



Déshydratation de cristaux

Un nouvel appareil qui maîtrise l'humidité des cristaux macromoléculaires est disponible sur les lignes de lumière ESRF

Les propriétés des cristaux de protéines peuvent souvent être améliorées par déshydratation contrôlée de ceux-ci. Un nouvel appareil développé par l'EMBL et l'ESRF est maintenant utilisable couramment à l'ESRF pour maîtriser l'hydratation des cristaux non congelés quand ils sont montés sur une ligne de lumière de cristallographie macromoléculaire. Ceci permet un réglage fin de la déshydratation et ainsi de caractériser pleinement un système donné afin d'augmenter les chances de trouver un protocole de déshydratation adapté au cristal. De plus, sa facilité d'utilisation rend ces expériences faisables dans un délai raisonnable.

La déshydratation peut avoir plusieurs effets observables sur les propriétés des cristaux parmi lesquels un changement de groupe d'espace, la réduction de la maille cristalline, des changements de mosaïcité, une amélioration des profils des taches de diffraction, une amélioration de la résolution ou du pouvoir de diffraction de l'échantillon.

L'appareil fournit un courant d'air d'une humidité relative précise qui peut être utilisée pour faire varier la quantité d'eau présente dans des cristaux macromoléculaires.



L'expérience est simple : l'appareil peut être installé rapidement sur la ligne, les échantillons sont montés dans des boucles utilisées habituellement en cryogénie et l'impact de la déshydratation peut être contrôlé visuellement au moyen de l'acquisition d'images de diffraction in situ. Une fois le niveau optimal d'hydratation obtenu, la congélation de l'échantillon en vue d'une mesure complète de données est facile à réaliser : soit à la main, soit en utilisant nos changeurs d'échantillons.

Détails pratiques

Que me faut il ?

- Plusieurs cristaux non congelés issus approximativement de la même condition de cristallisation – qui peuvent être sacrifiés si nécessaire.
- Des boucles de type Mesh, montées sur des bases de standard SPINE.
- Des paniers remplis de tubes vides, tous issus des standards SPINE.

Combien de temps une expérience de ce type prend elle ?

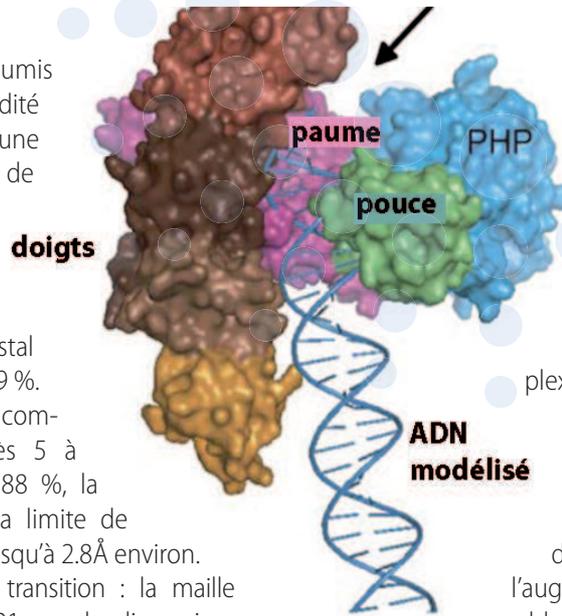
- Un test rapide de quelques heures peut être effectué afin de voir si votre système cristallin est sensible aux changements de déshydratation..
- Des protocoles de déshydratation peuvent être très différents selon le système du cristal. Pour cette raison, affiner un protocole de déshydratation peut prendre du temps et nécessiter le sacrifice de plusieurs cristaux. Il faut en général 24 heures pour explorer et raffiner un protocole de déshydratation.
- Une fois affiné, un protocole permet de conditionner rapidement et de stocker des échantillons pour des expériences ultérieures.

Quel est le taux de succès de ce type d'expériences ?

- La déshydratation améliore l'ordre d'un système cristallin dans 10 à 20 % des cas. Elle résulte alors en une augmentation de la limite de diffraction observée.
- Si votre cristal contient beaucoup de solvant et/ou est de basse symétrie, la déshydratation peut l'améliorer.
- Si vous avez observé une variabilité dans les dimensions de maille de vos cristaux après congélation, ceci peut indiquer que votre système est sensible à la déshydratation.

