

Université Joseph Fourier – Grenoble 1  
Ecole Doctorale de Physique

## **THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 5 décembre 2007 par

**Marion JASNIN**

Pour obtenir le titre de

**Docteur en Sciences**

de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

**Spécialité : Biophysique**

---

La dynamique intracellulaire explorée par marquage isotopique et  
diffusion incohérente de neutrons

Intracellular dynamics studied by isotope labelling and incoherent  
neutron scattering

---

Composition du jury:

Dr. Marie-Claire Bellissent-Funel	Rapporteur
Dr. Alessandro Paciaroni	Rapporteur
Dr. Denis Le Bihan	Examineur
Dr. Ruediger E. Lechner	Examineur
Prof. Judith Peters	Examineur
Dr. Moeava Tehei	Co-Directeur de thèse
Dr. Giuseppe Zaccai	Directeur de thèse

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale  
Jean-Pierre Ebel (CEA-CNRS-UJF), Grenoble



## Remerciements

Je me souviens encore de cette journée d'août 2004 où je suis venue à l'IBS rencontrer Joe Zaccai, radieux et enthousiaste, qui donnait une saveur inoubliable aux projets qu'il évoquait. Ce jour-là, j'ai su que je ferais ma thèse à tes côtés, cher Joe, et c'est une des plus belles choses qui me soit arrivée. Et puis, il y eut l'arrivée de Moeava Tehei, après son post-doc en Nouvelle-Zélande. Moeava qui m'a prise sous son aile et m'a appris, petit à petit, les ficelles des manip neutrons. A votre contact, je suis tombée sous le charme de cette petite particule aux propriétés exceptionnelles pour la biologie... Biologie que j'ai découvert dans l'environnement chaleureux et riche en apprentissage du LBM, et grâce à la rencontre avec Martine Moulin et Michael Haertlein au DLAB de l'ILL, quelques mois après mon arrivée au LBM. Nous allions alors commencer une collaboration qui durerait bien plus longtemps que prévue. Nouvelles rencontres en octobre 2006 à Roscoff, avec Marie-Claire Bellissent-Funel, Rued Lechner et Denis Le Bihan, lors de la conférence sur l'« eau dans les milieux biologiques ». Rencontres qui ont inspiré une grande partie de mes résultats de thèse. Je présentais quelques mois plus tard une partie de ces résultats au workshop « Proteins at work » organisé par Alessandro Paciaroni, à Perugia. Ces rencontres menèrent au 5 décembre 2007, où j'ai soutenu ma thèse après trois années de recherche dans un environnement exceptionnel à tout point de vue...

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Marie-Claire Bellissent-Funel, Alessandro Paciaroni, Judith Peters, Denis Le Bihan et Rued Lechner, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et de m'avoir fait profiter de votre expérience. Par vos conseils et votre présence, vous avez éclairé ce travail de thèse d'une lumière toute particulière.

Je voudrais remercier du fond de mon cœur, Joe Zaccai, de m'avoir aidée à réaliser ces projets ambitieux, en me soutenant dans chacune de mes initiatives, en me guidant avec cœur et intelligence. Merci pour ta disponibilité, ta confiance et ta bonté, de m'avoir transmis si souvent ton savoir. Chaque jour à tes côtés fut une découverte, une inspiration et une joie des moments partagés.

Je voudrais remercier chaleureusement Moeava Tehei, de m'avoir transmis son savoir-faire avec patience, et ce sens de la minutie qui le caractérise si bien. Merci de m'avoir guidée dans ces nombreuses directions de recherche et d'avoir participé à chacune de leurs réalisations. Pour ta constance, quelques soient les difficultés, qui t'aide à appréhender chaque situation avec force et recul, qui fait de toi le plus solide des soutiens. Et un ami qu'il fait bon avoir à ses côtés...

Merci à Michael Haertlein, d'avoir soutenu nos projets, et pour toutes les discussions scientifiques riches en apprentissage. De m'avoir accueillie avec bonté au DLAB et de m'avoir confiée aux bons soins de Martine.

Merci à Martine Moulin, pour son encadrement sûr, et son investissement dans tous les projets que nous avons réalisés ensemble. De m'avoir fait découvrir la richesse du travail de labo, et inspirée confiance même dans les manip les plus difficiles. Ces années à tes côtés furent une grande source d'apprentissage et d'épanouissement. Merci pour ta générosité et ton attention envers les autres, ton soutien et ta confiance. De m'avoir aidée à grandir et à m'épanouir...

Merci à Bruno Franzetti, pour les nombreuses discussions et le plaisir des manip communes sur les cellules halophiles. Pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci à Katy Wood, qui m'a montrée le chemin et a toujours été disponible pour un conseil ou une aide.

A Frank Gabel, Elisa Fabiani et Andreas Stadler, pour les riches discussions sur la diffusion de neutrons et leur présence dans le groupe de Joe.

Merci à Christine Ebel pour son soutien et son aide dans les mesures de centrifugation analytique, et de m'avoir tenue si bonne compagnie de très nombreux soirs grâce à la proximité de nos bureaux.

Merci à David Lemaire pour son enthousiasme et sa gentillesse, et son aide dans les mesures de spectrométrie de masse.

Merci à tout le DLAB pour son accueil chaleureux: à JB, Marithé, Val, Shirley, Phil, Suzanna, Estelle et Trevor. A Annie pour ses petits coups de pouce à l'EMBL.

Merci à David C. pour sa lumière et sa générosité, à Paolo pour la saveur de l'Italie.

A Marek Koza et Steve Jenkins, qui m'ont toujours bien accueillie et aidée sur IN6, à Francesca Natali, Judith Peters et Sébastien Vial, pour leur soutien sur IN13 et les portes échantillons généreusement prêtés, à Bernhard Frick et Lambert Van Eijck, pour leur aide précieuse sur IN16, à Stéphane Rols pour son savoir faire avec les routines de l'ILL, à Mark Telling, à ISIS, et Martine Heinrich, au Forschungszentrum de Jülich, pour leur disponibilité et leur aide.

Un chaleureux merci à Jean Muller, Stéphane Pignard et Etienne Pernot pour leur soutien et leur aide dans les enseignements à l'ENSPG, et le plaisir de travailler à leurs côtés.

Je voudrais également remercier du fond de mon coeur tout le LBM, pour son atmosphère bienveillante où j'ai été heureuse de réaliser ma thèse. Merci à Nico C. pour sa présence apaisante et son écoute, à Fred pour sa gentillesse et ses conseils de langue anglaise, à Jacques pour la magie insufflée, à Martin pour ses petits mots de soutien qui réchauffent le coeur, à Eva pour les délicieuses petites pauses gâteaux, à Benoît pour ses talents de conteur inégalés, à Etienne pour sa douceur et son attention, à Manu, Renata, Antonina et Izabella, pour les moments complices, à Domi M. pour son enthousiasme communicatif, à Asun et à ses savoureuses tortillas, à Mylène pour sa joie de vivre, au dynamisme d'Aline, à Marcus pour sa bonté et ses succulents cookies au chocolat blanc, à Domi R. pour ses bons soins, à Wisia et à ses conseils affûtés. Merci pour ces années ensoleillées à vos côtés...

Un petit clin d'œil aussi à Charles, Philippe, Tom, Ben, Romain et Elo, qu'il fut bon de croiser au détour des LMES, LCCP et LEM.

Mes pensées s'envolent alors vers tous les amis sans lesquels la route ne serait pas aussi douce...

A Cécile et Fabrice, Vass et Thierry, Ruben, Pascal, David S., Antoine, Deul Le, Victor, Mario, Amandine, Aurore, Emiliane et Pierre, Anne et Joe H., à tous les moments partagés au fil des années...

A Aude et Marc, à notre rencontre à Hercules 2006 et à celles qui suivirent...

A Christelle et Nico C., à nos longues discussions et aux inoubliables fêtes

A Nico Ch., Seb et Mélie, Guigui et Fanny, Emilie, Yannick et Sophie, Aude, à nos immanquables restos

A Coco et Géd, Mimie, So et Tom, à nos 26 décembre

A Heather, à Thunder Bay sous les étoiles...

... Et, finalement, de tendres pensées rejoignent mes parents, Bat, et Anny, Angélique, Miguel et le petit Tristan, Monique et Bernard... Merci pour votre soutien au fil des années, votre présence à mes côtés, votre confiance...

## Table des matières

<b>1</b>	<b>La dynamique intracellulaire explorée par diffusion de neutrons</b>	<b>5</b>
1.1	Introduction générale.....	5
1.2	Cartographie de la dynamique intracellulaire.....	8
1.2.1	Un environnement intracellulaire fortement encombré.....	9
1.2.2	<i>E. coli</i> , une bactérie bien caractérisée.....	11
1.2.3	La dynamique intracellulaire par marquage isotopique.....	14
<b>2</b>	<b>La dynamique des molécules biologiques par diffusion de neutrons</b>	<b>17</b>
2.1	Le paysage dynamique des molécules biologiques.....	17
2.1.1	Les mouvements internes dans les macromolécules biologiques .....	17
2.1.2	La diffusion de l'eau dans les systèmes biologiques.....	19
2.2	Introduction aux neutrons thermiques et froids.....	20
2.2.1	Propriétés des neutrons.....	20
2.2.2	Longueur de diffusion et section efficace.....	21
2.2.3	Diffusion cohérente et diffusion incohérente.....	21
2.2.4	Les grandeurs mesurées en dynamique.....	23
2.3	La diffusion incohérente de neutrons pour sonder la dynamique des molécules biologiques.....	25
2.3.1	Expériences résolues en énergie.....	26
2.3.2	Diffusion incohérente élastique, fluctuations carrées moyennes et résilience moyenne.....	27
2.3.3	Diffusion incohérente quasiélastique et mouvements diffusifs.....	29
2.3.4	Diffusion incohérente inélastique et mouvements vibrationnels.....	30
2.3.5	Analyse expérimentale de la dynamique.....	30
2.3.6	Instruments et traitement des données.....	31
	Les sources de neutrons.....	31
	Les spectromètres.....	33
	Les spectromètres à rétrodiffusion.....	33
	Les spectromètres à temps-de-vol.....	34
	Traitement des données expérimentales.....	35

2.3.7	Bioneutronique: la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines (article).....	36
<b>3</b>	<b>Down to intracellular water dynamics in living organisms</b>	<b>45</b>
3.1	<i>In vivo</i> measurement of intracellular water dynamics in <i>E. coli</i> (article).....	47
3.1.1	Introduction.....	47
3.1.2	Methods.....	48
	Sample preparation.....	48
	Neutron measurements.....	48
	Data analysis .....	49
3.1.3	Results.....	50
3.1.4	Discussion.....	54
3.1.5	Further discussion ( <i>not included in the article</i> ).....	55
3.1.6	References.....	57
3.2	Conclusion & Perspectives for future work.....	59
<b>4</b>	<b>Internal and global macromolecular motions in <i>E. coli</i></b>	<b>63</b>
4.1	<i>In vivo</i> measurement of internal and global macromolecular motions in <i>E. coli</i> (article).....	65
4.1.1	Introduction.....	65
4.1.2	Materials and Methods.....	67
	Sample preparation.....	67
	Neutron scattering measurements.....	67
	Incoherent neutron scattering from living cells.....	68
	Separation of the diffusive motions using QENS .....	68
	Data analysis.....	69
4.1.3	Results and Discussion.....	70
	Internal motions in living cells by QENS.....	70
	Fast internal motions.....	71
	Slow internal motions.....	74
	Very slow internal motions and macromolecular self-diffusion.....	76
	Influence of the cell environment on macromolecular dynamics.....	79
4.1.4	References.....	81
4.2	Conclusion.....	84

<b>5</b>	<b>Solvent isotope effect on macromolecular dynamics in <i>E. coli</i></b>	<b>87</b>
5.1	Solvent isotope effect on macromolecular dynamics in <i>E. coli</i> (article).....	88
5.1.1	Introduction.....	88
5.1.2	Methods.....	90
	Sample preparation.....	90
	Neutron measurements and data analysis.....	90
	Elastic incoherent neutron scattering.....	90
	Neutron scattering experiments and analysis.....	91
5.1.3	Results and Discussion.....	92
5.1.4	References.....	96
5.2	Conclusion.....	99
<b>6</b>	<b>Dynamique de l'ARN <i>in vivo</i>, par marquage isotopique et diffusion incohérente de neutrons</b>	<b>101</b>
6.1	Matériels et méthodes.....	101
6.1.1	Protocole d'hydrogénation de l'ARN cellulaire.....	101
6.1.2	Taux de marquage dans l'ARN et les protéines cellulaires.....	102
	Taux de marquage dans l'ARN par centrifugation analytique.....	102
	Matériels et méthodes.....	102
	Résultats.....	104
	Taux de deutériation dans les protéines par spectrométrie de masse	106
	Matériels et méthodes.....	106
	Résultats.....	107
	Signal incohérent attendu pour l'ARN cellulaire.....	108
6.2	Mesures élastiques sur IN13.....	111
6.2.1	Matériels et méthodes.....	111
	Préparation des échantillons.....	111
	Expériences de diffusion de neutrons.....	111
6.2.2	Résultats.....	112
	Signal provenant de l'ARN cellulaire.....	112
	Influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire....	115
6.3	Conclusion.....	117

<b>7</b>	<b>Conclusion Générale &amp; Perspectives</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Annexe 1: Publications</b>	<b>123</b>
	8.1 Down to atomic-scale intracellular water dynamics.....	124
	8.2 <i>In vivo</i> measurement of internal and global macromolecular motions in <i>E. coli</i> ..	129
	8.3 Solvent isotope effect on macromolecular dynamics in <i>E. coli</i> .....	137
<b>9</b>	<b>Annexe 2: Milieu de culture Enfors</b>	<b>143</b>
<b>10</b>	<b>Annexe 3: Protocole d'hydrogénation de l'ARN dans des cellules <i>E. coli</i> deutériées</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>Annexe 4: Masse moléculaire de la myoglobine sans méthionine N-terminale</b>	<b>147</b>
<b>12</b>	<b>Annexe 5: Sections efficaces incohérentes des acides aminés et des nucléotides dans des cellules <i>E. coli</i> natives et deutériées</b>	<b>149</b>
<b>13</b>	<b>Annexe 6: Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism (article)</b>	<b>153</b>
<b>14</b>	<b>Abréviations</b>	<b>161</b>
<b>15</b>	<b>Abbreviations</b>	<b>163</b>
<b>16</b>	<b>Références</b>	<b>165</b>



# *1 LA DYNAMIQUE INTRACELLULAIRE EXPLORÉE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS*

Cette thèse est le résultat d'une collaboration entre le Laboratoire de Biophysique Moléculaire (LBM) de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) et le Laboratoire de Deutériation (DLAB) de l'Institut Laue Langevin (ILL), à Grenoble, France. Le travail a été effectué sous la direction de Giuseppe Zaccai, à l'IBS/ILL, et de Moeava Tehei, à l'ILL. Les échantillons ont été préparés au DLAB avec le concours de Martine Moulin et Michael Haertlein, qui ont encadré la mise en place des protocoles et la préparation des échantillons. Les mesures de diffusion de neutrons ont été réalisées à l'ILL et à ISIS, Chilton, Royaume Uni.

## **1.1 Introduction Générale**

Les macromolécules biologiques sont des systèmes dynamiques, animés par une grande variété de mouvements (Fitter et al., 1996a; Linderström-Lang and Scheliman, 1959). Ces mouvements s'étalent sur des gammes de temps allant de la femtoseconde à la seconde, avec des amplitudes comprises entre le centième d'Ångström et la centaine d'Ångström (Mc Cammon and Harvey, 1987). Le complexe paysage dynamique des macromolécules se traduit par une diversité de géométries de mouvements et d'énergies associées. Frauenfelder et collaborateurs ont introduit la notion de sous-états conformationnels, séparés par des barrières énergétiques, pour décrire les différentes structures possibles pour les protéines (Frauenfelder et al., 1988; Frauenfelder et al., 1991). Chaque sous-état est lui-même une combinaison de sous-états séparés par d'infimes changements structuraux et accessibles via des mouvements de faible énergie (Fenimore et al., 2004). Les mouvements moléculaires qui se produisent sur des temps allant de la pico- à la nanoseconde (ps-ns), avec des amplitudes de l'ordre de l'Ångström, constituent les 'mouvements élémentaires' à l'origine des changements conformationnels de plus grandes amplitudes qui se produisent sur des temps plus longs (Brooks et al., 1988).

En amont de ces mouvements moléculaires, se trouvent les forces qui soutendent les structures et conditionnent les mouvements. Ces forces regroupent les liaisons d'hydrogène, les interactions de van des Waals, l'interaction hydrophobe ou encore les interactions électrostatiques. Elles sont dites 'faibles', car elles ont des énergies associées de l'ordre de l'énergie thermique. L'étude de la dynamique moléculaire, *i.e.* la dynamique mesurée sur des temps allant de la ps à la ns avec des amplitudes de fluctuations de l'ordre de l'Angström, correspond à l'étude de ces forces de cohésion. Elle permet de remonter aux mouvements moléculaires.

La diffusion incohérente de neutrons est une technique expérimentale de choix pour étudier la dynamique moléculaire au sein de systèmes biologiques. Les neutrons thermiques et les neutrons froids présentent des énergies et longueurs d'onde qui correspondent aux énergies et amplitudes des mouvements moléculaires, respectivement. La technique est sensible aux mouvements des atomes d'hydrogène, qui sont répartis uniformément au sein des structures biologiques et représentent près de la moitié des atomes présents dans les structures. Sur les gammes de temps et échelles de longueur accessibles par la diffusion de neutrons, les atomes d'hydrogène retracent les mouvements des groupements chimiques auxquels ils sont liés, comme par exemple les chaînes latérales des acides aminés. Par ailleurs, il est possible de renforcer ou de masquer le signal provenant d'une partie du système en ayant recours à la deutériation spécifique. Le deutérium ( $^2\text{H}$ ), isotope de l'hydrogène comportant un neutron en plus du proton dans son noyau, a un signal incohérent très faible devant celui de  $^1\text{H}$ . Le remplacement des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium permet de masquer le signal incohérent des parties deutériées et d'accéder à la dynamique spécifique des parties hydrogénées de systèmes complexes. La deutériation spécifique fut largement utilisée au cours de la thèse, grâce à une étroite collaboration avec le DLAB à l'ILL. Les échantillons ont nécessité l'utilisation d'eau lourde et de constituants deutériés, au coût important, et ont été financé par le programme de financement du DLAB.

