

CRISTALLOGRAPHIE SOUS ATMOSPHÈRES "CONTRÔLÉES"



Interactions Solide – gaz :

Matériaux poreux

Ni /H₂ → (stockage, accumulateurs)

Matériaux lacunaires

Zéolithes → (stockage, catalyse)

Molécules organiques

cyclodextrines

calixarènes

Protéines

"Enzymes à gaz" (hydrogénases, oxydases
nitrogénases, NO synthases..)

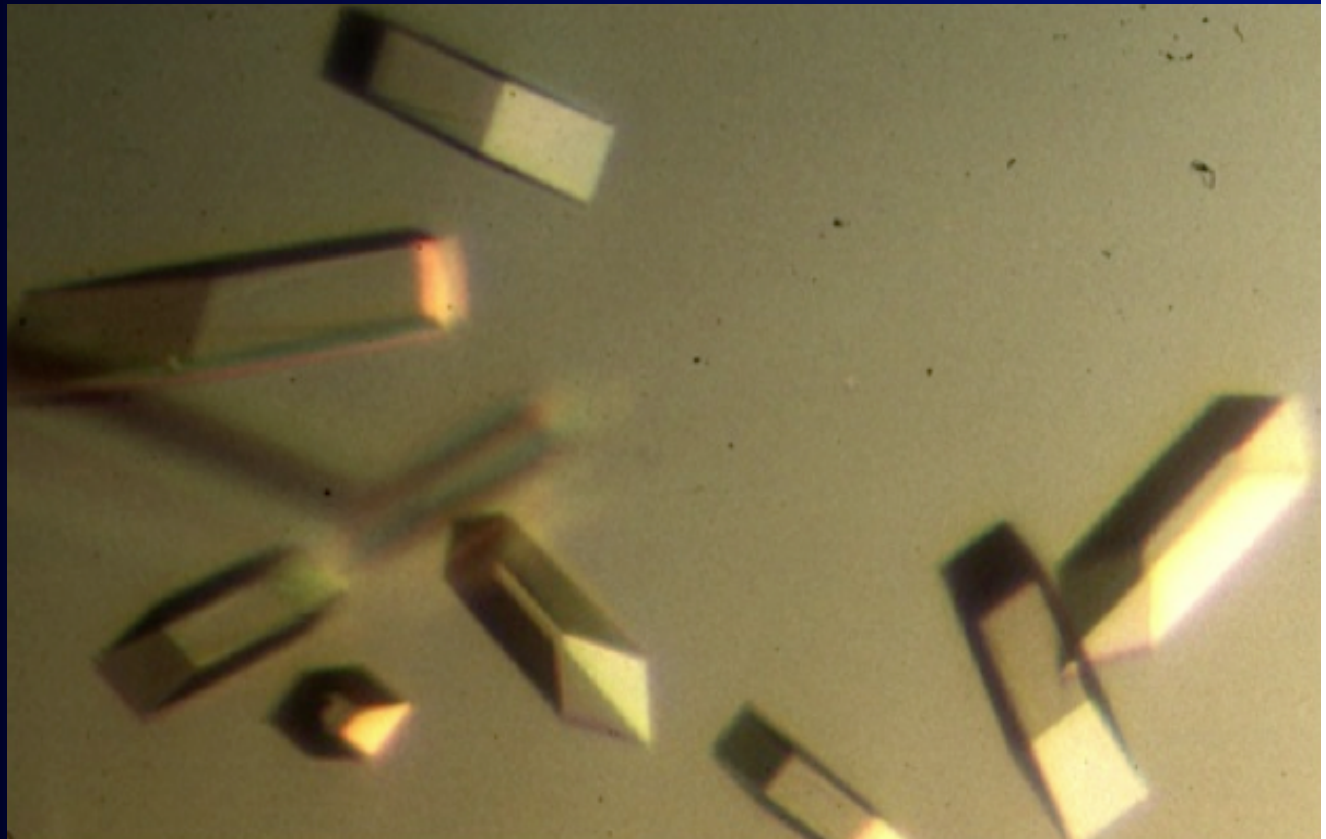
Mais étudiées à l'état cristallin !

Gaz Utilisables

Gaz rares : Ar, Kr, Xe	→	Cavités et tunnels dans les protéines
H ₂ / O ₂	→	Stockage / Etudes de mécanismes
CO / CO ₂	→	Écologie / dépollution Effet de serre
N ₂	→	Enzymologie / anesthésie
NO / N ₂ O	→	
CH ₄ / C ₂ H ₆ / C ₂ H ₄	→	Hormones végétales / Energie "verte"
SF ₆	→	Electromécanique, THT
• • • • •		

1. Spécificité des cristaux de Protéines :

- ◆ Taille: $\sim 0,2$ à $0,6$ mm
- ◆ Contient env. 40 à 60% de solvant (permet la diffusion de sels à des sites spécifiques)
- ◆ Cavités
Hydrophobes =
cible des gaz
rares (Ar, Kr, Xe)
- ◆ Sites actifs =
 O_2 , N_2 , CO,



Constantes Physiques des gaz nobles (Ar, Kr, Xe) :

	Argon	Krypton	Xenon
Z :	18	36	54
Eb :	-185.8 °C	-152.3 °C	-107.1 °C
Solubilité :	25 cm ³ /l at 4°C	45 cm ³ /l at 4°C	60 cm ³ /l at 4° C
T° critique :	-122.3 °C	-63.6 °C	+ 16.7 °C
P critique :	49.8 bar	55.2 bar	58.4 bar
Rayon VdW :	1.97 Å	2.12 Å	2.32 Å
Polarisabilité :	1.64 (4πε ₀) Å ³	2.48 (4πε ₀) Å ³	4.04 (4πε ₀) Å ³
Potentiel 1ère ionisation :	15.76 eV	14.00 eV	12.13 eV

