

## *Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

**CRMC-N**

**CRMC-N**

**Jean-Pierre Astier,  
Françoise Bonneté,  
Natalie Ferté,  
Stéphane Veesler**



1

## *Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

### **Une Question de Physicien: Pourquoi Etudier la Cristallisation des Protéines?**

**Pour Comprendre les Mécanismes de la Croissance Cristalline:  
Même Mécanismes pour Petites et Macro Molécules  
Bon Modèle pour les Physiciens**



**Application:  
Utilisation de cette Connaissance pour Concevoir des Expériences  
pour obtenir les Premiers Cristaux  
et Produire des Cristaux de Meilleurs Qualité  
Pour la résolution Structurale (Bio-cristallographie)**

**CRMC-N**

S. Veesler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

2

**CRMC-N**

## *Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

### *INTRODUCTION*

Depuis 1978, où la diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) a été utilisée, pour la première fois, pour étudier les premiers moments de la cristallisation des protéines, on utilise souvent l'anglicisme PRENUCLEATION pour décrire les premiers stades de la cristallisation [Kam Z., Shore H.B. and Feher G. (1978). "On the crystallization of proteins." J. Mol. Biol. 123: 539-555].

Les études des solutions de protéines par les techniques de diffusion des rayonnements (lumière, X et neutrons) couplées à des outils de simulation numérique, ont apporté une aide à la cristallisation et une compréhension du lien entre conditions de cristallisation et interactions.

Dans le but de rationaliser les essais de cristallisation on peut proposer des tests/diagnostics à partir de l'étude de l'états des molécules en solution et de leur interactions.

Dans la présentation suivante, je ferai quelques rappels sur la technique de diffusion de la lumière puis je présenterai quelques exemples.

3

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## *Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

### **Une Approche Physico-chimique:**

#### **Caractérisation des Macromolécules en Solution**

→ Diffusion de la Lumière – Statique et Dynamique

→ Diffusion des RX aux Petits Angles

#### **Besoin de Critères pour Choisir/Déterminer de Manière Rationnelle les Conditions de Cristallisation**

« Prédiction » du Diagramme de Phases

**Approche Complémentaire à la Cristallisation à Haut Débit (HTS)**

4

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Diagramme de Phases / Courbes de Solubilité

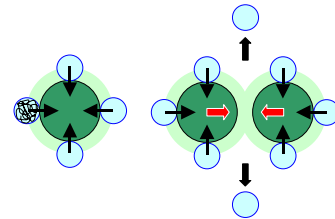
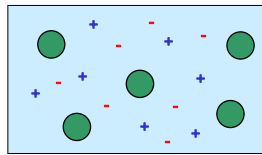
Macromolécule en solution, Detergent + Lipide

⊕

Température, pH, Force Ionique et Nature, [PEG],...

van der Waals, Coulombienne,  
et Hofmeister

Dépletion



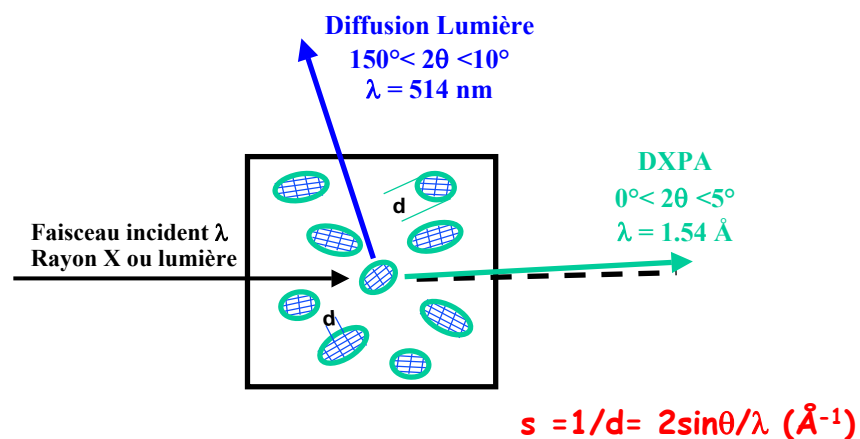
5

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Principes de la Diffusion des Rayonnements



Techniques Idéales pour Étudier les Solutions de  
 Macromolécules, Nanoparticules...

