifique de l'urate oxydase (en U/mg) ainsi que le volume de la solution, nous pouvions remonter à sa concentration en mg/ml. En mesurant la densité optique de la solution purifiée, nous avons alors évalué à $1.0(+/-0.1) \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ le coefficient d'extinction molaire du complexe urate oxydase – 8-azaxanthine. Ce n'est que très récemment que nous nous sommes rendu compte que ce coefficient était erroné. Nous avons alors entrepris de le déterminer précisément en réalisant une analyse nanomolaire en acide aminés, présentée au début du second chapitre. A partir de cette analyse, le coefficient d'extinction molaire du complexe a été évalué à $2.2(+/-0.1) \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. L'écart par rapport à la première valeur signifie que la quantité d'urate oxydase présente initialement dans les lots était inférieure à celle calculée à partir des données sur son activité. Avec du recul, plusieurs explications peuvent être avancées: les lots fournis datant de plusieurs années, certaines protéines peuvent s'être dénaturées et/ou précipitées ; de plus l'urate oxydase cristallisant dans son tampon à froid (4°C), certaines protéines se trouvaient peut-être sous forme cristalline et donc non en solution ; enfin, une perte a pu avoir lieu lors de l'étape de purification. Les concentrations évaluées dans les publications sont par conséquent surestimées et les valeurs de second coefficient du viriel et des profondeurs des potentiels d'interaction sous-estimées. Les variations observées et, les discussions et conclusions développées dans ces articles restent cependant inchangées.

X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins

D. Vivarès and F. Bonneté*

Laboratoire de Minéralogie Cristallographie,
UMR 7590 CNRS, Universités Paris 6–Paris 7–
IPG, Case 115, 4 Place Jussieu,
F-75252 Paris CEDEX 05, France

Correspondence e-mail:
bonnete@lmcp.jussieu.fr

Received 14 September 2001
Accepted 2 January 2002

The determination of the three-dimensional structures of biological macromolecules by X-ray diffraction generally requires large good-quality crystals, which are often difficult to obtain as crystal nucleation and growth depend upon a great number of physicochemical parameters. In the future, the emergence of structural genomic projects will require new and rapid methods to determine crystallization conditions. Until now, the prediction of crystallization conditions has essentially been based on the knowledge of interparticle interactions in solutions inferred from studies on small soluble proteins in the presence of salts. The present study, by small-angle X-ray scattering, of urate oxidase from *Aspergillus flavus*, a homotetrameric enzyme of 128 kDa, allowed the extension of the results to the crystallization of large proteins in the presence of polyethylene glycol (PEG). The protein crystallization, the nucleation rate and the different morphological crystal shapes obtained were correlated with the second virial coefficient (A_2), which was found to be in a restricted range at the low end of the 'crystallization slot' proposed by George & Wilson [(1994). *Acta Cryst. D* **50**, 361–365].

1. Introduction

In the field of structural biology, the main technique for the determination of the three-dimensional structures of macromolecules (proteins, nucleic acids, macromolecular complexes, viruses *etc.*) remains crystallography – more than 80% of structures are solved by the diffraction of X-rays. In addition, with the constant improvement in X-ray sources, in data-collection instruments and in data analysis, the number of known structures has increased tremendously over past decades. Paradoxically, it is crystallization, still too often governed by trial-and-error methods, that remains the limiting stage of crystallography. Better understanding of the factors that control the nucleation and crystal growth of macromolecules is of prime importance, especially in the context of genome sequencing.

It is now admitted that phase transitions such as liquid–liquid or liquid–solid (crystal or precipitate) phase separations are governed by weak interaction forces between macromolecules in solution: hard-sphere forces, coulombic repulsions, van der Waals attractions *etc.* Studies have notably been performed on different model systems to find a way to correlate the interactions of macromolecules in solution with crystallization. Various parameters (pH, temperature, addition of crystallizing agent) were systematically and independently studied. Such studies are intended to develop more rational approaches that could help crystallographers to limit crystallization conditions.

The first and most studied protein molecule is lysozyme, which crystallizes easily on the addition of salts (sodium thiocyanate, sodium chloride *etc.*). In this case, it was shown by small-angle X-ray and static light scattering that the global interactions between particles were modified from repulsive to attractive by the addition of salt, leading to the crystallization process (Muschol & Rosenberger, 1995; Ducruix *et al.*, 1996). In addition, a differential anion effect was observed with lysozyme and various other systems, which affects both solubility (Riès-Kautt & Ducruix, 1989; Carbonnaux *et al.*, 1995; Veesler *et al.*, 1996) and macromolecular interactions whatever the size, the isoelectric point and the compactness of the protein (Ducruix *et al.*, 1996; Lafont *et al.*, 1997; Bonneté *et al.*, 1999, 2001; Budayova *et al.*, 1999; Finet, 1999; Tardieu *et al.*, 1999; Piazza & Pierno, 2000). This differential effect follows the direct or reverse order of the Hofmeister series (Hofmeister, 1888), depending on whether the pH of the solution is above or below the isoelectric point of the protein, respectively.

A thermodynamic parameter, the second virial coefficient A_2 (often written B_{22} in static light-scattering experiments) was found to be suitable to characterize the net intermolecular forces in solution, as it is negative with net attractive protein–protein interactions and positive with repulsive ones. George & Wilson (1994) have shown by compiling the data from a diverse set of soluble proteins crystallized with various precipitant agents that the soluble proteins crystallize in a narrow range of the second virial coefficient (about -1.0 to -8.0×10^{-4} mol ml g $^{-2}$) which they called the ‘crystallization slot’, corresponding to slight attractive interactions between particles. The second virial coefficient therefore appeared to be a useful tool to predict the crystallization of proteins. This observation was later confirmed in the case of addition of salt to different proteins such as lysozyme (Bonneté *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Haas *et al.*, 1999), BPTI (Lafont *et al.*, 1997), chymotrypsinogen (Velev *et al.*, 1998) or apoferritin (Petsev *et al.*, 2000). Although some interaction studies between macromolecules have been performed with the widely used non-adsorbing polymer PEG (polyethylene glycol; Budayova *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2000; Finet & Tardieu, 2001), only a few works correlate the second virial coefficient with protein crystallization (Hitscherich *et al.*, 2000).

In previous work, we used urate oxidase from *A. flavus* as a new model system for crystallogensis. Its three-dimensional structure in complex with the inhibitor 8-azaxanthine was solved at 2.05 Å resolution (Colloc'h *et al.*, 1997). The active enzyme is a homotetrameric globular protein (monomeric subunit of about 32 kDa) with an external diameter of 70 Å, enclosing a tunnel 70 Å long and 15 Å in diameter. It is composed of two homodimers superimposed head-to-tail, each dimer being composed of two monomers related by a crystallographic twofold axis.

Its interactions in solution were characterized by small-angle X-ray scattering under conditions where the enzyme is most active and stable (Bonneté *et al.*, 2001). Under these conditions, urate oxidase presented slightly repulsive interactions. Changing the pH or adding salt (300 mM sodium

thiocyanate and 1 M sodium formate) was found to be ineffective to induce attractive interactions and protein crystallization. Experiments performed with the addition of PEG first showed a correlation between crystallization and attractive interactions of urate oxidase in solution, which suggested that this protein could be an excellent system for crystallogensis studies.

In the present work, the interactions of urate oxidase in solution were first studied by SAXS as a function of addition of other salts close to the pI (at pH 8.5) and far from the pI (at pH 10.5). Our studies were limited to medium salt concentrations (up to 500 mM); it is noteworthy that at high salt concentrations a variety of effects which are not fully understood can occur (Boyer *et al.*, 1999; Ebel *et al.*, 1999; Petsev *et al.*, 2000). Furthermore, as the addition of PEG was found to be more effective close to the isoelectric point (Bonneté *et al.*, 2001), the effects of PEGs of different molecular weights (3350, 8000 and 20 000 Da) and at various concentrations were studied mainly at pH 8.5.

Whatever the pH of the solution, the addition of salts was found to be ineffective to induce attractive interactions, in contrast to the case with small soluble proteins (lysozyme, BPTI or γ -crystallins); this result is discussed by coupling SAXS experiments with numerical simulations based on a simple model from colloid physics, the DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) model (Derjaguin & Landau, 1941; Verwey & Overbeek, 1948). On the other hand, PEG is shown to induce an attractive interaction between proteins which increases with both the size and the concentration of polymer.

In parallel with the SAXS experiments, crystallization trials were performed and attractive interactions observed by addition of PEG could be correlated with the crystallization of urate oxidase. Nucleation and crystal shapes were found to change with the weight and the concentration of the polymer, as did the second virial coefficient. In addition, our results indicate that the crystallization of urate oxidase occurs in a restricted range of the second virial coefficient at the low end of the ‘crystallization slot’ defined by George and Wilson (1994).

2. Materials and methods

2.1. Preparation of urate oxidase

Urate oxidase solution was prepared as described previously (Bonneté *et al.*, 2001). Several protein solutions were then prepared in buffers at different pH values (50 mM Tris pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.1, 50 mM sodium borate pH 8.7 and 10 mM sodium carbonate pH 10.5) by diluting the stock solution with the appropriate pH buffer and concentrating this new solution in an Amicon cell. This process was repeated several times to ensure that the protein solution was at the desired pH. All solutions were finally adjusted to a concentration of about 60 mg ml $^{-1}$.

2.2. Preparation of PEG and salt solutions

All PEG (from Hampton Research) and salt (from Sigma) solutions for the SAXS experiments and the crystallization trials were buffered at a given pH with appropriate buffers. All solutions were filtered through 0.22 μm Millipore filters. The stock solutions 2 M sodium acetate and sodium sulfate, 40% PEG 3350, 40% PEG 8000 and 20% PEG 20 000 were prepared and buffered at the appropriate pH. Concentrations of PEG solutions are expressed in weight per volume.

2.3. Crystallization trials

The crystallization trials were performed in an air-conditioned room (293 K) with the microbatch technique. Droplets were prepared by mixing 2 μl of a concentrated and purified protein solution with 2 μl of precipitant agent and pipetted under a layer of paraffin oil in a 72-well microbatch plate (paraffin oil and plates from Hampton Research). Crystals were observed with a TE 200 microscope from Nikon and photographs were taken with the software *Replay* developed by Microvision, with an enlargement of 200.

2.4. Solution X-ray scattering measurements

X-ray scattering curves were recorded with the small-angle scattering instrument D24 using the synchrotron radiation emitted by the storage ring DCI at LURE (Orsay). The instrument, the data-acquisition system and the thermostatted cell under vacuum used for these experiments have been described previously (Boulin *et al.*, 1986; Depautex *et al.*, 1987; Dubuisson *et al.*, 1997). The wavelength of the X-rays was 1.488 Å (Ni K edge). The sample-to-detector distances used in the different series of experiments were 1890 ± 5 mm, yielding an s increment per channel of $2.15 \pm 0.005 \times 10^{-4} \text{ Å}^{-1}$. One to six frames with duration of 200 s each according to the protein concentration were recorded for each sample and corresponding buffers. The curves were scaled to the transmitted intensity. After subtraction of the appropriate buffer, the curves were normalized to the enzyme concentration before plotting.

3. Theory

3.1. Interaction forces

Proteins in solution interact through non-specific medium-range (from a few angstroms to a few tens of angstroms) interaction forces. Three interactions are well identified: the repulsive hard-sphere interaction, which characterizes the fact that proteins cannot interpenetrate, the repulsive coulombic interaction arising from the net charge of the protein and the attractive van der Waals component, which is the resulting dipolar interaction between proteins. These three interactions, which depend on pH, temperature and solvent composition, constitute what is called the DLVO model.

Proteins in solution also interact through other non-specific forces such as hydration or hydrophobic forces, which are still poorly characterized. The addition of precipitating agents

(salts or PEG) can also induce other additional attractive forces. The attractive interaction induced by the addition of polymer is the depletion attraction, which is a function of the polymer mass and concentration (Lekkerkerker, 1997; Kulkarni *et al.*, 2000; Vliegthart & Lekkerkerker, 2000). This depletion interaction, which was originally described in the case of colloid–polymer mixtures (Asakura & Oosawa, 1954; Vrij, 1976) and subsequently in the case of protein–polymer mixtures (Mahadevan & Hall, 1990) can be explained in a simplified manner (Fig. 1) for an ideal polymer solution. Molecules of polymer (characterized by their radius of gyration R_g) and colloids cannot mutually interpenetrate; furthermore, the centre of polymers is excluded from a region of thickness R_g around each colloidal particle. This region is called the depletion zone. When two colloid particles come sufficiently close to each other, their depletion zones overlap and the free volume accessible to the polymer molecules increases, leading to a gain in entropy of the system. Thermodynamically, it is therefore more favourable for the polymer that the colloidal particles become closer, which corresponds to an attractive interaction between them. This model remains valid as long as molecules of polymer do not overlap.

3.2. Small-angle X-ray scattering

The second virial coefficient A_2 , which characterizes the resultant force of all individual interactions, is determined in this case by small-angle X-ray scattering (SAXS). The total normalized intensity $I(c, s)$ scattered by a solution of monodisperse spherical particles at a scattering angle 2θ can be expressed as a function of the particle concentration c and the modulus of the scattering vector s , $s = 2\lambda^{-1}\sin\theta$, by

$$I(c, s) = I(0, s)S(c, s). \quad (1)$$

$I(0, s)$, the intensity scattered by one particle and usually called the particle form factor, is the Fourier transform of the spherically averaged auto-correlation function of the electron-density contrast associated with the particle. The form factor is generally obtained from curves recorded at low concentrations to avoid interaction effects.

With interacting spherical particles, departure from ideality may simply be accounted for by a multiplying factor or interference term, $S(c, s)$, usually called the solution structure factor. The nature of the net interactions, either attractive or repulsive, can be simply determined by the plot of the struc-

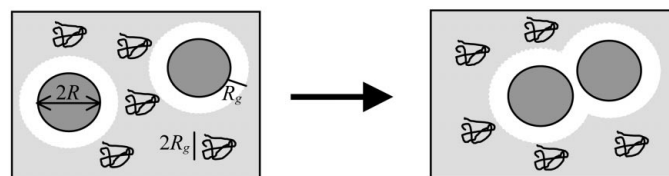


Figure 1

The depletion zone around each protein molecule where the centres of polymer molecules cannot enter is in white. When the depletion zones overlap, the volume accessible to the polymer increases, giving rise to an entropy-driven depletion attraction between proteins.

ture factor at the origin, $S(c, 0)$, as a function of the particle concentration, since it is related to the osmotic pressure Π by

$$S(c, 0) = \frac{RT}{M} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)^{-1}, \quad (2)$$

with

$$\frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M} + A_2c + A_3c^2 + \dots, \quad (3)$$

the concentration c being expressed in g cm^{-3} .

Therefore, the second virial coefficient can be obtained by the expression

$$S(c, 0) = \frac{I(c, 0)}{I(0, 0)} = \frac{1}{1 + 2MA_2c + \dots}. \quad (4)$$

In the case where the term $2MA_2c$ is small ($\ll 1$), the expansion in powers of c of the structure factor at the origin $S(c, 0)$ can be limited to the second virial coefficient and linearized. Experimentally, the structure factor at the origin is evaluated from the expression

$$S(c, 0) = \frac{\lim_{s \rightarrow 0} I(c, s)}{\lim_{c \rightarrow 0} I(c, 0)}. \quad (5)$$

The slope of the linear fit gives the coefficient A_2 in mol ml g^{-2} ,

$$\frac{1}{S(c, 0)} = 1 + 2MA_2c. \quad (6)$$

If A_2 is positive, the overall interactions are repulsive; if A_2 is negative, the interactions are attractive.

4. Results

4.1. Temperature effects

In previous work (Bonneté *et al.*, 2001), a slight temperature effect was observed on the scattered intensity at small angles at pH 10.5 between 283 and 293 K, which was attributed to a small van der Waals attraction. In order to characterize it in terms of second virial coefficient, SAXS experiments were performed over a larger range of temperature from 278 to 303 K at a constant pH closer to the isoelectric point, where the repulsive component is weaker. Since the Tris buffer was very sensitive to variations of temperature ($\text{dp}K_a/\text{dT} = -0.028$; Beynon & Easterby, 1996), we used a 50 mM sodium borate buffer whose pH is known to be less temperature dependent ($\text{dp}K_a/\text{dT} = -0.008$). Values of the second virial coefficient were determined from SAXS experiments as a function of urate oxidase concentration at each temperature (Table 1). The second virial coefficient, while sharply increasing with the temperature, remains positive.

It is worth noting that at 277 K some crystals grew after several weeks in the absence of any crystallizing agent whatever the pH of the solution (pH 8.5–10.5; data not shown). The crystallographic structure was determined from crystals grown in 10 mM sodium carbonate pH 10.5 at 277 K (Colloc'h *et al.*,

Table 1

Variations of second virial coefficient as a function of temperature in 50 mM sodium borate pH 8.7.

T (K)	A_2 ($10^{-4} \pm 5 \times 10^{-6} \text{ mol ml g}^{-2}$)
278	+0.09
283	+0.17
293	+0.24
303	+0.36

1997). According to Table 1, this shows that urate oxidase can crystallize with a second virial coefficient A_2 close to zero.