L'étude de la dynamique moléculaire au sein de cellules vivantes, appelée par la suite 'dynamique intracellulaire', constitue une étape clef dans la compréhension du fonctionnement des systèmes vivants. Si les études expérimentales sur systèmes purifiés en poudre ou en solution permettent d'extraire des caractéristiques fondamentales de la dynamique moléculaire, il n'est pas possible d'étendre les résultats obtenus *in vitro* à ceux attendus dans l'environnement physiologique. Les conditions d'hydratation ou encore de concentration affectent fortement le comportement dynamique des macromolécules (voir par exemple la revue de (Gabel et al., 2002)). *Escherichia coli* (*E. coli*) fait partie des bactéries les mieux

caractérisées à ce jour, qui présente l'avantage de pouvoir se diviser et vivre dans des milieux partiellement à complètement deutériés. Elle constitue un système privilégié permettant d'étudier la dynamique intracellulaire en combinant la diffusion incohérente de neutrons et le marquage isotopique. L'objectif de la thèse était de mettre en œuvre ces deux techniques afin de poser les bases permettant de réaliser une 'cartographie dynamique' de la cellule *in vivo*. Il s'agissait, d'une part, de focaliser sur les mouvements spécifiques aux différentes (macro)molécules présentes dans la cellule, et, d'autre part, de parcourir et d'étudier les différents types de mouvements moléculaires possibles au sein d'un même type de macromolécule.

Ce premier chapitre d'introduction présente l'enjeu principal de la thèse, à savoir étudier la dynamique des molécules biologiques au sein de cellules vivantes, en vue d'apporter un éclairage nouveau sur la dynamique moléculaire. Il revient sur la notion d'encombrement macromoléculaire et sur ses implications, et présente le système d'étude, la bactérie *E. coli*, utilisée pour les expériences de diffusion incohérente de neutrons sur cellules entières. Il montre enfin la force de la technique, combinée au marquage isotopique, pour étudier la dynamique intracellulaire et élargir la connaissance des systèmes vivants.

Le deuxième chapitre fait le lien entre les mouvements présents dans les molécules biologiques, et les mouvements accessibles par l'intermédiaire de la technique de diffusion incohérente de neutrons. Il introduit le paysage dynamique des macromolécules biologiques, avec les différentes échelles de temps et de longueur associées. Il présente les neutrons thermiques et froids, et leurs propriétés d'interaction avec la matière; il focalise finalement sur la diffusion incohérente et sur ses différentes utilisations possibles pour étudier des mouvements spécifiques au sein des macromolécules biologiques. Le chapitre se termine par un article de vulgarisation scientifique qui présente les bases de la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines. L'article résume en langage accessible au non spécialiste les idées clefs présentées au cours du chapitre.

Le troisième chapitre de la thèse, basé sur un article examiné par *Physical Review Letters*, élucide la dynamique de l'eau dans le cytoplasme d'*E. coli*. Les mouvements diffusifs de l'eau (H<sub>2</sub>O) intracellulaire furent explorés au sein de cellules entièrement deutériées, afin de mettre à profit l'utilisation du marquage isotopique pour renforcer le signal de l'eau.

Le quatrième chapitre repose sur un article publié dans *Biophysical Journal*, qui décrit une étude quasiélastique sur les mouvements internes et globaux dans les macromolécules d'*E. coli*. Il propose une comparaison avec des travaux précédents réalisés sur

des systèmes purifiés ou en solution, et révèle l'influence de l'environnement cellulaire, en particulier celle de l'eau cellulaire ou encore de l'encombrement macromoléculaire, sur la dynamique interne des macromolécules.

Le cinquième chapitre est basé sur un article publié dans *European Biophysical Journal*, qui explore la dépendance en fonction du solvant de la dynamique macromoléculaire moyenne *in vivo*, par diffusion élastique de neutrons. Les amplitudes de fluctuations carrées moyennes, qui quantifient la flexibilité macromoléculaire moyenne, et les constantes de force effectives, associées à la rigidité structurale encore appelée résilience, furent évaluées au sein de cellules *E. coli* contenant du H<sub>2</sub>O ou du D<sub>2</sub>O, respectivement.

Le sixième chapitre présente finalement une approche basée sur la deutériation spécifique visant à extraire la dynamique de l'ARN du signal mesuré dans *E. coli*. Il détaille le protocole mis au point au DLAB avec Martine Moulin et Michael Haertlein pour hydrogéner spécifiquement l'ARN dans des bactéries *E. coli* deutériées. Il expose les mesures de taux de marquage dans l'ARN, d'une part, et dans les protéines, d'autre part, et retrace les mesures de diffusion de neutrons réalisées sur les cellules sélectivement marquées. Le chapitre se termine par une discussion sur les limites expérimentales extraites de cette étude, et commente l'influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire.

Le dernier chapitre résume les résultats principaux, les conclusions et les perspectives esquissées.

## **1.2 Cartographie de la dynamique intracellulaire**

Les macromolécules biologiques ont évolué pour être fonctionnelles à l'intérieur de cellules fortement encombrées par d'autres macromolécules et constituants cellulaires, formant des grands complexes quaternaires en interactions spécifiques et non spécifiques. La plupart des études expérimentales sur les molécules biologiques sont effectuées *in vitro*, sur des échantillons de poudres ou des solutions diluées, dans des conditions qui diffèrent des conditions physiologiques. Les études *in cellulo*, bien que difficiles à mettre en œuvre, revêtent l'intérêt fondamental de révéler l'influence de l'environnement cellulaire sur le fonctionnement des macromolécules, comme par exemple l'influence de l'encombrement macromoléculaire ou du niveau d'hydratation.

### 1.2.1 Un environnement intracellulaire fortement encombré

L'eau est le composant majeur de la cellule. Chez les procaryotes, elle représente près de 70 % du poids cellulaire (72 % chez *E. coli* d'après (Record et al., 1998)). Viennent ensuite les macromolécules, qui constituent 96 % du poids cellulaire sec chez *E. coli* par exemple, avec une contribution protéique majoritaire de 55 %, suivie par une contribution en ARN de 20.5 % (Madigan et al., 2000). L'intérieur de la cellule est caractérisé par une concentration macromoléculaire extrêmement élevée, qui génère des conditions de fort encombrement moléculaire, lié à des interactions spécifiques et non spécifiques. *E. coli* présente une concentration protéique intracellulaire qui s'élève à 200-320 mg/ml, pour une concentration en ARN comprise entre 70-120 mg/ml (Sundararaj et al., 2004). Le degré d'encombrement dans le cytoplasme d'*E. coli* est illustré schématiquement en Figure 1.

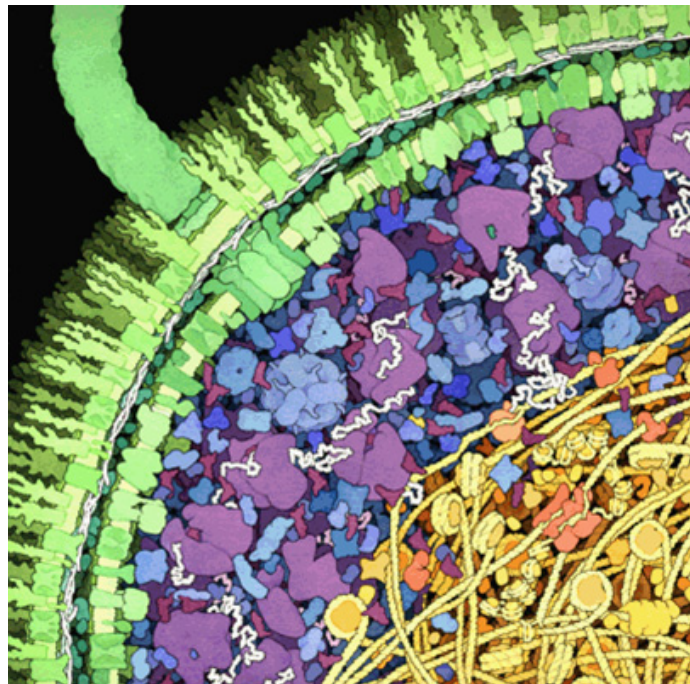


Figure 1: Représentation du degré d'encombrement dans le cytoplasme d'*E. coli* (Goodsell, 1993). La membrane, accompagnée d'un flagelle, est représentée en vert, le cytoplasme en bleu-violet et la partie nucléaire en jaune-orangé.

La notion d'« encombrement macromoléculaire » est issue du fait qu'une grande partie du volume cellulaire est occupé par les macromolécules, toutes espèces confondues. Chez les procaryotes, les macromolécules représentent entre 20 et 40 % du volume cellulaire (Ellis, 2001b; Ellis and Minton, 2003; Zimmerman and Minton, 1993). Afin de souligner la spécificité d'une grande partie des interactions, le terme « encombrement macromoléculaire

partiellement spécifique » permet de garder en mémoire la complexité de l'environnement cellulaire, qui diffère d'une solution encombrée de molécules, comme des polymères par exemple. L'encombrement macromoléculaire non spécifique est également appelé 'effet de volume exclu' car ses caractéristiques sont fortement influencées par l'incapacité des molécules à s'interpénétrer, qui se traduit par de fortes répulsions stériques (Ellis, 2001b; Zimmerman and Trach, 1991). Il donne lieu à deux effets contraires: d'une part, il favorise l'association des macromolécules, et, d'autre part, il réduit les coefficients de diffusion des molécules, en fonction de leur taille (Zimmerman and Minton, 1993). L'association macromoléculaire est favorisée du fait qu'elle augmente le volume accessible aux macromolécules présentes et diminue l'énergie libre totale du milieu (Ellis, 2001b). Les constantes d'équilibre des réactions biochimiques peuvent ainsi être augmentées jusqu'à 2 ou 3 ordres de grandeur, en fonction de la taille et de la forme des réactifs et produits, ainsi que des macromolécules présentes (Zimmerman and Trach, 1991). Les processus biologiques qui modifient le volume accessible ou dépendent d'associations non covalentes et/ou de changements conformationnels (synthèse et repliement des protéines et d'acides aminés (Martin and Hartl, 1997), signalisation cellulaire, expression des gènes, fonctionnement des systèmes mobiles) en sont, par conséquent, affectés. Par contre, l'encombrement macromoléculaire réduit les taux de diffusion moléculaires (Luby-Phelps, 2000; Zimmerman and Minton, 1993), en fonction de la taille des molécules. Les coefficients de diffusion des petites molécules (telle que la carboxyfluorescéine) comme des grandes (telle que la GFP, la protéine de fluorescence verte) ont été mesurés dans plusieurs types cellulaires; leurs valeurs sont réduites d'un facteur compris entre 3 et 10 par rapport aux valeurs mesurées en solution diluée (Doster and Longeville, 2007; Ellis, 2001a; Elowitz et al., 1999; Luby-Phelps, 2000). Comme les effets de l'encombrement macromoléculaire sur les taux de réaction résultent d'un fin équilibre entre deux effets contraires, ils restent complexes et propres à la nature de chaque réaction.

La majeure partie des études biochimiques et biophysiques sont réalisées en solution diluée, allant de quelques picomoles à quelques mg/ml, qui négligent les effets de l'encombrement macromoléculaire sur les processus étudiés. Ces effets restent encore peu étudiés, et sont principalement évalués grâce à l'ajout de fortes concentrations de particules (encore appelés « agents d'encombrement ») dans les solutions diluées, ainsi que par simulation. De telles solutions concentrées ne permettent pas de tenir compte de la spécificité des interactions qui caractérise l'« encombrement macromoléculaire partiellement spécifique » à l'intérieur de la cellule. Les études *in cellulo* sont souvent délicates à mettre en œuvre, mais

permettent de révéler l'influence de l'environnement cellulaire, avec toutes ses interactions spécifiques et non spécifiques, sur le fonctionnement de la cellule. Les processus biologiques qui dépendent d'associations non covalentes et/ou de changements conformationnels, sont affectés par l'encombrement macromoléculaire dans la cellule. Ces processus sont possibles grâce aux mouvements moléculaires sur des temps allant de la ps à la ns, comme nous le verrons par la suite. Des effets importants sont par conséquent attendus au niveau de la dynamique des macromolécules. Un des objets de la thèse était de soulever cette question, en sondant la dynamique moléculaire au sein de bactéries *E. coli*.

### 1.2.2 *E. coli*, une bactérie bien caractérisée

La bactérie *E. coli* revêt beaucoup d'avantages pour les mesures expérimentales, en particulier une grande simplicité de préparation et de composition. Elle comporte, en masse, 70 % d'eau et 29 % de macromolécules. Le Tableau 1 détaille le poids sec associé aux différentes macromolécules chez *E. coli*.

<b>Molécule</b>	<b>Poids sec (%)</b>
<b>Total des macromolécules</b>	<b>96</b>
Protéines	55
Polysaccharides	5
Lipides	9.1
Lipopolysaccharides	3.4
ADN	3.1
ARN	20.5
<b>Total des monomères</b>	<b>3</b>
Acides aminés et précurseurs	0.5
Sucres et précurseurs	2
Nucléotides et précurseurs	0.5
<b>Ions inorganiques</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>100</b>

Tableau 1. Composition chimique d'*E. coli*, tirée de (Madigan et al., 2000).

*E. coli* est une bactérie Gram négative appartenant à la famille des entérobactéries. C'est un des organismes les plus étudiés et les mieux caractérisés en biologie. On la trouve dans le colon et le grand intestin des êtres humains et de la plupart des animaux à sang chaud. Elle joue un rôle important dans l'anabolisme et le catabolisme des vertébrés (Sundararaj et al., 2004). En forme de bâtonnet, elle mesure environ 2  $\mu\text{m}$  de long et 0.8  $\mu\text{m}$  de large (Figure 2), et se divise toutes les trente minutes environ. Elle possède les structures suivantes: une membrane externe et une membrane interne (cytoplasmique), séparées par une paroi cellulaire et un périplasma, des flagelles et des *pili* (ou *fimbrae*), et un cytoplasme contenant le nucléoïde (chromosome), des corps d'inclusion, des ribosomes, polysomes et polyribosomes, des protéines, et des ions (Sundararaj et al., 2004).

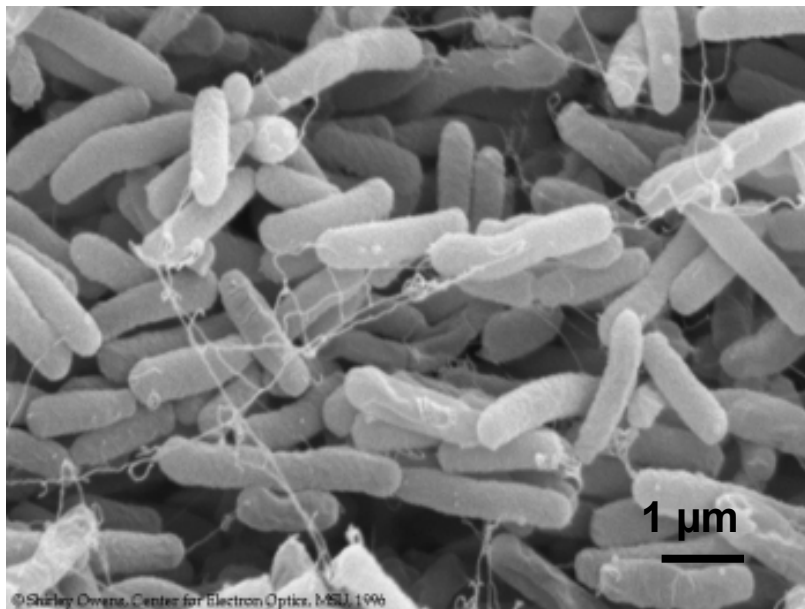


Figure 2: Image par microscopie électronique à balayage de bactéries *E. coli* (tiré de Shirley Owens, Center for Electron Optics, MSU)

En surface de la membrane externe se trouvent des flagelles (Figure 1). Les flagelles sont des appendices rigides en forme de vis (de 10 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur et 25 nm de largeur), qui tournent et permettent à la bactérie de se déplacer. Une bactérie peut contenir entre 5 et 20 flagelles, distribuées de façon uniforme à la surface de la membrane externe.

Les *pili* ou *fimbrae* sont de fins appendices d'environ 6.5 nm de diamètre et de 0.2 à 2  $\mu\text{m}$  de longueur. Une bactérie peut contenir entre 100 et 300 *pili*. Le terme *fimbrae* est utilisé pour les filaments impliqués dans l'attachement à une surface; le terme *pili* fait référence à des filaments utilisés pour l'attachement à d'autres cellules.



La membrane cellulaire externe, d'une largeur de 10 – 15 nm environ, consiste en une bicouche lipidique composée d'une couche externe contenant des lipopolysaccharide (LPS) et d'une couche interne composée de phospholipides (Figure 3). Elle constitue une barrière résistante aux éléments chimiques et composés hydrophobes tels que certains antibiotiques. La membrane externe comporte des protéines, essentiellement des porines, qui sont des canaux de diffusion sélectifs permettant à certaines molécules de passer à travers la membrane.

Le périplasma, d'environ 10 nm d'épaisseur, occupe entre 10 et 20 % du volume d'*E. coli*. Il correspond à l'espace entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique, et contient la paroi cellulaire (Figure 3). La paroi cellulaire est composée d'un peptidoglycane lié de façon covalente à la membrane externe. Le peptidoglycane est un polymère interconnecté de manière souple, composé de sucres et de peptides. Chez *E. coli*, il est très fin et souvent constitué d'une seule couche.

La membrane interne est une bicouche lipidique de 5-8 nm d'épaisseur, constituée à environ 40 % de phospholipides et 60 % de protéines (Figure 3). La membrane interne d'*E. coli* ne contient ni stérole, ni stéroïde (comme le cholestérole). Les bactéries mésophiles comme *E. coli* ont tendance à avoir des acides gras avec des chaînes courtes, et des acides gras insaturés qui maintiennent la fluidité de la membrane. La membrane interne sert notamment de barrière osmotique, de transporteur de nutriments, de synthétiseur de lipides et de peptidoglycane, et de transporteur d'électrons.