L'ADN Pol III de Escherichia coli

Lorsque ces cristaux sont soumis à un gradient d'une humidité relative (HR) décroissante, une diminution dans la qualité de la diffraction est observée à environ 96 % HR, à tel point qu'il n'est plus possible d'indexer les clichés de diffraction du cristal avant que la HR n'atteigne 89 %. À ce stade, la diffraction commence à s'améliorer. Après 5 à 10 minutes à une HR de 88 %, la diffraction est rétablie et la limite de résolution augmente d' 1\AA jusqu'à 2.8\AA environ. Les cristaux subissent une transition : la maille élémentaire initiale en P212121 avec des dimensions d'environ $a=83, b=99, c=144\text{\AA}$, est réduite à environ

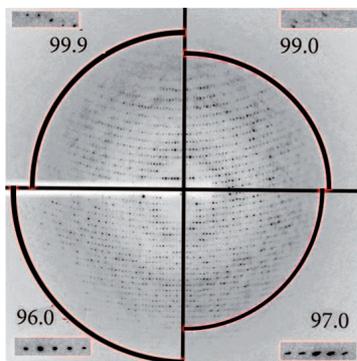


$a=83, b=94, c=131\text{\AA}$. Ceci correspond à une réduction en volume de toute la maille de 14 % et une réduction approximative du contenu du solvant de 57 % (v/v) à 50 %.

Ces cristaux avaient été signalés préalablement comme améliorables grâce à leur déshydratation au moyen d'un autre appareil plus complexe le FMS (Lamers et al, 2006). Bien que les deux appareils fonctionnent de manière très différente, ces cristaux subissent la même transition. Les changements se produisent à des valeurs HR quasiment identiques et l'augmentation de la résolution est comparable. Ceci met en évidence la nature robuste et reproductible de la méthode.

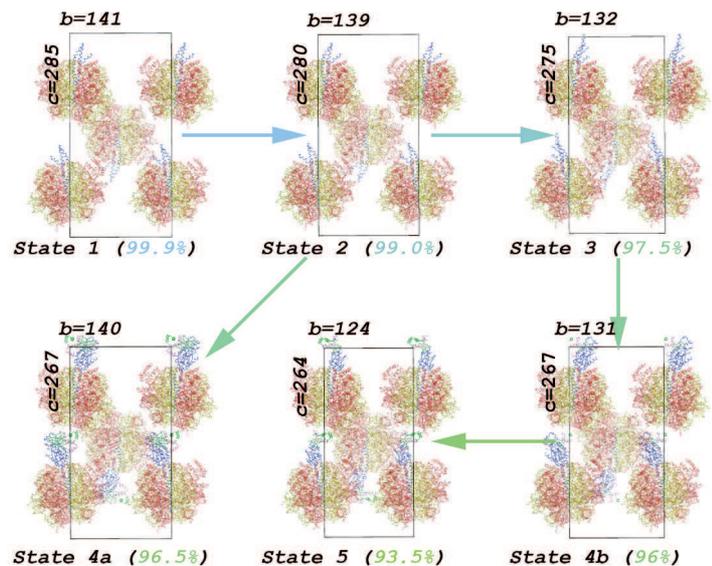
L'ATPase F₁ de bœuf

Les cristaux de l'ATPase F1 bovin ont un comportement plus complexe quand ils sont soumis à une déshydratation contrôlée. Ces cristaux ont été préalablement caractérisés lors de la déshydratation, en utilisant le FMS (Bowler et al, 2006b, Sanchez-Weatherby et al, 2007). Néanmoins, l'extrême facilité de manutention de ce nouvel appareil, couplée avec l'utilisation d'une ligne de lumière synchrotron



Changements de la diffraction aux rayons X des cristaux de l'ATPase F1 observés au cours de leur déshydratation. Les limites de résolution obtenues à chaque état de déshydratation : 3Å, 3.8Å, 4Å et 2.5Å sont exposées dans chaque quadrant de l'image. Un zoom sur la même zone du détecteur (dans les petits encarts), montre l'amélioration des profils des pics de Bragg après déshydratation.

brillante, a permis une étude beaucoup plus détaillée des changements subis par ces cristaux lors de la déshydratation. Ce système a permis d'approfondir notre compréhension du processus de déshydratation des cristaux et de comprendre ses principes généraux sous-jacents.



Les structures des différents états de transition de l'ATPase F1. Empilement cristallin des cristaux de l'ATPase F1 à chaque état de déshydratation. Les mailles élémentaires à chaque état de déshydratation sont ici présentées suivant l'axe a. L'unité asymétrique ainsi que les molécules reliées par symétrie sont représentées suivant leur chaîne carbonée principale et colorées par sous-unité (α en rouge, β en jaune, δ en magenta et ε en vert). Les flèches indiquent les différents chemins que peuvent suivre les cristaux.