6

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Diffusion de la Lumière

### 1. Rappels Théoriques (de 1869 aux années 1980)

Interactions Photons-Matière: Ici Diffusion (Rayleigh ou Mie).  
Le Laser induit une polarisation de la molécule qui elle même ré-émet de la Lumière  
comme une source secondaire : c'est la **Diffusion de la Lumière**.

Variation de Fréquence ( $\Delta\nu$ ),  $I(\theta)$  et la Polarisation = f(Taille - Masse, Forme, Interactions)

Soit  $d \ll \lambda$  diffusion des petites particules assimilées à des points (isotropes)

Soit  $d \geq \lambda$  plus complexe, il faut tenir compte de la dépendance angulaire, des problèmes de polarisation et d'indice optique des particules.

CMC

Atelier de Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

7

CRMC-N

## Diffusion de la Lumière

### (1) Intensité Diffusée ( $I_d$ )

Théorie des fluctuations (Smoluchowski, Einstein) pour expliquer la valeur de l' $I_d$ : les Fluctuations Thermiques donnent des Fluctuations de Concentrations.

$I_d$  est reliée à ces Fluctuations... Compressibilité Isotherme ... Interactions.

Debye et Zimm de leur cotés s'intéressent à la dépendance angulaire de l' $I_d$ :  
cela donne la mesure de  $M_w$ ,  $R_g$ , Forme et  $A_2$ .

### (2) Fréquence de l' $I_d$ , variation temporelle

1964 Pecora montre que l'on peut mesurer  $D_T$  (et  $D_R$  dans certain cas) à partir de l'étude des Fréquences

Dans la cas (1) on s'intéresse aux valeurs de l' $I_d$  sans mesurer la  $\Delta\nu$  = Diffusion Statique de la Lumière (ou Élastique)

Dans la cas (2) on s'intéresse à  $\Delta\nu$  = Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

CMC

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

8

CRMC-N

## (1) Diffusion Statique de la Lumière (ou Élastique)

- $d < \lambda/10$  ( $\approx 50\text{nm}$ )

Particules isotropes assimilées à des diffuseurs ponctuels

Intensité diffusée indépendante de l'angle d'observation ( $\theta$ )

$$KC/\Delta I = 1/M_w + 2A_2C$$

$$\text{avec } K = K' (dn/dC)^2 I_{\text{ref}} 2\pi^2 / \lambda_0^4 n_0$$

On obtient  $M_w$  et  $A_2$  par la mesure  $I_{\text{solvant}}$ ,  $I_{\text{ref}}$  et  $I$  en Fonction de  $C$

$A_2$  est relié à la distribution spatiale des particules

$A_2 < 0$  Interactions Attractives,  
 $A_2 > 0$  Interactions repulsives,  
 $A_2 = 0$  Peu ou Pas d'Interaction.

« Wilson Slot »

9

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## (1) Diffusion Statique de la Lumière (ou Élastique)

- $d \geq \lambda/10$  ( $\approx 50\text{nm}$ )

Intensité diffusée dépend de l'angle d'observation ( $\theta$ )

Interférences (déphasage) entre les différentes parties d'une particule

Introduction du facteur de forme  $P(\theta)$ .

$$KC/\Delta I = 1/M_w (1 + q^2 R_g^2) + 2A_2C$$

On obtient  $M_w$ ,  $R_g$  et  $A_2$  par la mesure  $I_{\text{solvant}}$ ,  $I_{\text{ref}}$  et  $I$  en  $f(C, \theta)$  (Zimm Plot)

10

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

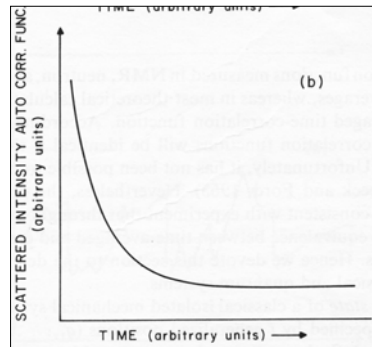
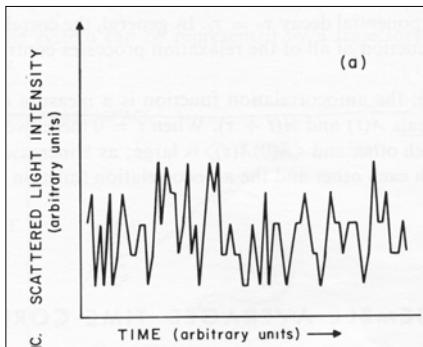
## (2) Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

Les macromolécules en solution sont en mouvement (translation, rotation et vibration) donc l'Intensité Diffusée va fluctuer au cours du temps.