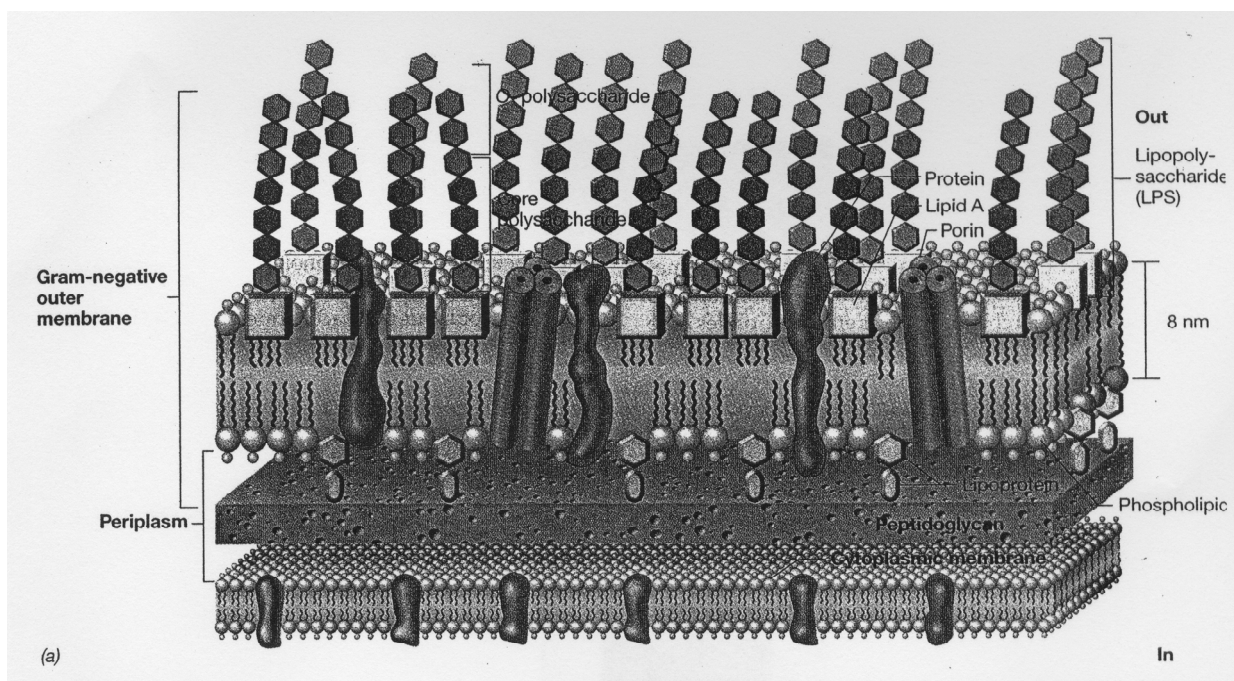


Figure 3. Représentation de la membrane externe, de la paroi cellulaire et de la membrane interne d'une bactérie Gram négative (Madigan et al., 2000).

Le cytoplasme, finalement, contient tous les autres composants d'*E. coli*. En particulier, les protéines, l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN), les ribosomes et polyribosomes, les corps d'inclusion, les petites molécules organiques et les ions. La région contenant le chromosome s'appelle le nucléoïde. Le chromosome mesure 1.55 mm de circonférence (0.49 mm de diamètre) et interagit avec des dizaines de milliers de protéines. Il est condensé en un corps, le nucléoïde, d'environ 17  $\mu\text{m}$  de diamètre (le nucléoïde comporte jusqu'à 2.3 chromosomes en fonction de la phase). Les ribosomes (70 S) sont composés de deux sous unités, la sous unité 30 S et la sous unité 50 S, constituées de protéines (37 %) et d'ARN (67 %). Les cellules procaryotes comme *E. coli* n'ont ni noyau ni autre organelle complexe, telles que le réticulum endoplasmique, comme c'est le cas pour les eucaryotes.

*E. coli* possède la particularité de pouvoir se reproduire dans un milieu partiellement ou entièrement deutérié. Elle permet ainsi de recourir au marquage isotopique, détaillé dans la partie suivante.

### **1.2.3 La dynamique intracellulaire par marquage isotopique**

Le chapitre 2 présentera en détail l'utilisation de la diffusion incohérente de neutrons pour sonder les mouvements moléculaires au sein de molécules biologiques. La technique a été largement employée sur des échantillons de poudres hydratées (Doster et al., 1989b; Ferrand et al., 1993; Fitter, 1999; Gabel et al., 2004; Paciaroni et al., 2002; Tehei et al., 2001), des solutions (Pérez et al., 1999; Tehei et al., 2006b) ou encore des empilements de membranes purifiées (Fitter et al., 1998; Fitter et al., 1996a; Fitter et al., 1996b; Fitter et al., 1997; Fitter et al., 1999b). En 2004, Tehei et collaborateurs ont établi que la diffusion de neutrons permettait également de sonder la dynamique macromoléculaire dans des organismes vivants, tels que des cellules entières de bactéries, du fait que la mesure reposait sur la diffusion incohérente (Tehei et al., 2004). Ils ont réalisé des expériences de diffusion élastique sur des bactéries psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles, en utilisant le spectromètre IN13 à l'ILL, qui possède des gammes de temps et de longueur associées aux fluctuations des chaînes latérales et principales dans les protéines. Les amplitudes de fluctuation moyennes (MSF) et la résilience macromoléculaire moyenne, dominées par la contribution protéique, ont été évaluées pour les quatre types de bactéries (Figure 4). Les valeurs obtenues pour les deux paramètres ont mis en lumière la sélection de forces augmentant la résilience structurale à haute température, tout en conservant la flexibilité nécessaire pour assurer l'activité. Autrement

dit, l'adaptation à la température s'est effectuée par la dynamique: l'évolution a sélectionné les forces nécessaires à la stabilité et aux mouvements fonctionnels à température physiologique.

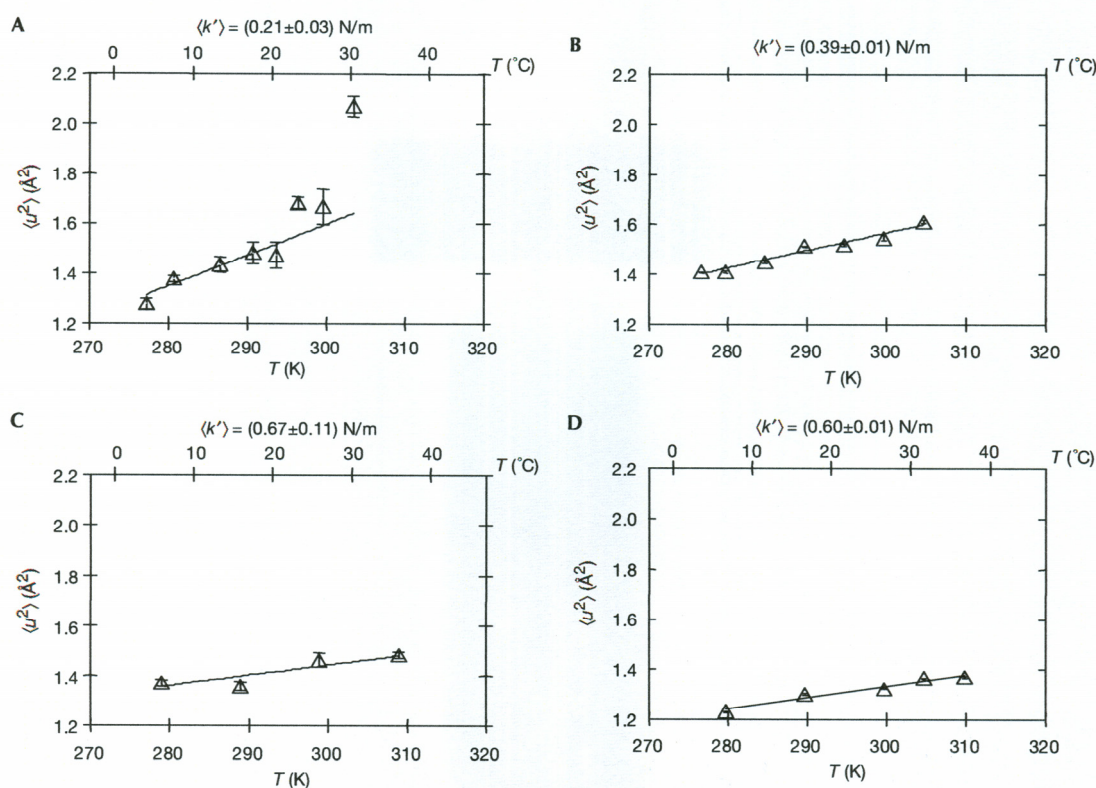


Figure 4. Evolution des MSF,  $\langle u^2 \rangle$ , et des résiliences,  $\langle k' \rangle$ , en fonction de la température pour des bactéries *A. arcticum* (A) psychrophiles, *P. mirabilis* (B) mésophiles, *T. thermophilus* (C) thermophiles et *A. pyrofilus* (D) hyperthermophiles (Tehei et al., 2004).

Cette étude, réalisée au LBM et à l'ILL, a constitué l'amorce d'une réflexion sur les possibilités offertes par la diffusion de neutrons pour étudier la dynamique macromoléculaire *in vivo*. Elle fut le point de départ de ce travail de thèse, dont l'enjeu fut d'aller plus loin dans la réflexion et la réalisation, en mettant en œuvre les différentes techniques spectroscopiques accessibles en diffusion de neutrons ainsi que l'utilisation du marquage isotopique.

L'effet isotopique très important existant entre l'hydrogène et le deutérium est une des clefs de voûte de la diffusion de neutrons. Le marquage isotopique permet de focaliser sur la dynamique d'une partie hydrogénée au sein d'un système complexe deutérié. Son utilisation pour les études de dynamique fut introduite par Réat et collaborateurs qui ont montré que l'on pouvait étudier la dynamique d'acides aminés sélectivement hydrogénés dans des membranes pourpres deutériées (Réat et al., 1998). Le protocole repose sur la culture de cellules *H. salinarum* dans du milieu deutérié implémenté avec des acides aminés hydrogénés. Il a

récemment permis de mettre en évidence des différences au niveau de la dynamique de plusieurs types d'acides aminés, qui pourraient être liées à des différences d'environnement ou de branchements dans la membrane (Wood, 2007). Le marquage isotopique a également été utilisé pour étudier le couplage dynamique entre l'eau d'hydratation et la membrane pourpre (Wood et al., 2007). La composante 'eau' fut explorée en utilisant des couches membranaires deutériées séparées par leurs couches d'eau (H<sub>2</sub>O) d'hydratation respectives; la composante 'membrane' fut extraite des mesures sur des membranes natives (abondance naturelle pour l'hydrogène et le deutérium) hydratées en D<sub>2</sub>O. Ces études mettent en lumière l'intérêt de la deutériation spécifique pour masquer les parties du système qui ne font pas l'objet de l'étude. Cependant, il est important de souligner qu'elle reste une technique coûteuse, qui requière la compétence d'experts. A ce jour, il n'existe que peu de laboratoires spécialisés dans le marquage isotopique de systèmes biologiques. Le DLAB de l'ILL fait partie de ces rares plateformes, qui permettent la préparation d'échantillons biologiques complexes sélectivement marqués.

Ce travail a conjugué le marquage isotopique et la diffusion incohérente de neutrons, en vue d'étendre l'étude de la dynamique intracellulaire amorcée par Tehei et collaborateurs (Tehei et al., 2004), à d'autres gammes de temps et types de mouvements, d'une part, et, d'autre part, d'identifier la dynamique de composants spécifiques de la cellule. Il propose une « cartographie dynamique » de la cellule, en explorant *in vivo* la dynamique de l'eau intracellulaire ainsi que celle des macromolécules, telles que les protéines ou l'ARN, sur de larges gammes de temps.

## **2 LA DYNAMIQUE DES MOLECULES BIOLOGIQUES EXPLOREE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS**

Ce chapitre présente les notions clefs de la diffusion de neutrons et son application à l'étude de la dynamique des molécules biologiques.

La dynamique consiste en l'étude des forces, qui soutendent les structures et conditionnent les mouvements moléculaires. Les mouvements moléculaires sont à l'origine de la flexibilité et de la malléabilité des systèmes biologiques, sous-jacentes à l'activité biologique. Le neutron est une particule élémentaire qui permet de sonder les propriétés de la matière, et en particulier la dynamique des molécules biologiques.

Le chapitre donne une description du vaste paysage dynamique des molécules biologiques, avec les différentes échelles de temps et de longueur associées. Il présente les propriétés de diffusion et d'interaction des neutrons avec la matière, et montre comment les neutrons thermiques et froids permettent d'accéder aux différents types de mouvements moléculaires et d'en extraire les paramètres associés. Le chapitre se termine par un article de vulgarisation scientifique qui présente les bases de la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines. L'article résume en langage accessible au non spécialiste les idées clefs présentées au cours du chapitre.

### **2.1 Le paysage dynamique des molécules biologiques**

#### **2.1.1 Les mouvements internes dans les macromolécules biologiques**

Les macromolécules biologiques sont des systèmes dynamiques, animés par une grande diversité de mouvements moléculaires (Brooks et al., 1988; Fitter et al., 1996a). Les mouvements explorés s'étendent sur des temps allant de la femtoseconde (phénomène de transfert d'électrons) à la seconde (dénaturation locale, transition allostérique, rotations des chaînes latérales enfouies), avec des amplitudes comprises entre le centième d'Ångström (vibration d'un atome dans la liaison covalente) et la centaine d'Ångström (courbure globale

des acides nucléiques). Une liste non exhaustive des amplitudes et fréquences de ces mouvements a été recensée par Mc Cammon et Harvey et est présentée dans le Tableau 1 (Mc Cammon and Harvey, 1987).

Type de mouvement	Echelle de temps	Amplitude (Å)
<u>Toutes les macromolécules</u>		
Vibration des atomes	10 fs – 10 ps	0.01 – 0.5
Libration des groupes enfouis	0.01 – 1 ns	0.5
Déplacements relatifs de domaines globulaires	0.01 – 100 ns	1 – 5
Transition allostérique	10 µs – s	1 – 5
Dénaturation locale	10 µs – s	5 – 10
<u>Acides nucléiques</u>		
Mouvements longitudinaux des bases en doubles hélices	10 – 100 fs	0.1
Mouvements latéraux des bases en doubles hélices	0.1 – 1 ps	1
Etirement global	0.1 – 10 ps	0.3 – 3
Torsion globale	0.1 – 10 ps	1 – 10
Changement de conformations dans les sucres	0.001 – 1 ns	2
Courbure globale	0.1 – 100 ns	50 – 200
<u>Protéines</u>		
Rotation des chaînes latérales de surface	10 – 100 ps	5 – 10
Rotations des chaînes latérales enfouies, de taille moyenne	0.1 ms – s	5

Tableau 1: Tiré de (Mc Cammon and Harvey, 1987). Amplitudes et échelles de temps des mouvements observables au sein des macromolécules biologiques.

La polydispersité dynamique dans les macromolécules biologiques correspond à une polydispersité de géométries de mouvement. Les mouvements internes peuvent être séparés en deux grandes catégories: les mouvements de type vibrationnel, où les atomes ou molécules fluctuent autour de leur position d'équilibre, et les mouvements de type diffusif. Cette dernière catégorie comprend un large panel de mouvements, allant de la diffusion continue d'un atome dans un espace plus ou moins confiné, en passant par les rotations uniaxiales apparentes de groupes moléculaires tels que les méthyles, aux mouvements réorientationnels aléatoires de grandes amplitudes des sous-unités moléculaires (tels que les chaînes latérales des acides aminés ou les chaînes d'acides gras). Les coefficients de diffusion sont compris entre  $10^{-9}$

$\text{cm}^2/\text{s}$  (diffusion latérale des lipides dans les membranes, réorientation des chaînes latérales) et  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  (diffusion des atomes dans des groupes moléculaires). La géométrie des mouvements est fortement influencée par l'environnement direct des atomes et leur ancrage à des entités plus grandes par l'intermédiaire des liaisons chimiques. Sur des temps supérieurs à la ps par exemple, les atomes acquièrent un mouvement collectif en raison de leur attachement aux atomes des chaînes principales (et latérales, dans le cas des protéines). Ainsi les échelles de temps et de longueur explorées lors des expériences joueront un rôle prépondérant dans la détermination du type de mouvement observé.

### **2.1.2 La diffusion de l'eau dans les systèmes biologiques**

La diffusion de l'eau en contact avec les macromolécules biologiques, également appelée « eau d'hydratation » ou « eau interfaciale », a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, par résonance magnétique nucléaire (RMN) et diffusion de neutrons. L'eau d'hydratation, mesurée dans des échantillons de poudres hydratées, des solutions ou encore des empilements de membranes purifiées, présente des coefficients de diffusion translationnelle compris entre  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  et  $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ , qui augmentent avec le degré d'hydratation (Bastos et al., 2004; Bellissent-Funel et al., 1996; Beta et al., 2003; Fitter et al., 1999a; Schreiner et al., 1988), ainsi que des temps de relaxation rotationnelle réduits d'un facteur 5 à 10 par rapport à ceux de l'eau libre (Fitter et al., 1999a; Halle, 2004; Modig et al., 2004).

La diffusion de l'eau dans des structures plus complexes, comme les muscles ou même le cerveau, fut explorée par RMN dès les années 70. Les études ont établi que les mouvements diffusifs de l'eau dans les tissus musculaires et cérébraux sont ralentis d'un facteur 2 à 10 par rapport à ceux de l'eau libre (Bratton et al., 1965; Cope, 1969; Hazlewood et al., 1991; Kasturi et al., 1980; Le Bihan, 2007).