4.2. pH and salt effects: SAXS experiments

Small-angle X-ray scattering experiments were performed with solutions of urate oxidase at different concentrations in the presence of its inhibitor at pH 8.5 and 10.5. A compilation of second virial coefficient (A_2) values of urate oxidase determined from these SAXS experiments and from a previous work (Bonneté *et al.*, 2001) are plotted in Fig. 2 as a function of pH between pH 7.5 and 10.5. Below pH 7.5 and above pH 10.5, the protein is unstable (Bayol *et al.*, 1995). A_2 is minimum between pH 7.5 and 8.0 and then sharply increases until pH 10.5. This result was expected, as the theoretical isoelectric point is about 7.7. Consequently, by changing the pH away from the pI (pH > 8.0) the protein net charge increases, leading to an increase in the repulsive electrostatic interactions.

Experiments were performed with addition of salts at two pH values close (pH 8.5) and far (pH 10.5) from the isoelectric point (pI) of the protein. With model systems such as lysozyme, the protein interactions in solution weakly depend on the nature of the cation and are strongly dependent on the kind of anion (Ducruix *et al.*, 1996). We therefore focused our study on the anion effect using sodium salts. As the pH values

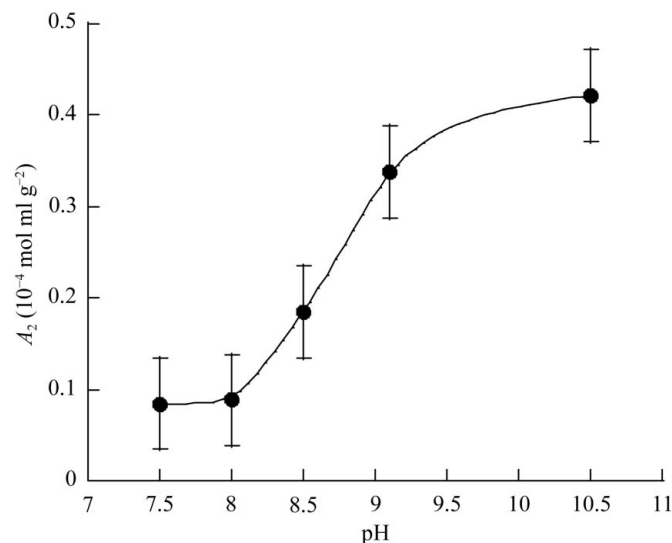


Figure 2

Variations of the second virial coefficient as a function of the pH of urate oxidase solutions with error bars of $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ mol ml g}^{-2}$ (the line is drawn as a guide).

of the solutions studied were above the isoelectric point (pH 8.5 and pH 10.5), the monovalent and divalent sodium salts chosen from the Hofmeister series which were *a priori* the most efficient for inducing attractive interactions and protein crystallization (Carbonnaux *et al.*, 1995; Veessler *et al.*, 1996) were sodium acetate and sodium sulfate.

Values of the second virial coefficient at pH 8.5 and 10.5 without salt and with sodium acetate or sulfate are summarized in Table 2. At pH 8.5 or 10.5, adding salts to any concentration up to 500 mM did not bring the solution into an attractive regime. The values of the second virial coefficient measured in 100 and 500 mM sodium acetate and 400 mM sodium sulfate at pH 8.5 and in 500 mM sodium acetate at pH 10.5 are about the same as those at pH 7.5 or 8.0, values close to the pI. At pH 10.5, the effect of salt addition is progressive until the screening of the charges on the surface of the molecule. At pH 8.5, the values at 100 and 500 mM are close to each other and inverted, but are not different enough to be attributable to an increase of the repulsion as observed with apoferritin (Petsev & Vekilov, 2000). In a previous study, charge screening was also observed at pH 9.1 with two other salts, sodium formate and sodium thiocyanate (Bonneté *et al.*, 2001). All these studies confirm that in the case of urate oxidase the only role of salts seems to be the screening of electrostatic repulsion.

Crystallization trials were performed under identical conditions in an air-conditioned room at about 293 K. No crystal were obtained after several weeks.

4.3. pH and salt effects: numerical simulations

The pH and salt effects observed on the variations of the second virial coefficient can be simply explained by a decrease in the coulombic repulsive interactions, owing to the decrease of the protein net charge by either changing the pH close to the pI or by screening the repulsion with salt. This assumption was checked by characterizing not only the global interactions between proteins, expressed by A_2 , but also each of the different underlying interaction potentials. For this purpose, numerical simulations were performed on series of SAXS experiments on urate oxidase at different pH values without salt and at pH 8.5 and 10.5 with addition of 100 and 500 mM sodium acetate.

Details of the theoretical treatment have been described elsewhere (Malfois *et al.*, 1996; Tardieu *et al.*, 1999). We used an iterative program developed by Luc Belloni (Belloni, 1991) with a simplified model that takes into account the protein–protein interactions. The macromolecular particles are considered as spheres of net charge Z and the ions are treated as points and appear only through the ionic strength I of the solution. The program, based on the relationship between the interaction potentials and the structure factor, calculates a theoretical structure factor from three interaction potentials, *i.e.* a hard-core potential, a coulombic repulsion and a van der Waals attraction, which constitutes the DLVO model. These three potentials depend upon the sphere-equivalent diameter of the protein σ ($\sigma = 2R$). In addition, the repulsive coulombic

Table 2

Values of the second virial coefficient with and without salt added in Tris buffer at pH 8.5 and in sodium carbonate pH 10.5 at 293 K.

pH	A_2 ($10^{-4} \pm 5 \times 10^{-6}$ mol ml g $^{-2}$)			
	Without salt	100 mM sodium acetate	500 mM sodium acetate	400 mM sodium sulfate
8.5	+0.19	+0.09	+0.11	+0.14
10.5	+0.42	+0.24	+0.14	

potential is a function of the effective protein charge and of the ionic strength of the solution; the attractive van der Waals potential is characterized by its depth J (in $k_B T$ units) and its range d (in Å) and depends upon the temperature. The theoretical structure factor determined by combination of these three potentials is then compared with the experimental one. The parameters (σ , Z , I , J and d) of the interaction potentials are modified until the experimental curves are correctly fitted on the whole s range.

If the only effect of pH and salt is to modify the net charge of the protein and the ionic strength of the solution, the two other parameters J and d remain constant, as the van der Waals potential is insensitive to variations in the concentration of electrolytes and pH. The diameter σ of urate oxidase is fixed at 70 Å from the crystallographic structure (Colloc'h *et al.*, 1997). With a tunnel whose volume represents only about 5% of the total volume, the enzyme can reasonably be considered to be a compact protein. The depth and the range of the van der Waals potential, expected to be constant for

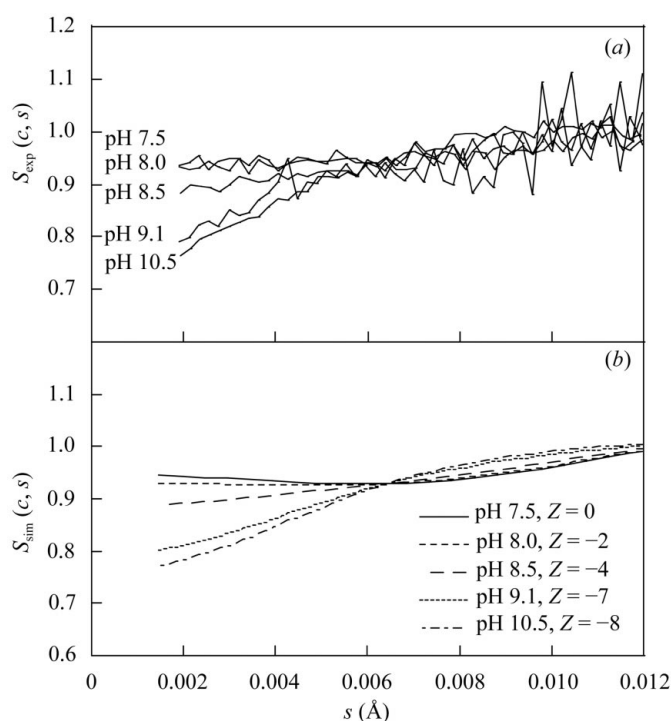


Figure 3

(a) Experimental structure factors of urate oxidase at 32 mg ml $^{-1}$ as a function of pH; (b) corresponding simulated structure factors.

compact particles (Malfois *et al.*, 1996), were fixed to be about $2.5k_B T$ and 3 Å, respectively, at 293 K.

The experimental structure-factor curves at pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.1 and 10.5 could be fitted using a calculated ionic strength of 0.025 M and a protein net charge of $Z = 0, -2, -4, -7$ and -8 , respectively (Fig. 3), without changing any other parameters. The value of $Z = 0$ for pH 7.5 was expected as this is about the theoretical isoelectric point. In order to account for our experimental results at pH 8.5 and 10.5 with salt concentrations of 100 and 500 mM sodium acetate, respectively, we fitted the curves with respective ionic strengths of 0.125 and

0.525 M ([sodium acetate] + [buffer]), keeping the protein net charge (determined above at both pH) constant (not shown).

The theoretical study shows that considering the effect of salt only as a screening term, without specific consideration of anion or cation type, allows us to account for the experimental results.

4.4. PEG effects on interaction forces

In the previous study, PEG was shown to be efficient in inducing attractive interactions between molecules of urate oxidase at pH 9.1 in the presence of salt or at pH 8.5 without salt (Bonneté *et al.*, 2001). The PEG therefore seemed to be all the more effective when the coulombic repulsion was low, *i.e.* at a pH close to the pI or on screening the charges of the particle at pH values far from the pI.

In the present work, the effects of the concentration and the size of PEG were studied on urate oxidase interactions in solution. SAXS experiments were performed at pH 8.5 with three PEGs of different molecular weights: 3350, 8000 and 20 000 Da. The increase of the scattered intensity observed at small angles ($s < 0.005 \text{ Å}^{-1}$) with the increase in protein concentration was indicative of attractive interactions between particles (Fig. 4). Expressed in terms of the second virial coefficient *via* (6), we observed that whatever the size of the polymer compared with the size of the protein, it was possible to reach an attractive regime corresponding to a negative second virial coefficient (Fig. 5) by increasing the polymer concentration. The efficiency of PEG in inducing more attractive interactions increases with the molecular weight and the concentration of the polymer. This result highlights the correlation between interactions in solution and solubility; Atha & Ingham (1981) showed that protein solubility decreases when the molecular weight and the concentration of the polymer increase.

4.5. Crystallization with PEG

In contrast to the case of salts, where no crystal was observed after several weeks at room temperature, crystals of urate oxidase grew in a few days from 30 mg ml^{-1} solutions of enzyme at pH 8.5 with different percentages of the three PEGs (Fig. 6).

As expected from a general protein concentration against % PEG diagram, for a given concentration of protein the nucleation rate increases with the PEG concentration and, in the same way, the PEG concentration necessary to crystallize the protein is lower when the size of PEG is larger. By correlating the different crystallization trials of urate oxidase in the three PEGs (3350, 8000 and 20 000) at pH 8.5 with the second virial coefficient in Fig. 5, we observed that the nucleation rate in the different crystallization drops follows the variation of A_2 and that the enzyme crystallizes in a very narrow range of A_2 values: $-0.40 < A_2 < 0.10$ ($\times 10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2}$). The upper and lower limits of A_2 are those determined from growing crystals in the usual range of protein concentration ($10\text{--}30 \text{ mg ml}^{-1}$). In this protein concentration range, higher concentrations of PEG led either

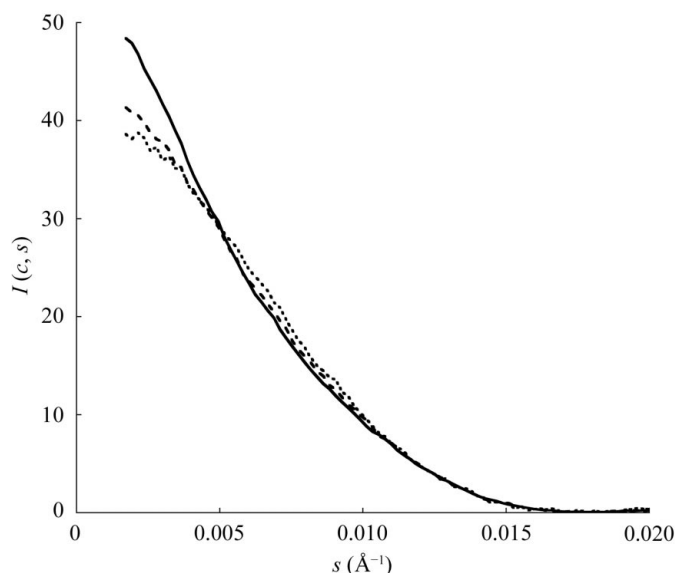


Figure 4
SAXS patterns of urate oxidase solutions in 50 mM Tris pH 8.5 at 293 K, with addition of 8% PEG 3350 at various concentrations of enzyme: 4 (dotted line), 16 (dashed line) and 32 mg ml^{-1} (continuous line).

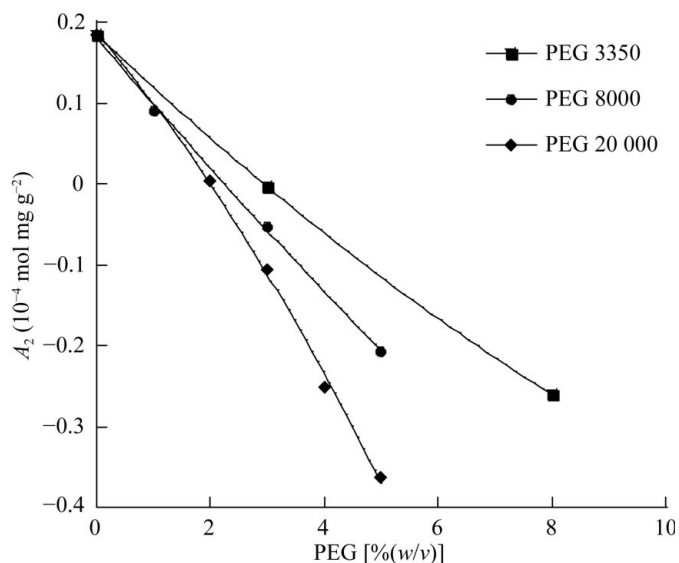


Figure 5
Second virial coefficient of urate oxidase as a function of percentage of different PEGs (the lines are drawn as guides).

to liquid–liquid phase separations, which can give crystals, or to amorphous precipitation.

In addition, different crystal habits were observed under the different PEG conditions used. These crystal shapes seemed to be more dependent upon the concentration of PEG and the supersaturation of the solution than upon the size of PEG. Whatever the molecular weight of PEG, for a low amount of PEG the crystals preferentially adopted a ‘massive’ polyhedral form, whereas for higher amounts of PEG they displayed a needle habit. Furthermore, the same shapes are observed for the conditions 5% PEG 3350, 4% PEG 8000 and 3 and 4% PEG 20 000 which correspond to an almost constant second virial coefficient. These results suggest that for a given initial protein concentration each crystal shape seems to correspond to a narrow range of the second virial coefficient (Fig. 6). Work is in progress to better characterize and understand the origin of these different crystal shapes.

5. Discussion

In the case of urate oxidase, monovalent or divalent salts only screen the protein charges through their ionic strength and do not induce attractive interactions and protein crystallization, in contrast to proteins such as lysozyme or BPTI. The failure of monovalent salts (at concentrations up to 1 M) to bring the overall interactions into an attractive regime have already been observed with other large proteins, *e.g.* aspartate transcarbamylase (ATCase; $R \simeq 60$ Å) from *E. coli* (Budayova *et al.*, 1999), α -crystallin ($R \simeq 85$ Å) from bovine lens (Finet, 1999; Finet & Tardieu, 2001) and with the brome mosaic virus (BMV; $R \simeq 135$ Å; Casselyn *et al.*, 2001). It may then follow that owing to this lack of attraction, monovalent salts alone are poorer crystallization agents for large particles than for small compact proteins. Even if in the case of urate oxidase sodium sulfate is inefficient to induce attractive interactions and crystallization, such a result cannot be extended to other large macromolecules since multivalent ions, whose effects are still poorly understood, are known to help in crystallizing or precipitating several large biological macromolecules (Ng *et al.*, 1996; Hempstead *et al.*, 1997).

For large macromolecules, PEG appears to be a far more efficient crystallization agent. Indeed, as for α -crystallin and ATCase, we observed that PEG induces attractive interactions between molecules of urate oxidase. We found that this attractive interaction increases with the concentration C_p and the size R_g of the polymer, R_g being evaluated by the expression R_g (Å) = $0.215 M_w^{0.583}$, where M_w is the polymer molecular weight (Devanand & Selser, 1991). These variations of interactions were observed whatever the ratio of the R_g of the polymer to the radius R of the protein, *i.e.* $\xi = R_g/R$ ($\xi < 1$ for PEG 3350, $\xi \simeq 1$ for PEG 8000, $\xi > 1$ for PEG 20 000). Kulkarni *et al.* (2000) recently showed that the depletion attraction presents a minimum near the polymer concentration C_p^* [equal to $3M_w/(4\pi N_a R_g^3)$] at which polymers start overlapping (Kulkarni *et al.*, 2000). In our case, the second virial coefficient displays a monotonic decrease with the

increase in PEG concentration even above C_p^* (for example, PEG 20 000 where $C_p^* \simeq 2.5\%$).