Ionisation difficile

Ionisation moyenne

Ionisation facile

Xe, Kr : Solubilités

- Xe : Solubilité dans l'eau

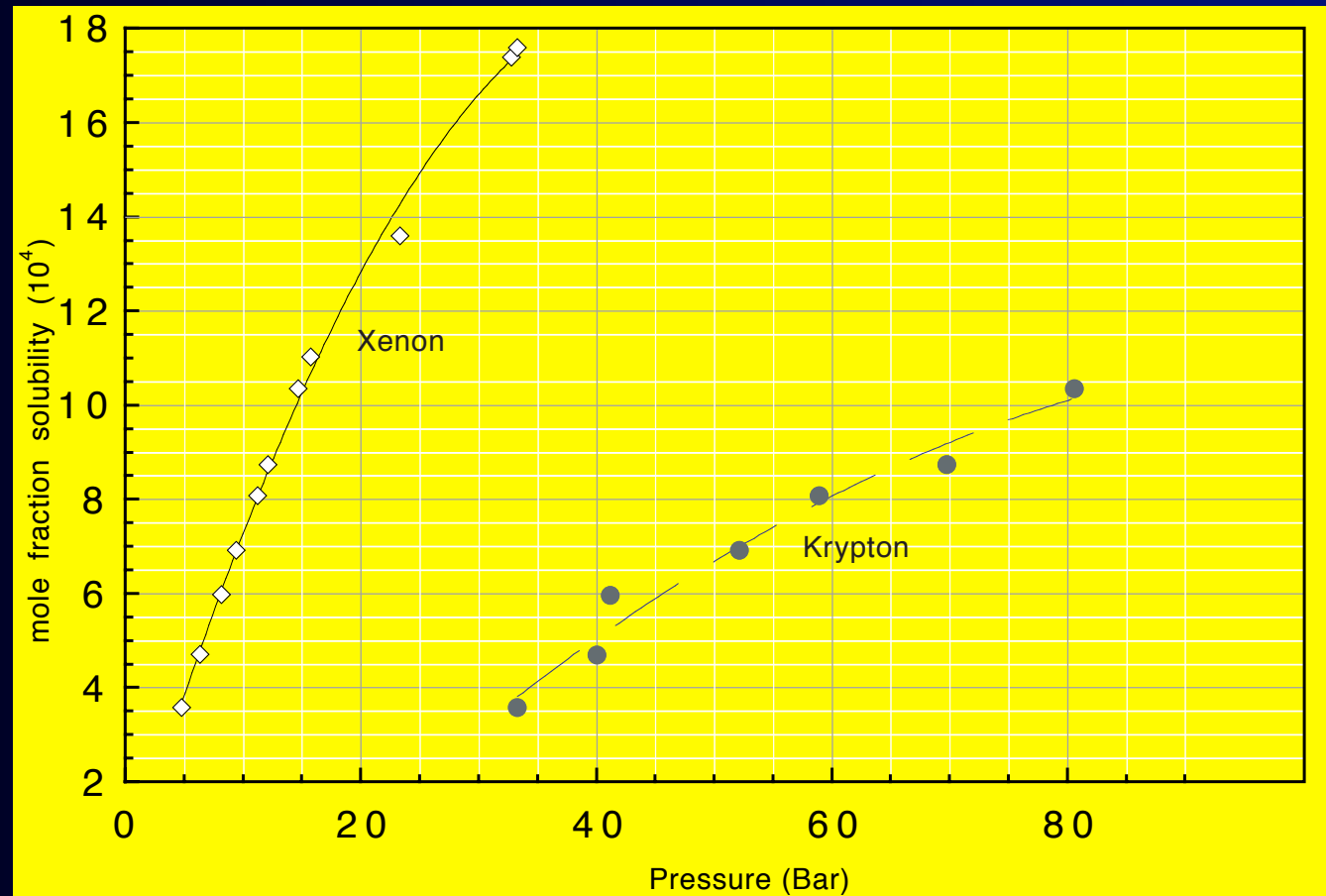


- Cristal de protéine sous pression de Xe



- Canaux de solvant

→ diffusion rapide du xénon



• Xénon –Type d'interactions

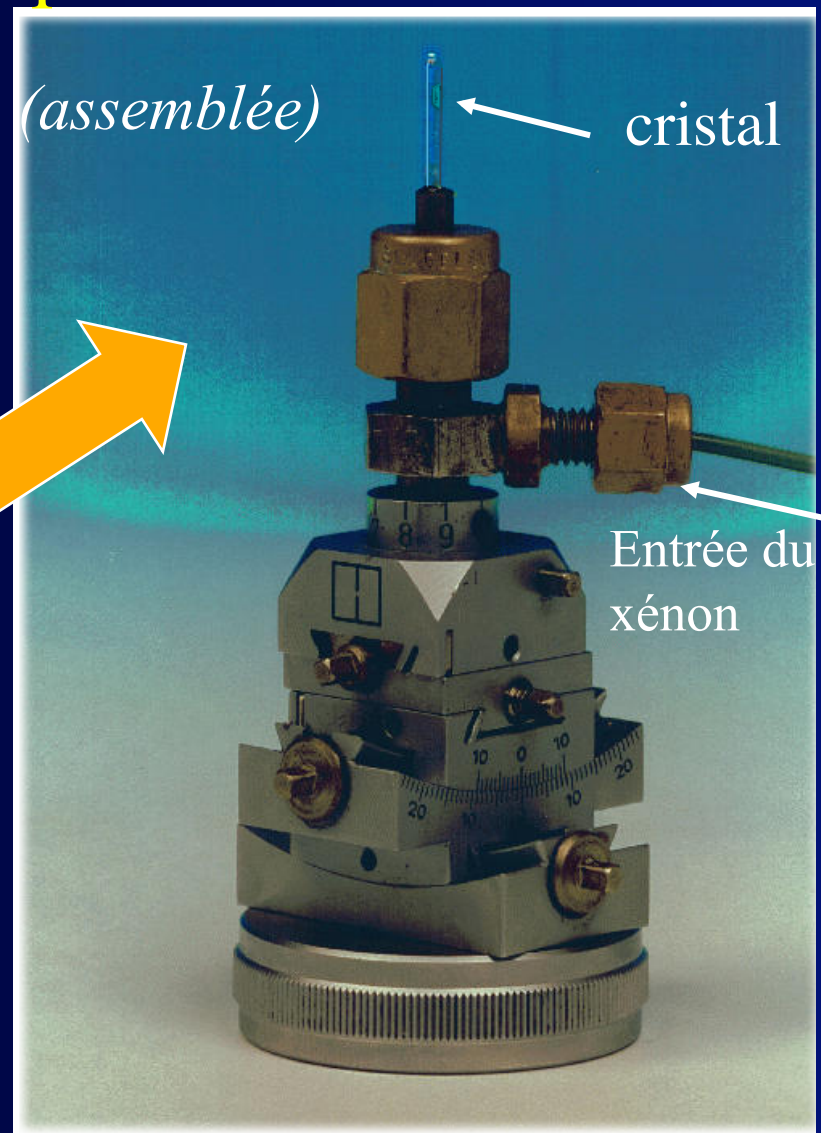
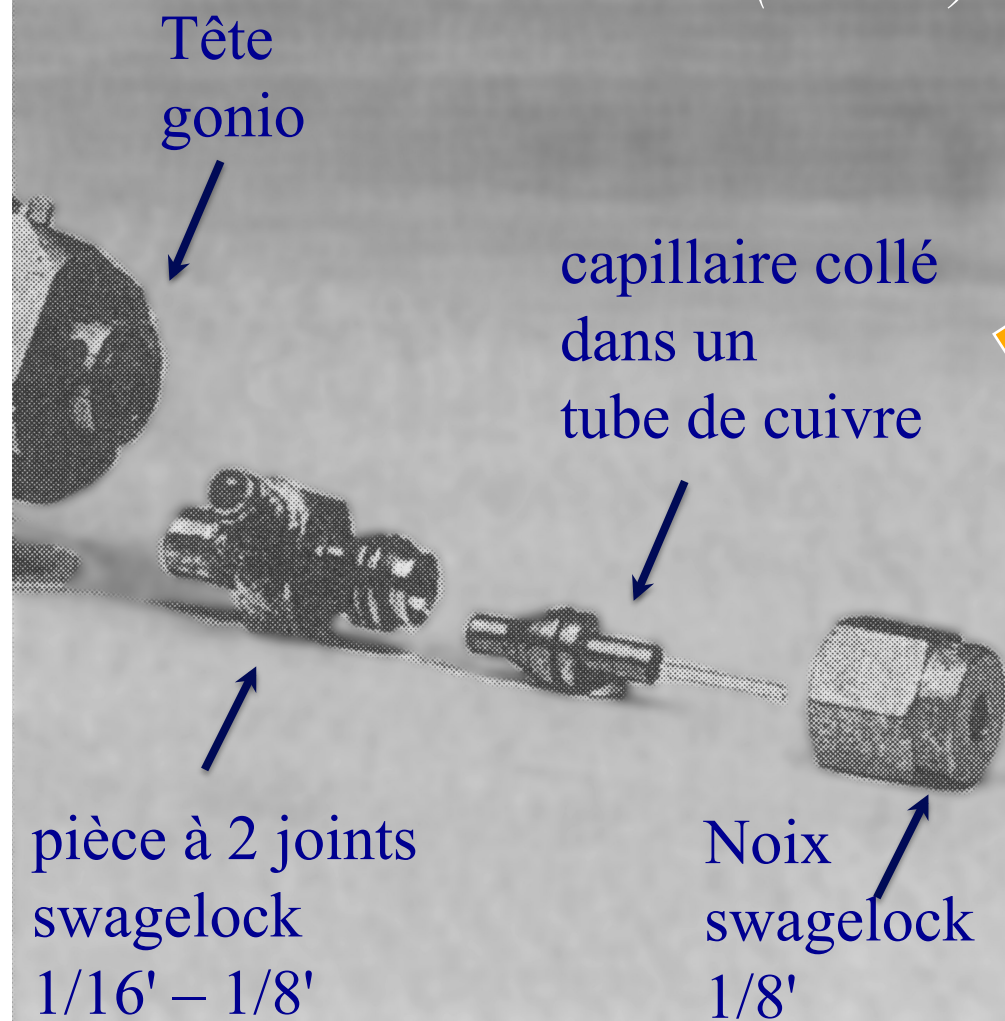
- Non covalentes (van der Waals)

interactions réversibles , dipolaire - dipole induit
(forces de dispersion London) $\sim r^{-6}$