Analyse des fluctuations = informations structurales et dynamiques

Ces fluctuations vont ressembler à du bruit.

Pour sortir le signal du bruit l'outil c'est la fonction de corrélation.



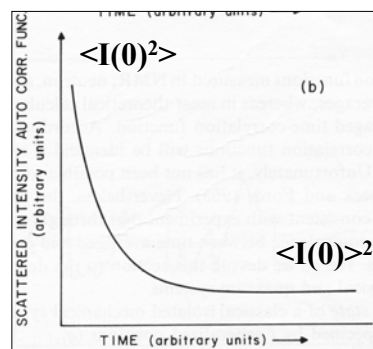
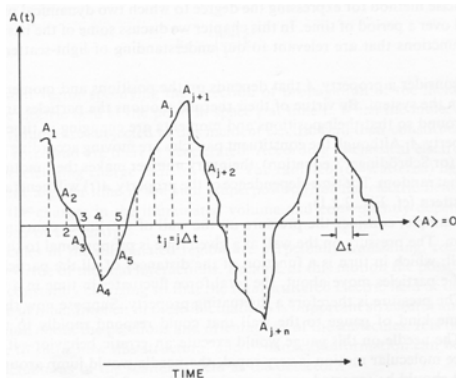
S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMS

CRMC-N

## (2) Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

Fonction d'autocorrélation  $G(\tau) = \langle I(0) \cdot I(\tau) \rangle$   
Décroît de  $\langle I(0)^2 \rangle$  à  $\langle I(0) \rangle^2$



S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

12

CRMS

CRMC-N

## (2) Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

Fonction d'autocorrélation  $G(\tau) = \langle I(0).I(\tau) \rangle$

Cas d'une Solution idéale\* monodisperse  $G(\tau) \approx \exp(-D_0 q^2 \tau)$   
 $\text{Ln}(G(\tau)) \approx B_0 - D_0 q^2 \tau$

et  $D_0 = k_B T / 6\pi\eta_0 R_h$

Cas d'une Solution idéale\* polydisperse  $G(\tau) \approx \Sigma \exp(-D_{i,0} q^2 \tau)$

\* Sans interaction

En général particules en interactions alors on mesure un  $D_{\text{eff}}$

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

13

CRMC-N

## (2) Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

On approche  $G(\tau) \approx \exp(-\langle D \rangle_z q^2 \tau)$

Et on développe  $\text{Ln}(G(\tau)) \approx B_0 - \langle D \rangle_z q^2 \tau + B_2 \tau^2 \dots$  (Cumulants)

$$\langle D \rangle_z = \frac{\sum N_i M_i^2 D_i}{\sum N_i M_i^2}$$

$B_2 =$  variance du  $\langle D \rangle_z$  ou facteur de qualité ou Polydispersité

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

14

CRMC-N

## (2) Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)

**Les Fluctuations d'Intensité Diffusée sont Reliées  
à la Diffusion des Macromolécules dans le Solvant**

$D_m, D_0, K_D, R_h$  et  $\nu$

$$D_m = D_0(1 + K_D C)$$

$K_D < 0$  Interactions Attractives,

$K_D > 0$  Interactions repulsives,

$K_D = 0$  Peu ou Pas d'Interaction.

$$D_0 = k_B T / 6\pi\eta_0 R_h$$

$\nu$  : Facteur de Qualité ou Polydispersité.