The addition of PEG induces the crystallization of urate oxidase, in a restricted second virial coefficient range -0.4 to $+0.1 \times 10^{-4}$ mol ml g $^{-2}$, at the low end of the ‘crystallization slot’ of George & Wilson (1994), which corresponds to the range -8 to -1×10^{-4} mol ml g $^{-2}$. Such behaviour has already been observed with other large proteins (Ebel *et al.*, 1999; Hitscherich *et al.*, 2000; Petsev *et al.*, 2001). All these results tend to confirm the theoretical work of Haas & Drenth (1998), which is based on the assumption that the first step of the protein crystallization mechanism, *i.e.* nucleation, occurs *via* a liquid–liquid phase separation. Indeed, for a small protein (MW = 14 kDa) they predicted an A_2 crystallization range of -3.5 to -9.0×10^{-4} mol ml g $^{-2}$ and for a large protein (MW = 140 kDa), an A_2 crystallization range from -0.35 to -0.90×10^{-4} mol ml g $^{-2}$ (assuming that both proteins have the same partial excluded volume equal to 0.74 cm 3 g $^{-1}$). Consequently, the second virial coefficient should be even further into the low-end part of the ‘crystallization slot’ of George & Wilson when the biological macromolecule is larger.

6. Conclusions

The results presented in this paper have shown that small-angle X-ray scattering can be a useful tool to characterize and understand protein interactions in solution and the mechanism of crystallization. The determination of the second virial coefficient A_2 from the SAXS measurements on dilute urate oxidase solutions appears in general to be a non-destructive method of predicting crystallization conditions. Studies of large macromolecules have confirmed that the addition of monovalent salts alone is often unable to induce attraction and to lead to crystallization. On the other hand, the study of urate oxidase (128 kDa) has underlined the important crystallizing power of a broad range of PEGs for large proteins.

We have shown that urate oxidase crystallizes in a restricted range of A_2 at the low end of the ‘crystallization slot’ described by George & Wilson for reasonable protein concentrations. It seems that this result can be generalized to all large proteins.

We also correlated variations of the second virial coefficient in various PEG with nucleation rates and crystals shapes.

Our studies emphasized the advantage of SAXS compared with the more common light scattering. Indeed, it is possible to obtain not only the zero-angle scattered intensity leading to A_2 , but also the different underlying interaction potentials acting between the proteins in solution in various conditions by coupling SAXS experiments with numerical simulations in the whole s range. We have recently studied in the same way PEG–protein mixtures in crystallization conditions (Vivarès *et al.*, unpublished work). Work is in progress to characterize the influence of the protein size on the depletion attractive interaction induced by PEG addition. Such a study may enable us to obtain a general rule for protein crystallization with PEG.

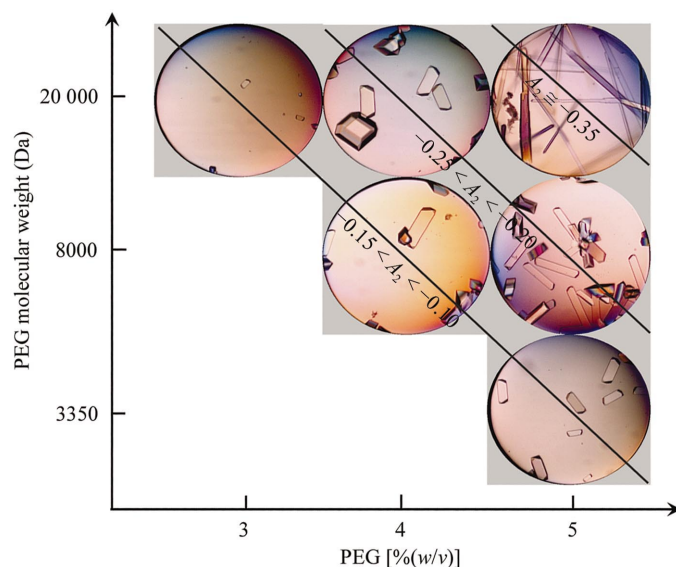


Figure 6

Crystals of urate oxidase (initial concentration 30 mg ml^{-1}) in 50 mM Tris pH 8.5 with various concentration of different PEGs. The diameter of each hole is $1300 \mu\text{m}$. Each diagonal line corresponds to a narrow domain of A_2 (expressed in $10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2}$) determined from Fig. 5.

We gratefully acknowledge M. El Hajji from Sanofi-Synthelabo (France) for generously providing us with urate oxidase and for his interest in this study. We thank A. Tardieu from LMCP-Paris and P. Vachette from LURE-Orsay for fruitful and critical discussions, and D. Myles from EMBL-Grenoble for re-reading the manuscript. We thank again P. Vachette and J. Perez from LURE-Orsay for their help during SAXS experiments on the instrument D24, and J. Perez for developing new programs for data treatment. The authors also gratefully acknowledge the financial support of CNES.

References

- Asakura, S. & Oosawa, F. (1954). *J. Chem. Phys.* **22**, 1255–1256.
- Atha, D. H. & Ingham, K. C. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 12108–12117.
- Bayol, A., Dupin, P., Boe, J. F., Claudy, P. & Létoffé, J. M. (1995). *Biophys. Chem.* **54**, 229–235.
- Belloni, L. (1991). *Interacting Monodisperse and Polydisperse Spheres*, edited by P. Lindner & T. Zemb, pp. 135–155. North Holland: Elsevier.
- Beynon, R. J. & Easterby, J. S. (1996). *Theory of Buffer Action*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Bonneté, F., Finet, S. & Tardieu, A. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 403–414.
- Bonneté, F., Vivarès, D., Robert, C. & Colloc'h, N. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 330–339.
- Boulin, C., Kempf, R., Koch, M. H. J. & McLaughlin, S. M. (1986). *Nucl. Instrum. Methods A*, **249**, 399–407.
- Boyer, M., Roy, M. O., Jullien, M., Bonneté, F. & Tardieu, A. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 185–192.
- Budayova, M., Bonneté, F., Tardieu, A. & Vachette, P. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 210–219.
- Carbonnaux, C., Riès-Kautt, M. & Ducruix, A. (1995). *Protein Sci.* **4**, 2123–2128.
- Cassely, M., Perez, J., Tardieu, A., Vachette, P., Witz, J. & Delacroix, H. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1799–1812.
- Colloc'h, N., El Hajji, M., Bachet, B., L'Hermite, G., Schiltz, M., Prangé, T., Castro, B. & Mornon, J. P. (1997). *Nature Struct. Biol.* **4**, 947–952.
- Depaetex, C., Desvignes, C., Feder, P., Lemonnier, M., Bosshard, R., Leboucher, P., Dageaux, D., Benoit, J. P. & Vachette, P. (1987). *LURE: Rapport d'Activité pour la Période Août 1985–1987*. LURE, Orsay, France.
- Derjaguin, B. V. & Landau, L. (1941). *Acta Physicochim. (USSR)*, **14**, 633.
- Devanand, K. & Selser, J. C. (1991). *Macromolecules*, **24**, 5943–5947.
- Dubuisson, J. M., Decamps, T. & Vachette, P. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 49–54.
- Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M. & Tardieu, A. (1996). *J. Cryst. Growth*, **168**, 28–39.
- Ebel, C., Faou, P. & Zaccari, G. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 395–402.
- Finet, S. (1999). *Interactions entre Protéines en Solution: Étude par diffusion des Rayons X aux Petits Angles du Lysozyme et des Protéines du Cristallin; Application à la Cristallisation*. Université Paris 6, Paris, France.
- Finet, S. & Tardieu, A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 40–49.
- George, A. & Wilson, W. W. (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 361–365.
- Guo, B., Kao, S., McDonald, H., Asanov, A., Combs, L. L. & Wilson, W. W. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 424–433.
- Haas, C. & Drenth, J. (1998). *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4226–4232.
- Haas, C., Drenth, J. & Wilson, W. W. (1999). *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2808–2811.
- Hempstead, P. D., Yewdall, S. J., Fernie, A. R., Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Rice, D. W., Ford, G. C. & Harrison, P. M. (1997). *J. Mol. Biol.* **268**, 424–448.
- Hitscherich, C. J., Kaplan, J., Allaman, M., Wiencek, J. & Loll, P. J. (2000). *Protein Sci.* **9**, 1559–1566.
- Hofmeister, F. (1888). *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **24**, 247–260.
- Kulkarni, A. M., Chatterjee, A. P., Schweizer, K. S. & Zukoski, C. F. (2000). *J. Chem. Phys.* **113**, 9863–9873.
- Lafont, S., Veisler, S., Astier, J. P. & Boistelle, R. (1997). *J. Cryst. Growth*, **173**, 132–140.
- Lekkerkerker, H. N. W. (1997). *Physica A*, **244**, 227–237.
- Mahadevan, H. & Hall, C. K. (1990). *AIChE J.* **36**, 1517–1528.
- Malfois, M., Bonneté, F., Belloni, L. & Tardieu, A. (1996). *J. Chem. Phys.* **105**, 3290–3300.
- Muschol, M. & Rosenberger, F. (1995). *J. Chem. Phys.* **103**, 10424–10432.
- Ng, J. D., Lorber, B., Witz, J., Théobald-Dietrich, A., Kern, D. & Giegé, R. (1996). *J. Cryst. Growth*, **168**, 50–62.
- Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S. T., Tsekova, D., Nanev, C., Wilson, W. W. & Vekilov, P. G. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 21–29.
- Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S.-T. & Vekilov, P. G. (2000). *Biophys. J.* **78**, 2060–2069.
- Petsev, D. N. & Vekilov, P. G. (2000). *Phys. Rev. Lett.* **84**, 1339–1342.
- Piazza, R. & Pierno, M. (2000). *J. Phys. Condens. Matter*, **12**, A443–A449.
- Riès-Kautt, M. & Ducruix, A. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 745–748.
- Tardieu, A., Le Verge, A., Riès-Kautt, M., Malfois, M., Bonneté, F., Finet, S. & Belloni, L. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 193–203.
- Veisler, S., Lafont, S., Marcq, S., Astier, J. P. & Boistelle, R. (1996). *J. Cryst. Growth*, **168**, 124–129.
- Velev, O. D., Kaler, E. W. & Lenhoff, A. M. (1998). *Biophys. J.* **75**, 2682–2697.
- Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. (1948). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Amsterdam: Dover.
- Vliegthart, G. A. & Lekkerkerker, H. N. W. (2000). *J. Chem. Phys.* **112**, 5364–5369.
- Vrij, A. (1976). *Pure Appl. Chem.* **48**, 471.

Catching the PEG-induced attractive interaction between proteins

D. Vivarès^{1,a}, L. Belloni², A. Tardieu¹, and F. Bonneté^{3,b}

¹ LMCP- UMR7590, case 115, 4 place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05, France

² CEA-Saclay, Service de Chimie Moléculaire, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

³ CRMC2^c-CNRS, Campus de Luminy, case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France

Received 29 April 2002 /

Published online: 29 October 2002 – © EDP Sciences / Società Italiana di Fisica / Springer-Verlag 2002

Abstract. We present the experimental and theoretical background of a method to characterize the protein-protein attractive potential induced by one of the mostly used crystallizing agents in the protein-field, the poly(ethylene glycol) (PEG). This attractive interaction is commonly called, in colloid physics, the depletion interaction. Small-Angle X-ray Scattering experiments and numerical treatments based on liquid-state theories were performed on urate oxidase-PEG mixtures with two different PEGs (3350 Da and 8000 Da). A “two-component” approach was used in which the polymer-polymer, the protein-polymer and the protein-protein pair potentials were determined. The resulting effective protein-protein potential was characterized. This potential is the sum of the free-polymer protein-protein potential and of the PEG-induced depletion potential. The depletion potential was found to be hardly dependent upon the protein concentration but strongly function of the polymer size and concentration. Our results were also compared with two models, which give an analytic expression for the depletion potential.

PACS. 87.15.Nn Properties of solutions; aggregation and crystallization of macromolecules – 87.15.Aa Theory and modeling; computer simulation – 83.85.Hf X-ray and neutron scattering

1 Introduction

Non-adsorbing polymers added to a colloidal suspension induce an attractive interaction between colloidal particles called the depletion interaction. A theoretical model known as the Asakura-Oosawa (AO) model, in which polymers (radius of gyration R_g) are allowed to interpenetrate, colloids (radius R) are considered as hard-spheres particles and colloids and polymers are mutually impenetrable, was first proposed by Asakura and Oosawa [1], and Vrij [2]. In the AO model, the centres of the polymer molecules are therefore excluded from a region of thickness R_g around each colloidal particle. This region is called the depletion zone. When two colloid particles get sufficiently close, their depletion zones overlap and the polymer molecules are excluded from the region between colloidal particles. The resulting unbalanced osmotic pressure gives rise to the attractive depletion interaction between the colloidal

particles, which depends upon the polymer size and concentration. Gast *et al.* [3] and Lekkerkerker *et al.* [4] extended the AO model to predict the phase diagram of polymer-colloid mixtures.

In the case of protein-polymer mixtures, it has been shown experimentally with several proteins that the commonly used polyethylene glycol (PEG) induces attractive “depletion” interactions between proteins, which may lead to protein crystallization, the essential step in the 3D protein structure determination by X-ray crystallography [5–10]. Mahadevan and Hall, by using the AO model, were the first to predict the general trends of the protein solubility with PEG when $R/R_g > 1$ [11]. However, the AO model is known to fail when $R/R_g < 1$. Recently, by using a new theoretical model when $R/R_g < 1$ — the thermal Polymer Reference Interaction Site Model (PRISM)— Kulkarni *et al.* predicted the global variations of lysozyme and bovine serum albumin second virial coefficients as a function of PEG mass and concentration [7, 12, 13].

In the present work, we studied the depletion potential between biological macromolecules induced by PEG in crystallization conditions. The protein used for this study was urate oxidase from *Aspergillus flavus*, a large homotrimeric globular protein of 128 kDa molecular weight. In

^a Present address: CRMC2-CNRS, Campus de Luminy, case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France; e-mail: vivares@crmc2.univ-mrs.fr

^b e-mail: bonnete@crmc2.univ-mrs.fr

^c Laboratory associated to Universities Aix-Marseille II and III.

a recent work, we showed the correlation between attractive interactions induced by the addition of PEG, characterized by a negative second virial coefficient, and crystallization of urate oxidase [9,14]. Here we present Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) studies coupled to a theoretical treatment in order to characterize the effective depletion interaction as a function of size and concentration of PEG. In some respects, the present work can be compared to recently published Small-Angle Neutron Scattering (SANS) studies by Ye *et al.* [15] in the case of colloid-polymer mixtures and Tuinier *et al.* [16,17] in the case of protein-polysaccharide mixtures. We studied two different PEGs (PEG 3350 Da and PEG 8000 Da) until their overlap concentrations C^* . Protein concentrations were kept sufficiently low to avoid any liquid-liquid or liquid-solid phase separation in the protein-polymer mixture but were sufficiently high to see the PEG effect on the scattering curves. The mixture of slightly charged proteins and neutral polymer was studied by comparing SAXS experiments with theoretical results from the two-component approach based on the binary Ornstein-Zernike and hypernetted chain (HNC) equations. The two-component treatment, where polymer-polymer, protein-polymer and protein-protein pair interactions are considered, is more advanced than the one-component approach where only the interaction potentials between macromolecules which interact through solvent and ions are explicitly considered [6,18]. The direct polymer-polymer, protein-polymer and protein-protein interactions, and the effective protein-protein depletion interactions were determined. The polymer molecules were considered as “soft colloids” in the mixture [19–21]. Such a view significantly simplifies the description of the binary mixture: the polymer-polymer interaction is characterized by a continuous potential between the two centres-of-mass (CM) of the polymer molecules, and the polymer-protein interaction is characterized by a continuous potential between the polymer CM and the protein surface.

The present semi-empirical study appears to be a new way to get an insight into the polymer-protein interactions and to determine accurately the effective polymer-induced depletion potentials. The resulting depletion potentials obtained were finally compared to the analytic depletion potentials given by the two models previously cited (AO and PRISM).

2 Theory

2.1 Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

The total intensity $I(s)$, scattered by a polydisperse solution of spherical particles at a scattering angle 2θ , can be expressed as a function of the modulus of the scattering vector s , $s = 2\lambda^{-1} \sin \theta$, and of the particles concentration c_i by [22]

$$I(s) = \sum_i \sum_j \sqrt{c_i c_j} \sqrt{I_i^0(s) I_j^0(s)} S_{ij}(s). \quad (1)$$

$I^0(s)$, the intensity scattered by one particle and usually called the particle form factor, is the Fourier transform of the spherically averaged auto-correlation function of the electron density contrast associated with the particle.

$S_{ij}(s)$ is the partial structure factor, which takes into account spatial correlations and therefore interactions between particles.