Au regard du fort encombrement macromoléculaire dans le cytoplasme d'une cellule, un paradigme a émergé selon lequel l'eau cellulaire serait en grande partie une eau d'hydratation, interfaciale, avec une diffusion fortement ralentie par rapport à celle de l'eau libre. Très peu d'études expérimentales, pourtant, permettent de discuter cette hypothèse. Les mouvements vibrationnels de l'eau dans des levures ont été explorés à température cryogénique (20 K), par diffusion inélastique de neutrons (Ford et al., 2004). Dans ces systèmes, 25 à 30 % de l'eau cellulaire présentent un comportement vibrationnel modifié par rapport à celui de l'eau libre. Les mouvements diffusifs de l'eau dans des *Artemia* (forme de zoo-plancton) rehydratées, avec des degrés d'hydratation compris entre 0.1 et 1.2 g d'eau / g *Artemia* sec ont

été explorés par diffusion quasiélastique de neutrons (Trantham et al., 1984). Les contributions translationnelles et rotationnelles de l'eau intracellulaire dans ce système sont ralenties d'un ordre de grandeur par rapport à celles de l'eau libre. Ce système, cependant, reste peu hydraté par rapport à des bactéries mésophiles telles que *E. coli* par exemple ( $h = 2.6 \text{ g H}_2\text{O/ g}$  macromolécule (Record et al., 1998)).

Dans ce travail de thèse, la diffusion de l'eau dans le cytoplasme d'*E. coli* a été explorée *in vivo*, à température physiologique. L'étude apporte une mesure expérimentale directe des mouvements diffusifs de l'eau dans ce type de cellule.

## **2.2 Introduction aux neutrons thermiques et froids**

### **2.2.1 Propriétés des neutrons**

Le neutron est une particule élémentaire électriquement neutre et de spin  $\frac{1}{2}$ , découverte en 1932 par J. Chadwick (Chadwick, 1932a; Chadwick, 1932b). C'est un des constituants du noyau, de même masse que le proton ( $m = 1.675 \times 10^{-27} \text{ kg}$ ) et de moment magnétique  $\mu = -1.913$  magnétons nucléaires. Sa charge nulle lui permet de pénétrer profondément dans la matière et d'interagir directement avec le noyau, par interaction nucléaire ou magnétique. Dans la plupart des systèmes biologiques, l'interaction magnétique est négligeable devant l'interaction nucléaire.

Le neutron possède des propriétés corpusculaires et ondulatoires. Son énergie,  $E$ , s'exprime en fonction de sa vitesse,  $v$ , mais également en fonction de sa longueur d'onde,  $\lambda$ , reliées l'une à l'autre par la formule de De Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad [2.1]$$

où  $h$  est la constante de Planck. Ainsi,  $E$  vérifie:

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{h^2}{2m\lambda^2} \quad [2.2]$$



Les neutrons peuvent être considérés comme des ondes planes de vecteur d'onde  $\mathbf{k}$ , de norme  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ , et relié à  $\mathbf{v}$  par la relation:

$$\mathbf{k} = \frac{m}{\hbar} \mathbf{v} \quad [2.3]$$

avec  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ .

### 2.2.2 Longueur de diffusion et section efficace

L'interaction nucléaire est à très courte portée ( $\sim 10^{-14}$  m) par rapport à la longueur d'onde des neutrons ( $\sim 10^{-10}$  m). Le noyau peut donc être considéré comme ponctuel. La diffusion des neutrons par les noyaux est isotrope et l'onde diffusée est sphérique. Le pseudo-potentiel de Fermi,  $V$ , associé dépend d'un seul paramètre,  $b$ , correspondant à la longueur de diffusion.  $V$  s'exprime:

$$V(\mathbf{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b_i \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_i) \quad [2.4]$$

avec  $R_i$  la position du noyau de l'atome  $i$

$r$  : la position du neutron

$b_i$  : la longueur de diffusion de l'atome  $i$

$b$  est un nombre complexe, qui représente le déphasage entre les ondes incidente et diffusée. En pratique, la partie réelle est positive ou négative selon si l'interaction neutron-noyau est attractive ou répulsive, et la partie imaginaire représente l'absorption.  $b$  permet de définir simplement une autre grandeur, la section efficace,  $\sigma$ , exprimée par la relation :  $\sigma = 4\pi b^2$ .

### 2.2.3 Diffusion cohérente et diffusion incohérente

Les sections efficaces des atomes étant très faibles, un échantillon doit comporter un très grand nombre d'atomes ( $\sim 10^{22}$ ) pour donner lieu à une diffusion mesurable. Les atomes dans l'échantillon sont souvent composés de plusieurs espèces, qui sont elles-mêmes un mélange de plusieurs isotopes. Si le noyau est de spin non nul, comme le neutron a deux états

de spin possibles (+1/2, et -1/2), le système neutron-noyau possède également deux états de spins possible. Etant donné que l'interaction neutron-noyau dépend non seulement de la nature du noyau, mais aussi de l'état de spin total du système,  $b$  diffère d'une espèce à une autre, ainsi que d'un isotope à un autre. C'est pourquoi, le  $b$  effectif d'un échantillon d'atomes identiques se scinde en deux parties : une partie cohérente,  $b_{coh}$ , et une partie incohérente,  $b_{inc}$ .  $b_{coh}$  correspond à la valeur moyenne des longueurs de diffusion de tous les noyaux appartenants aux atomes, qui représentent en général plusieurs isotopes différents.  $b_{inc}$  existe de part la présence de plusieurs isotopes dans l'échantillon (incohérence isotopique) et/ou la présence d'un spin pour certains noyaux, qui présente une certaine orientation par rapport au spin du neutron (incohérence de spin).  $b_{inc}$  est définie comme la racine de la déviation carrée moyenne de  $b$  par rapport à  $b_{coh}$ .  $b_{coh}$  et  $b_{inc}$  vérifient :

$$\begin{aligned} b_{coh} &= \langle b \rangle \\ b_{inc} &= \sqrt{\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2} \end{aligned} \quad [2.5]$$

La diffusion cohérente donne lieu à des interférences entre les ondes diffusées par différents noyaux ou isotopes présents dans l'échantillon, et renseigne sur les corrélations entre les positions des noyaux à différents temps. Elle donne des informations sur les effets collectifs, structuraux ou dynamiques, au sein de l'échantillon.

La diffusion incohérente induit des interférences entre les ondes diffusées par le même noyau à différents temps, et contient des informations sur la dynamique individuelle des atomes. Elle permet d'étudier les mouvements moléculaires au sein des molécules biologiques.

Le tableau 2 présente les longueurs de diffusion cohérentes et incohérentes, ainsi que les sections efficaces associées, des principaux atomes présents dans un échantillon biologique. Plusieurs points ressortent des valeurs présentées:

- Les signaux cohérent et incohérent ne dépendent pas de la taille du noyau. Le signe et la valeur de  $b$  varient de manière irrégulière en fonction du nombre atomique  $Z$  et de la masse atomique. Ainsi, contrairement aux rayons X, les atomes lourds ne dominent pas le signal.

○ Le signal incohérent de l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) domine le signal de tous les autres atomes par un ordre de grandeur, notamment celui de son isotope le deutérium ( $\text{D} = ^2\text{H}$ ). Cette particularité est très exploitée pour extraire la dynamique de parties sélectivement hydrogénées dans un échantillon (voir le chapitre d'introduction).

○ On peut également noter que les sections efficaces sont exprimées en barn ( $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$ ), ce qui souligne la faiblesse de l'interaction. C'est pourquoi, on peut considérer que le signal observé correspond à la somme des signaux issus des atomes ayant interagi avec les neutrons dans l'échantillon.

atome ou isotope	Z	$b_{coh}$ ( $10^{-12}$ cm)	$b_{inc}$ ( $10^{-12}$ cm)	$\sigma_{coh}$ (barns)	$\sigma_{inc}$ (barns)	$\sigma_{tot}$ (barns)
$^1\text{H}$	1	-0.37	2.52	1.76	79.91	81.67
$\text{D} = ^2\text{H}$	1	0.67	0.40	5.60	2.04	7.64
C	6	0.67	0	5.56	0	5.56
N	7	0.94	0.20	11.03	0.49	11.52
O	8	0.58	0	4.24	0	
P	15	0.51	0.02	3.31	0.01	3.31
S	16	0.28	0	0.99	0	0.99

Tableau 2: Longueurs et sections efficaces de diffusion des principaux atomes ou isotopes présents dans les macromolécules biologiques (extrait de (Bée, 1988)).

## 2.2.4 Les grandeurs mesurées en dynamique

Lors d'une expérience de spectroscopie neutronique, on mesure le nombre de neutrons diffusés dans un angle solide  $d\Omega$  supporté par la direction du vecteur d'onde diffusé  $\mathbf{k}_f$ , en fonction de deux grandeurs :

○ le transfert d'énergie,  $\hbar\omega$ , entre l'énergie du neutron incident,  $E_i$ , et l'énergie du neutron diffusé,  $E_f$ :

$$\hbar\omega = E_f - E_i \quad [2.6]$$

○ le transfert de vecteur d'onde,  $\mathbf{Q}$ , entre le vecteur d'onde incident,  $\mathbf{k}_i$ , et le vecteur d'onde diffusé,  $\mathbf{k}_f$ :

$$\mathbf{Q} = \mathbf{k}_f - \mathbf{k}_i \quad [2.7]$$

La quantité mesurée s'appelle la section efficace double-différentielle de diffusion,  $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$ . Pour un système de N particules identiques de section efficace totale de diffusion  $\sigma$  et de longueur de diffusion  $b$ ,  $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$  s'exprime :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \frac{k_f}{k_i} \langle b^2 \rangle S(\mathbf{Q}, \omega) = \frac{k_f}{k_i} \frac{\sigma_{\text{coh}} + \sigma_{\text{inc}}}{4\pi} S(\mathbf{Q}, \omega) \quad [2.8]$$

avec  $\sigma_{\text{coh}}$  et  $\sigma_{\text{inc}}$  les sections efficaces liées cohérente et incohérente, respectivement.  $S(\mathbf{Q}, \omega)$  renseigne sur les corrélations entre positions atomiques à différents temps et vérifie :

$$S(\mathbf{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi N} \sum_j \sum_k \int_{-\infty}^{+\infty} \langle e^{-i\mathbf{Q}\cdot\mathbf{r}_j(0)} e^{i\mathbf{Q}\cdot\mathbf{r}_k(t)} \rangle e^{-i\omega t} dt \quad [2.9]$$

avec  $\mathbf{r}_j(0)$  et  $\mathbf{r}_k(t)$ , les positions des atomes  $j$  au temps 0 et  $k$  au temps  $t$ , respectivement. Le terme entre  $\langle \dots \rangle$  est une fonction de corrélation de type Van Hove. La mesure de  $S(\mathbf{Q}, \omega)$  permet de remonter aux propriétés structurales et temporelles du système, les variables  $\mathbf{Q}$  et  $\omega$  étant directement corrélés à l'espace et au temps, respectivement, par transformée de Fourier.

Par ailleurs,  $S(\mathbf{Q}, \omega)$  est la somme des fonctions de diffusion de Van Hove cohérente,  $S_{\text{coh}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , et incohérente,  $S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , pondérées par les fractions des sections efficaces liées cohérente et incohérente :

$$S(\mathbf{Q}, \omega) = \frac{\sigma_{\text{coh}}}{\sigma_{\text{coh}} + \sigma_{\text{inc}}} S_{\text{coh}}(\mathbf{Q}, \omega) + \frac{\sigma_{\text{inc}}}{\sigma_{\text{coh}} + \sigma_{\text{inc}}} S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega) \quad [2.10]$$

$S_{\text{coh}}(\mathbf{Q}, \omega)$  correspond à la transformée de Fourier temporelle de la fonction de corrélation de paire entre  $\langle \dots \rangle$  ;  $S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  correspond à la transformée de Fourier temporelle de la fonction d'auto-corrélation entre  $\langle \dots \rangle$ .

Ainsi  $\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega}$  se scinde en une partie cohérente et une partie incohérente et vérifie:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = \left( \frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{\text{coh}} + \left( \frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} \right)_{\text{inc}} = \frac{k_f}{k_i} \left[ \frac{\sigma_{\text{coh}}}{4\pi} S_{\text{coh}}(\mathbf{Q}, \omega) + \frac{\sigma_{\text{inc}}}{4\pi} S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega) \right] \quad [2.11]$$

Compte tenu de la grande section efficace incohérente des atomes d'hydrogène, qui prédominent dans les macromolécules biologiques, on s'intéressera par la suite à l'étude de la fonction de diffusion incohérente,  $S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , afin d'extraire les paramètres dynamiques des systèmes biologiques étudiés.

## 2.3 La diffusion incohérente de neutrons pour sonder la dynamique des macromolécules biologiques

La diffusion incohérente renseigne sur la dynamique individuelle des atomes. Elle est largement dominée par le signal provenant des hydrogènes, qui représentent près de la moitié des atomes présents dans les macromolécules biologiques et sont distribués de façon quasi-homogène au sein des structures. La spectroscopie neutronique donne accès à une échelle de temps allant de la ps à la ns, pour lesquels les mouvements des hydrogènes reflètent les mouvements des groupes plus grands auxquels ils sont attachés. Cet avantage s'avère particulièrement intéressant pour sonder les divers types de mouvements thermiques existant au sein des macromolécules biologiques.

La diversité de mouvements dans les molécules se traduit par une diversité d'interactions possibles entre le neutron et l'échantillon. L'interaction peut se faire sans transfert d'énergie ou avec transfert d'énergie à différents  $\mathbf{Q}$ . La quantité d'énergie échangée entre le neutron et l'atome définit le type de diffusion incohérente. On en distingue trois: la diffusion incohérente élastique, la diffusion incohérente quasi-élastique et la diffusion incohérente inélastique. Un spectre en fonction du transfert d'énergie se divise ainsi en trois régions:

- un **pic élastique**, à transfert d'énergie nul ( $\hbar\omega = 0$ ): il représente le signal provenant des neutrons qui ont interagi avec l'échantillon sans échanger d'énergie avec les atomes.

- un **élargissement quasi-élastique**, centré autour du pic élastique: il informe sur les mouvements diffusifs des atomes dans l'échantillon, qui se traduisent par des petits transferts d'énergie continus entre le neutron et l'atome.
- une **région inélastique**, à transfert d'énergie non nul: elle est associée aux excitations vibrationnelles des atomes à fréquence donnée.

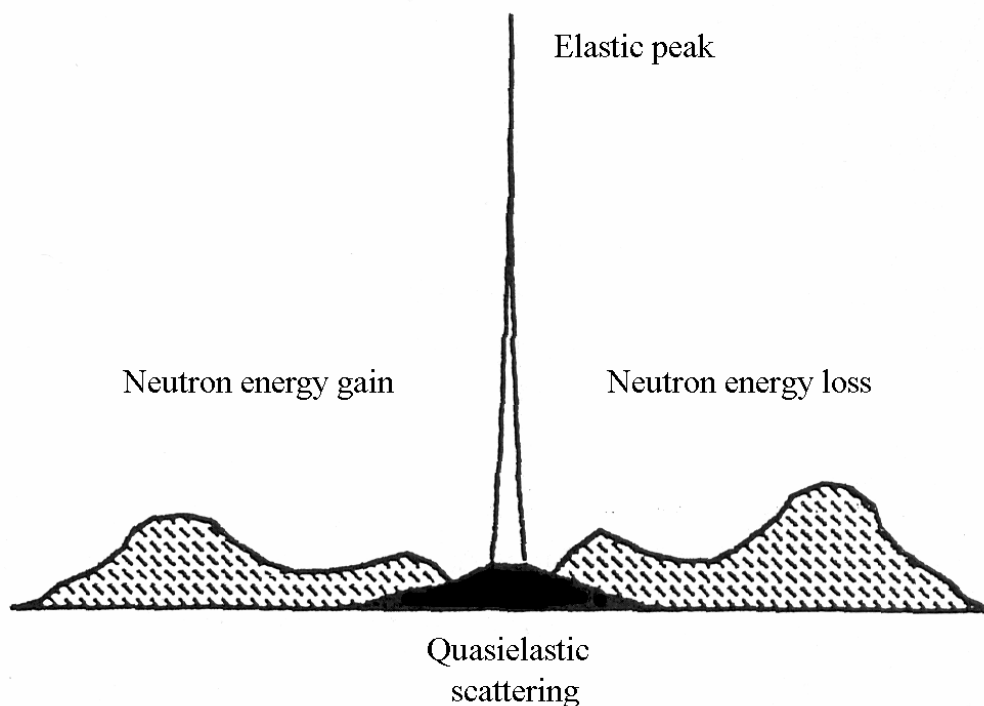


Figure 1. Représentation d'un spectre de diffusion incohérente de neutrons en fonction du transfert d'énergie. Extrait de (Smith, 1991).

Cette partie introduit la notion d'expérience résolue en énergie, intrinsèque à la technique de diffusion incohérente de neutrons, et détaille chaque type de diffusion incohérente, en mettant en lumière les mouvements auxquels elles permettent d'accéder respectivement.

### 2.3.1 Expériences résolues en énergie

La diffusion incohérente de neutrons repose sur l'utilisation de spectromètres présentant une résolution instrumentale en énergie et une gamme de  $Q$ , qui déterminent,

respectivement, les échelles de temps et de longueur des mouvements observables. La résolution instrumentale en énergie,  $\Delta E$ , définit la limite inférieure des transferts d'énergie accessibles, ou encore la limite supérieure des temps de corrélation associés aux mouvements observés. Elle correspond, expérimentalement, à la largeur du pic élastique à mi-hauteur (FWHM). La gamme de  $Q$  dépend de la longueur d'onde incidente,  $\lambda$ ; elle est comprise entre  $0.001 \text{ \AA}^{-1}$  à  $5 \text{ \AA}^{-1}$ , en fonction du spectromètre. Le tableau 3 présente les paramètres associés aux spectromètres utilisés lors de la thèse, avec  $\Delta t$ , la gamme de temps définie par la résolution instrumentale ( $\Delta t \propto 1/\Delta E$ ).

Instrument, source	$\lambda$ (Å)	$\Delta E$ , FWHM (μeV)	Domaine en énergie (meV)	$\Delta t$	$Q$ (Å <sup>-1</sup> )
IN16, ILL	6.27	0.9	-0.015..0.015	~ 1 ns	0.02..1.9
IN13, ILL	2.23	8	-0.125..0.3	~ 100 ps	0.3..5.5
IRIS, ISIS	~ 5	17	0.2..1.2	~ 50 ps	0.3..1.8
IN6, ILL	5.1	90	-200..2	~ 10 ps	0.3..1.8

Tableau 3: Paramètres de spectromètres accessibles à l'ILL, Grenoble, et à ISIS, Chilton, R.U.

