

## **1- Rapport d'expérience no 30-01-402 et LS1924 (1 au 4 février 2002)**

Participants : C. Cohen-Addad, F. Fieschi, R.Kahn, C. Massenet, E. Pebay-Peyroula

La NADPH oxydase des neutrophiles fait partie du système de défense immunitaire non spécifique. Ce complexe est impliqué dans la destruction des micro-organismes en produisant des ions superoxydes. L'activation résulte d'une cascade d'évènements dont l'aboutissement est la réorganisation des facteurs cytosoliques et leur association au flavocytochrome membranaire. Les facteurs cytosoliques sont des protéines modulaires avec des domaines structuraux connus dans les chaînes de transmission du signal. Au cours de cette expérience, nous avons résolu la structure du domaine SH3 de la protéine p40 complexé au peptide polyproline de la protéine p47. La structure a été résolue à 1.46 Å de résolution avec un facteur R de 18.1% et Rlibre 20.7%. Initialement, les cristaux diffractaient à 4 Å de façon très mosaïque (pas d'indexation possible). Une série de recuit a permis d'améliorer la qualité de façon spectaculaire (diffraction à 1.46 Å). Ces résultats sont inclus dans le manuscrit de thèse de Claire Massenet (thèse UJF, 11 décembre 2002), la publication est en cours de rédaction.

## **2- Rapport d'expérience no 30-01-557**

Participants : C. Cohen-Addad, E. Girard, R.Kahn

Collaboration : J. Coves, E. Rossy

La protéine MerP (7500 Da) fait partie d'un système de défense bactérienne contre les ions métalliques. Des cristaux de cette protéine ont été obtenus et ont été trempés dans une solution contenant un dérivé de gadolinium (E. Girard) afin d'en résoudre la structure qui n'a pas pu être résolue par remplacement moléculaire à partir des modèles obtenus par RMN. Des données ont été collectées à la longueur d'onde du seuil d'absorption du gadolinium, jusqu'à la résolution de 3.0 Å.

Les conditions de l'enregistrement des données sont les suivantes :

= 1.711 Å, distance cristal-détecteur = 120 mm, incrément entre les images = 1° sur 180 °, temps d'enregistrement par image = 60 secondes.

Les résultats sont les suivants :

$P2_12_12_1$ ,  $a= 53.89$   $b=83.95$   $c=105.25$  Å,  $R_{sym}= 13.1\%$ ,  $R_{ano}= 8.7 \%$ , complétude= 99%,  
redondance= 5.7.

La recherche d'ions gadolinium par le calcul de cartes de Patterson anormales et également par méthodes directes (programme Shake'n Bake) n'a pas permis de détecter clairement la présence d'atomes de gadolinium fixés sur la protéine. Des essais de cristallisation pour améliorer la qualité des cristaux de la protéine native et la fixation de l'atome de gadolinium sont en cours.

### **3- Rapport d'expérience no 30-01-557**

Participants : R.Kahn, E. Pebay-Peyroula

Collaboration : G. Brandolin, C. Dahout

Le transporteur de nucléotides est une protéine de la membrane interne des mitochondries responsable de l'importation de l'ADP et l'exportation de l'ATP. Depuis juin 2001, de nombreuses campagnes d'expériences sur le transporteur de nucléotide ont été faites afin d'obtenir des dérivés d'atomes lourds. Un jeu de données natif avait été obtenu sur une forme cristalline  $P2_12_12_1$  (ou  $P2_12_12$ ) à 2.5 Å de résolution. Par la suite, nous avons constaté un défaut dans cette forme cristalline provoquant le doublement d'un des paramètres de maille. Plus de 90% des cristaux présentaient ce défaut. Nous avons alors identifié des conditions permettant l'obtention d'une autre forme cristalline  $C222_1$ . Ces cristaux diffractent de façon anisotrope. Les cristaux des deux formes cristallines sont trop petits pour être testés sur un diffractomètre de laboratoire. Toutes les recherches de dérivés d'atomes lourds se font à l'ESRF. En moyenne 40 cristaux sont testés en 24h, 3 à 4 donnent lieu à un enregistrement de données. Lors de l'expérience du 16/11/02 nous avons pu enregistrer 3 jeux de dérivés contenant du mercure. Ces dérivés combinés au cristal natif ont permis un phasage avec mlphare à 3.2 Å de résolution (fom de 0.63). Les cartes MIR montrent clairement les hélices transmembranaires. Le phasage est amélioré par la procédure d'aplatissement de solvant et les phases sont étendues à 2.5 Å de résolution. Le modèle est en cours de construction.