Consequently, in our binary mixture of urate oxidase (UOX) and polyethylene glycol (PEG), the total scattered intensity can be written as

$$\begin{aligned} I(s) &= c_{\text{UOX}} I_{\text{UOX}}^0(s) S_{\text{UOX-UOX}}(s) \\ &\quad + 2\sqrt{c_{\text{UOX}} c_{\text{PEG}}} \sqrt{I_{\text{UOX}}^0(s) I_{\text{PEG}}^0(s)} S_{\text{PEG-UOX}}(s) \\ &\quad + c_{\text{PEG}} I_{\text{PEG}}^0(s) S_{\text{PEG-PEG}}(s) \\ &= I_{\text{UOX}}(s) + I_{\text{PEG-UOX}}(s) + I_{\text{PEG}}(s). \end{aligned} \quad (2)$$

This expression, and particularly the term $I_{\text{PEG}}(s) = c_{\text{PEG}} I_{\text{PEG}}^0(s) S_{\text{PEG-PEG}}(s)$, is not strictly valid because of possible overlapping between molecules of polymer at high polymer concentrations. However, it constitutes a reasonable approximation since, in all our experiments the concentrations of PEG 3350 Da and PEG 8000 Da are below their respective overlap concentration.

It is important to notice that in our PEG-protein mixture, partial intensities $I_{\text{PEG}}(s)$ and $I_{\text{PEG-UOX}}(s)$ are not negligible in front of the protein partial intensity $I_{\text{UOX}}(s)$ (see Sects. 4.1 and 4.2 for details). We have therefore taken into account the three partial intensities in the total X-ray scattered intensity $I(s)$.

2.2 Numerical treatment and fitting strategy: the “two-component” model

In a binary mixture, partial structure factors $S_{ij}(s)$ are related to the Fourier transform of the partial pair distribution function $g_{ij}(r)$ [23]:

$$S_{ij}(s) = \delta_{ij} + \sqrt{c_i c_j} \int \left(g_{ij}(r) - 1 \right) \exp(2i\pi \vec{s} \cdot \vec{r}) d\vec{r}, \quad (3)$$

where $i, j = 1, 2$, δ_{ij} is the Kronecker symbol ($\delta_{ij} = 0$ when $i \neq j$ and $\delta_{ij} = 1$ when $i = j$) and r the interparticle distance.

In order to determine the pair distribution function in a homogeneous fluid, one usually uses the exact Ornstein-Zernike equation which links the total $h_{ij}(r) = g_{ij}(r) - 1$ and the direct correlation $c_{ij}(r)$ functions:

$$h_{ij}(r) = c_{ij}(r) + \sum_k c_k \int h_{ik}(r') \cdot c_{kj}(|\vec{r} - \vec{r}'|) \cdot d\vec{r}'. \quad (4)$$

An additional equation, generally called the closure equation, is necessary to calculate the pair distribution functions $g_{ij}(r)$ and therefore the partial structure factors $S_{ij}(s)$ from the direct pair intermolecular potentials

$U_{ij}(r)$. In the present work, we used the hypernetted chain (HNC) equation:

$$g_{ij}(r) = \exp \left(-U_{ij}(r)/k_B T + \gamma_{ij}(r) \right), \quad (5)$$

where $\gamma_{ij}(r) = h_{ij}(r) - c_{ij}(r)$.

The so-called “one-component” model is based on the same equations with $i = j = 1$.

No significant differences in all our numerical treatments were observed by using the other accurate integral equations, the Percus-Yevick (PY) or the Rogers-Young (RY) equations. On the other hand, the Mean Spherical Approximation (MSA) is not appropriate in our case since it is known to work only for very weak interactions ($U_{ij}(r) \ll k_B T$).

From a set of the three direct potentials, $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$, $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ and $U_{\text{UOX-UOX}}(r)$, partial structure factors can be determined with an iterative program using equations (3-5) [24, 25]. From equation (2) and the two form factors, $I_{\text{PEG}}^0(s)$ and $I_{\text{UOX}}^0(s)$, the theoretical total scattered intensity of the binary mixture, $I(s)$, can be calculated and then compared to the experimental one.

The form factors $I_{\text{PEG}}^0(s)$ and $I_{\text{UOX}}^0(s)$ were determined in pure polymer and protein solutions, respectively. The direct interaction pair potentials $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$ and $U_{\text{UOX-UOX}}(r)$ were considered identical in the protein-polymer mixture and in the respective protein-free and polymer-free solutions. These potentials were determined by fitting experimental scattered intensities in the two pure solutions using the one-component model based on the Ornstein-Zernike and HNC integral equations. In order to fit the total scattered intensity of the protein-polymer mixture, the direct protein-polymer potential $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ was considered as an adjustable potential.

Once there is agreement between experimental and theoretical total scattered intensities, one could access the protein-protein pair distribution function $g_{\text{UOX-UOX}}(r)$ and therefore the one-component effective potential $U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r)$ given by

$$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r) = -k_B T \ln g_{\text{UOX-UOX}}(r) + k_B T \gamma_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r). \quad (6)$$

$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r)$ is the potential, which should lead with the one-component model to the same protein-protein pair distribution function $g_{\text{UOX-UOX}}(r)$ as that found with the two-component model, for a given protein concentration [26].

In our case, the protein volume fraction is so low ($\Phi_{\text{UOX}} < 0.05$) that the effective protein-protein correlations can be neglected ($\gamma_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r) \cong 0$). $U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r)$ is therefore directly linked to the protein-protein pair distribution function:

$$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r) \cong -k_B T \ln g_{\text{UOX-UOX}}(r). \quad (7)$$

The attractive depletion potential is then simply equal to

$$U_{\text{depletion}}(r) = U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r) - U_{\text{UOX-UOX}}(r) \quad (8)$$

with: $U_{\text{depletion}}(r) = -k_B T c_{\text{PEG}} \int h_{\text{UOX-PEG}}(r') c_{\text{UOX-PEG}}(|\vec{r} - \vec{r}'|) d\vec{r}'$.

2.3 Form factors

The protein form factor $I_{\text{UOX}}^0(s)$ was determined from the more diluted solution of urate oxidase (*i.e.* $c_{\text{UOX}} = 4 \text{ mg cm}^{-3}$) in the 50 mM Tris buffer pH 8.5 without PEG.

The polymer form factor $I_{\text{PEG}}^0(s)$ was taken equal to the Debye form factor valid for a Gaussian coil [27]:

$$I_{\text{PEG}}^0(s) = I_{\text{PEG}}^0(0) \cdot \frac{2}{x^2} (e^{-x} - 1 + x) \quad (9)$$

with $x = 4\pi^2 s^2 R_g^2$, where R_g is the polymer radius of gyration. $I_{\text{PEG}}^0(0)$ is a function of $\Delta\rho_{\text{PEG}} = \rho_{\text{PEG}} - \rho_{\text{solvent}}$, the electron density contrast associated with the polymer. This Debye form factor has already been successfully used with PEG [28, 29].

2.4 Direct pair potentials

The direct protein-protein potential $U_{\text{UOX-UOX}}(r)$ was chosen equal to the so-called DLVO potential. The DLVO model has already been successfully applied to several proteic systems in the low-salt domain [18, 30–32]. The DLVO potential is the sum of three potentials: a hard-sphere potential, a Coulombic repulsion and a van der Waals attraction. The hard-sphere potential expresses the fact that proteins cannot interpenetrate, the repulsive Coulombic potential is due to the fact that each protein holds the same net charge and the van der Waals attractive potential is the resulting dispersion interaction between proteins. For the sake of simplicity, we chose a Yukawa shape for the Coulombic and the van der Waals potentials. A Yukawa-shape van der Waals potential was shown to be sufficient to describe the attractive protein-protein interaction in aqueous solutions [32].

The respective mathematical expression of the three potentials are the following:

– Hard-sphere potential:

$$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{HS}}(r) = +\infty \quad \text{for } r \leq \sigma, \\ = 0 \quad \text{for } r > \sigma, \text{ where } \sigma \text{ is the protein diameter.}$$

– Repulsive Coulombic potential:

$$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{coul}}(r) = Z^2 L_B / [\sigma(1 + 0.5\sigma/\lambda_D)^2] \\ \cdot (\sigma/r) \cdot \exp(-(r - \sigma)/\lambda_D) \quad \text{for } r > \sigma,$$

where Z is the effective protein charge, L_B is the Bjerrum length (equal to $e^2/(4\pi\epsilon_0\epsilon_s k_B T) = 7.31 \text{ \AA}$ at $T = 293.15 \text{ K}$ with $\epsilon_s = \epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 80$) and λ_D the Debye length ($\lambda_D (\text{\AA}) = 3/\sqrt{I}$ at 293.15 K, where I is the ionic strength expressed in mol/l). The potential is expressed in $k_B T$ units.

– van der Waals potential:

$$U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{vdW}}(r) = -J_{\text{vdW}} \cdot (\sigma/r) \cdot \exp(-(r-\sigma)/d) \quad \text{for } r > \sigma,$$

where J_{vdW} (in $k_B T$ units) and d (in Å) are, respectively, the depth and the range of the potential.

To describe the direct polymer-polymer potential $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$, we used an approach where the effective potential is finite for all distances between two PEG molecule CM. Molecules of polymer are therefore considered as “soft colloids” [19–21,33]. The mathematical form chosen for the polymer-polymer potential was a Gaussian form [19]:

$$U_{\text{PEG-PEG}}(r) = J_{\text{PEG}} \cdot \exp(-(r/R_{\text{PEG}})^2),$$

where J_{PEG} (in $k_B T$ units) and R_{PEG} (in Å) are the prefactor parameter and the range of the Gaussian potential, respectively.

For the direct protein-polymer potential $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$, we followed the same approach as for pure polymer solutions. The repulsive interaction was modelled by a soft colloidal potential between the polymer CM and the surface of the hard-sphere protein [19,34]. To our knowledge, no analytical expression based on physical arguments exists in the literature for the colloid-polymer potential. The mathematical form that we have chosen for the protein-polymer potential was a Yukawa form, which depends only upon two parameters:

$$U_{\text{PEG-UOX}}(r) = +\infty \quad \text{for } r \leq \sigma/2, \\ = J_{\text{PEG-UOX}} \cdot \frac{\sigma}{2r} \cdot \exp(-(r-\sigma/2)/d_{\text{PEG-UOX}}) \quad \text{for } r > \sigma/2,$$

where $J_{\text{PEG-UOX}}$ (in $k_B T$ units) and $d_{\text{PEG-UOX}}$ (in Å) are the intensity and the range of the potential, respectively.

When $J_{\text{PEG-UOX}} \rightarrow \infty$, the polymer-protein potential is identical to a hard-sphere potential:

$$U_{\text{PEG-UOX}}(r) = +\infty \quad \text{for } r \leq \sigma/2 + R_{\text{PEG}}^{\text{HS}}, \\ = 0 \quad \text{for } r > \sigma/2 + R_{\text{PEG}}^{\text{HS}},$$

where $R_{\text{PEG}}^{\text{HS}}$ (in Å) is the effective polymer hard-sphere radius towards the protein.

3 Experimental

Preparation of urate oxidase and PEG solutions and X-ray scattering experiments have already been described elsewhere [9]. All stock solutions of urate oxidase (60 mg cm^{-3}), PEG 3350 Da (40% expressed in weight per volume) and PEG 8000 Da (40%) were buffered at pH 8.5 with 50 mM Tris. The highest protein concentration studied in all experiments was 32 mg cm^{-3} since, above this concentration, liquid-liquid or liquid-solid phase separation can occur with the addition of PEG. All experiments were done at 20 °C.

X-ray scattering curves were scaled to the transmitted intensity and the buffer signal was subtracted.

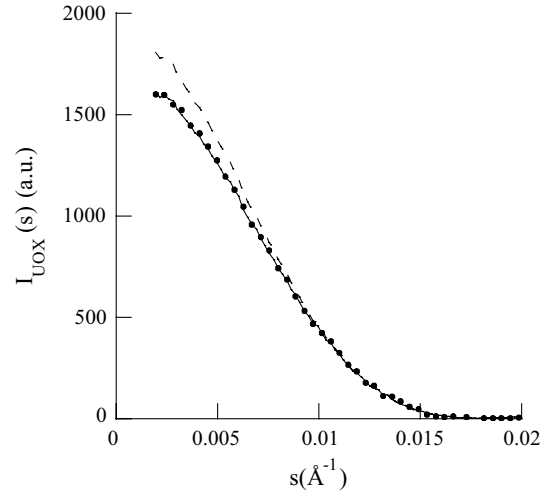


Fig. 1. Experimental (dots) and theoretical (solid line) X-ray scattering intensities of the urate oxydase solution in 50 mM Tris buffer pH 8.5 as a function of the scattering vector s . The theoretical scattered intensity of the ideal protein solution (dashed line), supposing that the form factor is recorded at 4 mg cm^{-3} , is also shown. The protein concentration in all the plots is 32 mg cm^{-3} . Note that in this figure and in all the other ones, only half of the total experimental data points are shown for the sake of clarity. All the following scattering curves are at the same relative scale.

4 Results

4.1 Scattering from pure proteins: determination of $U_{\text{UOX-UOX}}(r)$

In order to evaluate $U_{\text{UOX-UOX}}(r) = U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{HS}} + U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{coul}} + U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{vdW}}$, five parameters — $\sigma, Z, I, J_{\text{vdW}}$ and d_{vdW} — must be determined. The protein diameter σ was fixed to 70 Å in agreement with the crystallographic structure. J_{vdW} and d_{vdW} were fixed to, respectively 2.5 $k_B T$ and 3 Å, which are the expected values of the van der Waals component for a compact protein [32]. Some numerical treatments have already been done as a function of pH and with salt added [9]. For experiments at pH 8.5 in a 50 mM Tris buffer, *i.e.* with a ionic strength $I = 0.025$ M, the effective protein charge Z was found equal to -4 . This low value was expected since this pH is close to the isoelectric point ($pI \cong 7.7$). The experimental scattered intensity of urate oxidase at 32 mg cm^{-3} , $I_{\text{UOX}}(s)$, in 50 mM Tris buffer is plotted in Figure 1. The fit was done with all the parameters described above. We considered that the form factor $I_{\text{UOX}}^0(s)$ is equal to the normalized scattered intensity recorded at 4 mg cm^{-3} .

4.2 Scattering from pure polymers: determination of $I_{\text{PEG}}^0(s)$ and $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$

Different concentrations (w/v) of two PEGs were studied: 1%, 3% and 8% for PEG 3350 Da; 0.5%, 1%, 3% and 5% for PEG 8000 Da.

We first fitted the lowest concentration curves with $I_{\text{PEG}}(s) = c_{\text{PEG}} I_{\text{PEG}}^0(s)$ considering the polymer solution as ideal. $I_{\text{PEG}}^0(s)$ is given by the Debye expression (Eq. (9)) with $I_{\text{PEG}}^0(0)$ viewed as a multiplicative parameter (Fig. 2a and b). We can notice that the simple Debye form factor is sufficient to account for the experimental results. The best fits obtained on a wide s -range were with $R_g = 20$ Å and $R_g = 34$ Å for PEG 3350 Da (1%) and PEG 8000 Da (0.5% or 1%), respectively. These two values are in agreement with other studies [35–38]. According to the above measurements, we can notice that in the total X-ray scattered intensity (Eq. (2)), in the case of a mixture of urate oxidase (32 mg cm⁻³) and 1% PEG 8000 Da (1% PEG 3350 Da), the front factor of $S_{\text{PEG-PEG}}(s)$ is equal to approximately 1% (0.5%) of the front factor of $S_{\text{UOX-UOX}}(s)$ and the front factor of $S_{\text{PEG-UOX}}(s)$ represents about 20% (14%) of the front factor of $S_{\text{UOX-UOX}}(s)$ at low- s angles. Those percentages are even far more important for higher PEG concentrations and lower protein concentrations (data not shown). This shows that $I_{\text{PEG-UOX}}(s)$ and $I_{\text{PEG}}(s)$ cannot be neglected in the total X-ray scattered intensity since the uncertainties on the total scattered intensity by the protein-polymer mixture is less than 1% (evaluated from the number of counts and taking into account that the background has been subtracted).

For other PEG concentrations, curves were fitted by assuming that the scattered intensity could be written $I_{\text{PEG}}(s) = c_{\text{PEG}} I_{\text{PEG}}^0(s) S_{\text{PEG-PEG}}(s)$, and by adjusting the effective polymer-polymer Gaussian potential $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$ previously described. Bolhuis *et al.* have theoretically determined the effective soft polymer-polymer potential [19]. They found that, whatever is the polymer concentration, the prefactor of the effective soft polymer-polymer potential is about $2k_B T$. We decided to fix $J_{\text{PEG}} = 2k_B T$ and therefore the only remaining adjustable parameter was the range of the Gaussian potential R_{PEG} . For more concentrated PEG solutions (5% PEG 8000 Da and 8% PEG 3350 Da), it was necessary to modify the Debye form factor to correctly fit the experimental curves on a large s -range, probably because these two concentrations are close to the two PEGs overlap concentrations, $C_{\text{PEG8000}}^* \approx 5\%$ and $C_{\text{PEG3350}}^* \approx 10\%$ [38]. All best-fit parameters are reported in Table 1. We can notice that the range of the Gaussian potential R_{PEG} is equal or slightly superior to the polymer radius of gyration R_g and increases with the polymer concentration.

4.3 Scattering from protein-polymer mixtures: determination of $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$

Mixtures of urate oxidase with 3% and 8% PEG 3350 Da, and 1%, 3% and 5% PEG 8000 Da were investigated. Experimental intensities were fitted considering a soft contact between the polymer CM and the protein surface. The form factors and the direct protein-protein and polymer-polymer potentials determined previously were kept unchanged.