Rq: en Général  $D_m \neq D_0$  donc  $R_h \neq k_B T / 6\pi\eta_0 D_m$

CRMC-N

CRMC-N

## Techniques de Diffusion en Solution

|                          | <b>DEL</b><br>Lab.  | <b>DQEL</b><br>Lab.   | <b>DXPA</b><br>Lab. ou Synchrotron   |
|--------------------------|---|---|--|
| <b>Sans Interaction</b>  | $M_w$<br>$R_g (> \lambda/10)$   | $D_0, R_h, \nu\%$<br>$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_0}$   | $R_g, M_w$<br>$I(s) = I(0) \exp(-\frac{4\pi^2 s^2 R_g^2}{3})$  |
| <b>Avec Interactions</b> | $K \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 I_{ref} \frac{C}{\Delta l}$<br>$= \frac{1}{M_w} + A_2 C + \dots$<br>Coefficient du Viriel<br>$A_2$<br><br>$A_2 > 0$ : Repulsif<br>$A_2 < 0$ : Attractif | $D_m = D_0 (1 + k_D \cdot C)$<br><br>$k_D = k_H - k_S$<br>Statique ( $k_S$ )<br>+ Hydrodynamique ( $k_H$ )<br><br>$k_D > 0$ : Repulsif<br>$k_D < 0$ : Attractif | $I(c,s) = I(0,s) \neq S(c,s)$<br>Facteur de Structure $S(c,s)$<br>$\Downarrow$<br>Coefficient du Viriel ( $A_2$ )<br><br>$I(c,s) \nearrow$ quand $c \nearrow$ : Repulsive<br>$I(c,s) \searrow$ quand $c \searrow$ : Attractive |

CRMC-N

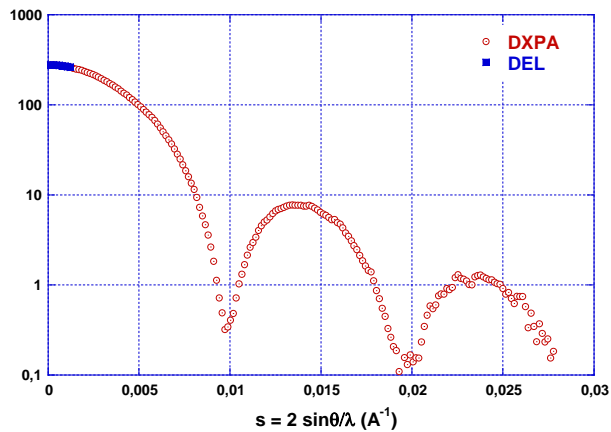
CRMC-N



## Techniques de Diffusion en Solution: DEL + DXPA

### Techniques Complémentaires

Intensité Diffusée (a.u.)



Apoferritin  
 $R_g = 55,8\text{\AA}$

17

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Montages Expérimentaux

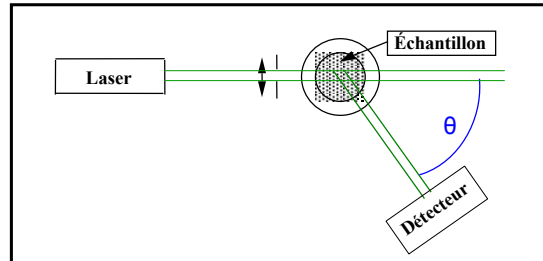
18

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Montage de Diffusion de la Lumière



$$q = 4\pi/\lambda \sin(\theta/2)$$
$$\lambda = 514,5 \text{ nm}$$

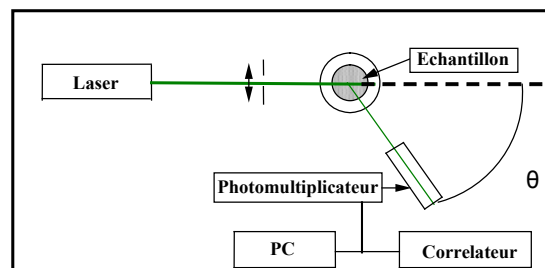
- (1) On s'intéresse aux valeurs de l' **Intensité Diffusée (moyenne)**  
sans mesurer la  $\Delta\nu =$  **Diffusion Statique de la Lumière (ou Élastique)**
- (2) On s'intéresse à  $\Delta\nu =$  **Diffusion Dynamique de la Lumière (ou Quasi-Élastique)**  
**Variation temporelle de  $I_d$**

19

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Diffusion de la Lumière



$$q = 4\pi/\lambda \sin(\theta/2)$$
$$\lambda = 514,5 \text{ nm}$$

20

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Appareillages de Diffusion de la Lumière



21

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

CRMC-N

## Appareillage de Diffusion de la Lumière



**Banc de Mesure en Diffusion de la  
Lumière**

**Système d'Acquisition des  
Données**

22

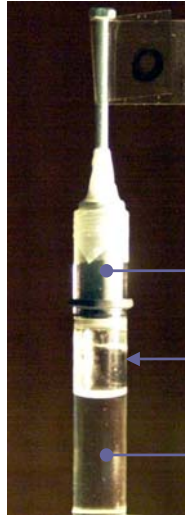
S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