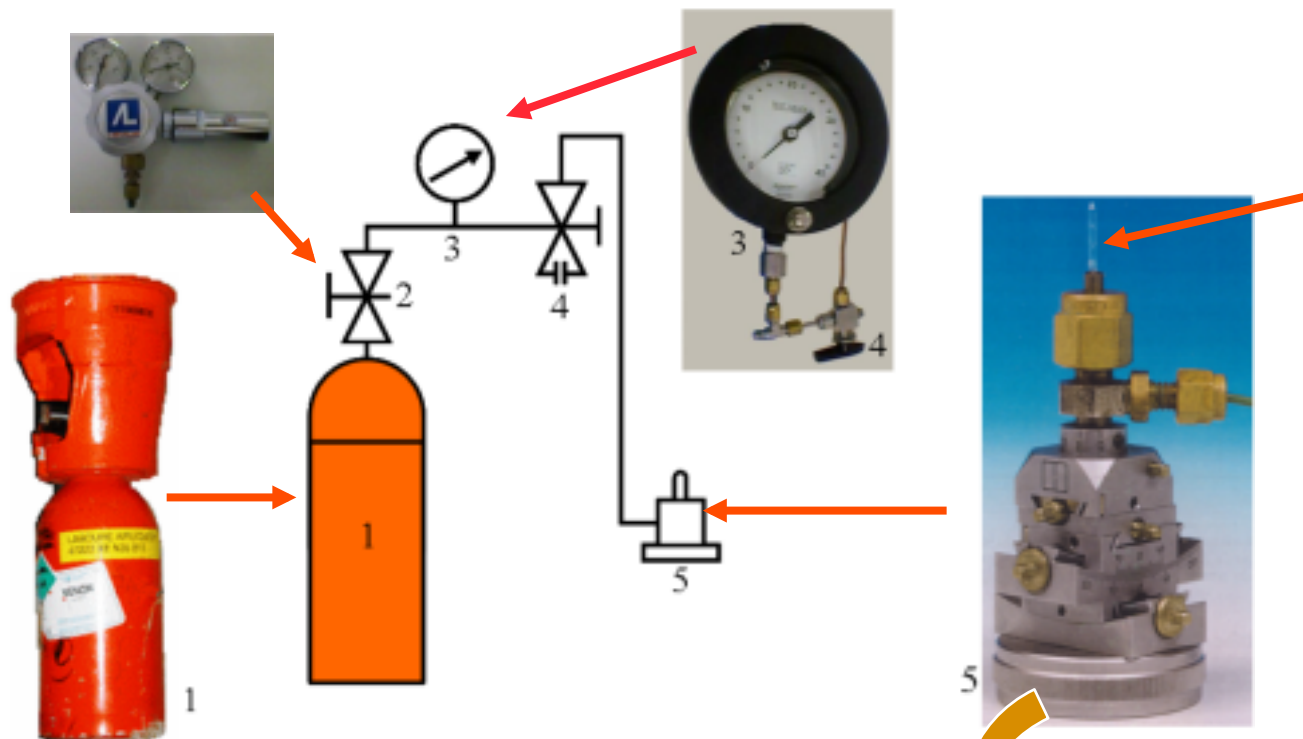
- Cibles du xénon :
 - Atomes non polaires
 - Chaines latérales aliphatiques (Leu, Ile, Val...)
 - Petites cavités hydrophobes ou canaux

Prangé et al. Protein Struct. Func. Genetics 1998, 30, 61-73

Dispositif expérimental : A température ordinaire (5 - 50 bar)



Schiltz, Prangé and
Fourme, *J. Appl. Cryst.* 1994



cristal de protéine

Pression $\sim 1 - 40$ bar
(60 bar max.)

Statique durant toute la
collecte des données de
diffraction

Collecte à température
ordinaire

1. Cylindre de gaz
2. Connecteur et manomètre
3. Jauge de précision
4. valve de fuite
5. Cellule

Source RX:
Synchrotron ESRF,
Grenoble

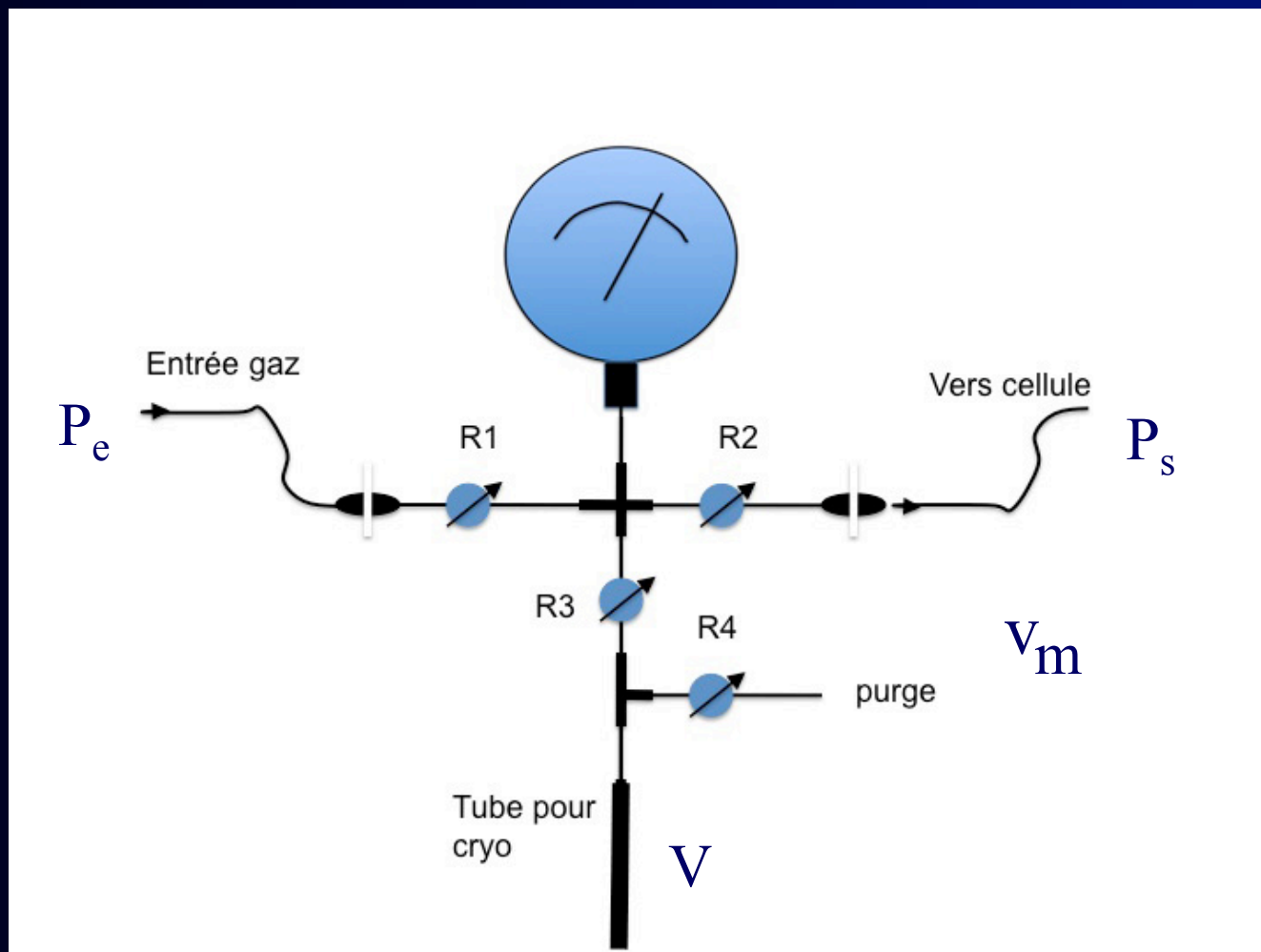


Amélioration (cryo-pompage)