### **2.3.2 Diffusion incohérente élastique, fluctuations carrées moyennes et résilience moyenne**

La diffusion incohérente élastique de neutrons (IENS) informe sur les corrélations entre les positions d'un même atome sur des temps définis par la résolution instrumentale. Plus un atome a un mouvement confiné (dans une échelle de longueur définie par la gamme en  $Q$  du spectromètre), plus l'intensité élastique totale est intense. Une partie des mouvements décrits par les atomes des molécules biologiques, consiste en des fluctuations diffusives ou vibratoires localisées dans un certain volume. Dans ce cas, la dépendance en  $Q$ , de l'intensité élastique totale,  $I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$ , qui contient à la fois les contributions élastique et quasiélastique à  $\omega = 0 \pm \Delta\omega$ , permet d'accéder à l'amplitude carrée moyenne des fluctuations (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ . Le MSF est souvent appelé déplacement atomique carré moyen (MSD) dans la littérature, bien qu'il ne s'agisse pas toujours d'un déplacement autour d'une position d'équilibre.

Le plus souvent,  $I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  est mesuré sur une large gamme de température et décroît lorsque la température augmente: à mesure que la température augmente, les atomes acquièrent suffisamment d'énergie pour diffuser en dehors de la fenêtre de longueur et d'énergie, définies par la gamme en  $Q$  et la résolution en énergie du spectromètre, respectivement, et ils ne contribuent plus au signal élastique total.

Un système fluctuant autour d'une position d'équilibre peut être décrit par un modèle harmonique. Dans le cas des macromolécules, les fluctuations ne sont pas toujours purement harmoniques, en particulier pour des températures au-delà de 200 K environ, où des mouvements de type diffusif apparaissent (Doster et al., 1989b). Toutefois, lors de l'étude de l'intensité élastique totale, il est possible de faire une approximation quasi-harmonique qui consiste à considérer que les atomes fluctuent avec une amplitude moyenne, qui englobe les distances séparant les sites possibles pour les atomes (Zaccai, 2000). L'amplitude moyenne des mouvements définit la largeur du puits de potentiel pseudo-harmonique. Dans ce cas, l'intensité élastique totale,  $I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$ , se simplifie d'après l'approximation gaussienne:

$$I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega) = \text{cte.} \exp\left(-\frac{\langle u^2 \rangle}{6} Q^2\right) \quad [2.12]$$

L'approximation est valable pour un système d'atomes dynamiquement équivalents, ayant une distribution de mouvements localisés dans l'espace et dans le temps. Par analogie avec l'approximation de Guinier utilisée en diffusion aux petits angles pour une solution de particules identiques (Guinier and Fournet, 1955), la contrainte spatiale se traduit par:  $\langle u^2 \rangle Q^2 \leq 2$  (Réat et al., 1998). Le MSF,  $\langle u^2 \rangle$ , est calculé à partir de la pente du logarithme népérien du facteur de structure dynamique élastique en fonction de  $Q^2$ .

Zaccai a proposé une analyse du MSF en fonction de la température, en terme de constante de force (Zaccai, 2000). L'analyse a permis de relier la flexibilité des protéines à leur résilience. D'un point de vue physique, la notion de constante de force est strictement définie dans le cas de mouvements purement harmoniques. Elle représente la force divisée par la distance requise pour éloigner un atome de sa position d'équilibre. Zaccai a étendu l'analyse sur une plage de température où les mouvements dans les protéines deviennent anharmoniques, en introduisant la notion de constante de force effective, encore appelée résilience (Zaccai, 2000). La résilience,  $\langle k' \rangle$ , caractérise la rigidité effective d'un système décrit par un potentiel d'énergie libre,  $\Delta G$ ; elle prend en compte des fluctuations entropiques aussi bien



qu'enthalpiques. Elle est inversement proportionnelle à la pente du MSF en fonction de la température  $T$ , et s'exprime en  $\text{N.m}^{-1}$ . Elle vérifie la relation :

$$\langle k' \rangle = \frac{2k_B}{d \langle u^2 \rangle} = \frac{0.00276}{d \langle u^2 \rangle} \quad [2.13]$$

où  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  J/K est la constante de Boltzmann.  $\langle u^2 \rangle$  s'exprime en  $\text{Å}^2$  dans la partie droite de l'équation 2.13, avec  $T$  en Kelvin. Plus la pente du MSF en fonction de la température est grande, plus le système est mou par rapport à des liaisons ( $\Delta H$ ) ou à des fluctuations entropiques ( $\Delta S$ ).

### **2.3.3 Diffusion incohérente quasiélastique et mouvements diffusifs**

Les mouvements atomiques et moléculaires sont activés par l'énergie thermique de l'échantillon. Lorsqu'un atome a emmagasiné suffisamment d'énergie, il est capable de traverser une barrière énergétique pour aller se positionner sur un nouveau site. Des mouvements de transport ou de réorientations se produisent de façon aléatoire et sont à l'origine de la diffusion quasi-élastique de neutrons (QENS). Parmi les mouvements stochastiques possibles, on compte des mouvements diffusifs translationnels et rotationnels. Dans un cas simple de diffusion suivant une loi exponentielle dans le temps, le signal QENS est exprimé mathématiquement par une fonction Lorentzienne. Le QENS issu de la combinaison de plusieurs mouvements diffusifs peut être approché mathématiquement par plusieurs Lorentziennes. A partir de la dépendance en  $Q^2$  de la largeur à mi hauteur (HWHM) de la (des) Lorentzienne(s), on peut extraire les coefficients de diffusion et les temps caractéristiques associés aux mouvements. Plusieurs modèles théoriques peuvent être utilisés, dont le choix repose sur une analyse fine du HWHM en fonction de  $Q^2$ , d'une part, et, d'autre part, sur celle du facteur de structure élastique incohérent, EISF. L'EISF renseigne sur la géométrie des mouvements; il est déterminé expérimentalement comme le rapport entre l'intensité élastique intégrée,  $I^{\text{él}}(\mathbf{Q})$ , avec la somme des intensités élastique intégrée,  $I^{\text{él}}(\mathbf{Q})$ , et quasi-élastique intégrée,  $I^{\text{qe}}(\mathbf{Q})$  :

$$\text{EISF}(\mathbf{Q}) = \frac{I^{\text{él}}(\mathbf{Q})}{I^{\text{él}}(\mathbf{Q}) + I^{\text{qe}}(\mathbf{Q})} \quad [2.14]$$

Les modèles couramment utilisés sont des modèles de sauts sur un nombre fini de sites, ou encore des modèles de diffusion en surface ou dans un volume restreint (celui d'une sphère par exemple). Une explication détaillée des différents modèles possibles se trouve dans le livre de Bée (Bée, 1988).

### **2.3.4 Diffusion incohérente inélastique et mouvements vibrationnels**

La région inélastique d'un spectre de diffusion de neutrons consiste en des pics à transfert d'énergie non nul. Ces pics résultent d'un échange d'énergie avec les modes vibrationnels des atomes ou molécules de l'échantillon. La diffusion incohérente inélastique de neutrons (IINS) permet d'étudier les excitations vibrationnelles, en accédant à la distribution des fréquences de vibration des molécules, également appelée densité d'états.

### **2.3.5 Analyse expérimentale de la dynamique**

Au sein d'un même système biologique, des mouvements avec des contributions de type vibrationnel et de type diffusif peuvent se produire. Afin de rendre possible l'analyse des signaux mesurés, on est amené à supposer que les deux types de contributions sont découplés. Comme les contributions vibrationnelles apparaissent sur des temps caractéristiques allant de la fs à la ps, et les contributions diffusives sur des temps allant de la ps à la ns, on peut faire l'hypothèse que les deux types de contributions sont décorrélées dans le temps, et les découpler. Toutefois, certains mouvements diffusifs peuvent être suffisamment rapides pour s'étendre sur la plage inélastique et inversement, si bien que l'hypothèse reste une simplification.

Dans ce cas, le facteur de structure dynamique,  $S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , est égal au produit de convolution des facteurs de structure dynamique vibrationnel,  $S_{\text{vib}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , et diffusif,  $S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega)$  :

$$S_{\text{inc}}(\mathbf{Q}, \omega) = S_{\text{vib}}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega) \quad [2.15]$$

Dans le cas de mouvements diffusifs localisés par exemple,  $S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega)$  peut être décrit par:

$$S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega) = A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega) \quad [2.16]$$

où  $A_0$  correspond à l'EISF et  $\sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega)$  à la composante quasiélastique, décrite comme la somme de fonctions Lorentziennes,  $L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2}$ , associées à des contributions de type translationnel ou rotationnel, que l'on suppose également découplées.

D'autre part, la contribution vibrationnelle peut être divisée en deux parties: une partie élastique,  $\delta(\omega)$ , et une partie inélastique,  $S_{\text{vib,inel}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , pondérées par un facteur de Debye Waller ( $DW = \exp(-\langle x^2 \rangle Q^2)$ ), avec  $\langle x^2 \rangle$  le déplacement carré moyen associé aux vibrations à hautes fréquences):

$$S_{\text{vib}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \{ \delta(\omega) + S_{\text{vib,inel}}(\mathbf{Q}, \omega) \} \quad [2.17]$$

Au cours des expériences qui seront présentées dans les chapitres suivants, on s'est intéressé aux mouvements diffusifs donnant lieu à un signal quasi-élastique. Dans la région quasi-élastique correspondant à des transferts d'énergie  $|\Delta E| = \hbar\omega \leq 1.5\text{meV}$ , la convolution avec les excitations vibrationnelles se résume au facteur de Debye Waller et à un bruit de fond supplémentaire indépendant de l'énergie, plat et déstructuré,  $B(\mathbf{Q})$ , provenant des mouvements vibrationnels de hautes énergies. Ainsi le facteur de structure dynamique quasi-élastique,  $S_{\text{inc,qe}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , s'écrit:

$$S_{\text{inc,qe}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \cdot S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega) + B(\mathbf{Q}) \quad [2.18]$$

### 2.3.6 Instruments et traitement des données

#### Les sources de neutrons

Une des difficultés expérimentales présentées par la technique de diffusion de neutrons, découle de la faiblesse de l'interaction entre le neutron et l'atome. L'intensité

mesurée est proportionnelle aux sections efficaces des atomes de l'échantillon, qui s'expriment en barns, avec  $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$ . Par ailleurs, les flux de neutrons qui peuvent être générés dans un réacteur de recherche restent relativement peu intenses, comparés aux sources de rayons X telles que les synchrotrons ou même les sources beaucoup plus faibles de laboratoire. C'est pourquoi les expériences requièrent l'utilisation de grands instruments, avec des faisceaux de grande section (de l'ordre de quelques centimètres carrés), afin d'utiliser de façon optimale le flux accessible (typiquement  $10^6 \text{ neutrons.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pour un bon spectromètre). D'autre part, il est nécessaire d'utiliser une grande quantité d'échantillon (quelques centaines de mg) et de collecter les données sur de longs temps de mesure (allant de quelques heures jusqu'à une journée). Par contre, pour les études dynamiques avec analyse du signal incohérent, les échantillons n'ont ni besoin d'être cristallins ni même monodisperses, ce qui ouvre un large panel d'expériences. De plus, l'utilisation du marquage isotopique permet d'étudier des parties spécifiques au sein de systèmes complexes.

Les expériences présentées par la suite ont été réalisées dans des centres neutroniques à rayonnement international: l'Institut Laue Langevin (ILL), Grenoble, qui reste à ce jour la source la plus intense au monde, et ISIS, Laboratoire de Rutherford, Chilton. A l'ILL, les neutrons sont produits dans un réacteur nucléaire par fission d'un combustible enrichi en uranium-235 ( $^{235}\text{U}$ ). Lors du processus de fission nucléaire, l' $^{235}\text{U}$  absorbe un neutron et se fragmente en libérant de l'énergie et 2.5 neutrons en moyenne, d'énergie comprise entre 1 et 2 MeV. Un réacteur de recherche ne contient qu'une petite quantité d' $^{235}\text{U}$  (typiquement quelques kg) par rapport aux réacteurs des centrales nucléaires, constitués en moyenne de 3 tonnes d' $^{235}\text{U}$  pour une masse totale de combustible de 100 tonnes. A ISIS, les neutrons sont produits par spallation nucléaire: un faisceau de protons avec une énergie de 1 GeV environ, est envoyé sur une cible d'atomes lourds de tantale. La spallation nucléaire libère des bouffées de neutrons ayant une énergie de 1 à 2 MeV. Les neutrons issus des processus de fission et de spallation, sont ensuite ralentis par collisions successives dans des modérateurs contenant des atomes légers, maintenus à température constante. Dans le cas des neutrons thermiques, le modérateur à l'ILL est constitué d'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ ) maintenue à 300K; dans le cas des neutrons froids produit à l'ILL ou pour IRIS à ISIS, il s'agit d'un modérateur constitué de deuterium liquide maintenu à 25 K (voir Tableau 4). Une fois l'équilibre thermique atteint, le flux de neutrons,  $\Phi(E)$ , *i.e.* le nombre de neutrons passant par unité d'aire avec des énergies comprises entre  $E$  et  $E+dE$ , suit une distribution de Maxwell :

$$\Phi(E)dE = \Phi_{thermal} \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{\sqrt{E}}{(k_B T)^{3/2}} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) dE \quad [2.19]$$

où  $T$  est la température du bain,  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  J/K est la constante de Boltzmann et  $\Phi_{thermal}$  est le flux intégré ( $\int_0^{\infty} \Phi(E)dE = \Phi_{thermal}$ )).

Neutrons	Energie (meV)	$\lambda$ (Å)	Modérateur
Froids	0.1 – 10	29 - 2.9	D <sub>2</sub> liquide à 25 K
Thermiques	10 – 100	2.9 - 0.9	D <sub>2</sub> O à 300 K
Chauds	100 – 500	0.9 – 0.4	Graphite à 2400 K

Tableau 4: Energies, longueurs d’onde et modérateurs pour les trois types de neutrons produits à l’ILL (Yellow Book, ILL, <http://www.ill.fr>).

## Les spectromètres

Les expériences de spectroscopie neutronique reposent sur la mesure de changement de direction et de changement d’énergie des neutrons, suite à leur interaction avec l’échantillon. Des détecteurs sont placés autour de l’échantillon et permettent de compter les neutrons en fonction de leur angle de diffusion. Ces détecteurs, par contre, ne permettent pas de mesurer le changement d’énergie des neutrons.

Selon les expériences réalisées, deux techniques principales peuvent être utilisées pour déterminer l’énergie des neutrons incidents et diffusés: la méthode du ‘temps-de-vol’ (‘time-of-flight’) et la méthode à rétrodiffusion (‘backscattering’).

## Les spectromètres à rétrodiffusion

La méthode à rétrodiffusion repose sur la sélection des longueurs d’onde incidente et diffusée, par diffraction sur un monocristal. Dans ce cas, la longueur d’onde est donnée par la loi de Bragg:

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad [2.20]$$

où  $n$  est un entier,  $d$  est l'espacement entre plans réticulaires, et  $2\theta$  est l'angle de diffusion. La largeur spectrale du faisceau,  $\delta\lambda$ , qui définit la résolution instrumentale, est obtenue en différenciant la relation:

$$\frac{\delta\lambda}{\lambda} = \frac{\delta d}{d} + \frac{\cos\theta}{\sin\theta} \delta\theta \quad [2.21]$$

Elle présente un minimum lorsque  $\theta$  est proche de  $90^\circ$ , c'est-à-dire lorsque le faisceau de neutron se réfléchit sur lui-même ( $2\theta = 180^\circ$ ): on dit qu'il est rétrodiffusé. Les spectromètres à rétrodiffusion utilisent cette configuration de rétrodiffusion afin de travailler avec la résolution instrumentale la plus fine possible.

Le principe est utilisé pour sélectionner un faisceau incident monochromatique, d'une part, et, d'autre part, pour analyser l'énergie des neutrons diffusés. On rappelle que l'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde au carré. La plupart du temps, la longueur d'onde du faisceau diffusé est maintenue constante, et on fait varier la longueur d'onde du faisceau incident, soit par chauffage du cristal monochromateur, comme c'est le cas pour IN13 à l'ILL, soit par effet 'Doppler', comme c'est le cas pour IN16 à l'ILL.

Les spectromètres à rétrodiffusion possèdent, en général, de plus hautes résolutions instrumentales que les spectromètres à temps-de-vol, dans une large gamme de  $Q$  accessible; ils donnent accès à des temps plus longs. Ils sont particulièrement adaptés pour les mesures incohérentes élastiques sur des fenêtres de temps comprises entre 0.1 et 1 ns. IN16, à l'ILL, possède une haute résolution instrumentale, de  $0.9 \mu\text{eV}$  (FWHM), qui lui permet d'accéder à des temps jusqu'à la ns. Le spectromètre IN13, quant à lui, possède une  $\text{FWHM} = 8 \mu\text{eV}$ , et est approprié pour étudier des mouvements sur 100 ps environ. Si le flux est suffisant, les spectromètres à rétrodiffusion sont également utilisés pour des expériences quasi-élastiques, toutefois limitées par les petites fenêtres de transfert d'énergie accessibles ( $\sim 10$  fois supérieures à la résolution).

### **Les spectromètres à 'temps-de-vol'**

Les spectromètres à 'temps-de-vol', en revanche, sont très utilisés pour les mesures quasi-élastiques et inélastiques de diffusion de neutrons. Ils possèdent de grandes fenêtres de transfert d'énergie et des résolutions instrumentales moins fines en général que les

spectromètres à rétrodiffusion, si bien qu'ils permettent de sonder des mouvements sur des temps plus courts, typiquement de l'ordre de la ps à la centaine de ps.

La méthode du 'temps-de-vol' utilise le fait que les neutrons froids ont une vitesse relativement petite ( $\sim 600$  m/s) et peuvent être sélectionnés en fonction de leur vitesse en utilisant des 'choppers', c'est-à-dire des disques tournants présentant des fentes. Plusieurs choppers sont positionnés les uns après les autres et permettent de sélectionner des neutrons avec une énergie incidente donnée. L'énergie finale est calculée à partir de la mesure du temps mis par le neutron pour parcourir la distance échantillon-détecteur, et de la distance parcourue. Les choppers permettent d'obtenir des bouffées de neutrons, nécessaires pour définir le temps initial.