CRMC-N

## Cellule de Diffusion de la Lumière

Cellule de  
Mesure  
 $\Phi=8\text{mm}$



Bouchon  
Hermétique

Cellule en Verre

Solution  
Volume mini=80 $\mu\text{l}$

23

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Diffusion de la Lumière

**Pratiquement:**

⚡ Attention aux poussières

⚡ Attention à la Diffusion Multiple (transparence)

⚡  $\langle I(t) \rangle$  ou  $dI(t)$  en Fonction de C :

Attention oligomèrisation =  $f(C)$

⚡ En **Diffusion Statique de la Lumière** On s'intéresse à  $\langle I(t) \rangle$   
Connaître  $dn/dC$  et l'indice de réfraction du milieu  
ouverture maximale (détecteur)

⚡ En **Diffusion Dynamique de la Lumière** On s'intéresse à  $dI(t)$   
Connaître la viscosité et l'indice de réfraction du milieu  
ouverture minimale (détecteur)

24

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Exemples / Applications

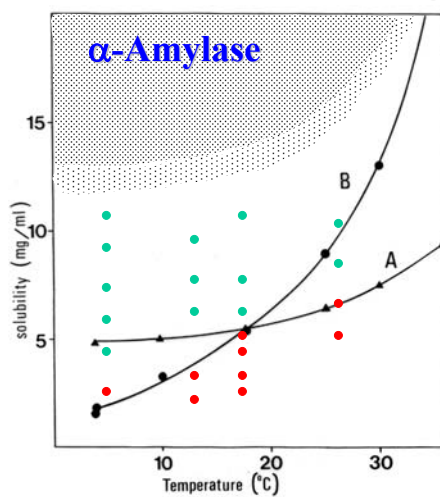
25

CRMC-N

S. Veesler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Prénucléation par DQEL Diagnostic



- $v > 10\%$
- $v < 10\%$

$D_0 = 5,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$

$R_h = 37 \text{ \AA}$

**Monomères**

Veesler et al. Acta Cryst. D (1994)

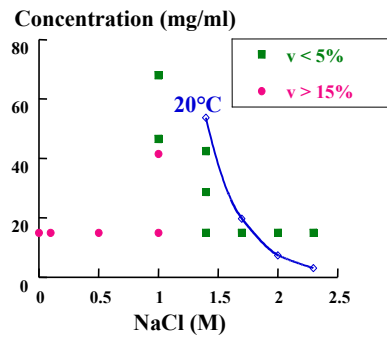
26

CRMC-N

S. Veesler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

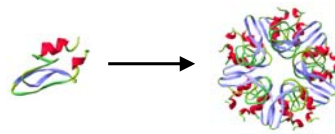
## Prénucléation par DQEL Diagnostic BPTI pH 4,5



$$D_0 = 9,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$R_h = 23,1 \text{ \AA}$$

Oligomères de BPTI  
DXPA



Lafont et al. *J. Cryst. Growth* (1994)

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

27

CRMC-N

## Prénucléation par DQEL Diagnostic

### En Résumé

- La **Monodispersité\*** est un bon Critère
- Les **Agrégats** sont à Éviter

\*à la Résolution de la DQEL

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

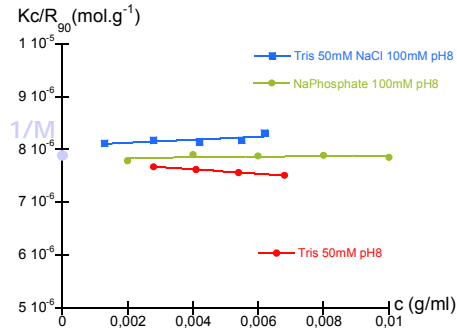
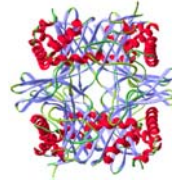
28

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DEL

Exemple de l'Urate Oxidase  
(F. Bonneté - M. Giffard)

$$\frac{Kc}{\Delta I_{90}} = \frac{1}{M} + 2A_2c$$



$A_2 > 0$  repulsion

$M_{exp} = 127000Da$  ( $M_{uox} = 135000Da$ )