$$V \gg v_m$$



$$P_s \gg P_e$$

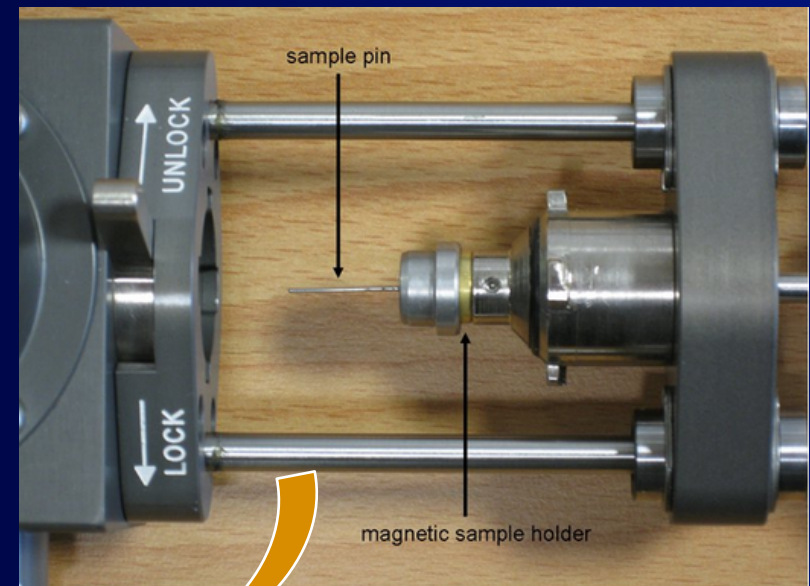
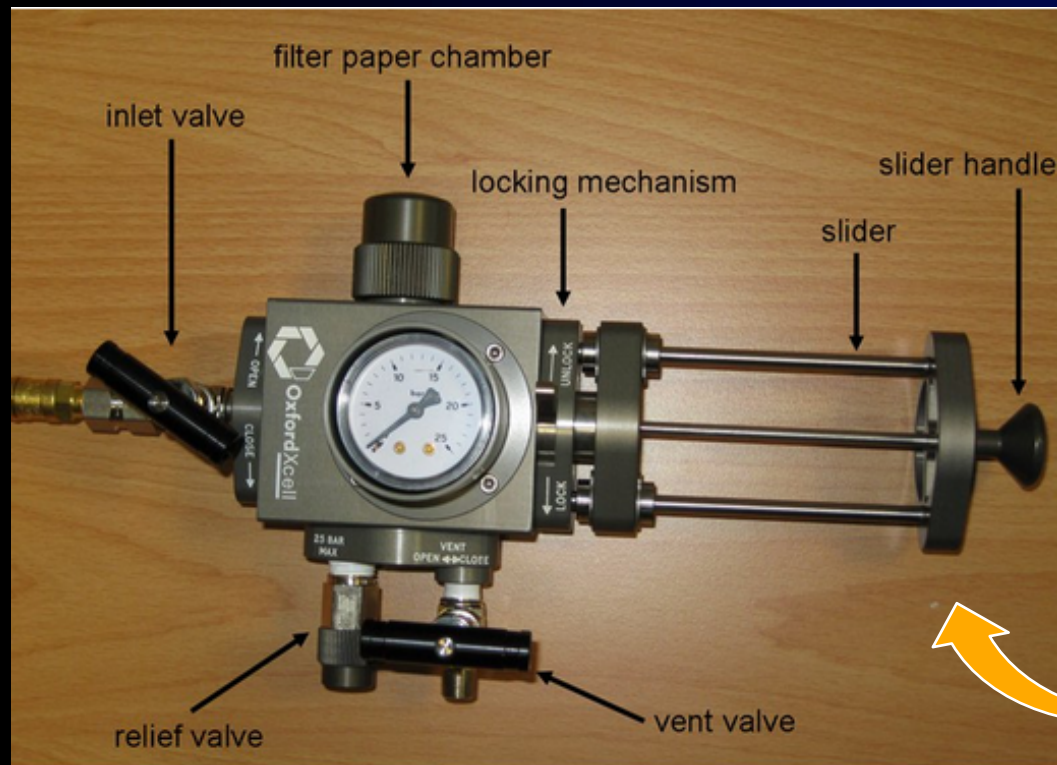


Pression utile > pression dans le cylindre

Limite (résistance du capillaire) : 40 – 50 bar / 298 K

Dispositif pour cryogénie (mesures à 100 K):

- 1 – Pressurisation dans une cellule démontable (≤ 25 bar)
- 2 – On relâche la pression et...
- 3 – Transfert rapide du cristal dans l'azote liquide (en moins de 10 s)



limite : 25 bar

$T = 100 \text{ K}$

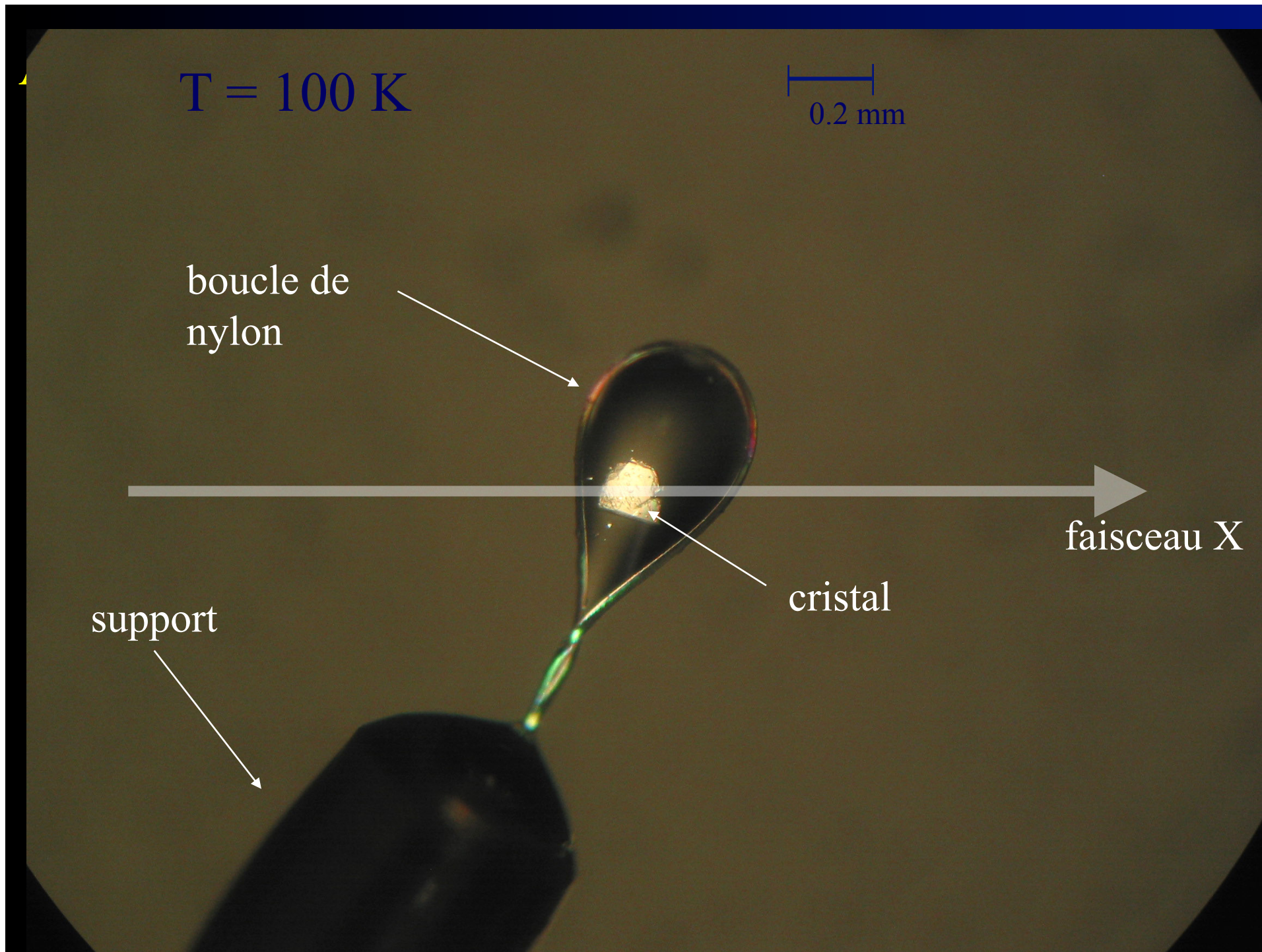
0.2 mm

boucle de
nylon

support

cristal

faisceau X

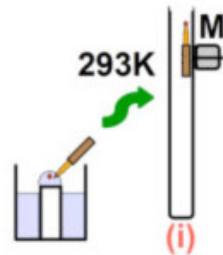


Systeme moyenne pression 20-200 bar (100 K):

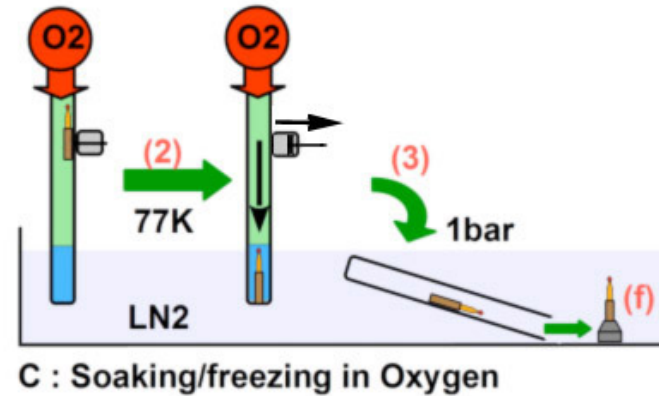
Equilibration (phase gaz) et
trempe (phase liquide) dans le
même milieu.