### **Traitement des données expérimentales**

L'intensité expérimentale mesurée par l'intermédiaire d'un spectromètre, nécessite d'être corrigée afin d'obtenir une fonction de diffusion,  $S(\mathbf{Q}, \omega)$ , propre au système étudié, et affranchie des artefacts instrumentaux. Pour cela, le traitement des données est réalisé selon les étapes suivantes:

- Les spectres sont normalisés à un moniteur qui compte les neutrons incidents. La normalisation au moniteur permet de corriger la variation éventuelle de flux au cours de la mesure, et de rendre le signal indépendant du temps de mesure.
- Le signal provenant de la cellule vide (ou du tampon), mesuré indépendamment de l'échantillon, est soustrait, en tenant compte des transmissions respectives de l'échantillon et de la cellule vide (ou du tampon). Par ailleurs, l'épaisseur de l'échantillon est préalablement choisie afin d'avoir une transmission supérieure à 0.9 et de minimiser les effets de diffusion multiple dans l'échantillon.
- Les spectres sont corrigés pour tenir compte de l'efficacité des détecteurs. La correction consiste à normaliser l'intensité mesurée pour l'échantillon par rapport à celle mesurée pour un échantillon de vanadium mesuré dans les mêmes conditions. Le vanadium est un diffuseur presque purement incohérent sur les gammes instrumentales observées, si bien que son intensité (également presque purement élastique) dépend faiblement de  $Q$ , à un facteur de Debye Waller près. On utilise ainsi

l'intensité élastique du vanadium (faiblement dépendante de  $Q$ ), pour définir la résolution instrumentale du spectromètre. Toutefois, si l'échantillon le permet, on utilise plutôt l'échantillon mesuré à basse température (entre 20 et 50 K) pour lequel tous les atomes sont immobiles et contribuent à un signal indépendant de  $Q$  (sauf si présence de pics de Bragg).

- Pour les mesures quasi-élastiques, on peut être amené à regrouper les spectres en fonction de leur répartition angulaire, afin d'améliorer la statistique des intensités mesurées et d'améliorer l'analyse.

### **2.3.7 Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines (article)**





MARION JASNIN\*

# Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines

## RÉSUMÉ

Les mouvements atomiques dans les protéines sont essentiels à la fonction biologique. Certaines caractéristiques des neutrons, font de ces particules une sonde d'intérêt majeur pour étudier ces mouvements. Ainsi, lorsqu'un échantillon de protéine se trouve placé dans un faisceau de neutrons, l'intensité diffusée permet d'analyser ces mouvements sur des temps moléculaires. La dépendance en température des mouvements atomiques caractérise le comportement dynamique de la protéine, et permet de corrélér celui-ci à la fonction et à l'activité biologique de la macromolécule étudiée. La dynamique est quantifiée par deux paramètres : le déplacement atomique carré moyen, qui rend compte de la flexibilité de la structure, et une constante de force, appelée « résilience », qui informe sur la rigidité du système. Cet article constitue une introduction à la diffusion neutronique et présente les principaux points qui font de celle-ci une technique de choix pour l'investigation de la structure et de la dynamique de la matière et notamment des protéines.

## MOTS-CLÉS

Diffusion de neutrons, protéine, dynamique, flexibilité, résilience

## Bioneutronics : proteins dynamics studied by neutron scattering

### SUMMARY

*Atomic motions inside proteins are essential for biological function. The neutron intensity scattered by a sample of protein allows the analysis of these motions on molecular time-scales. The dynamical behaviour of the protein can be characterized by the temperature dependence of the atomic motions and correlated to biological activity and function. Dynamics is quantified by two parameters: the atomic mean square displacement, which is related to protein flexibility, and a force constant, called resilience, which provides information on the rigidity of the system.*

### KEYWORDS

*Neutron scattering, protein, dynamics, flexibility, resilience*

## I - Introduction

Les protéines doivent être susceptibles de changer de conformation pour accomplir leurs fonctions biologiques. Les changements conformationnels sont possibles grâce aux mouvements permanents des atomes qui les constituent.

La relation intime qui lie la structure, la dynamique et la fonction biologique a été mise en lumière grâce à l'étude de la myoglobine. Il s'agit d'une petite

protéine (153 acides aminés chez l'homme) constitué d'une partie protéique et d'une porphyrine de fer encore appelée hème. Son rôle est de transporter et de fixer l'oxygène au niveau des muscles. L'oxygène ainsi que l'oxyde de carbone sont fixés au niveau de l'hème.

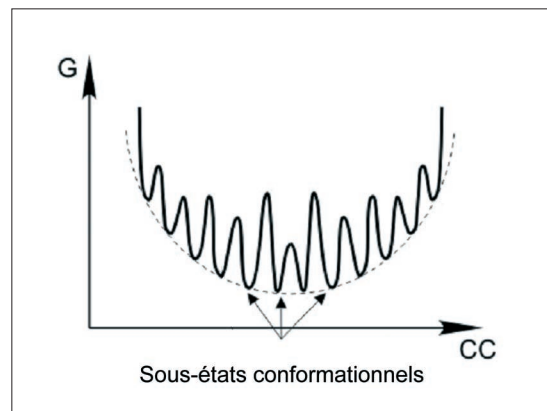
La signature spectrale de l'hème est fortement liée à son état de ligation.

Une analyse expérimentale fine de la refixation du CO sur l'hème, après photolyse par flash laser, a

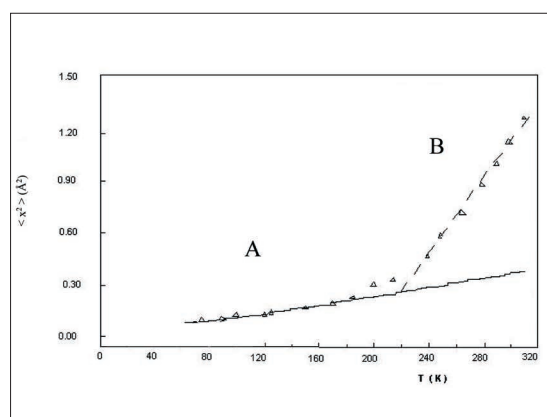
\*Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, 41, rue Jules Horowitz - 38027 Grenoble Cedex 01 – Tél.: 04 38 78 96 05 – Fax: 04 38 78 54 94  
E-Mail : Marion.Jasnin@ibs.fr

## Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines

**Figure 1**  
Sous-états conformationnels d'une protéine. Energie totale de Gibbs,  $G$ , pour une conformation de la protéine, en fonction d'une coordonnée conformationnelle. Les « vallées » représentent les sous-états conformationnels.



**Figure 2**  
La transition dynamique. Exemple de la myoglobine hydratée en  $D_2O$ , redessiné à partir de (2). Dans la partie A, la protéine est figée dans une conformation énergétique. Dans la partie B, au dessus de la transition dynamique, les atomes peuvent passer d'un état énergétique à un autre : la protéine peut changer de conformation.



permis à Hans Frauenfelder et ses collaborateurs de proposer le modèle des sous-états conformationnels pour les protéines (1). Selon ces auteurs, chaque protéine existe sous différents états ou conformations. Chaque état consiste lui-même en une multitude de sous-états conformationnels, qui présentent la même structure globale et participent à la même fonction, mais diffèrent les uns des autres par d'infimes changements structuraux. Cela se traduit par plusieurs états énergétiques possibles pour les atomes, séparés entre eux par des barrières d'énergie (voir figure 1).

Les protéines sont très sensibles à la température. Si elles sont rigides à très basses températures, elles deviennent flexibles à température physiologique. Un comportement dynamique commun à toutes les protéines a été mis en évidence par diffusion de neutrons (2). En dessous de 200K environ, elles se comportent comme des solides harmoniques. Les atomes sont fermement ancrés dans la structure, bloqués dans un état énergétique donné. Ils vibrent autour de leur position d'équilibre. Au-delà de 200K, ils acquièrent une énergie d'activation suffisante et sont susceptibles de sauter d'une position à une autre. La protéine peut changer de sous-état conformationnel. La température permet cette transition dynamique (voir figure 2). Comme nous le verrons dans ce qui suit, la diffusion de neutrons est une technique permettant de sonder directement les mouvements atomiques dans les macromolécules biologiques.

## II - Le neutron, une sonde incontournable pour les protéines

Le neutron est une particule fascinante pour percer les secrets de la matière. Compte tenu de son énergie et de son absence de charge, son interaction avec l'échantillon est non destructive. Cette particularité en fait un rayonnement unique pour la compréhension du nanomonde. Un neutron avec une énergie thermique d'environ 1 kcal/mol possède une longueur d'onde d'environ 1Å. Ces valeurs correspondent exactement aux amplitudes et énergies associées aux mouvements atomiques dans les macromolécules.

### 1. Le neutron est sensible à l'atome d'hydrogène

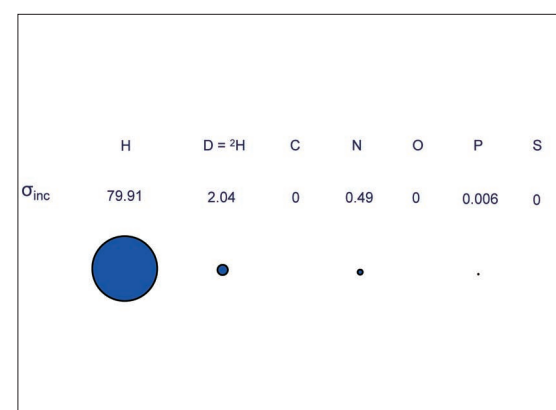
Le neutron « voit » le noyau d'hydrogène 40 fois plus que celui de tout autre atome (figure 3). La diffusion de neutrons sonde essentiellement les mouvements des atomes d'hydrogène. Ceux-ci représentent 50% des atomes d'une protéine, et sont uniformément répartis au sein de la structure. Pour une gamme de temps adaptée, leurs mouvements rapportent non pas leur vibration propre, mais les mouvements des chaînes latérales et principales auxquels ils sont liés. Ils reflètent ainsi la dynamique globale de la structure.

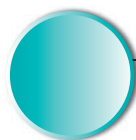
### 2. L'échange isotopique

La section efficace du ( $^2H$ ) deutérium est également très faible devant celle de l'hydrogène (figure 3). L'échange isotopique H-D est finement utilisé pour accroître ou réduire fortement le signal provenant de différentes parties de la structure.

**Figure 3**

Comparaison des sections dans lesquelles le neutron se trouve capté, ou sections efficaces incohérentes ( $\sigma_{inc}$ ), pour différents noyaux.  $\sigma_{inc}$  est exprimé en barn, 1 barn =  $10^{-24}$  cm<sup>2</sup>. La surface des cercles dessinés est proportionnelle à la valeur de  $\sigma_{inc}$  pour chacun des éléments considérés.





## 3. Diffusions cohérente et incohérente

L'interaction entre le neutron et l'atome donne lieu à de la diffusion cohérente et incohérente (3).

La diffusion cohérente résulte d'interférences entre des ondes diffusées par différents atomes. Elle informe sur la structure de l'échantillon et permet également de remonter aux mouvements collectifs des atomes.

Dans la diffusion incohérente, il n'y a pas d'interférence entre les ondes émises par différents atomes. En revanche, il y a interférence entre ondes émises à différents instants par le même atome. Elle permet donc d'étudier directement les mouvements atomiques individuels dans l'échantillon. La profusion des atomes d'hydrogène au sein des protéines, dont le signal incohérent domine fortement celui de tout autre atome, a naturellement mené à l'utilisation de la diffusion incohérente pour l'étude de la dynamique des protéines. Par ailleurs, un autre avantage de la diffusion incohérente est qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'échantillons cristallins ni même monodisperses. Des poudres hydratées, des protéines en solution, et même des cellules entières peuvent être étudiées.

## 4. Diffusion élastique et diffusion inélastique

L'intensité peut être diffusée élastiquement, i.e. sans perte d'énergie. Elle permet, dans ce cas, d'extraire la géométrie des mouvements atomiques.

Elle peut aussi être diffusée de façon inélastique : il y a alors transfert d'énergie entre le neutron et le noyau. L'information retirée concerne alors la diffusion des atomes au sein de l'échantillon.

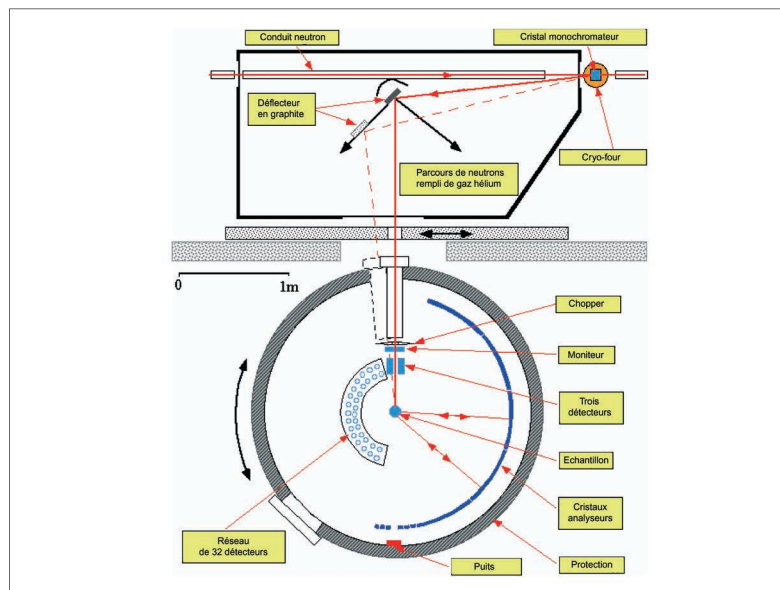
Dans cet article, nous nous intéresserons seulement au cas de la diffusion élastique incohérente. Son analyse permet de déterminer l'amplitude des fluctuations atomiques dans une gamme de temps définie par le spectromètre (6).

## 5. L'Institut Laue-Langevin

La diffusion de neutrons fait appel à l'utilisation de grands instruments. Nous disposons à Grenoble du réacteur à haut flux de l'Institut Laue-Langevin

**Figure 4**

Vue de l'Institut Laue-Langevin (photo ILL/Peter Ginter), avec son réacteur, à gauche sur l'image.



**Figure 5**

Principe du spectromètre à rétrodiffusion IN13 de l'ILL (image extraite du site [www.ill.fr](http://www.ill.fr)). Dans le cas d'une expérience de diffusion élastique, le faisceau de neutron est envoyé sur un monochromateur qui sélectionne la longueur d'onde incidente. Un déflecteur en graphite focalise ensuite le faisceau monochromatique sur l'échantillon. Les neutrons diffusés par l'échantillon sont analysés par des cristaux analyseurs. Ceux-ci sélectionnent ceux qui ont conservé leur énergie et les rétrodiffusent avec des angles de diffraction de  $90^\circ$ . Les neutrons sont finalement détectés par un jeu de 32 détecteurs à  $^3\text{He}$ . Pour les études inélastiques, où il y a transfert d'énergie entre le neutron et l'échantillon, l'analyse se fait à énergie finale constante, en faisant varier l'énergie incidente par chauffage du cristal monochromateur. IN13 a une résolution en énergie de  $8 \mu\text{eV}$ , qui permet d'avoir accès à des temps caractéristiques d'environ 100 ps. Il permet de couvrir une large gamme d'amplitude de mouvement.

(ILL) (voir figure 4), premier centre neutronique mondial. Le niveau d'équipement de L'ILL permet d'accéder à une trentaine d'instruments, des spectromètres (à temps de vol, à rétrodiffusion, à écho de spin) et des diffractomètres, dédiés à différentes techniques d'étude de la structure et de la dynamique de la matière.

Ces instruments couvrent de larges échelles de temps et de taille (pour plus de détails, voir le site [www.ill.fr](http://www.ill.fr)). De plus l'ILL dispose d'un laboratoire de marquage au deutérium, the Deuteration Laboratory ([www.ill.fr/YellowBook/deuteration/index.htm](http://www.ill.fr/YellowBook/deuteration/index.htm)), qui permet la réalisation d'échantillons marqués pour l'étude spécifique de systèmes complexes. L'accès aux centres de neutrons se fait sur proposition de projets, évalués par des conseils scientifiques.

## 6. Le choix du spectromètre

Le spectromètre détermine la gamme de temps et d'amplitude des mouvements étudiés. La fenêtre en temps est déterminée par la résolution instrumentale en énergie, l'amplitude par les angles de diffusion accessibles aux détecteurs.

Le spectromètre à rétrodiffusion IN13 (figure 5) de l'ILL constitue un instrument clef pour l'étude de la dynamique des protéines. Il permet de dé-

## Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines

tecter des mouvements atomiques de quelques Ångströms sur une centaine de picoseconde. Sur ces gammes de temps et d'amplitude, les atomes d'hydrogène ancrés dans la structure reflètent les mouvements des chaînes latérales et principales auxquels ils sont liés. Ils retracent la dynamique globale de la structure. Par ailleurs, les atomes d'hydrogène du solvant, qui pourraient fortement dominer le signal, diffusent hors de la fenêtre et ne contribuent pas à l'intensité mesurée.

### III - Deux paramètres extraits: le déplacement atomique carré moyen et la résilience

Les structures des protéines sont maintenues repliées par des interactions connues : les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes ou encore les liaisons électrostatiques (figure 6). Ces interactions sont dites « faibles », car l'énergie thermique à des températures légèrement plus élevées que les températures physiologiques suffit pour les déstabiliser. Ainsi les protéines humaines perdent leur structure repliée (on dit qu'elles se dénaturent) au delà de 45 – 50°C. Les interactions faibles stabilisent la structure repliée des protéines et gouvernent les mouvements atomiques.

L'intensité incohérente diffusée élastiquement a une forme gaussienne pour des mouvements localisés dans la fenêtre de l'instrument. C'est le cas pour les atomes d'hydrogène ancrés dans la structure. En revanche, cette approximation n'est plus valable quand on s'intéresse à la diffusion libre des molécules d'eau du solvant.

L'intensité gaussienne dépend du déplacement atomique carré moyen. Ce premier paramètre peut être directement extrait des mesures expérimentales, et étudié pour différentes conditions, par exemple de température, d'hydratation ou de salinité.