$A_2 < 0$  attraction

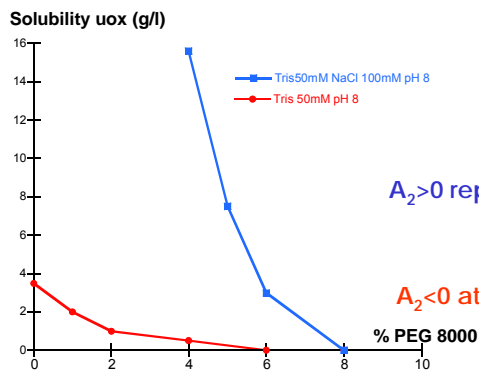
29

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DEL

Exemple de l'Urate Oxidase  
(F. Bonneté - M. Giffard)



$A_2 > 0$  repulsion  $\Rightarrow$  Solubilité Augmente

$A_2 < 0$  attraction  $\Rightarrow$  Solubilité Diminue

30

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DEL

Loll et al. Mesurent les Interactions entre **Micelles de Détergent**  
(sans Protéine)  
Milieu de Cristallisation de la Porine Ompf (*Protein Science* 2000)

### Détermination de la cmc

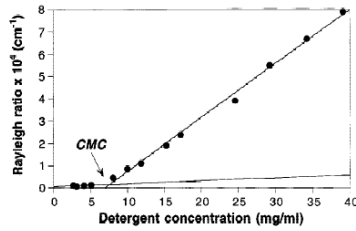


Fig. 2. Light scattering observed from a solution containing only PEG and detergent. The Rayleigh ratio is shown as a function of detergent concentration in a buffer containing 2% PEG. The detergent used is a mixture of n-octyl-2-hydroxyethylsulfoxide and octyl POE, corresponding to the trigonal crystallization condition for OmpF. Note the sharp break at roughly

### Détermination du $A_2$

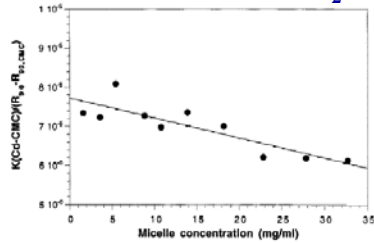


Fig. 3. Representative Debye plot for protein-free detergent micelles in trigonal buffer containing 2 (w/w)% PEG. Micelle concentration is obtained by subtracting the CMC from the total detergent concentration.  $B_{22}$  and the micelle molecular weight are obtained from the slope of the line and the y intercept, respectively (see Equation 3).

31

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DEL

Loll et al. Mesurent et Compagent les Interactions entre **Micelles de Détergent** et entre **Complexes Protéine-Détergent**

### Détermination du $A_2$

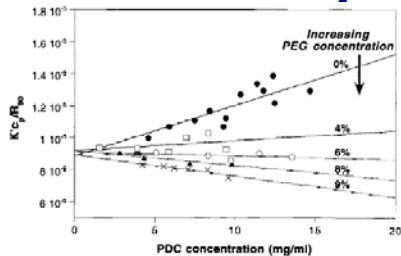


Fig. 4. Debye plot for porin-detergent complexes in trigonal buffer conditions at varying PEG concentrations (0, 4, 6, 8, 9 (w/w)%). The general trend of decreasing  $B_{22}$  with increasing PEG concentration is evident.

### Comparaison des $A_2$

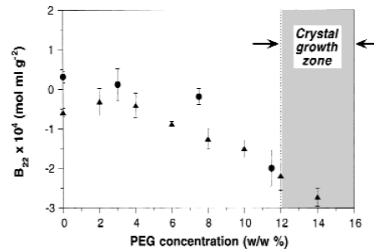


Fig. 5.  $B_{22}$  values for both porin-detergent complexes (circles) and protein-free detergent micelles (triangles) at varying PEG concentrations in the tetragonal crystallization buffer. The range of PEG concentrations in which crystals can be grown is shaded.

32

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N



## Interactions Moléculaires par DEL

1. Les solutions de Micelles de Détergents sans protéine ont un comportement proches de celles avec la Protéine.

### Importance du Milieu de Cristallisation

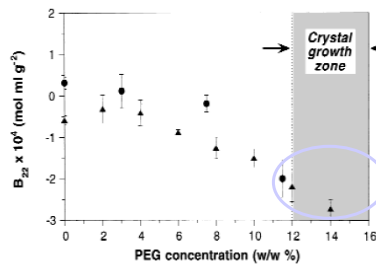


Fig. 5.  $B_{22}$  values for both porin-detergent complexes (circles) and protein-free detergent micelles (triangles) at varying PEG concentrations in the tetragonal crystallization buffer. The range of PEG concentrations in which crystals can be grown is shaded.