1. transfert à T.
ord. dans le
tube pression

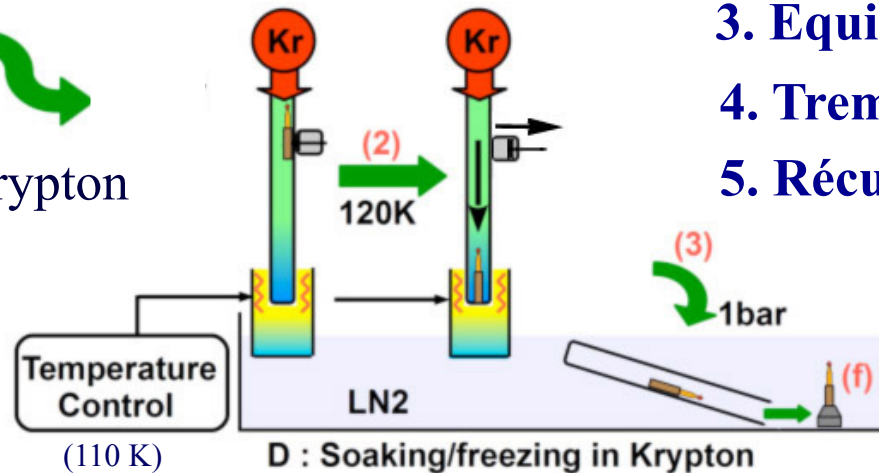
2. Chargement



Oxygène



Krypton



3. Equilibration
4. Trempe cryo.
5. Récupération

Carpentier et al. (2016) J. Applied. Cryst in press

Système moyenne pression 20-200 bar (100 K): Pompage cryogénique gaz : O₂, CO, Kr, Ar

~~Xe~~, ~~CO₂~~ ..

$$\rightarrow P_1 \gg P_2$$

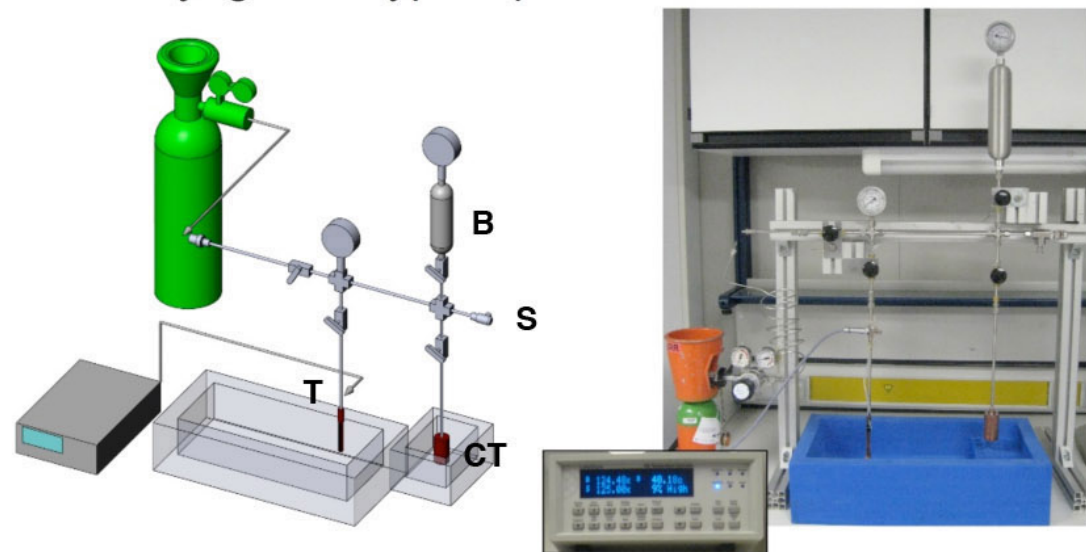
B = gas buffer

CT = cryo trap

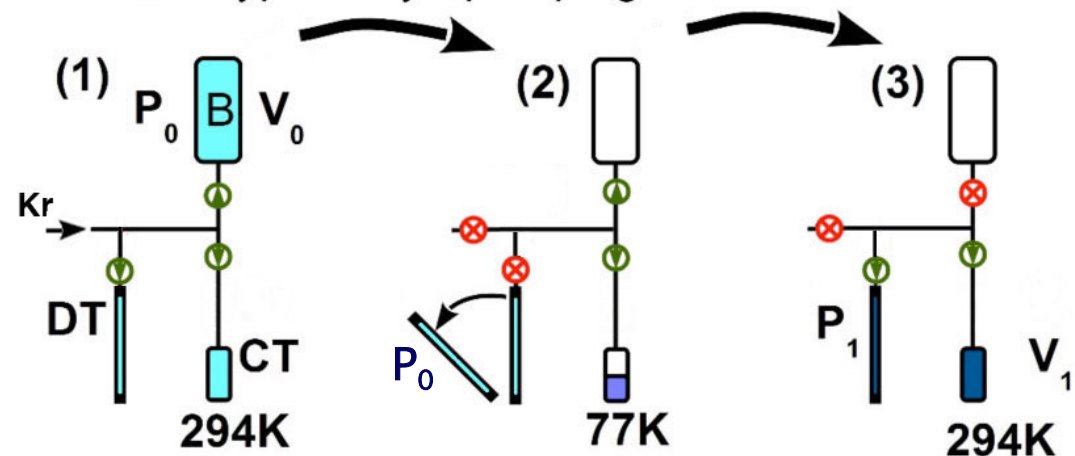
DT = Sample Drop Tube

Carpentier et al. (2016)
J. Applied. Cryst in press

Cryogenic krypton pressure cell



C: Krypton cryo-pumping



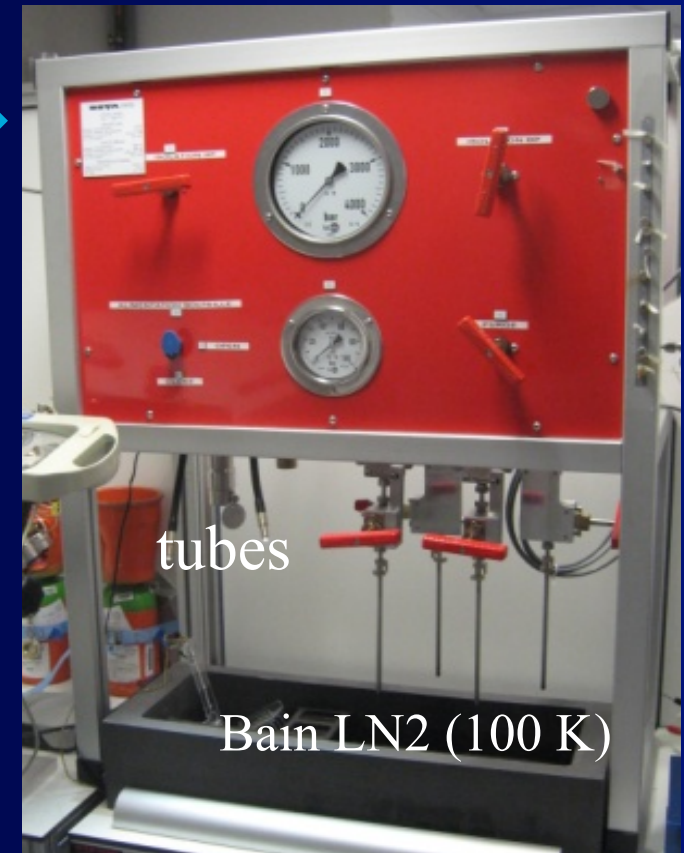
Très haute pression ($\leq 2\,000\text{ bar}$)

Gaz : He, Ar

He / Ar (200 bar)