Des modèles théoriques ont été proposés pour décrire

la dépendance en température du déplacement atomique carré moyen. Une analyse en terme de constante de force a été proposée par Bicout et Zaccai (5). La force résultante agissant sur un atome lorsqu'il s'éloigne de sa position d'équilibre peut s'exprimer sous la forme d'une force de rappel due à son environnement. La constante de force associée est inversement proportionnelle à la pente de la dépendance en température du déplacement atomique carré moyen. Elle est strictement valable pour l'état harmonique, à très basses températures. Une approximation quasi-harmonique permet d'étendre le modèle au-delà de la transition dynamique. La constante de force extraite est appelée résilience et se réfère à la rigidité du système (6).

Quel est l'ordre de grandeur des forces qui régissent les structures des protéines ?

En dessous de la transition dynamique, la résilience trouvée pour une poudre hydratée de myoglobine en  $D_2O$  est de 2 N/m (partie A de la figure 2). Dans notre monde macroscopique, cela équivaut au déplacement élastique d'une masse de 2 g sur une distance de 1 cm (figure 7).

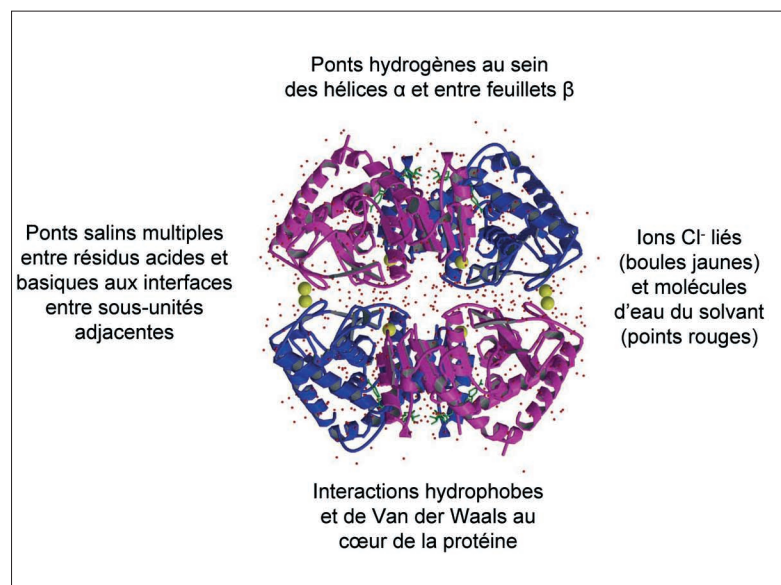
A température physiologique, la résilience a un ordre de grandeur de moins que celle trouvée à très basses températures : elle vaut 0,3 N/m pour la myoglobine hydratée. Les forces qui maintiennent la structure sont dix fois plus faibles, rendant la matrice plus molle. Par ailleurs, les amplitudes du déplacement atomique carré moyen sont plus étendues : le système est plus flexible.

### IV - Quelques autres systèmes d'études

Les systèmes de protéines purifiées étudiés se présentent le plus souvent sous la forme de poudres hydratées ou de solutions. Le solvant peut être soit du  $D_2O$ , soit du  $H_2O$ , selon que l'on s'intéresse respectivement à la dynamique de la protéine ou du solvant. On peut également utiliser le marquage au deutérium pour masquer certaines parties du système. La quantité de matériel requise est d'environ 200 mg.

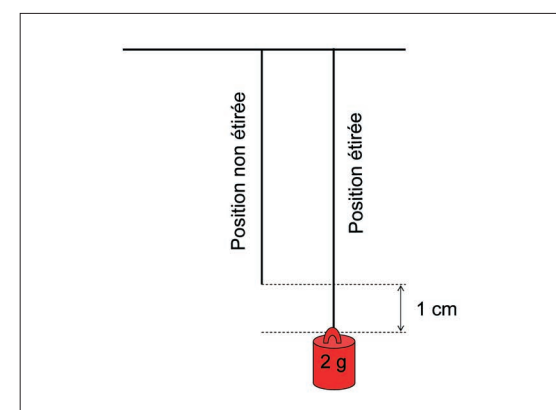
**Figure 6**

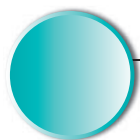
Les forces faibles dans les protéines. Elles maintiennent la structure repliée et flexible à température physiologique. (Image extraite avec permission de (4)).



**Figure 7**

Un poids de 2 g allonge un élastique de constante 2 N/m de 1 cm.





Une richesse de la technique est qu'elle permet d'examiner l'échantillon sous des conditions expérimentales très variées. On peut étudier l'influence de la température, de l'hydratation, du pH, de la salinité, ou de l'état de ligation sur la dynamique d'un système.

Les mesures sont le plus souvent comparatives, et de ce fait moins modèles-dépendantes. Au Laboratoire de Biophysique Moléculaire de l'Institut de Biologie Structurale, nous nous intéressons à l'adaptation des protéines aux conditions extrêmes de température et de salinité. Par exemple, nous avons essayé de comprendre comment une protéine s'est adaptée au cours de l'évolution, pour accomplir sa fonction sous des conditions de température extrêmement élevées (plus de 80°C). Une sélection de forces augmentant la résilience structurale à haute température, tout en conservant la flexibilité nécessaire pour assurer l'activité, a été mise en évidence (7). Cette étude suggère que l'adaptation s'est effectuée par la dynamique : l'évolution a sélectionné les forces nécessaires à la stabilité et aux mouvements fonctionnels à température physiologique.

L'étude de la relation entre la dynamique moléculaire et les forces qui sous-tendent les structures représente un chemin captivant, menant à la compréhension des systèmes vivants.

### V - Conclusion

A côté des centres existants, de nouvelles sources de neutrons se développent aujourd'hui de par le monde.

Deux nouveaux centres ont été construits au cours des 4 dernières années, à Lucas Height à côté de Sydney, en Australie (2002) et à Garching, à côté de Munich, en Allemagne (2004). Deux autres sources seront opérationnelles dans les prochaines années à Oak Ridge, aux Etats-Unis, et à Tokai, au Japon. Ces sources ouvrent de nouvelles perspectives de recherche, avec un large panel d'instruments accessibles.

L'unicité de la méthode, et l'information spécifique et fondamentale qu'elle apporte, font de la diffusion de neutrons une technique incontournable pour sonder le cœur de la matière et des molécules biologiques. Par ailleurs, l'utilisation des neutrons a des applications bien au-delà de l'étude de la dynamique moléculaire. En biologie, La méthode que l'on appelle diffusion de neutrons aux petits angles, combinée à l'utilisation du marquage isotopique, permet d'étudier de grands complexes macromoléculaires, essentiels au fonctionnement de la cellule.

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) FRAUENFELDER H., PARAK F., YOUNG R.D., Conformational substates in proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1988, 17, 451-479.
- (2) DOSTER W., CUSACK S., PETRY W., Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, 1989, 337(6209), 754-756.
- (3) BEE M., Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Material Science, Adam Hilger, Philadelphia, PA, 1988.
- (4) IRIMIA A., EBEL C., MADERN D., *et al.*, The Oligomeric States of Haloarcula Marismortui Malate Dehydrogenase are Modulated by Solvent Components as Shown by Crystallographic and Biochemical Studies. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 326, 859-873.
- (5) BICOUT D.J., ZACCAI G., Protein flexibility from the dynamical transition: a force constant analysis. *Biophysical Journal*, 2001, 80(3), 1115-1123.
- (6) ZACCAI G., How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, 2000, 288(5471), 1604-1607.
- (7) TEHEI M., MADERN D., FRANZETTI B., ZACCAI G., Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(49), 40974-40979.



### *La dynamique de l'eau intracellulaire dans les organismes vivants*

Le chapitre suivant, basé sur une lettre examinée par *Physical Review Letters* en juillet 2007, présente une étude sur la diffusion de l'eau dans le cytoplasme d'*E. coli*. Ce travail a tiré avantage du marquage isotopique présenté dans le chapitre d'introduction, afin de renforcer le signal de l'eau et de réduire le signal provenant des autres constituants cellulaires. Les mouvements diffusifs de l'eau (H<sub>2</sub>O) intracellulaire ont été explorés dans une matrice entièrement deutériée, par diffusion quasiélastique de neutrons. Le chapitre se termine par une discussion sur la spécificité de *H. marismortui*, un organisme extrêmement halophile provenant de la Mer Morte, dont la dynamique fut également étudiée.

Les résultats concernant la dynamique de l'eau intracellulaire au sein d'*E. coli* ont été publiés dans *EMBO reports* en juin 2008; l'article est joint en Annexe 1.





### 3     *DOWN TO INTRACELLULAR WATER DYNAMICS           IN LIVING ORGANISMS*

Water plays a crucial role in almost all biochemical processes, and its importance has long been recognized, with the second chapter of the well-known Lehninger biochemistry textbook devoted to the description of the properties of life's solvent (Nelson and Cox, 2005). Fascinating applications have already emerged from the investigation of water structure and dynamics in biological systems, even if many questions still remain open. Le Bihan and Breton have introduced a new *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) technique that uses water diffusion to map and study brain anatomy and function (Le Bihan and Breton, 1985; Le Bihan et al., 1986). The technique, called water diffusion MRI (dMRI), is based on the observation of the anisotropic diffusion behaviour of water molecules in brain white matter (Le Bihan, 2003; Le Bihan et al., 2006). Diffusion anisotropy originates from the white matter organization in bundles of fibers running in parallel (Moseley et al., 1990). As it has been postulated that neuronal activation could induce changes in neuronal volumes (Andrew and MacVicar, 1994; Darquie et al., 2001; Zhong et al., 1993), the dMRI technique would be uniquely suited for the measurement of the "mind at work", by monitoring direct changes in water diffusion coefficients due to changes in tissue microstructure.

This example of a direct application of water dynamics for probing the brain environment emphasizes the challenging task that represents the understanding of water properties, at every scale of biological matter. At the cell scale, water constitutes the malleable matrix that envelops and sustains every component in the cell interior. Water is of primary importance to various cellular biological processes, including cell volume regulation (Cayley et al., 2000; Record et al., 1998), molecular recognition (Esposito et al., 2000), as well as protein folding, stability, dynamics and function (Careri, 1998; Cooper, 2000; Eggers and Valentine, 2001; Esposito et al., 2000; Ferrand et al., 1993; Fitter et al., 1996a; Nagendra et al., 1998). However, if the properties of water in contact with purified biological macromolecules have been studied extensively up to one layer of coverage and are reasonably well understood, little

is known about water properties in the cellular environment. Considering that the macromolecular concentration in the cell cytoplasm goes up to 400 mg/ml (Ellis and Minton, 2003), to what extent is water dynamics perturbed by steric confinement between macromolecular surfaces? Does the cell 'tame' water behaviour as it is commonly believed (reviewed by (Ball, 2001; Le Bihan, 2007; Mentré, 2001))? The aim of the work was to explore intracellular water dynamics directly in living cells, and to propose a description of its dynamics based on experimental data. Considering the large incoherent neutron scattering cross section of hydrogen compared to deuterium, neutrons are uniquely suited to study water dynamics by using isotope labelling.

The following chapter, based on a letter submitted to *Physical Review Letters* in July 2007, presents a neutron study that elucidates water dynamics in the cytoplasm of *E. coli*. In this work, we took advantage of isotope labelling techniques presented in the introduction chapter, to enhance water scattering and reduce scattering by other cellular components. We explored the diffusive motions of H<sub>2</sub>O in a fully deuterated cellular matrix, using quasielastic neutron scattering. The chapter ends with a discussion on the specificity of *H. marismortui*, an extreme halophilic organism from the Dead Sea, whose water dynamics was also studied.

The results concerning intracellular water dynamics in *E. coli* were published in *EMBO reports* in June 2008; the article is joined in Appendix 1.

### 3.1 *In vivo* measurement of intracellular water dynamics in *E. coli*

M. Jasnin<sup>1</sup>, M. Moulin<sup>2</sup>, M. Haertlein<sup>2</sup>, G. Zaccai<sup>1,3</sup>, M. Tehei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Grenoble, France*

<sup>2</sup>*Institut Laue Langevin, Deuteration Laboratory, Grenoble, France*

<sup>3</sup>*Institut Laue Langevin, Grenoble, France*

Water constitutes the intracellular matrix in which macromolecules move and interact. Understanding its dynamic state is a major scientific challenge, and continues to provoke controversy. We measured water dynamics *in vivo* in the cytoplasm of *E. coli* by neutron scattering and deuterium labelling. Experimental time-scales covered motions from pure to interfacial water. Contrary to the expectation that water is “tamed” by macromolecular confinement, the measurements established that water diffusion in the bacteria is pure-like at physiological temperature.

#### 3.1.1 Introduction

The general assumption is that steric confinement by macromolecular surfaces in the crowded cytoplasm perturbs significantly cell water structure and hinders its migration. Incoherent neutron scattering spectroscopy, combined with hydrogen-deuterium labelling, is uniquely sensitive for the measurement of atomic motions on the pico- to nanosecond time-scale in complex biological systems (Gabel et al., 2002; Tehei et al., 2004; Zaccai, 2000). Studies on water confined in hydrophilic and hydrophobic materials, and on water close to the surface of biological macromolecules, have revealed that both the structure and the dynamics of water were strongly modified at low hydration values. The diffusive motions of water have been measured by quasielastic neutron scattering (QENS) in membrane stacks (Fitter et al., 1999a), hydrated macromolecules (Bellissent-Funel et al., 1996; Bon et al., 2002; Zanotti et al., 1999), model peptides (Russo et al., 2005), DNA (Bastos et al., 2004; Beta et al., 2003; Schreiner et al., 1988) as well as in *Artemia* shrimp cysts with low water content (Trantham et al., 1984). Ruffle and collaborators had first predicted that cell water was mainly interfacial (water that interacts strongly with macromolecules), with reduced mobility compared to pure water (Ruffle et al., 2002). They later found from inelastic incoherent neutron scattering (IINS) on yeast cells and muscle tissue at cryogenic temperature that interfacial water accounted for

about 25-30 % of the total cell water mass under these conditions (Ford et al., 2004). The study concerned water vibrational motions in the intracellular matrix and the quantity of water that might be affected by macromolecular crowding. In the present study, we focused on the water diffusive motions in live mesophilic bacteria, addressing the nature of intracellular water dynamics under physiological conditions.

### **3.1.2 Methods**

#### **Sample preparation**

Deuterated *E. coli* (BLE21(DE3) strain) were cultivated at 37°C to an optical density value of 1.5, in deuterated Enfors minimum growth medium with deuterated glycerol (d8) as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at 5000 rpm in a Beckman centrifuge (JLA 10500 rotor) for 20 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 200 ml of H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (respectively Tris-DCl) pH 6.6). The cells were pelleted via 20 minutes centrifugation and transferred to aluminium sample holders (4 x 3 x 0.02 cm<sup>3</sup>) for the neutron measurements. After the experiments, a small amount of the pellet was resuspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilutions steps. The number of colonies was compared to that obtained for cells from the fresh culture, and found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after the total beamtime exposure. The rest of the cell pellet was dried in an oven at 80°C for a few days; the dry cell weight was found to be about 21 % of the total cell weight. Considering that the proportion of intracellular water is approximately 72 % of *E. coli* total cell weight (Record et al., 1998), we evaluated that extracellular water was less than 7 % of the total water.

#### **Neutron measurements**

The experiments were carried out at 281 K and 301 K using two different spectrometers. The inverted time-of-flight spectrometer IRIS (Rutherford Appleton Laboratory, Chilton; see <http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/iris> for further information) has an energy resolution of 17 µeV (FWHM), and is sensitive to motions with associated times of a few tens of ps. The time-of-flight spectrometer IN6 (Institut Laue Langevin, Grenoble; [www.ill.fr](http://www.ill.fr)) is sensitive to motions with associated times of a few ps (FWHM = 90 µeV). The

scattering was measured over a wave-vector range of  $0.5 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q$  is the wave-vector transfer modulus) for both spectrometers. A vanadium sample (a purely incoherent elastic scatterer) was measured to define the instrument resolution and correct for detector efficiency. IRIS spectra were corrected for detector efficiency, sample container and *E. coli* macromolecular contribution (see *Results*), normalized, grouped, and transferred into energy transfer spectra using the MODES data reduction programs (MODES). IN6 spectra were corrected in the same way, normalized, and the dynamic structure factor,  $S(\mathbf{Q}, \omega)$ , where  $\omega$  is the energy transfer, was extracted by using the LAMP data reduction routines (LAMP). The sample transmissions were  $> 90 \%$  on both instruments and multiple scattering was neglected.

### Data analysis

In the case of translational diffusion and rotational motions of water, the calculated scattering function,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , can be expressed phenomenologically as follows (Bée, 1988):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\langle x^2 \rangle Q^2 / 3} \left[ A_{1,T}(\mathbf{Q}) L(\Gamma_T, \omega) \otimes (A_{0,R}(\mathbf{Q}) \delta(\omega) + A_{1,R}(\mathbf{Q}) L(\Gamma_R, \omega)) \right] \quad [3.1]$$

where  $e^{-\langle x^2 \rangle Q^2 / 3}$  is a Debye-Waller (DW) factor, which arises from the convolution of the elastic component of the high frequency vibrational scattering function with the scattering function of diffusive motions; the DW factor is simply a scaling factor in  $\omega$ -space that does not modify the shape of the quasielastic scattering function. The quasielastic component arises from the convolution of the translational and rotational scattering functions, which are described by Lorentzian functions:

$$L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2} \quad [3.2]$$

where  $\Gamma_i$  is the half-width at half-maximum (HWHM) of the Lorentzian peak. Eq. 3.2 simplifies as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\langle x^2 \rangle Q^2 / 3} \left[ A_1(\mathbf{Q}) L(\Gamma_T, \omega) + A_2(\mathbf{Q}) L(\Gamma_R + \Gamma_T, \omega) \right] \quad [3.3]$$

The experimental scattering function,  $S_{\text{exp}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , is obtained by convoluting  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  with

the energy resolution of the spectrometer,  $S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , determined by the vanadium sample:

$$S_{\text{exp}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\hbar\omega/2k_{\text{B}}T} \left[ \left( e^{-\langle x^2 \rangle Q^2 / 3} A_0(\mathbf{Q}) \delta(\omega) + S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) \right) \otimes S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega) \right] + B_0 \quad [3.4]$$

where  $e^{-\hbar\omega/2k_{\text{B}}T}$  is a detailed balance factor,  $A_0$  is the elastic incoherent structure factor (EISF) arising from the slow motions that are not resolved by the instrumental resolution, and  $B_0$  an inelastic background due to vibrational modes of lowest energy, which recalls the lattice phonons in crystals (Bée, 1988).