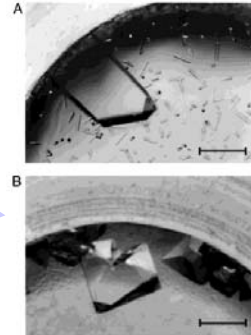


Fig. 1. Crystals of OmpF porin grown in this study. (A) Tetragonal crystals. (B) Tetragonal crystals. The curved surfaces in both panels are the walls of the microfluidic chamber. Scale bars correspond to  $\sim 0.25$   $\mu$ m.

2. La valeur du  $A_2$  est un bon Critère de Cristallisation

33

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DEL

Etude du Milieu de Cristallisation sans Protéine:

Detergent + Lipide

⊕

Température, pH, Force Ionique et Nature, [PEG],...

Attention Contre-Exemple:

J. Blouwolff JCG 303 (2007)

« Crystallization conditions of membrane protein CLC-ec1:  
An example outside the crystallization slot »

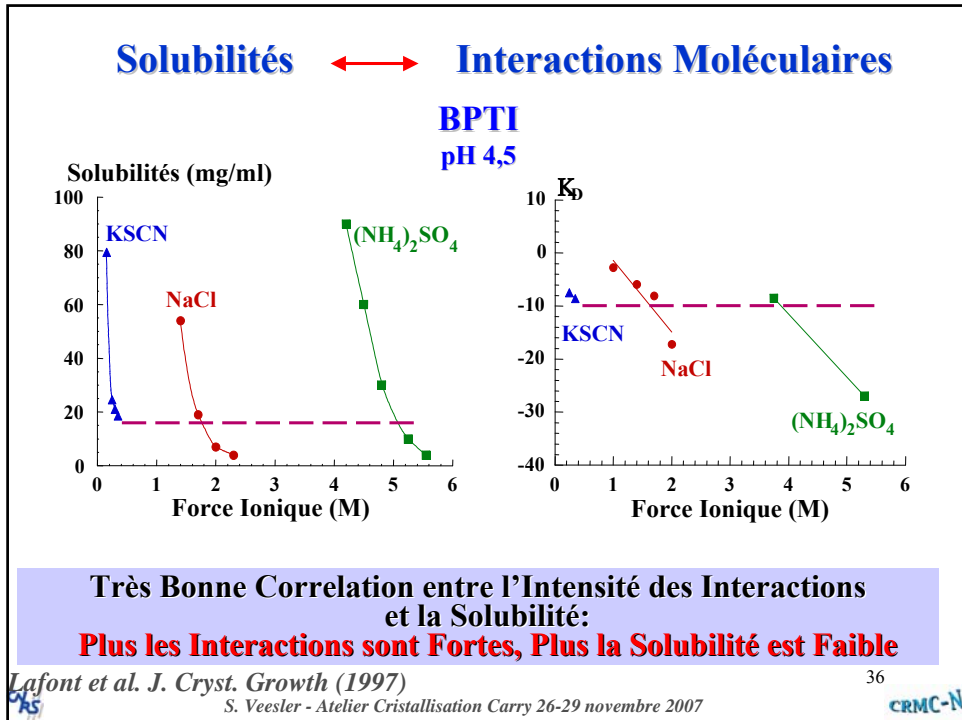
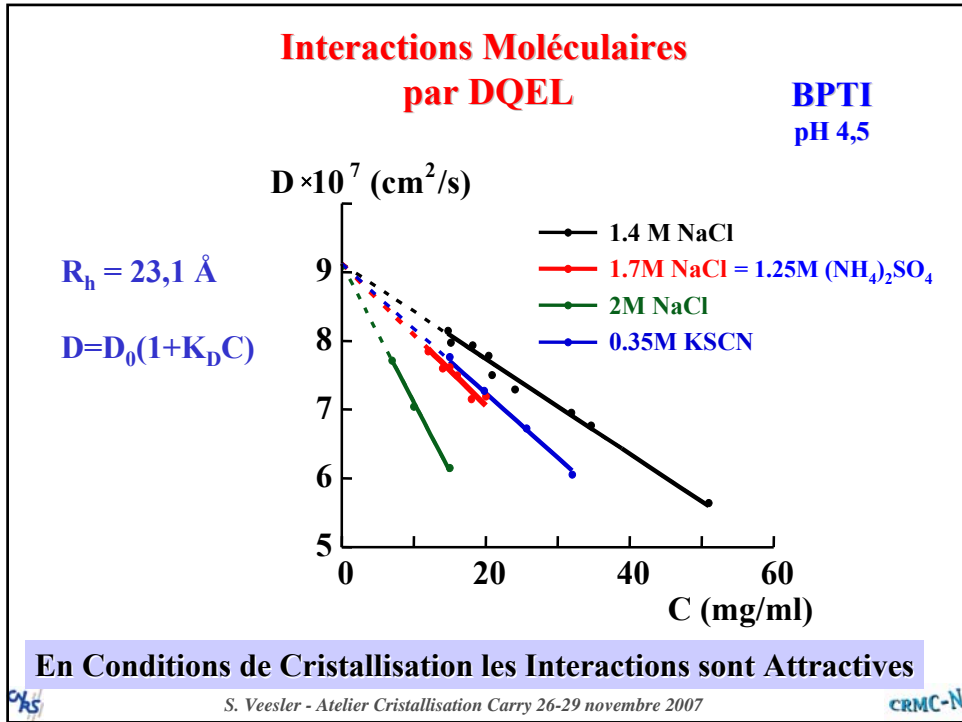
N-octyl- $\beta$ -maltoside / PEG 400 / pH=4,5