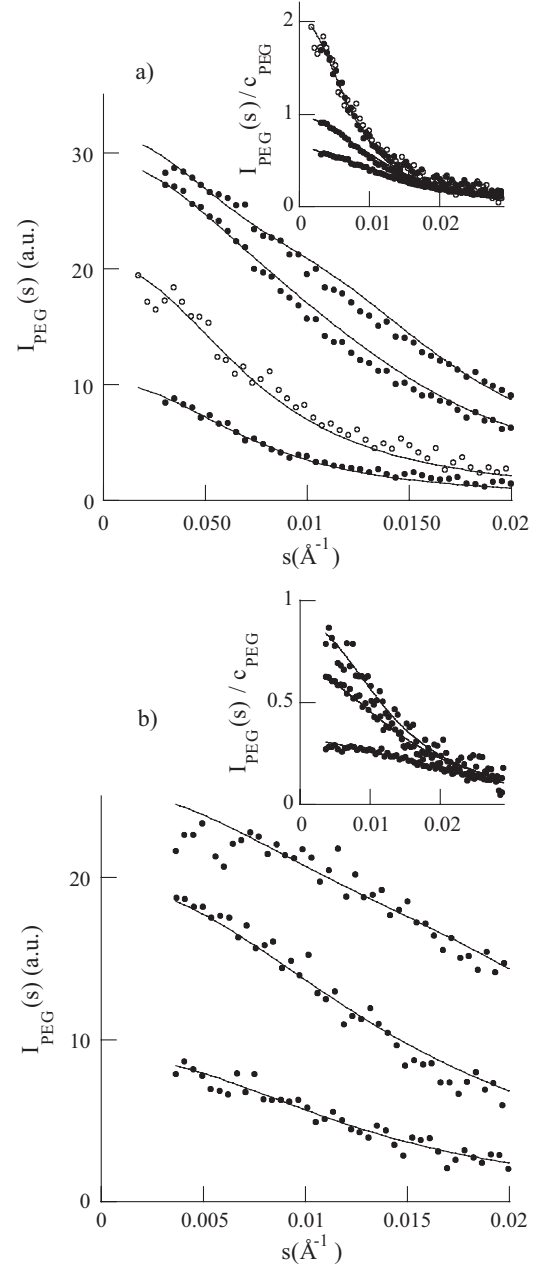


Fig. 2. Experimental (dots) and theoretical scattering intensities (solid lines) of different PEG solutions: a) PEG 8000 Da: 0.5%, 1%, 3% and 5% from bottom to top, respectively; b) PEG 3350 Da: 1%, 3% and 8% from bottom to top, respectively. Due to the weak PEG signal, the errors on the intensities vary from 10% to 20% depending on the polymer weight and concentration. In the insert, concentration-normalized intensities are shown. The best-fit parameters are given in table 1.

The two adjustable parameters are $J_{\text{PEG-UOX}}$ and $d_{\text{PEG-UOX}}$, respectively the strength and the range of the Yukawa potential. For each polymer, the best-fit parameters were determined from the “more attractive” conditions: UOX 32 mg cm⁻³, 5% PEG 8000 Da and UOX 32 mg cm⁻³, 8% PEG 3350 Da. We plotted in Figure 3, in the case of 5% PEG 8000 Da, the experimental and

Table 1. Fit parameters for the different free-protein PEG solutions.

PEG (Da)	% (w/v)	R_g (Å)	R_{PEG} (Å)
8000	0.5	34	—
	1	34	—
	3	34	37
	5	38	39
3350	1	20	—
	3	20	20
	8	22	23.5

theoretical normalized intensities $I(s)/I_0(s)$, where $I(s)$ and $I_0(s)$ are the scattering intensities in the protein-polymer mixture and in the free-polymer protein solution, respectively. We can observe that several ($J_{\text{PEG-UOX}}$; $d_{\text{PEG-UOX}}$) couples can lead to the same ratio $I(s)/I_0(s)$ at the origin but only one of these couples can account for the shape of the curve on the whole s -range. The differences observed depending upon the choice of the direct protein-polymer potential are weak but sufficient to determine the right ($J_{\text{PEG-UOX}}$; $d_{\text{PEG-UOX}}$) couple since the uncertainties on the experimental scattered intensities are inferior to 1%. We can notice that a hard-sphere contact (high $J_{\text{PEG-UOX}}$ values) or a too soft interaction (low $J_{\text{PEG-UOX}}$ values) between the protein and the polymer are not suitable. The best-fit parameters were found to be ($J_{\text{PEG-UOX}} = 3.05k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 20$ Å) for PEG 8000 Da and ($J_{\text{PEG-UOX}} = 3.85k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 10$ Å) for PEG 3350 Da. We have controlled that a change of ± 2.5 Å on $d_{\text{PEG-UOX}}$ and a corresponding change on $J_{\text{PEG-UOX}}$ do not alter significantly the whole of the following conclusions. We then successfully fitted, without changing the above parameters, the experimental scattered intensity for other PEG and/or protein concentrations (Fig. 4).

While the intensity $J_{\text{PEG-UOX}}$ of the repulsive polymer-protein potential is almost the same for the two PEGs, the corresponding range $d_{\text{PEG-UOX}}$ increases with the PEG size (Fig. 5a). By plotting this direct polymer-protein potential against r/R_g , we can notice that the shape of this potential does not almost depend upon the polymer mass (Fig. 5b).

The polymer-protein potential is not infinite at the protein surface, which suggests that from our calculations the polymer CM can enter into the protein core and that molecules of polymer can wrap around protein molecules. Such a view is not surprising since in our case the sizes of the polymer and the protein molecules are similar.

4.4 The resulting attractive depletion interaction

From numerical simulations done on the binary mixture, we got the effective potential $U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r)$ as previously described. The depth and the range of the effective potential increases with the addition of PEG (Fig. 6).

Since the protein-protein effective potential can simply be written as $U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r) = U_{\text{UOX-UOX}}(r) +$

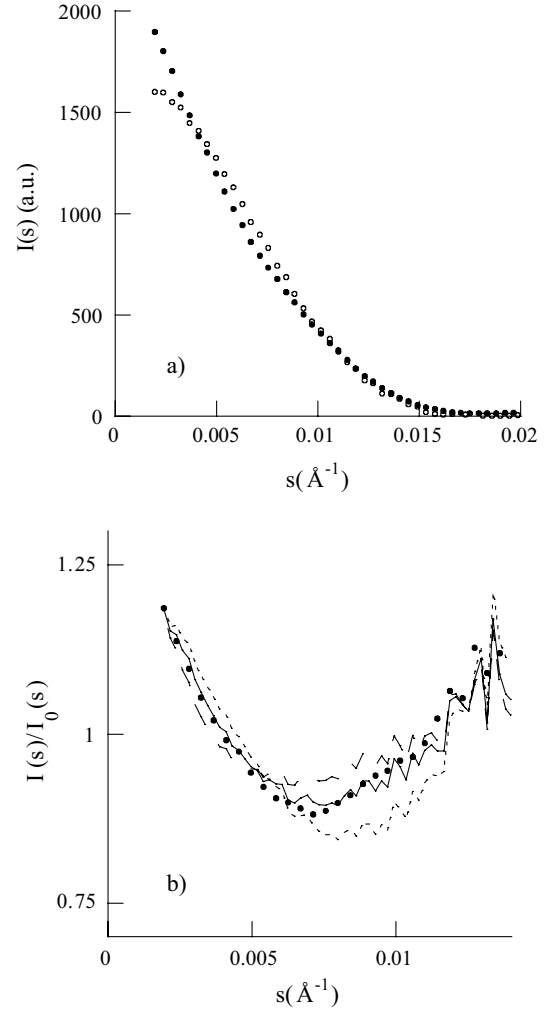


Fig. 3. Determination of the direct protein-polymer potential $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ in the case of 5% PEG 8000 Da with a concentration of urate oxydase of 32 mg cm^{-3} . a) Experimental X-ray scattering intensities in the free-polymer protein solution ($I_0(s)$, open dots) and in the protein-polymer mixture ($I(s)$, full dots); b) Experimental (dots) and theoretical normalized intensities $I(s)/I_0(s)$ with ($J_{\text{PEG-UOX}} = 1.085k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 40$ Å) (dashed line), with ($J_{\text{PEG-UOX}} = 3.05k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 20$ Å) (solid line) and with ($R_{\text{PEG}}^{\text{HS}} = 28$ Å) (dotted line).

$U_{\text{depletion}}(r)$, the depletion potential $U_{\text{depletion}}(r)$ was then obtained for the different PEG concentrations and sizes.

Whatever the polymer size, the depletion potential depth increases with the polymer concentration (Fig. 7a). However, as can be observed with PEG 8000 Da, the depletion depth does not increase linearly with the PEG concentration and seems to slightly saturate at high polymer concentration. This result is similar to another recent experimental work [15]. The depletion range is approximately equal for each polymer to $2R_g$, whatever the polymer concentration (Fig. 7b). Nevertheless, this range slightly reduces when the polymer concentration increases. Moreover, we found in our case that the depletion

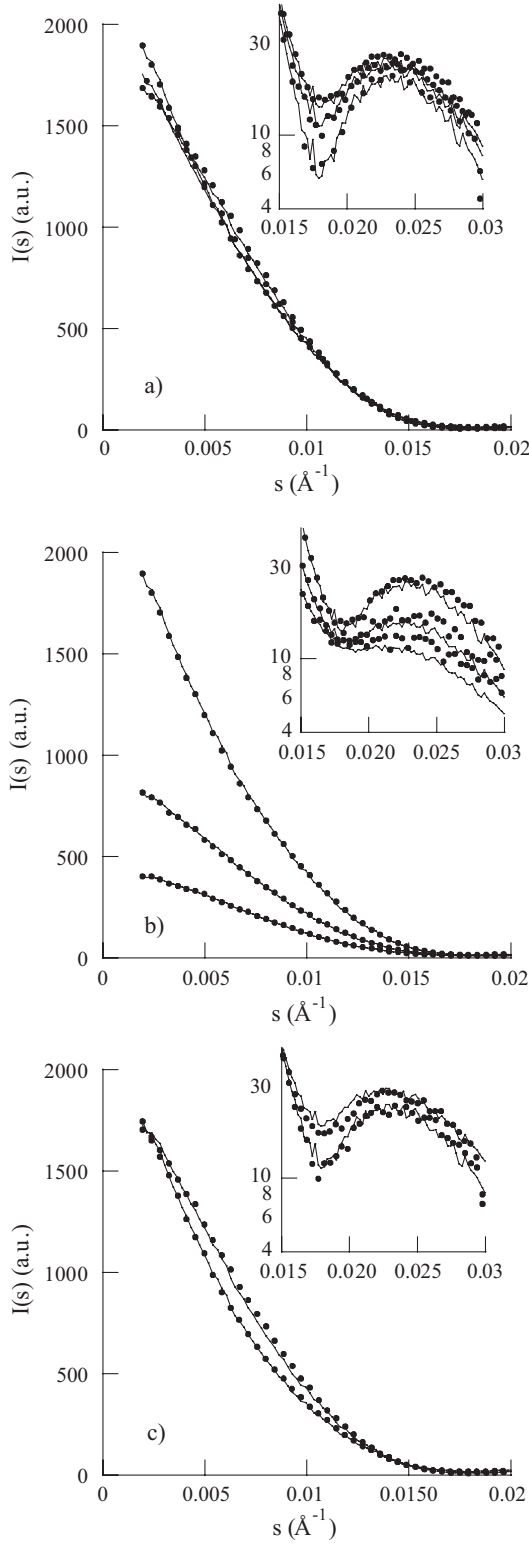


Fig. 4. Experimental (dots) and theoretical (solid line) X-ray scattering intensities of PEG-UOX mixtures. a) PEG 8000 Da 1%, 3% and 5%, from bottom to top, respectively, with a protein concentration of 32 mg cm^{-3} ; b) PEG 8000 Da 5% with various protein concentrations 8 mg cm^{-3} , 16 mg cm^{-3} and 32 mg cm^{-3} from bottom to top, respectively; c) PEG 3350 Da 3% and 8%, from bottom to top, respectively, with a protein concentration of 32 mg cm^{-3} . In the insert the logarithm of X-ray scattering intensities for high s values is shown.

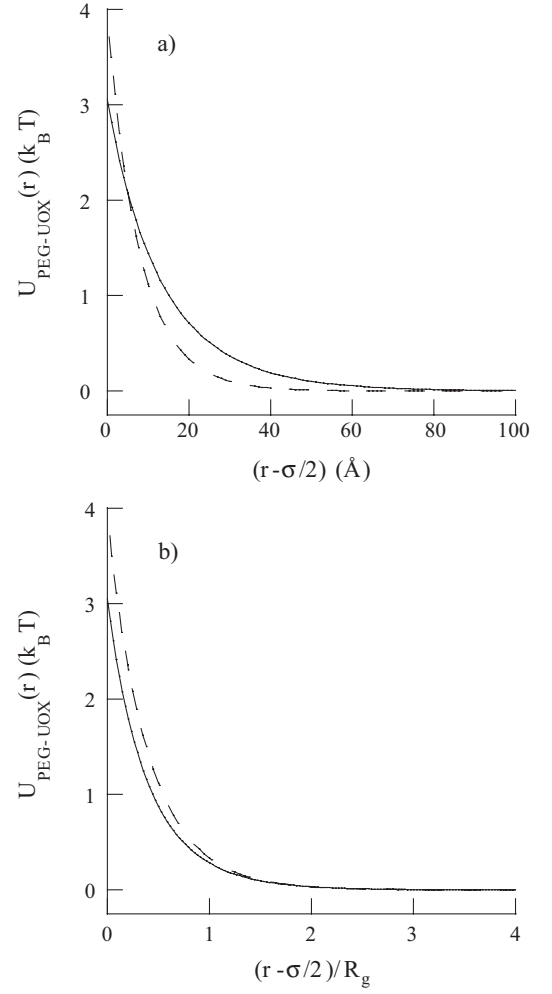


Fig. 5. Direct polymer-protein potential $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$, used to fit the experimental data, with PEG 8000 Da (solid line) and PEG 3350 Da (dashed line). a) Plotted as a function of $(r - \sigma/2)$; b) plotted as a function of $(r - \sigma/2)/R_g$.

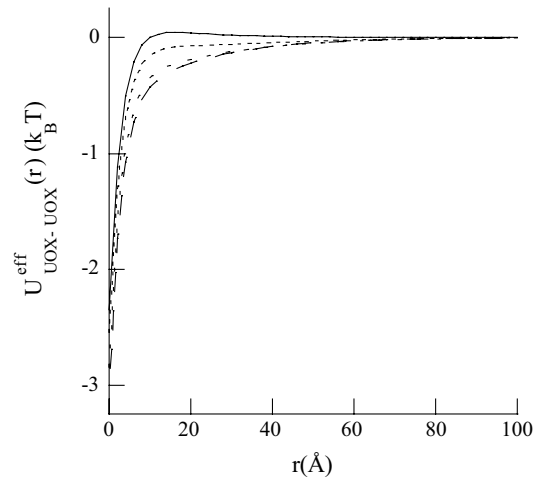


Fig. 6. Effective protein-protein potential $U_{\text{UOX-UOX}}^{\text{eff}}(r)$ in the case of PEG 8000 Da. The PEG concentrations are from top to bottom: 0% (free-polymer protein solutions), 1%, 3% and 5%.

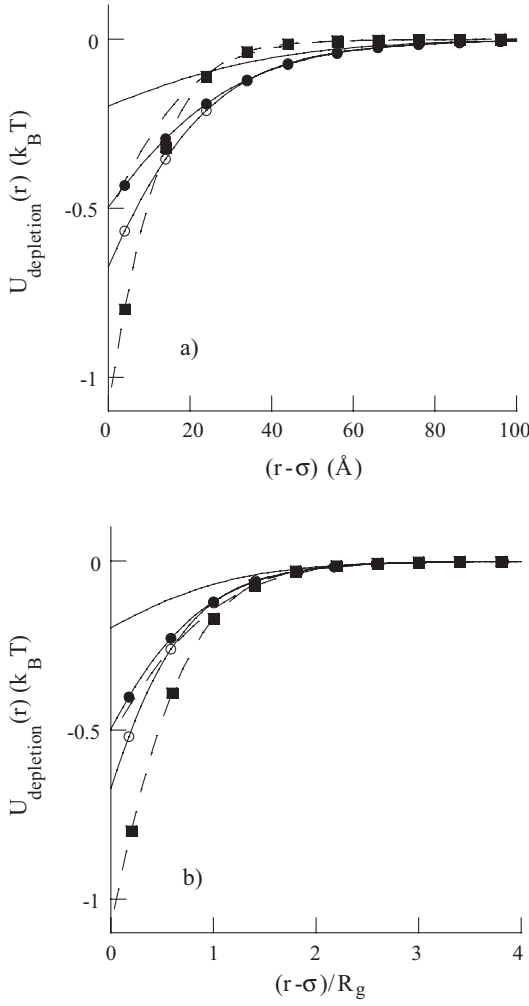


Fig. 7. Variations of the resulting depletion potential $U_{\text{depletion}}(r)$ with the PEG concentrations for PEG 8000 Da 1% (solid line), 3% (solid line and full circles), 5% (solid line and open circles) and PEG 3350 Da 3% (dashed line), 8% (dashed line and full squares). a) Plotted as a function of $(r-\sigma)$; b) plotted as a function of $(r-\sigma)/R_g$.

potential hardly depends upon the protein concentration (data not shown).