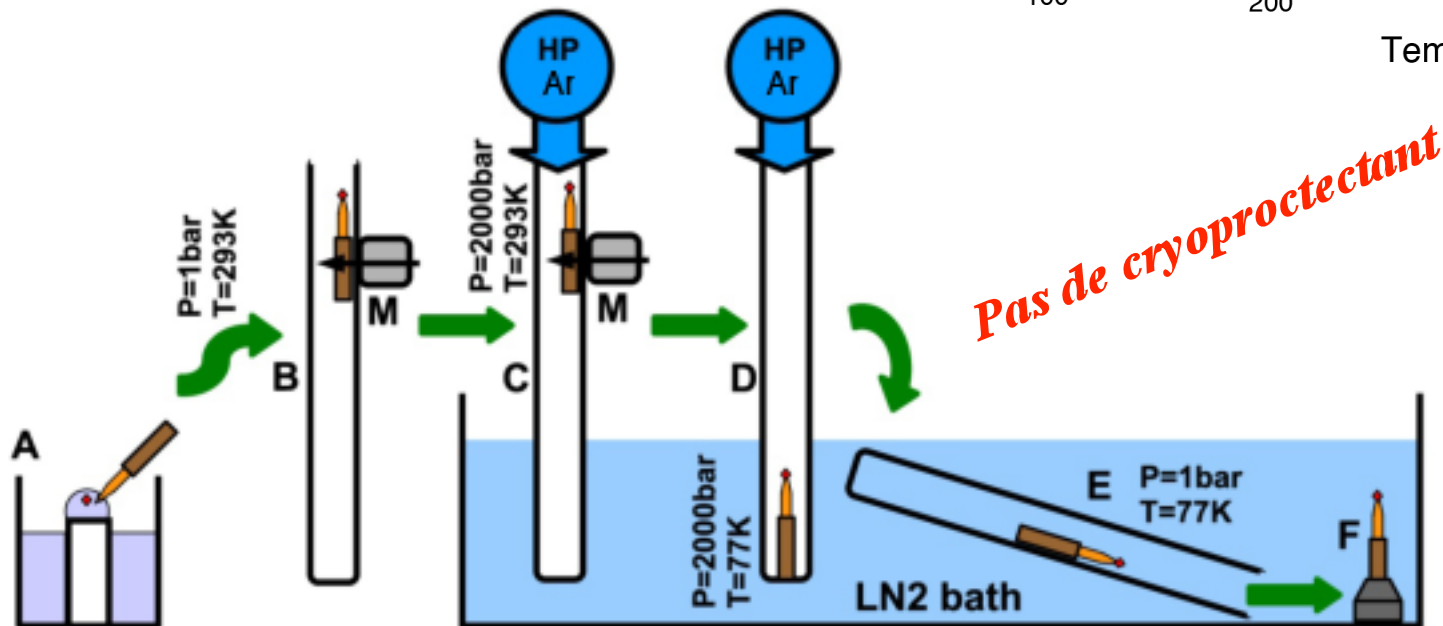
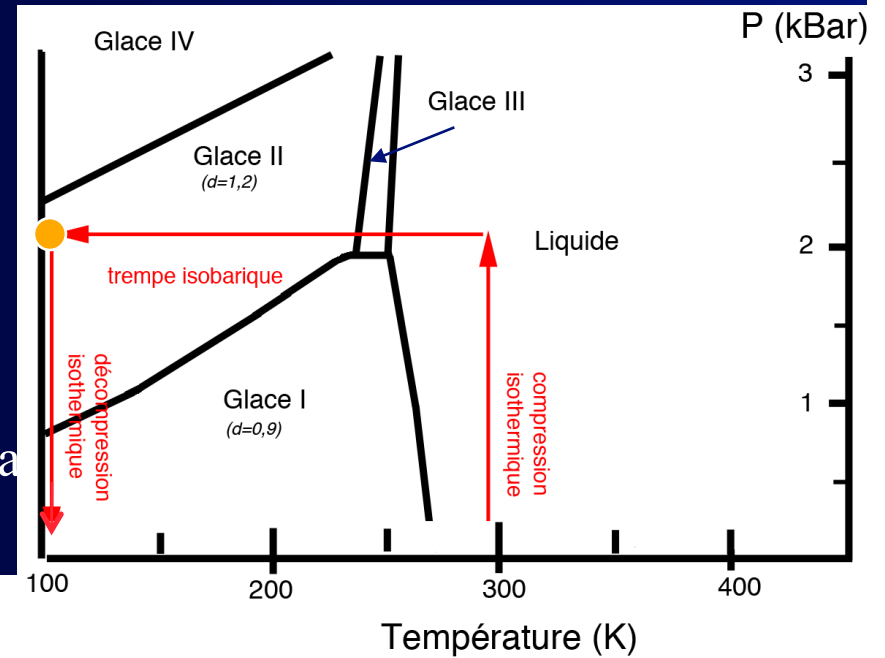
Tableau de
pressurisation



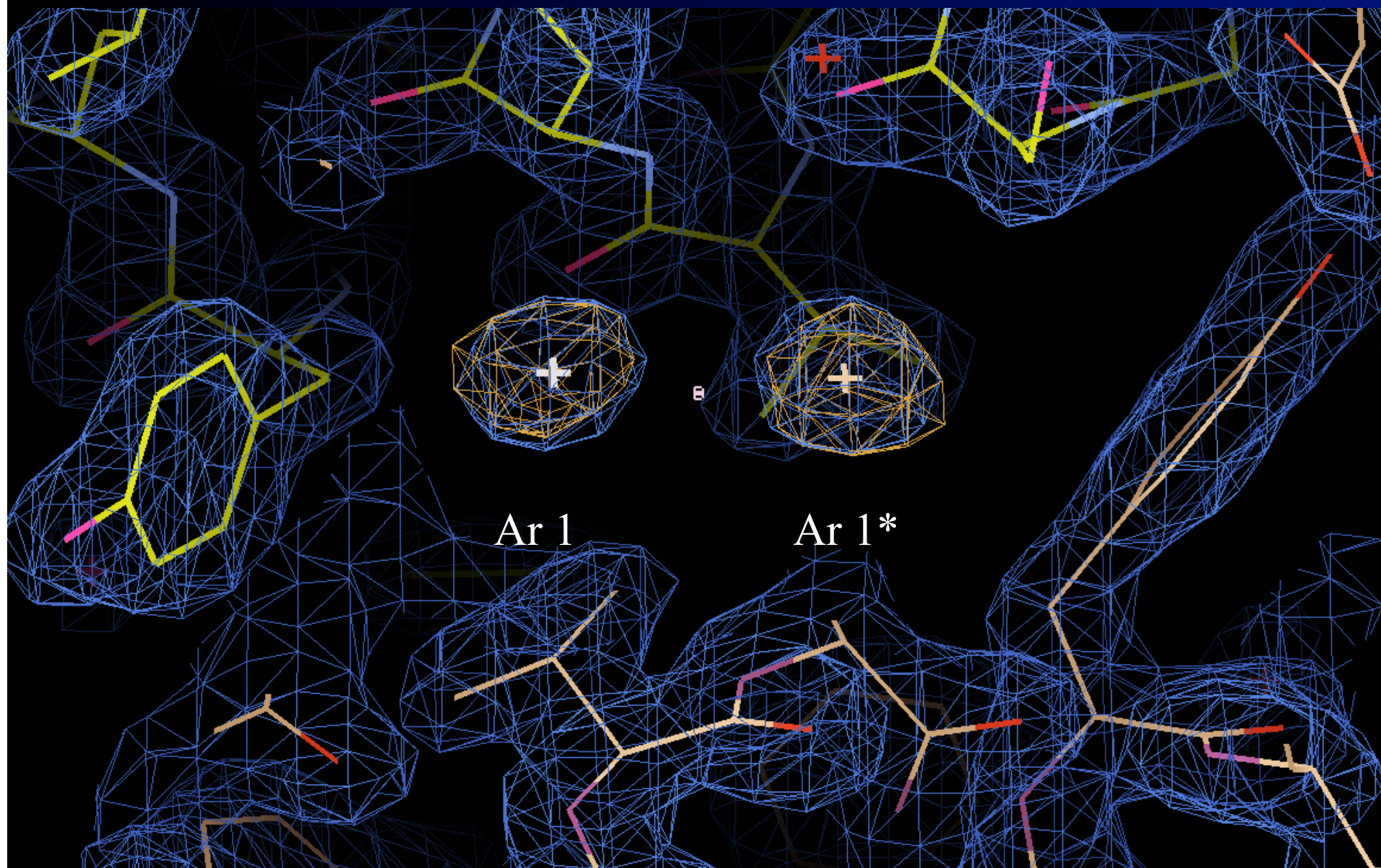
ARGON 2 KBAR - METHODOLOGIE

Étapes:

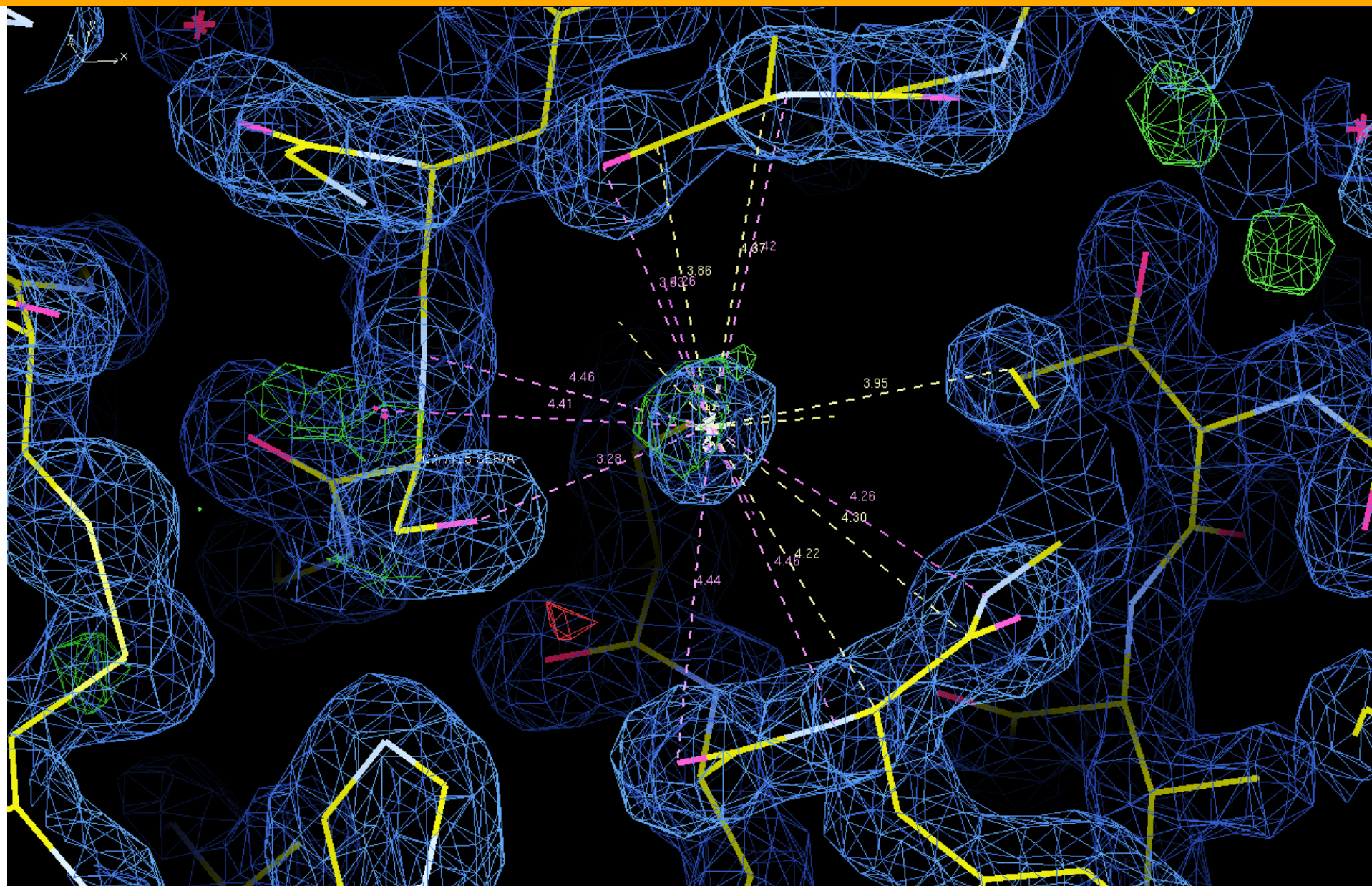
- ① "Pêche" du cristal ((293 K, 1 bar),
 - ② Chargement dans le tube pression, (293 K)
 - ③ Pressurisation (293 K, 2 kbar),
 - ④ Chute du cristal (77-110 K, 2 kbar),
 - ⑤(E) Relâche de la pression (77-110 K, 1 bar)
 - ⑥(F) Récupération du cristal et montage pour tra
- synchrotron (100 K)



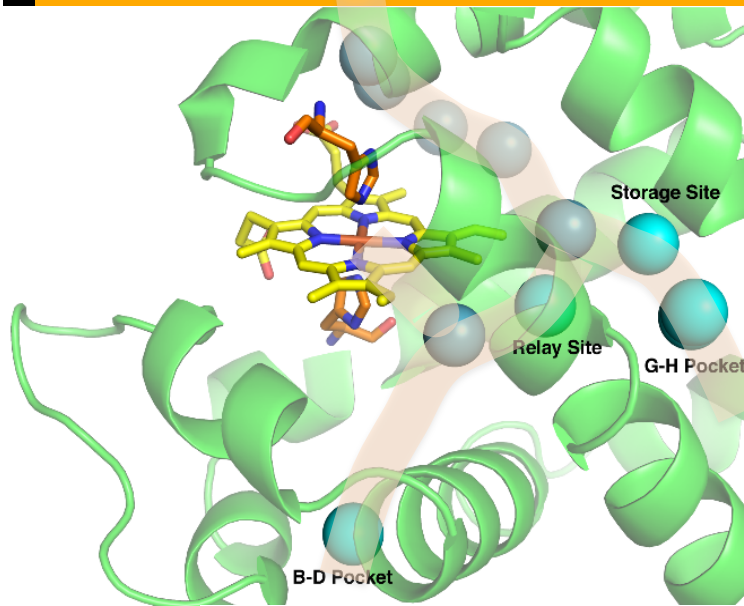
Insuline /argon $\longrightarrow$ pouvoir de phasage : $6 S + 1 Ar = 125 \%$



APPLICATION : INTERACTIONS ELASTASE-ARGON(40 BAR) : INHIBITION ENZYMATIQUE



APPLICATION : TRAFFIC DE L'OXYGÈNE - NEUROGLOBINE



① krypton = 100 bar :

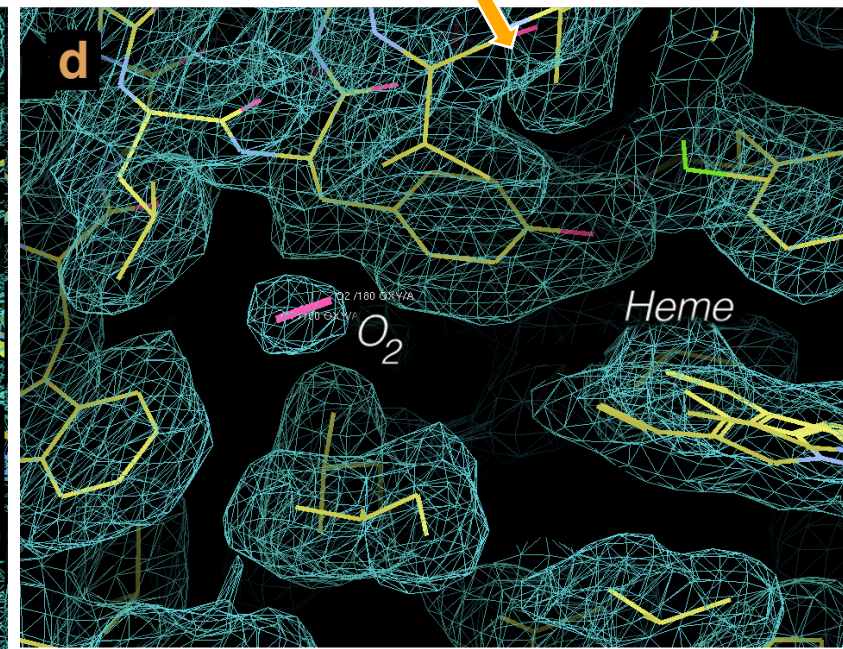
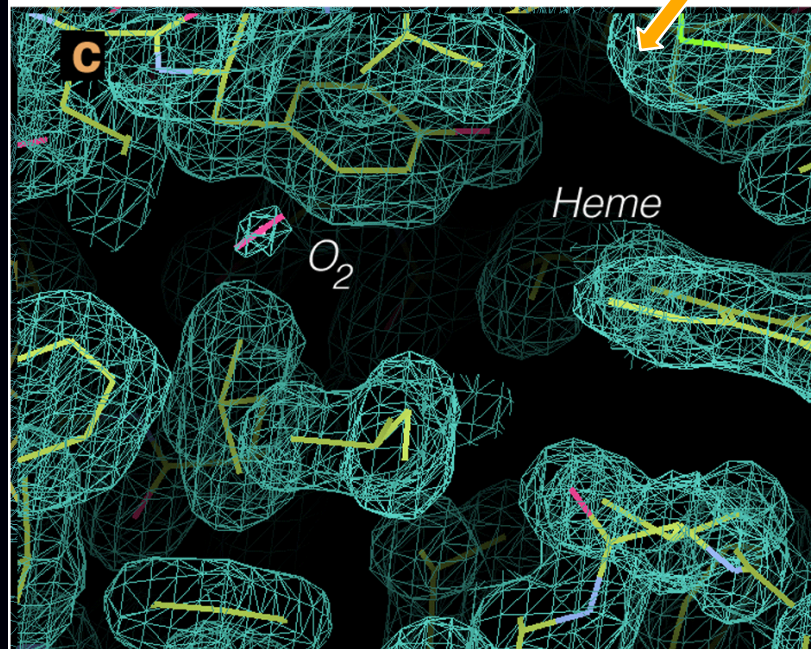
☞ Mise en évidence des tunnels