34

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

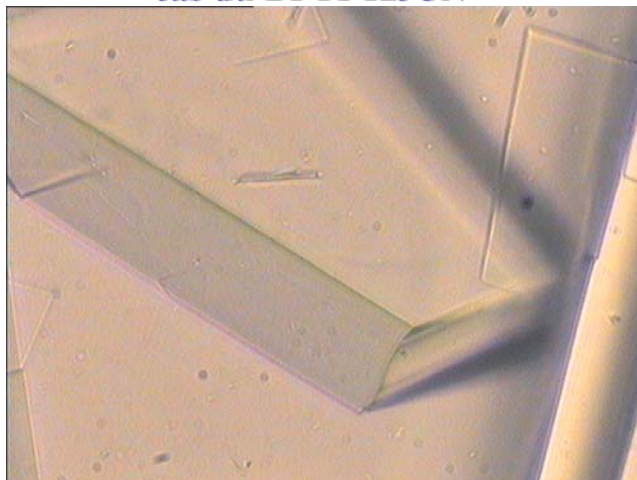
CRMC-N



## Si les Interactions sont trop Intenses

### Demixion

#### cas du BPTI-KSCN



Grouazel et al. *Acta Cryst.* 2002, D58, 1560.

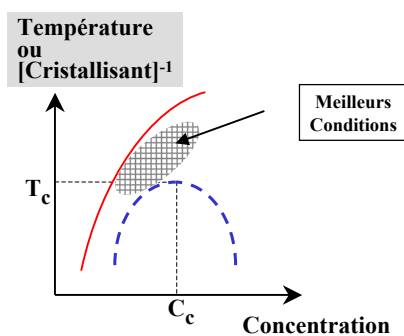
S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

37

CRMC-N

CRMC-N

## Séparation de Phases Liquide-Liquide



Séparation de Phases Thermo-Induite  
**Facile à Réaliser**  
Séparation de Phases par Variation de Composition  
**Balayage Isotherme**

38

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

CRMC-N

## Interactions Moléculaires par DL

### En Résumé

- En Conditions de Cristallisation les Interactions sont **Attractives**
- Très Bonne Corrélation entre l'Intensité des Interactions **Attractives** et la **Solubilité**
- Interactions Attractives** Trop Intenses =Précipitation ou Démixion

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

39

CRMC-N

## *Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

### En Conclusion:

#### Caractérisation des Macromolécules en Solution

Besoin de Critères pour Choisir/Déterminer de Manière Rationnelle les Conditions de Cristallisation

La **Monodispersité** est un bon Critère - Les **Agrégats** sont à Éviter

« Prédiction » du Diagramme de Phases

Très Bonne Corrélation entre les Interactions et les Conditions de **Cristallisation**

Approche Physico-chimique Complémentaire à la Cristallisation à Haut Débit (HTS)

CRMC-N

S. Veessler - Atelier Cristallisation Carry 26-29 novembre 2007

40

CRMC-N

*Diffusion de la Lumière et Cristallisation*

**A Tester/Valider sur les Protéines Membranaires**

Jean-Pierre Astier,  
Françoise Bonneté,  
Natalie Ferté,  
Stéphane Veesler