We have investigated the influence of the nature of the polymer-polymer interaction $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$ and the protein-polymer interaction $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ on the resulting depletion potential. This study was done in the case of 5% PEG 8000 Da, a condition in which the possible effects are more pronounced. For the polymer-polymer potential, when the polymer solution is considered as ideal ($U_{\text{PEG-PEG}}(r) = 0$), the experimental normalized intensities $I(s)/I_0(s)$ are not well fitted (Fig. 8a), which corresponds to an overestimation of the depletion interaction (Fig. 8b). The repulsive polymer-polymer potential cannot therefore be neglected in our numerical treatments. The nature of the direct protein-polymer potential is also important. We have already mentioned that a hard-sphere contact or a too soft interaction between the protein and the polymer are not suitable to fit the exper-

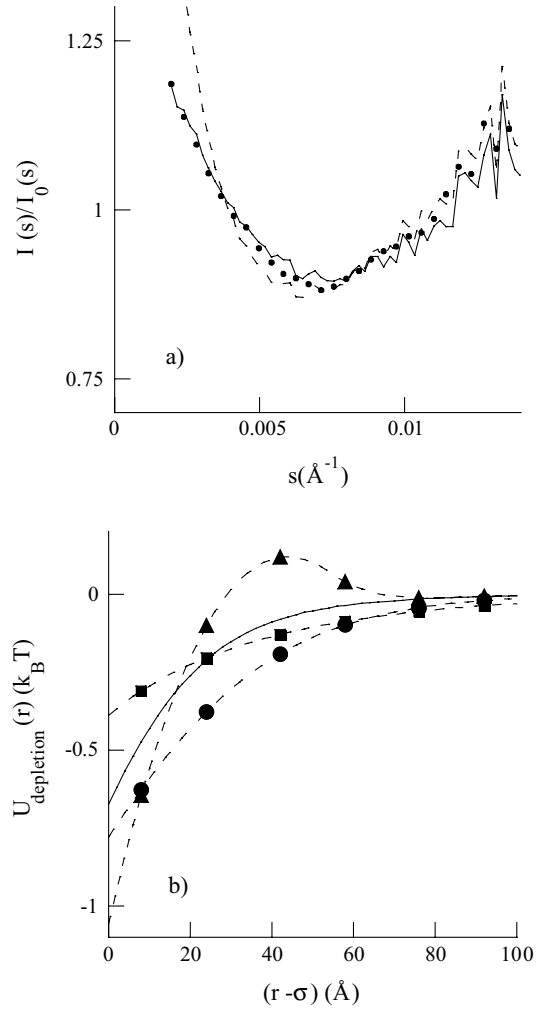


Fig. 8. Case of 5% PEG 8000 Da. a) Experimental (dots) and theoretical normalized intensities $I(s)/I_0(s)$ for ($J_{\text{PEG-UOX}} = 3.05k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 20 \text{ \AA}$) with $U_{\text{PEG-PEG}}(r) \neq 0$ (best fit, solid line) and with $U_{\text{PEG-PEG}}(r) = 0$ (dashed line). b) Influence of the choice of the polymer-polymer and protein-polymer on the resulting depletion interaction: best fit (solid line) and when $U_{\text{PEG-PEG}}(r) = 0$ (dashed line and full circles), when $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ is very soft ($J_{\text{PEG-UOX}} = 1.085k_B T$; $d_{\text{PEG-UOX}} = 40 \text{ \AA}$) (dashed line and full squares) and when $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ is a hard-sphere potential ($R_{\text{PEG}}^{\text{HS}} = 28 \text{ \AA}$) (dashed line and full triangles).

imental normalized intensity (Fig. 3b). We plotted in the Figure 8b the resulting depletion potential in both cases (hard-sphere contact and very soft interaction). If the polymer-protein interaction is modelled by a hard-sphere contact, the shape of the resulting depletion potential is sharply modified: its depth is higher, its range shorter and a small repulsive component appears at $r \approx R_g$. We find here the typical depletion potential shape for a hard-sphere binary mixture. Opposite deviations on the depletion range and depth are observed with a too soft protein-polymer potential. Consequently, the depletion potential shape is sharply dependent upon the nature of the polymer-protein potential.

5 Comparison with analytical models

We compared our results in the case of PEG 8000 Da with the Asakura-Oosawa (AO) model and with the thermal Polymer Reference Interaction Site Model (PRISM), which both give an analytical expression for the depletion potential and which have already been used in the case of polymer-protein mixtures.

The AO model considers the polymer solution as ideal and polymers as hard spheres towards proteins and predicts the following expression for the depletion potential [1,2]:

$$\begin{aligned}
 U(r)/k_B T &= +\infty & \text{for } 0 < r < \sigma = 2R, \\
 U(r)/k_B T &= -(4/3)\pi(R_{\text{pol}} + R)^3 N_a C_p \\
 &\quad \cdot \left[1 - \frac{3r}{4(R + R_{\text{pol}})} + \frac{r^3}{16(R + R_{\text{pol}})^3} \right] \\
 &\quad \text{for } \sigma \leq r \leq \sigma + 2R_{\text{pol}}, \\
 U(r)/k_B T &= 0 & \text{for } r > \sigma + 2R_{\text{pol}},
 \end{aligned}$$

where N_a is Avogadro's number and R_{pol} is generally approximated by the radius of gyration of the polymer.

The depletion potential predicted by the AO model is plotted in Figure 9a. R_{pol} was chosen equal to the best effective hard-sphere radius previously found: $R_{\text{pol}} = R_{\text{PEG}}^{\text{HS}} = 28 \text{ \AA}$. For all polymer concentrations, the AO model predicts a depletion range slightly shorter than that we found. For the lowest PEG concentration (1% PEG 8000 Da), the potential depth is similar to our calculations; however, the AO model overestimates the depth of the depletion potential for higher polymer concentrations. Discrepancies between the AO model and experimentally based results have already been observed in the case of colloid-polymer mixtures where the sizes of the polymer and the colloid molecules are comparable [15,39].

It is interesting to note that the two-component HNC calculation with the same hard-sphere contact between the protein and the polymer ($R_{\text{PEG}}^{\text{HS}} = 28 \text{ \AA}$) gives the same depletion potential than the AO model in the case of 1% PEG 8000 Da but not for higher polymer concentrations (Fig. 9b). We found here the now common failing of the AO model to account for the small repulsive component which occurs in binary hard-sphere mixtures for non-negligible polymer concentrations (see, for example, [40]).

We also compared our results with the more recent Polymer Reference Interaction Site Model, usually called PRISM [41,42], already used in the case of protein-polymer mixture [7,12,13]. The PRISM theory predicts the following analytic depletion potential:

$$\begin{aligned}
 U(r)/k_B T &= +\infty & \text{for } 0 < r < 2R, \\
 U(r)/k_B T &= -\ln \left(1 + \frac{\pi z}{3} \left(\frac{R}{r} \right) \left(\frac{R}{\sigma} \right) e^{-(r-2R)/\xi} \right) \\
 &\quad \text{for } r \geq 2R,
 \end{aligned}$$

where σ is the effective statistical segment length given by $\sigma = \sqrt{\frac{6}{N}} R_g$ when $C_{\text{polymer}} < C_{\text{polymer}}^*$, z is

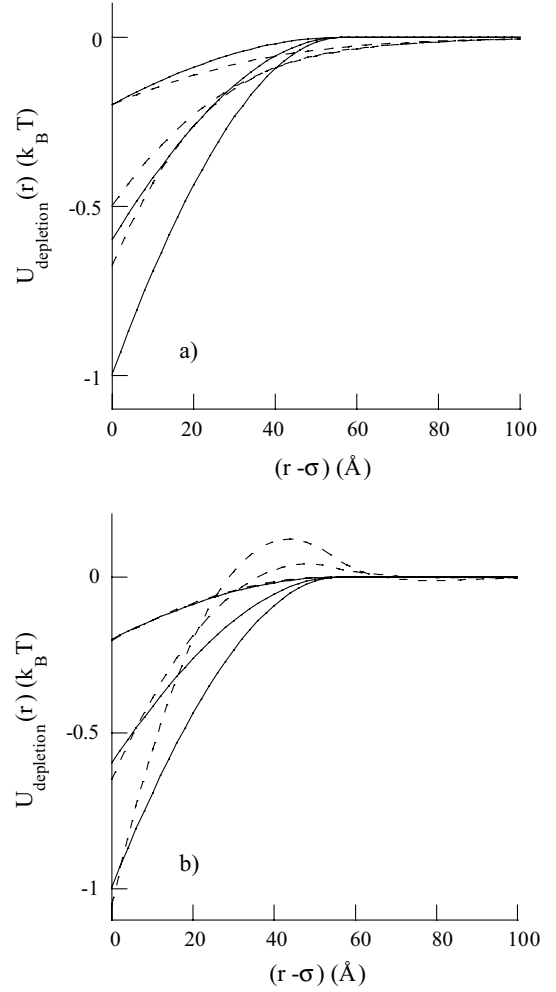


Fig. 9. Comparison with the AO model in the case of PEG 8000 Da 1%, 3% and 5% (from top to bottom). a) Comparison between the AO model (solid lines) and the present work (dashed lines); b) comparison between the AO model (solid lines) and the depletion potential calculated by the HNC numerical treatment when $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ is a hard-sphere potential ($R_{\text{PEG}}^{\text{HS}} = 28 \text{ \AA}$) (dashed lines).

the reduced polymer segment number density given by $z = N N_a C_p \sigma^3$ and ξ is the correlation length given by $\xi = \sigma \frac{1}{\sqrt{1-T/T_s}} \frac{1}{\sqrt{\frac{12}{N} + \frac{\pi z}{3}}}$.

T_s is the spinodal temperature for the polymer-solvent separation. As an approximation, T_s was considered equal to the lower critical solution temperature (LCST). The LCST, which corresponds to the minimal temperature at which PEG/water solutions separate in two liquid phases, has already been determined experimentally for various PEGs in low-salt water [7,43]. For PEG 8000 Da, this temperature is about 389 K. In addition T_s was supposed constant in all the PEG concentration range investigated. It is worth noting that in PRISM only the depletion range, and not the depletion depth, depends upon T_s .

We plotted the predicted depletion potential by PRISM for PEG 8000 Da considering the parameters described above (Fig. 10). We controlled that a variation of

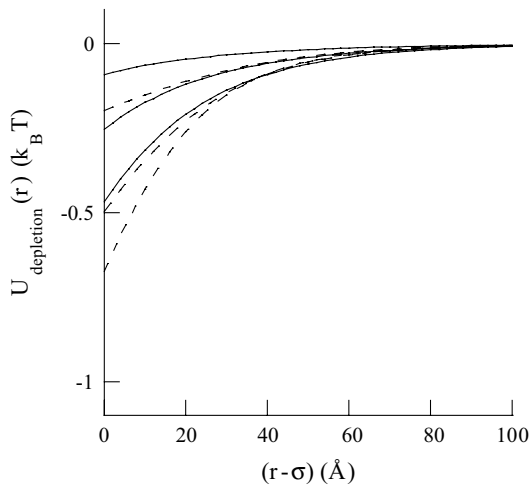


Fig. 10. Comparison between PRISM (solid lines) and the present work (dashed lines) in the case of PEG 8000 Da 1%, 3% and 5% (from top to bottom).

± 20 K on T_s does not significantly change the PRISM depletion potential whatever the polymer concentration. The values of the potential depth predicted by PRISM are slightly lower than those previously found. PRISM predicts a range which is very similar to our results.

6 Discussion and conclusion

In the present work, Small-Angle X-ray Scattering experiments were performed to study the depletion interaction between protein molecules induced by PEG. The protein used for this study was urate oxidase.

X-ray scattered intensities of polymer-free, protein-free and protein-polymer mixtures were measured in order to evaluate with the one-component and two-component models based on the Ornstein-Zernike and HNC integral equations, the respective underlying pair potentials $U_{\text{PEG-PEG}}(r)$, $U_{\text{PEG-UOX}}(r)$ and $U_{\text{UOX-UOX}}(r)$. In this theoretical treatment, molecules of polymer were considered as soft colloids. This approach presents the advantage of simplifying the description of polymer. It allowed us to get the resulting effective protein-protein potential in the mixture and therefore the depletion interaction.

Two different PEGs (PEG 3350 Da and PEG 8000 Da) were studied at various concentrations. The depletion potential shape was found identical whatever the polymer size studied: the potential depth increases with the polymer concentration and the potential range is approximately equal to $2R_g$ and tends to slightly reduce when the polymer concentration increases.

Few direct measurements of the depletion interaction induced by polymer addition in colloid-polymer mixtures have been performed. Recently, Yodh *et al.* directly determined by a new optical technique the interaction potential between two micron-sized silica spheres immersed in DNA solutions of different concentrations [44,45]. To our knowledge, no similar work has been done on a protein-polymer mixture. In that case, our indirect semi-empirical

determination of the PEG-induced depletion potential in protein solution appears to be a new way to get some information about the direct protein-polymer potential and the depletion potential at least for low polymer concentrations. Our results were compared with two models already used in the protein field which give an analytic expression for the depletion potential: the AO model and the more recent PRISM model. Both models predict depletion potentials whose general shape is in agreement with our work. However, the AO model shows slight discrepancies with our work although the polymer concentrations are below the polymer overlap concentration. Moreover, in order to calculate the depletion potential with the AO model, the effective hard-sphere polymer radius towards the protein $R_{\text{PEG}}^{\text{HS}}$ has to be previously determined. This radius is usually different from the polymer radius of gyration especially in the protein field where the polymer and the protein size are similar. Moreover, $R_{\text{PEG}}^{\text{HS}}$ depends upon the protein. PRISM presents the advantage of not being dependent upon the protein. Furthermore, this recent model gives results which are close to ours even if the depletion depths predicted are lower than that we found. Consequently, PRISM seems to be a more efficient model than the AO model to predict analytically the depletion potential.

The present study brings us more information about the effect of PEG on protein crystallization. Indeed, in the previous paper [9] we have shown that urate oxidase crystallises with the addition of PEG (3350 Da or 8000 Da) in conditions similar to those investigated here. We demonstrated that the depletion depth is quite weak while its range is large in comparison with the van der Waals potential range. One can therefore reasonably think that PEG promotes protein crystallization by inducing a medium-range attractive potential between macromolecules, in addition with the short-range van der Waals potential. That result contrasts with that obtained with small proteins like lysozyme where crystallization is induced by a short-range attraction [18]. Consequently, the potential range of the attractive interaction needed for protein crystallization seems to be all the more longer as the protein is larger. Since the potential range sharply varies with the polymer size and also with the polymer concentration, by choosing the right polymer concentration and size, we can greatly modify the phase diagram and so better control the protein crystallization [46,47].

References

1. S. Asakura, F. Oosawa, J. Chem. Phys. **22**, 1255 (1954).
2. A. Vrij, Pure Appl. Chem. **48**, 471 (1976).
3. A.P. Gast, C.K. Hall, W.B. Russel, J. Colloid Interface Sci. **96**, 251 (1983).
4. H.N.W. Lekkerkerker, W.C.K. Poon, P.N. Pusey, A. Stroobants, P.B. Warren, Europhys. Lett. **20**, 559 (1992).
5. M. Budayova, F. Bonneté, A. Tardieu, P. Vachette, J. Cryst. Growth **196**, 210 (1999).
6. S. Finet, A. Tardieu, J. Cryst. Growth **232**, 40 (2001).