② Oxygène > 20 bar :

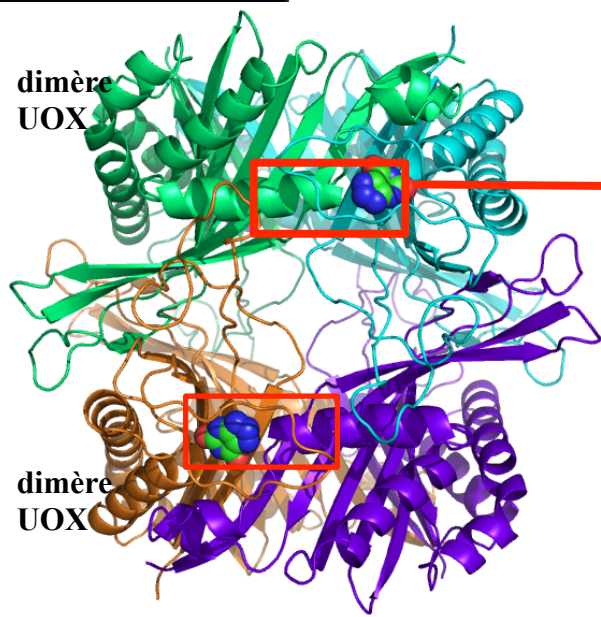
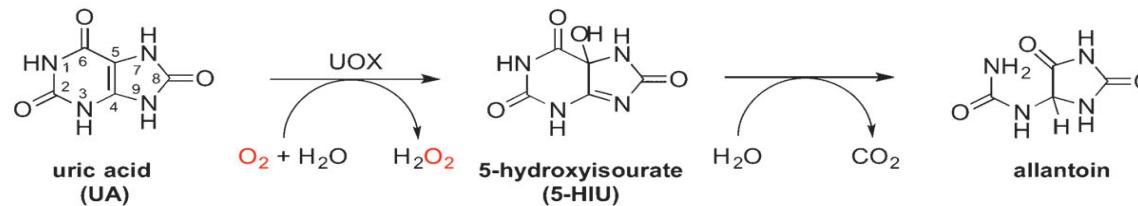
☞ Mise en évidence du site de stockage

30 bar

80 bar

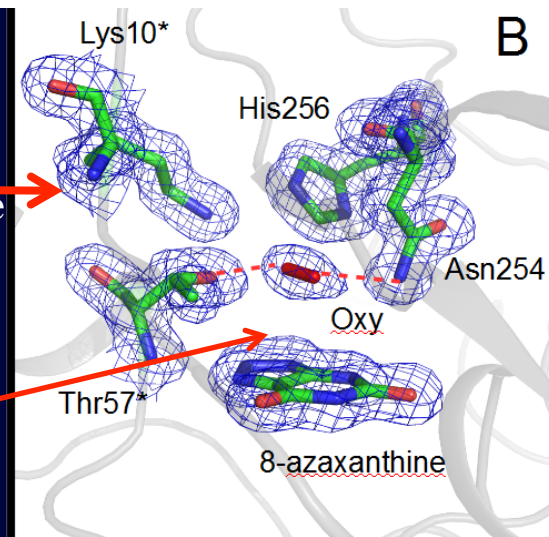


APPLICATION : TRAFFIC DE L'OXYGÈNE – URATE OXYDASE



site actif =
interface dimère

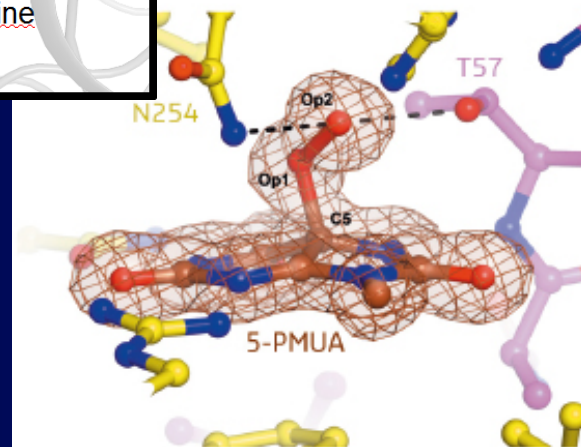
O₂



UOX-O₂ structure
à 42 bar d'O₂
(Omit map)

Urate oxydase = absente chez l'homme. Utilisée dans le traitement de l'hyper-urémie en chimiothérapie

La méthode "Soak and freeze" indique le site de fixation de O₂
→ révèle aussi le mécanisme de la conversion de O₂ en H₂O₂
(intermédiaire hydro peroxyde que l'on isole)



Angew Chem. Int. Ed. 53, 13710 (2014)

Remerciements

Peter van der LINDEN

ESRF, Grenoble



Philippe CARPENTIER

ESRF, CEA Grenoble



Nathalie COLLOC'H

ISTCT, Caen



Fín

Un peu de théorie



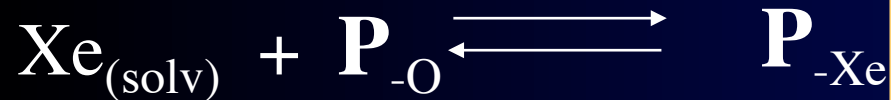
$$P_{\text{Xe(gaz)}} = h_{\text{Xe}}^{(\text{T})} \cdot X_{\text{Xe(solv)}}$$

$\Rightarrow$ *Loi de Henry*

$P_{\text{Xe(gaz)}}$ = pression partielle
du xénon à l'équilibre

$h_{\text{Xe}}^{(\text{T})}$ = constante de Henry

$X_{\text{Xe(solv)}}$ = Fraction molaire
du xénon dissous



$\Rightarrow$ *Loi d'action de masse*

$\text{P}_{-\text{O}}$ = Site libre dans la Protéine

$\text{P}_{-\text{Xe}}$ = Site occupé (xénon)

X : fraction molaire

N : nb. de moles

Loi d'action de masse :

$$K_{(T)} = \frac{X_{P-Xe}}{X_{xe(solv)} \cdot X_{P-0}} = \frac{N_{P-Xe}}{X_{xe(solv)} \cdot N_{P-0}} = \frac{N_{P-Xe}}{X_{xe(solv)} \cdot (N_p^{tot} - N_{P-Xe})}$$

nb. total de mole de protéine.

*facteur d'occupation
du site :*

$$\frac{N_{P-Xe}}{N_P^{tot}} = \frac{\lambda_{(T)} \cdot P_{xe(gaz)}}{1 + \lambda_{(T)} \cdot P_{xe(gaz)}}$$

$$\lambda_{(T)} = \frac{K_{(T)}}{h_{Xe}^{(T)}}$$

Isotherme de Langmuir