7. A.M. Kulkarni, A.P. Chatterjee, K.S. Schweizer, C.F. Zukoski, *J. Chem. Phys.* **113**, 9863 (2000).
8. C.J. Hitscherich, J. Kaplan, M. Allaman, J. Wiencek, P.J. Loll, *Protein Sci.* **9**, 1559 (2000).
9. D. Vivares, F. Bonneté, *Acta Crystallogr., Sect. D* **58**, 472 (2002).
10. M. Casselyn, J. Perez, A. Tardieu, P. Vachette, J. Witz, H. Delacroix, *Acta Crystallogr., Sect. D* **57**, 1799 (2001).
11. H. Mahadevan, C.K. Hall, *AIChE J.* **36**, 1517 (1990).
12. A.M. Kulkarni, A.P. Chatterjee, K.S. Schweizer, C.F. Zukoski, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 4554 (1999).
13. A. Kulkarni, C.F. Zukoski, *J. Cryst. Growth* **232**, 156 (2001).
14. F. Bonneté, D. Vivarès, C. Robert, N. Colloc'h, *J. Cryst. Growth* **232**, 330 (2001).
15. X. Ye, T. Narayanan, P. Tong, J.S. Huang, M.Y. Lin, B.L. Carvalho, L.J. Fetters, *Phys. Rev. E* **54**, 6500 (1996).
16. R. Tuinier, E. ten Grotenhuis, C. Holt, P.A. Timmins, C.G. de Kruif, *Phys. Rev. E* **60**, 848 (1999).
17. R. Tuinier, J.K.G. Dhont, C.G. de Kruif, *Langmuir* **16**, 1497 (2000).
18. A. Tardieu, A. Le Verge, M. Riès-Kautt, M. Malfois, F. Bonneté, S. Finet, L. Belloni, *J. Cryst. Growth* **196**, 193 (1999).
19. P.G. Bolhuis, A.A. Louis, J.P. Hansen, E.J. Meijer, *J. Chem. Phys.* **114**, 4296 (2001).
20. A.A. Louis, P.G. Bolhuis, J.P. Hansen, E.J. Meijer, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 2522 (2000).
21. C.N. Likos, *Phys. Rep.* **348**, 267 (2001).
22. A. Guinier, G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-rays* (Wiley, New York, 1955).
23. L. Belloni, *Interacting Monodisperse and Polydisperse Spheres* (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1991).
24. L. Belloni, *J. Chem. Phys.* **99**, 43 (1985).
25. L. Belloni, *J. Chem. Phys.* **88**, 5143 (1988).
26. L. Belloni, *J. Phys. Condens. Matter* **12**, R549 (2000).
27. P. Debye, *J. Chem. Phys.* **14**, 636 (1946).
28. N.L. Abbott, D. Blankschtein, T.A. Hatton, *Macromolecules* **25**, 3932 (1992).
29. C. Branca, A. Faraone, S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo, A. Triolo, R. Triolo, V. Villari, *J. Appl. Crystallogr.* **33**, 709 (2000).
30. M. Muschol, F. Rosenberger, *J. Chem. Phys.* **103**, 10424 (1995).
31. O.D. Velez, E.W. Kaler, A.M. Lenhoff, *Biophys. J.* **75**, 2682 (1998).
32. M. Malfois, F. Bonneté, L. Belloni, A. Tardieu, *J. Chem. Phys. B* **105**, 3290 (1996).
33. A.A. Louis, P.G. Bolhuis, J.P. Hansen, *Phys. Rev. E* **62**, 7961 (2000).
34. P.G. Bolhuis, A.A. Louis, *Macromolecules* **35**, 1860 (2002).
35. N.L. Abbott, D. Blankschtein, T.A. Hatton, *Macromolecules* **25**, 3917 (1992).
36. K. Devanand, J.C. Selser, *Macromolecules* **24**, 5943 (1991).
37. S. Kawaguchi, G. Imai, J. Suzuki, A. Miyahara, T. Kitano, K. Ito, *Polymer* **38**, 2885 (1996).
38. B. Vincent, P.F. Luckham, F.A. Waite, *J. Colloid Interface Sci.* **73**, 508 (1980).
39. A. Weiss, K.D. Hörner, M. Ballauff, *J. Colloid Interface Sci.* **213**, 417 (1999).
40. R. Dickman, P. Attard, V. Simonian, *J. Chem. Phys.* **107**, 205 (1997).
41. A.P. Chatterjee, K.S. Schweizer, *J. Chem. Phys.* **109**, 10464 (1998).
42. A.P. Chatterjee, K.S. Schweizer, *Macromolecules* **32**, 923 (1999).
43. S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata, M. Kaneko, *Polymer* **17**, 685 (1976).
44. R. Verma, J.C. Crocker, T.C. Lubensky, A.G. Yodh, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4004 (1998).
45. R. Verma, J.C. Crocker, T.C. Lubensky, A.G. Yodh, *Macromolecules* **33**, 177 (2000).
46. S.M. Ilett, A. Orrock, W.C.K. Poon, P.N. Pusey, *Phys. Rev. E* **51**, 1344 (1995).
47. P.R. ten Wolde, D. Frenkel, *Science* **277**, 1975 (1997).

Interest of the normalized second virial coefficient and interaction potentials for crystallizing large macromolecules

F. Bonneté^{*1} and D. Vivarès

Laboratoire de Minéralogie Cristallographie (LMCP), UMR 7590, Case 115, 4 place Jussieu, F-75252 Paris cedex 05, France. E-mail: bonnete@crmc2.univ-mrs.fr

It has been shown for several years that the second virial coefficient, A_2 , can be helpfully used to describe the thermodynamic behavior of biological macromolecules in solution prior to crystallization. The coefficient, which reflects either repulsive or attractive interactions between particles, can allow a rapid determination of crystallization conditions. Different biological systems, from 14 kDa to 4600 kDa, were studied by small angle X-ray scattering. With large macromolecules, the A_2 values were found at the low end of the crystallization slot described by George & Wilson [(1994) *Acta Cryst.* D50, 361–365]. This led us to investigate the physical meaning of the second virial coefficient and to propose the use of the dimensionless second virial coefficient independent of the molecular weight and the size of the particle, which only takes into account the interaction potential between macromolecules, to predict successful crystallization conditions for large macromolecules. With this normalized coefficient (a_2), the effect of salt on small proteins becomes equivalent to the effect of PEG on large macromolecules in terms of interaction potentials.

Keywords: interaction potentials, second virial coefficient, protein crystallization

1. Introduction

For the last two decades, the understanding of protein crystallization has progressed thanks to a better knowledge of the thermodynamic properties of protein solutions (Arakawa & Timasheff, 1985; Boistelle & Astier, 1988). Changes in the immediate environment of proteins in solution (temperature, pressure, concentration of salts, organic solvents, neutral polymers) can modify their solubility by altering the interactions protein-solvent and protein-protein and thus lead to crystallization (Riès-Kautt & Ducruix, 1997; Veesler & Boistelle, 1999). Characterizing protein interactions to predict phase diagrams became therefore of fundamental interest in crystallogenesis, the aim of these studies being a better understanding of the laws which govern crystallization for the physico-chemists and more rationalized trials for getting crystals for crystallographers.

Proteins in solution are under control of weak interactions forces (Israelachvili, 1992), which are mainly excluded volume (or hard sphere) forces, coulombic electrostatic repulsions and van der Waals attractions. These three interactions, which depend on pH, temperature and solvent composition, are taken into account in what is called the DLVO model (Derjaguin & Landau, 1941; Verwey & Overbeek, 1948). The addition of crystallizing agents like salts (George & Wilson, 1994; Muschol & Rosenberger, 1995; Boyer *et al.*, 1996; Ducruix *et al.*, 1996) or PEG (Budayova *et al.*, 1999; Finet & Tardieu, 2001) can also induce other additional attractive

forces. The attractive interaction induced by the addition of polymer is the depletion attraction, which is function of the polymer mass and concentration (Lekkerkerker, 1997; Kulkarni *et al.*, 2000; Vliegthart & Lekkerkerker, 2000). Proteins in solution can also interact through other non-specific forces like hydration or hydrophobic forces, which are still poorly characterized.

The resultant of macromolecular interactions between particles in solution is generally characterized by scattering techniques *via* the osmotic second virial coefficient (A_2 or B_{22}). It was shown that crystallization occurs within a narrow range of slightly negative second virial coefficients from about -1.0 to $-8.0 \times 10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$, called the “crystallization slot” (George & Wilson, 1994). More recently, the correlation between solubility and second virial coefficient was shown (Bonneté *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Haas *et al.*, 1999). Consequently, the second virial coefficient turned out to be the suitable parameter to predict the crystallization of biological macromolecules.

In order to determine the crystallization conditions of *Aspergillus flavus* urate oxidase, interactions in solution were investigated by small angle X-ray scattering (SAXS), in different physicochemical conditions of pH, temperature, addition of salts and of PEG (Bonneté *et al.*, 2001; Vivarès & Bonneté, 2002). In parallel, crystallization trials were performed in conditions corresponding to negative values of the second virial coefficient. Crystals of urate oxidase were obtained with PEGs of different sizes and at various concentrations, for A_2 values in a restricted range (about -0.4×10^{-4} to $+0.1 \times 10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$) at the low end of the “crystallization slot”.

In the present work, we analyze the ranges of second virial coefficient values obtained for different biological systems of different molecular weight and size, studied in various physicochemical conditions (pH, salt and PEG), which led to crystallization: lysozyme (Bonneté *et al.*, 1999), gammaD crystallin (data kindly provided by S. Finet (1999)), urate oxidase (Vivarès & Bonneté, 2002), brome mosaic virus (Casselyn *et al.*, 2001) (Table 1). From data obtained for small proteins like lysozyme (14300 Da) or gammaD crystallin (20000 Da) and for large particles like urate oxidase (128000 Da) and BMV (4.6×10^6 Da), it turns out that all values of A_2 obtained for large macromolecules in crystallization conditions were found in a more restricted range close to zero. This led us to propose the use of a dimensionless second virial coefficient normalized to molecular weight and excluded volume of particles to predict and control the nucleation and crystal growth of large globular proteins.

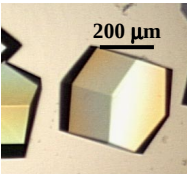
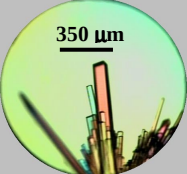
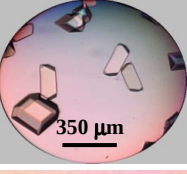
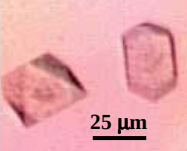
2. Experiments and methods

All these macromolecules were prepared and studied at the Laboratoire de Minéralogie Cristallographie (LMCP). All experimental conditions were already described elsewhere (Bonneté *et al.*, 1999; Finet, 1999; Casselyn *et al.*, 2001; Vivarès & Bonneté, 2002). Interactions between particles were characterized by small angle X-ray scattering using the instrument D24 on the ring DCI at L.U.R.E (Orsay-France). The advantage of SAXS compared to the more common light scattering was already emphasized in our previous study. Small angle X-ray scattering allows us to get, in only one experiment, the extrapolated zero-angle scattered intensity necessary for the determination of A_2 (the extrapolation being valid in the attractive regime (Bonneté *et al.*, 1997)) and the form factor of the protein solution giving informations about the presence or not of oligomers (Hamiaux *et al.*, 2000) or of aggregates. On the other hand, the coupling of SAXS experiments (experimental structure factor) with numerical simulations (calculated structure factor) (Tardieu *et al.*, 1999) allows us to determine the different underlying interaction potentials acting between proteins in solution in the

¹ Present address: CRMC2#-CNRS, campus de Luminy, case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France. # - Laboratory associated to the Universities Aix-Marseille II & III.

Table 1

Macromolecule parameters (M, molecular weight; σ , particle diameter; v_e , partial excluded volume), second virial coefficient A_2 , normalized second virial coefficient a_2 and crystallization conditions for our four model systems (error bars on A_2 values were chosen such as $MA_2 = \pm 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$).

Macromolecule : M/ σ / v_e	Crystallization condition	Corresponding A_2 ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}^{-2}$)	Corresponding a_2	Picture of crystals
Lysozyme (Bonneté <i>et al.</i> , 1999; Tardieu <i>et al.</i> , 1999) 14300 Da 32.4 Å 0.74 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	500 mM NaCl pH 4.5	- 3.3 (+/- 0.7)	- 6.4 (+/- 1.4)	
Gamma-D crystallin (Finet, 1999) 20000 Da 36 Å 0.74 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	500 mM NaCl pH 4.5	- 2.0 (+/- 0.5)	- 5.4 (+/- 1.4)	
Urate oxidase (Vivarès & Bonneté, 2002) 128000 Da 70 Å 0.84 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	4% PEG 20000 pH 8.5	- 0.26 (+/- 0.08)	- 4.0 (+/- 1.2)	
BMV (Casselyn <i>et al.</i> , 2001) 4.6 x 10 ⁶ Da 268 Å 1.32 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	6% PEG 8000 pH 5.0	+ 0.008 (+/- 0.002)	+ 2.8 (+/- 0.8)	

conditions studied. The intensity scattered by a solution of quasi-spherical particles is therefore the product of the form factor, $I(0,s)$, which depends on the particle geometry, and the structure factor, $S(c,s)$, which depend on the pair distribution function by:

$$S(c, s) = 1 + \rho \int 4\pi r^2 (g(r) - 1) \frac{\sin 2\pi rs}{2\pi rs} dr \quad (1)$$

where $\rho = cN_a/M$ is the number of particles per unit of volume and c is the particle concentration ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

The structure factor at the s-origin, $S(c,0)$, is related to the osmotic pressure Π of the particle solution (Guinier & Fournet, 1955) by:

$$S(c,0) = k_B T \left(\frac{\partial \Pi}{\partial \rho} \right)^{-1} \text{ or } S(c,0) = \frac{RT}{M} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)^{-1} \quad (2)$$

where k_B is Boltzmann's constant, T the absolute temperature and Π the osmotic pressure described by (Eisenberg, 1976):

$$\frac{\Pi}{\rho k_B T} = 1 + B_2 \rho + (\text{terms of order } \rho^2) \text{ or } \frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M} + A_2 c + (\text{terms of order } c^2) \quad (3)$$

A_2 or B_2 depends on the interaction pair potential $U(r)$ between particles in solution by the expression:

$$A_2 = \frac{B_2 N_a}{M^2} = \frac{2\pi N_a}{M^2} \int_0^\infty \left(1 - \exp \left(- \frac{U(r)}{k_B T} \right) \right) r^2 dr \quad (4)$$

with $U(r) = +\infty$ for $r < \sigma$

where r is the interparticle distance and σ the particle diameter.

A_2 or B_2 is positive for repulsive interactions and negative for attractive ones.

Since it is easier to measure particle concentrations than particle numbers, the experimental value of A_2 is generally obtained from the slope of the linear fit:

$$\frac{1}{S(c,0)} = 1 + 2.M.A_2.c \quad (5)$$

3. Results and discussion

Values of second virial coefficient A_2 have been measured by SAXS experiments, in pre-crystallizing conditions, for the four macromolecular model systems: lysozyme, gammaD crystallin, urate oxidase and Brome Mosaic Virus (BMV). Crystallization trials were performed in parallel. Interactions in solution and crystallization trials of lysozyme (Bonneté *et al.*, 1999) and gammaD crystallin (Finet, 1999) were investigated with addition of salt. Urate oxidase (Vivarès & Bonneté, 2002) and BMV (Casselyn *et al.*, 2001), which do not present attractive interactions and do not crystallize with only (monovalent) salt, were studied with addition of PEG. A_2 values (expressed in $\text{mol} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}^{-2}$) are plotted for each system as a function of salt or PEG concentrations in Fig. 1a. The zone where crystals were obtained for the different systems studied, is in grey squaring and some crystals are shown in Table 1.

The crystallization zone, $-6 < A_2$ ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ml} \cdot \text{g}^{-2}$) < 0 for the four model systems, corresponds approximately to the well-known "crystallization slot". However, one can notice that for large macromolecules - urate oxidase and BMV - the A_2 crystallization zone falls at the low-end of this slot. This was already observed with some other large macromolecules, halophilic malate dehydrogenase (Ebel *et al.*, 1999), OmpF porin (Hitscherich *et al.*, 2000) horse spleen apoferritin (Petsev *et al.*, 2000; Tanaka, 2002). It seems that such a restricted range of A_2 values for large macromolecules, which

gives rise to crystals, is in agreement with recent theoretical predictions (Haas & Drenth, 1998).

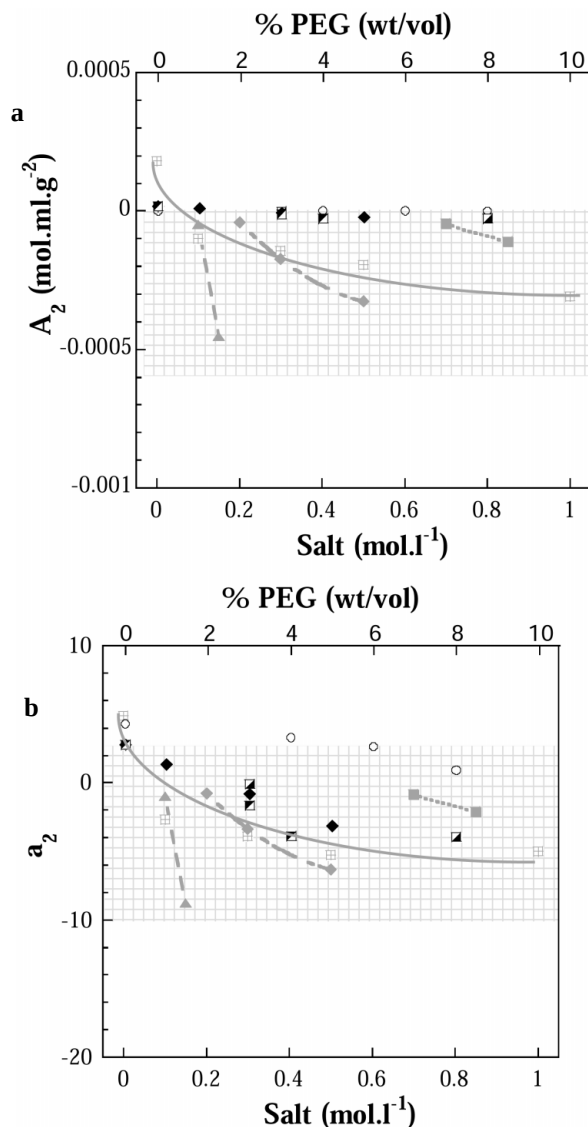


Figure 1

Second virial coefficients obtained from SAXS experiments for lysozyme (Bonneté *et al.*, 1999), gammaD crystallin (Finet, 1999), urate oxidase (Vivarès & Bonneté, 2002) and BMV (Casselyn *et al.*, 2001) and plotted in double x-axis. The different conditions are for each system: for lysozyme, at pH 4.5 NaNO₃ (—▲—), NaCl (—◆—), NaOAc (—■—); for gammaD crystallin at pH 4.5 NaCl (—□—); for urate oxidase at pH 8.5 PEG 3350 Da (—■—), PEG 8000 Da (—◆—), PEG 20000 Da (—■—); and for BMV at pH 5.0 PEG 8000 Da (○). a) Second virial coefficient A_2 in mol.ml.g⁻²; b) Dimensionless second virial coefficient a_2 . (There is no correspondance between % of PEG and molarity of salt).

Experimentally, according to Eq. 5, it is more convenient to measure A_2 in mol.ml.g⁻² but in that case, A_2 depends upon the radius and the mass of the particle (Eq. 4). In order to understand the origin of the different values of A_2 obtained with small and large macromolecules – difference predicted by Haas & Drenth (Haas & Drenth, 1998) – we considered the dimensionless second virial coefficient, which depends only upon the nature and the strength of the pair interaction potential between particles, already used by other

authors (Rosenbaum *et al.*, 1996; Petsev *et al.*, 2000; Petsev & Vekilov, 2000; Piazza & Pierno, 2000; Poon *et al.*, 2000; Vliegthart & Lekkerkerker, 2000). Generally, this dimensionless second virial coefficient is found equal to the parameter B_2 normalized either to the second virial coefficient due to the only

hard sphere pair potential $B_2^{HS} = \frac{2\pi\sigma^3}{3}$ (Rosenbaum *et al.*, 1996; Piazza & Pierno, 2000; Poon *et al.*, 2000) or to the spherical particle excluded volume $V_e = \frac{\pi\sigma^3}{6}$, where σ is the particle diameter (Petsev *et al.*, 2000; Vliegthart & Lekkerkerker, 2000).

Using the latter expression, this dimensionless second virial coefficient is defined by:

$$a_2 = \frac{12}{\sigma^3} \int_0^\infty \left(1 - \exp\left(-\frac{U(r)}{k_B T}\right) \right) r^2 dr \quad (6)$$

The excluded volume of the macromolecule (equal to $\frac{M.v_e}{N_a}$ with v_e

the partial excluded volume in cm³.g⁻¹ and not constant for all proteins), which is higher than the dry volume (Véretout *et al.*, 1989), allows to take into account the degree of compactness of the protein, due to the water content in the particle. It can be calculated from the ratio of v_e and $\bar{v}$, the partial specific volume generally found equal to 0.74 cm³.g⁻¹ for all proteins. For compact proteins, this ratio is equal to 1. The difference between the excluded volume of a macromolecule $V_e = \frac{M.v_e}{N_a}$ and the dry volume $\bar{V} = \frac{M.\bar{v}}{N_a}$ is

schematically illustrated in Fig. 2. The excluded volume is determined from the numerical simulations (Véretout *et al.*, 1989; Malfois *et al.*, 1996).

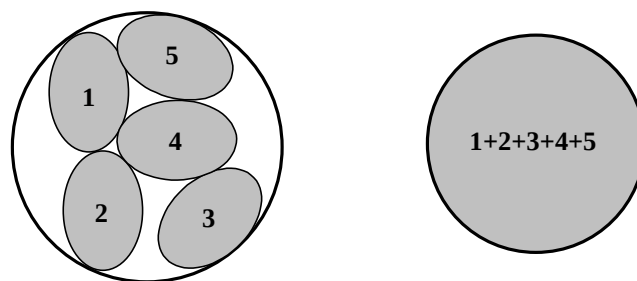


Figure 2

Illustration of the difference between the excluded volume V_e and the dry volume $\bar{V}$ supposing a quasi-spherical particle.

With this expression of a_2 , for adhesive hard sphere, the parameter is equal to $a_2^{HS} = 4$ and as soon as $a_2 < 4$ or negative, it indicates an attraction between particles which can lead to crystallization.

Using accurate values of partial excluded volume (Table 1), a_2 was calculated from the corresponding A_2 , $a_2 = \frac{M.A_2}{v_e}$, and plotted

as a function of salt for small proteins and of PEG percentages for large particles (Fig. 1b). Whereas the crystallization ranges for small and large particles, expressed in mol.ml.g⁻², appeared in different decades, the a_2 crystallization zone becomes now similar for particles of different sizes and approximately corresponds to $-10 < a_2 < 3$, in only one decade. In the high limit of this range, phase separation – liquid-liquid or precipitation – was observed for urate

oxidase for $a_2 < -6$ ($A_2 < -0.4 \times 10^{-4} \text{ mol.ml.g}^{-2}$) at concentration of protein of 20-25 mg.ml^{-1} .

One can then wonder, what the characteristics (depth and range) of the attractive pair potential are for two macromolecules with different sizes but with the same a_2 .

By coupling SAXS experiments and numerical simulations, we have calculated, as an example, the resulting pair potential in crystallizing conditions for a constant a_2 value of about -3.5 for lysozyme (Tardieu *et al.*, 1999) and urate oxidase (Vivarès *et al.*, submitted). The experimental conditions determined for this a_2 value from Fig. 1b, corresponds to 280 mM NaCl pH 4.5 for lysozyme and 5% PEG 8000 Da pH 8.5 for urate oxidase. The resulting pair potentials were plotted as a function of $(r - \sigma)$ (Fig. 3a) and of $(r - \sigma)/\sigma$ (Fig. 3b). Whatever the representation, the attractive potential depth is almost constant for both proteins, which is consistent with the fact that the interaction contact energy between two particles shows little variations from one macromolecule to another (Haas & Drenth, 1998) in crystallization conditions. In Fig. 3a, the potential range is shown to be longer for urate oxidase than for lysozyme when represented as a function of $(r - \sigma)$. On the other hand, by normalizing the potential range of particle interactions to the particle diameter, i.e. by plotting the potential as a function of $(r - \sigma)/\sigma$ (Fig. 3b), the ranges for the two proteins become approximately identical. In other words, the range of the attraction leading to crystallization depends on the particle diameter.

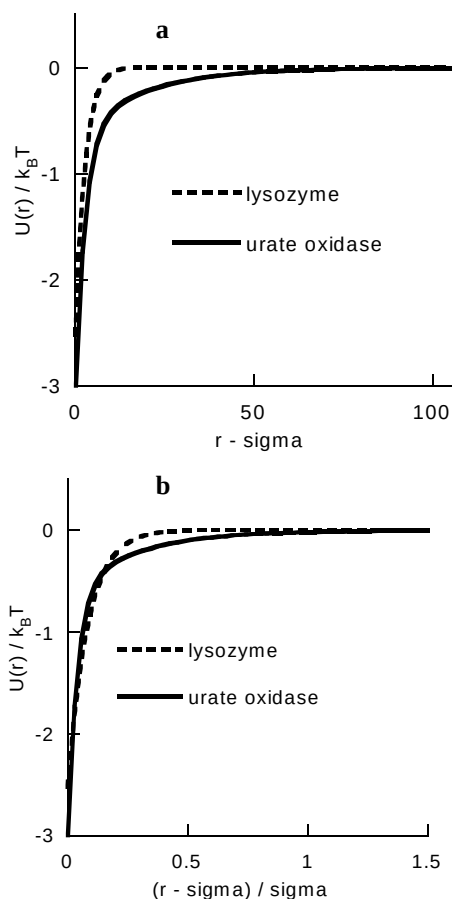


Figure 3

Resulting pair potentials in crystallizing conditions for a constant a_2 value ($a_2 \approx -3.5$) for lysozyme (with salt) and urate oxidase (with PEG): a) as a function of $r - \sigma$; b) as a function of $(r - \sigma)/\sigma$.

The examples of lysozyme and urate oxidase show that salts on small proteins and PEG on large proteins play quite equivalent roles.

Even if salts induce a small-range attractive potential, which seems not sufficient for large particles, and PEG a medium-range one, they both induce an attractive potential whose range is the same diameter fraction of the proteins considered. The importance of the interaction potential range, function of the particle diameter, on the phase diagram of colloidal particles has been previously shown in the literature (Hagen & Frenkel, 1994; Ilett *et al.*, 1995; Asherie *et al.*, 1996; Malfois *et al.*, 1996; ten Wolde & Frenkel, 1997; Rosenbaum *et al.*, 1999).

4. Conclusion

For some years, interactions of macromolecules in solution have been studied by small angle X-ray scattering in order to better understand and control crystallization and nucleation. Different biological objects presenting different characteristics (size, oligomeric state, pI) were intensively studied as a function of various physicochemical conditions (pH, temperature, ionic strength, nature of salt, addition of polymer of different sizes). For each system studied (lysozyme, gammaD crystallin, urate oxidase, brome mosaic virus) interactions were characterized, via the second virial coefficient, which helped us to determine crystallization conditions.

In this paper we have compiled A_2 data for the four macromolecular systems studied in the laboratory and compared to the well-known “crystallization” slot of George & Wilson (1994). For small macromolecules, the second virial coefficient was found to correspond to the slot. As soon as the macromolecule size increases, and as it was also observed with other large biological systems, the range of A_2 shifts in a restricted part at the low end of the “slot”. One could have thought that, with such low negative or even positive values at usual concentrations, large biological macromolecules would not crystallize. But by using a dimensionless second virial coefficient a_2 , which only takes into account the interaction potential between the biological macromolecules and not the particle size and molecular weight, one enlarges the slot for large particles while keeping that of small particles almost unchanged. Thus since the solubility and the second virial coefficient are well correlated, one can control the crystallization and the nucleation rate of macromolecules whatever their size. In terms of interaction potential, the efficiency of salt with small proteins was found comparable to that of polyethylene glycol with large ones to induce to crystallization.

Acknowledgements

We gratefully thank M. El Hajji from Sanofi-Synthelabo (France) for generously providing us with urate oxidase and for his interest in this study.

References

- Arakawa, T. & Timasheff, S. (1985). *Methods in Enzymology*. **114**, 49-77.
- Asherie, N., Lomakin, A. & Benedek, G. B. (1996). *Phys. Rev. Lett.* **77**, 4832-4835.
- Boistelle, R. & Astier, J. P. (1988). *J. Crystal Growth*. **90**, 14-30.
- Bonneté, F., Finet, S. & Tardieu, A. (1999). *J. Crystal Growth*. **196**, 403-414.
- Bonneté, F., Malfois, M., Finet, S., Tardieu, A., Lafont, S. & Veesler, S. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 438-447.
- Bonneté, F., Vivares, D., Robert, C. & Colloc'h, N. (2001). *J. Crystal Growth*. **232**, 330-339.
- Boyer, M., Roy, M. O. & Jullien, M. (1996). *J. Crystal Growth*. **167**, 212-220.
- Budayova, M., Bonneté, F., Tardieu, A. & Vachette, P. (1999). *J. Crystal Growth*. **196**, 210-219.
- Casselyn, M., Perez, J., Tardieu, A., Vachette, P., Witz, J. & Delacroix, H. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1799-1812.

- Derjaguin, B. V. & Landau, L. (1941). *Acta Physicochim. (USSR)*, **14**, 633.
- Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M. & Tardieu, A. (1996). *J. Crystal Growth*, **168**, 28-39.
- Ebel, C., Faou, P., Kernel, B. & Zaccai, G. (1999). *Biochemistry*, **38**, 9039-9047.
- Eisenberg, H. (1976). *Biological Macromolecules and Polyelectrolytes in solution*. Clarendon Press. Oxford.
- Finet, S. (1999). *Interactions entre protéines en solution : étude par diffusion des rayons X aux petits angles du lysozyme et des protéines du cristallin ; application à la cristallisation*. PhD thesis. Paris.
- Finet, S. & Tardieu, A. (2001). *J. Crystal Growth*, **232**, 40-49.
- George, A. & Wilson, W. W. (1994). *Acta Cryst. D***50**, 361-365..
- Guinier, A. & Fournet, G. (1955). *Small angle scattering of X-rays*. Wiley. New York.
- Guo, B., Kao, S., McDonald, H., Asanov, A., Combs, L. L. & Wilson, W. W. (1999). *J. Cryst. Growth*, **196**, 424-433.
- Haas, C. & Drenth, J. (1998). *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4226-4232.
- Haas, C., Drenth, J. & Wilson, W. W. (1999). *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2808-2811.
- Hagen, M. H. J. & Frenkel, D. (1994). *J. Chem. Phys.* **101**, 4093-4097.
- Hamiaux, C., Perez, J., Prangé, T., Veesler, S., Riès-Kautt, M. & Vachette, P. (2000). *J. Mol. Biol.* **297**, 697-712.
- Hitscherich, C. J., Kaplan, J., Allaman, M., Wiencek, J. & Loll, P. J. (2000). *Protein Sci.* **9**, 1559-1566.
- Ilett, S. M., Orrock, A., Poon, W. C. K. & Pusey, P. N. (1995). *Phys. Rev. E*, **51**, 1344-1352.
- Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press. New York.
- Kulkarni, A. M., Chatterjee, A. P., Schweizer, K. S. & Zukoski, C. F. (2000). *J. Chem. Phys.* **113**, 9863-9873.
- Lekkerkerker, H. N. W. (1997). *Physica A*, **244**, 227-237.
- Malfois, M., Bonneté, F., Belloni, L. & Tardieu, A. (1996). *J. Chem. Phys.* **105**, 3290-3300.
- Muschol, M. & Rosenberger, F. (1995). *J. Chem. Phys.* **103**, 10424-10432.
- Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S.-T. & Vekilov, P. G. (2000). *Biophys. J.* **78**, 2060-2069.
- Petsev, D. N. & Vekilov, P. G. (2000). *Phys. Rev. Lett.* **84**, 1339-1342.
- Piazza, R. & Pierno, M. (2000). *J. Phys.: Condens. Matter*, **12**, A443-A449.
- Poon, W., Egelhaaf, S., Beales, P., Salonen, A. & Sawyer, L. (2000). *J. Phys.: Condens. Matter*, **12**, L569-L574.
- Riès-Kautt, M. & Ducruix, A. (1997). *Methods in Enzymology*, **276**, 23-59.
- Rosenbaum, D., Zamora, P. C. & Zukoski, C. F. (1996). *Phys. Rev. Lett.* **76**, 150-153.
- Rosenbaum, D. F., Kulkarni, A., Ramakrishnan, S. & Zukoski, C. F. (1999). *J. Chem. Phys.* **111**, 9882-9890.
- Tanaka, S. (2002). Private communication.
- Tardieu, A., Le Verge, A., Riès-Kautt, M., Malfois, M., Bonneté, F., Finet, S. & Belloni, L. (1999). *J. Crystal Growth*, **196**, 193-203.
- ten Wolde, P. R. & Frenkel, D. (1997). *Science*, **277**, 1975-1978.
- Veesler, S. & Boistelle, R. (1999). *In Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach*. University Press. Oxford. 313-340.
- Veretout, F., Delaye, M. & Tardieu, A. (1989). *J. Mol. Biol.* **205**, 713-728.
- Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. (1948). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier. Amsterdam.
- Vivarès, D. & Bonneté, F. (2002). *Acta Cryst. D***58**, 472-479.
- Vliegthart, G. A. & Lekkerkerker, H. N. W. (2000). *J. Chem. Phys.* **112**, 5364-5369.

Résumé

INTERACTIONS EN SOLUTION ET CRISTALLISATION DE L'URATE OXYDASE

Les interactions en solution entre macromolécules jouent un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques et gouvernent aussi leur cristallisation. Nous avons étudié la corrélation entre la cristallisation et les interactions en solution pour l'Urate oxydase d'*Aspergillus flavus*. Les interactions, via le second coefficient du viriel, ont été déterminées par Diffusion des Rayons X aux Petits Angles (DXPA) et les potentiels d'interaction de paire à l'aide de traitements numériques. Nous avons montré que le PEG (polyéthylène glycol) induit des interactions attractives entre les molécules d'urate oxydase et favorise leur cristallisation. Les séparations de phase solide-liquide et liquide-liquide de cette protéine ont aussi été étudiées. Ces travaux nous ont permis de cristalliser des complexes d'Urate oxydase avec différents inhibiteurs. La structure de ces complexes nous a donné de nouvelles informations sur le mécanisme d'action de l'Urate oxydase qui est encore inconnu.

Mots clés : Diffusion des rayons X aux Petits Angles (DXPA), second coefficient du viriel, traitements numériques, potentiel d'interaction de paire, protéine, cristallisation, Urate oxydase, polyéthylène glycol (PEG).

Abstract

INTERACTIONS IN SOLUTION AND CRYSTALLIZATION OF URATE OXIDASE

Interactions in solution between macromolecules play a significant role in various biological events and also govern their crystallization. We have studied the correlation between crystallization and interactions in solution for Urate oxidase from *Aspergillus flavus*. Interactions, through the second virial coefficient, were determined by Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) and pair interaction potentials with numerical treatments. We have shown that PEG (polyethylene glycol) induces attractive interactions between molecules of Urate oxidase and favors protein crystallization. Solid-liquid and liquid-liquid phase separations of this protein were also studied. This work enabled us to crystallize Urate oxidase complexed with several inhibitors. The structure of these complexes gave us some new information about the Urate oxidase enzymatic mechanism which is still unknown.

Keywords : Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), second virial coefficient, numerical treatments, pair interaction potential, protein, crystallization, Urate oxidase, polyethylene glycol (PEG).