The IRIS spectra were fitted well according to Eq. 3.3, 3.4 by a single Lorentzian, arising from the translational diffusion of cell water. The fits were performed over the energy transfer range -0.2 to +0.5 meV by using the IRIS Bayesian fitting program *QL function* from the MODES package (MODES). The IN6 spectra were fitted according to Eq. 3.3, 3.4 by two Lorentzians, over the energy transfer range -1.5 meV to +1.5 meV, by using the QENS\_FIT routine present in the LAMP package (LAMP).

### 3.1.3 Results

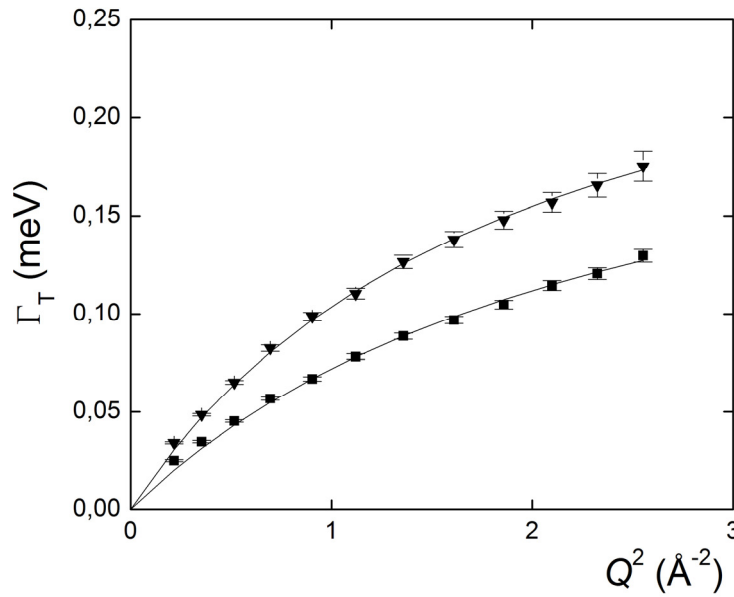
We performed experiments on deuterated cells containing H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O, respectively. The water scattering signal, free from the macromolecular contribution, was extracted from the difference between the two sample data sets. Extracellular water was less than 7 % of the total water mass, as detailed in *Methods*. The intracellular water, therefore, dominated the scattering signal at more than 93 % in the spectra corrected for macromolecular contribution. The measurements were carried out on two neutron spectrometers of different energy resolution, with complementary time-scales. The same length-scale was examined, as determined by the wave-vector transfer modulus  $Q$ . The full-width at half-maximum (FWHM) energy resolution of a neutron spectrometer defines the upper limit of the associated time-scale of motions. IN6 (FWHM = 90  $\mu\text{eV}$ ) at the ILL is suitable for the measurement of motions with characteristic times,  $\tau < 15$  ps, whereas IRIS (FWHM = 17  $\mu\text{eV}$ ), at ISIS, can resolve slower motions, with  $\tau < 75$  ps. Translational and rotational contributions of pure water can be separated by using data from the two time-scales. Hydrogen bond life times, associated to rotational relaxation times, are too short to contribute to the IRIS signal but can be measured on IN6 (Table 1). Translational pure water motions contribute to the scattering signal on both IN6 and IRIS. QENS measurements on hydrated macromolecules with low water content have revealed that

the residence times and the translational coefficients were about seven times higher (Bellissent-Funel et al., 1996) and reduced by a factor of five (Fitter et al., 1999a), respectively, compared to pure water. Rotational relaxation times, moreover, have been found slowed down by a factor between 5 and 10 (Halle, 2004; Modig et al., 2004). Reduced mobility interfacial water, therefore, can be detected optimally within the IRIS time-scale.

Neutron waves scattered by a moving atom as a function of time interfere with each other to give rise to the QENS energy broadening of the incident beam (Bée, 1988). In the case of simple exponential diffusion processes, the QENS can be fitted mathematically by Lorentzian functions. The  $Q^2$ -dependence of Lorentzian half-width at half-maximum (HWHM) contains information on the diffusion coefficient and other parameters of the process. *E. coli* water dynamics parameters extracted from IRIS data are reported in Figure 1 and Table 1. The spectra were each fitted with one elastic peak and one Lorentzian, which was attributed to translational motions of cell water. Its HWHM,  $\Gamma_T$  (Figure 1), was extracted and best fitted using a jump diffusion model (Bée, 1988), which describes diffusion between sites for the water protons with a mean residence time,  $\tau_0$ , at each site.  $\Gamma_T$  follows:

$$\Gamma_T = \frac{D_T Q^2}{1 + D_T Q^2 \tau_0} \quad [3.5]$$

where  $D_T$  represents the translational diffusion coefficient. The IRIS time-scale is uniquely suitable for the detection of reduced mobility interfacial water. Interestingly, however, we found translational diffusion coefficients that are very close to those of pure water at corresponding temperatures, with residence times about twice longer (Bellissent-Funel et al., 1995; Teixeira et al., 1985) (Table 1). Furthermore, QENS data indicated that *E. coli* water does not act as if it were confined (Figure 1). IRIS results, therefore, revealed an *E. coli* water translational contribution that was neither confined nor significantly slowed down compared to pure water.



**Figure 1.** IRIS data. HWHM of the translational Lorentzian,  $\Gamma_T$ , as a function of  $Q^2$ , at 281 K (squares) and 301 K (triangles).  $\Gamma_T$  was best fitted (solid lines) using a jump diffusion model (Bée, 1988) (Eq. 3.5). We found  $D_T = (1.53 \pm 0.05) \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 2.63 \pm 0.11 \text{ ps}$  at 281 K and  $D_T = (2.39 \pm 0.05) \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 2.16 \pm 0.05 \text{ ps}$  at 301 K. An important feature is that  $\Gamma_T$  extrapolated to 0 for  $Q \rightarrow 0$ , which means that cellular water does not act as if it were confined.

Spectrometer (FWHM, $\mu\text{eV}$ )	Origin of water (T, K)	$D_T$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\tau_0$ , ps	$\tau_{cor,R}$ , ps	Reference
IN6 (100)	Pure (278)	<b>1.3</b>	<b>2.33</b>	<b>4.71</b>	(Teixeira et al., 1985)
IRIS (17)	<i>E. coli</i> cells (281)	<b>1.53</b>	<b>2.63</b>		This work
IN6 (90)	<i>E. coli</i> cells (281)	<b>1.78</b>	<b>2.95</b>	<b>1.96</b>	This work
IRIS (17) & IN6 (90)*	<i>E. coli</i> buffer (281)	<b>1.68</b>	<b>1.48</b>	<b>1.89</b>	This work
IN6 (100)	Pure (285)	<b>1.6</b>	<b>1.66</b>		(Teixeira et al., 1985)
IN6 (90)	<i>H. marismortui</i> (285)	<b>1.29</b>	<b>6.12</b>	<b>1.83</b>	(Tehei et al., 2007)
MIBEMOL (28 ; 96) <sup>+</sup>	Pure (298)	<b>2.3</b>	<b>1.1</b>	<b>3.3</b>	(Bellissent-Funel et al., 1995)
IRIS (17)	<i>E. coli</i> cells (301)	<b>2.39</b>	<b>2.16</b>		This work
IN6 (90)	<i>E. coli</i> cells (301)	<b>2.94</b>	<b>2.28</b>	<b>1.54</b>	This work
IRIS (17) & IN6 (90)*	<i>E. coli</i> buffer (301)	<b>2.72</b>	<b>1.04</b>	<b>1.47</b>	This work

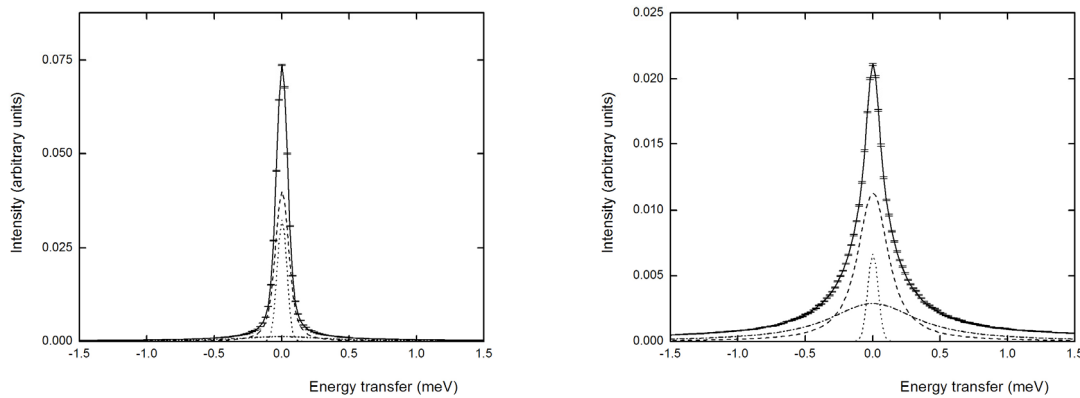
**Table 1.** Translational and rotational parameters of water in the pure state, in the cell and in the buffer. \* *E. coli* buffer was measured both on IRIS and IN6. The translational parameters were found to be similar on the two spectrometers. The rotational correlation times were extracted from the IN6 data. <sup>+</sup> Bellissent-Funel and collaborators have evaluated the translational parameters of pure water using the 28  $\mu\text{eV}$  resolution of the MIBEMOL spectrometer (LLB,



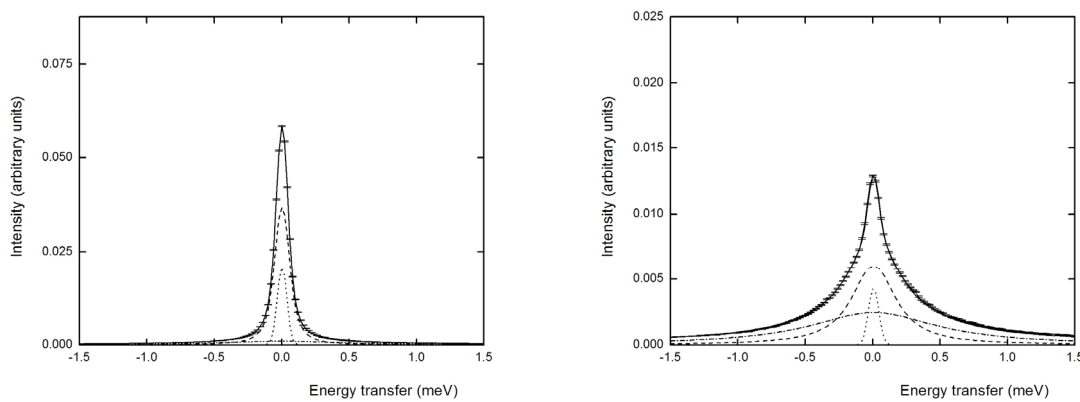
Saclay, [http://www-drecom.cea.fr/llb/spectros/spectros\\_p.php](http://www-drecom.cea.fr/llb/spectros/spectros_p.php)) (Bellissent-Funel et al., 1995). They have injected the translational Lorentzian isolated at 28  $\mu\text{eV}$ , in the spectra measured at 96  $\mu\text{eV}$ , in order to extract the rotational parameter.

IN6 spectra were fitted with one elastic peak and two Lorentzian functions (Figure 2). The translational and rotational motions of cell water were extracted from the narrow and broad Lorentzians, respectively. The HWHM of the broad Lorentzian shows a  $Q$ -independent profile (Figure 3), as expected for rotational motions (Sears, 1966). Rotational correlation times are close to the values extracted for the buffer under the same conditions and of the same order as the values measured for pure water by QENS and NMR (Chen et al., 1982; Sposito, 1981; Teixeira and Luzar, 1999). We concluded, therefore, that *E. coli* water diffusive motions are pure-like at physiological temperature.

(a)

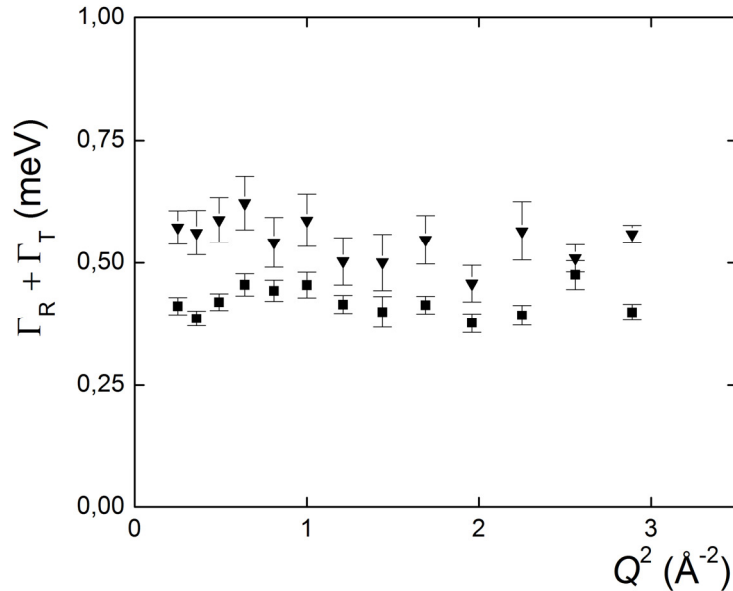


(b)



**Figure 2.** IN6 QENS data and applied fits using Eq. 3.3, 3.4 for *E. coli* cell water. Quasielastic spectra at  $Q = 0.5 \text{ \AA}^{-1}$  (a) and  $Q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$  (b), at  $T = 281 \text{ K}$  (left) and  $T = 301 \text{ K}$  (right). The data are indicated with the associated error bars. The bold and dotted lines represent the total fitted curve and the elastic peak, respectively. The narrow Lorentzian (dash line) was attributed

to translational motions and the broad component (*dash-dot line*) was attributed to rotational motions of cell water, broadened however by the translational contribution (see *Methods*).



**Figure 3.** IN6 data. Half-width at half-maximum of the broad Lorentzian,  $\Gamma_R + \Gamma_T$ , as a function of  $Q^2$ , at 281 K (*squares*) and 301 K (*triangles*). The rotational correlation times,  $\tau_{cor,R} = 1/\Gamma_R$ , were extracted from the broad Lorentzian after correction for the broadening arising from the translational contribution, and found to be  $1.96 \pm 0.07$  ps at 281 K, and  $1.54 \pm 0.08$  ps at 301 K.

### 3.1.4 Discussion

A recent neutron scattering study on *Haloarcula marismortui* (*H. marismortui*) cells has revealed a slow cell water component in these halophilic organisms (Tehei et al., 2007). In contrast, in live mesophilic *E. coli*, only one dynamic water population is detected, with properties similar to those of pure water. It has been speculated that *H. marismortui* cells adapted to the very saline environment of the Dead Sea, by trapping water molecules in a network of salt ions and acidic protein residues (Madern et al., 2000; Tehei et al., 2007). The study on *E. coli* contributed to direct proof, which dismantles the persisting idea that mesophile cells somehow 'tame' water and render it very different from pure water (Mentre, 2001). It confirms, furthermore, that hydration degree plays a crucial role in the dynamic state of water in confined geometries. If we exclude the *H. marismortui* study as a special evolutionary situation, low water mobility has so far been observed only in systems at low hydration or cryogenic temperature. Studies on water dynamics in deuterated C-phycoyanin, for example,

have found increasing water mobility already when hydration coverage reached one water layer (Bellissent-Funel et al., 1996). In Vycor, a porous silica glass with hydrophilic surfaces, water mobility became similar to that of pure-like water when hydration corresponded to a few water layers (Bellissent-Funel et al., 1995). *E. coli* contains about 2.6 g/g macromolecule of cellular water, in which the first hydration layer accounts for about 0.5 g/g macromolecule (Record et al., 1998). On average, cell water would therefore correspond to about five water layers around macromolecular surfaces. We recall that the residence time was found to be higher by a factor of two than that of pure water. This average may reflect the longer times spent by the water molecules in the hydration shells. Once released, however, exchange with external layers would take place with the diffusion rate of pure-like water.

### **3.1.5 Further Discussion (*not included in the article*)**

The neutron study on *E. coli* water dynamics was compared to studies on intracellular water properties performed with other techniques. Record and coworkers have evaluated the amount of cytoplasmic water in *E. coli* under various external osmolarities, using NaCl titrations (Record et al., 1998). They have discriminated between two water populations: a pure and a “bound” water populations. “Bound” water was defined as the amount of cytoplasmic water that was retained within the cell at high osmolarity, and was assimilated to macromolecular hydration water. They have found that bound water represented approximately 0.5 g/g macromolecule for a total cytoplasmic water content of about 2.6 g/g macromolecule. This means that bound water in *E. coli* accounts for about 20 % of total cell water mass. Our results showed that, close to physiological conditions, the translational diffusion of *E. coli* water was not reduced. The total water, including bound water, diffused similarly to pure water at the same conditions of temperatures. The bound water population, however, could influence *E. coli* residence times, which were found to be about twice longer than those found for the buffer. The residence time,  $\tau_0$ , is an average value of all the residence times for the water protons present in the cell;  $\tau_0$  is related to the height of the average local potential energy barrier imposed on the protons by their environment, by the Arrhenius relation:

$$\tau_0 = \tau_e e^{E_a/k_B T} \quad [3.6]$$

in which  $\tau_e$  is a pre-exponential factor and  $E_a$  is the activation energy. Assuming that  $\tau_e$  is the

same for cell water and for pure water, the activation energy difference between the two water systems,  $\Delta E_a$ , is  $0.41 \pm 0.03$  kcal/mol, which corresponds to about one tenth of the hydrogen bond energy. It suggested that cell water dynamics remains close to that of pure water, even with respect to the activation energy required for proton diffusion. Moreover, the slight increase of the residence time is also in good agreement with the results found for fully hydrated Vycor ( $h = 1$  g water/g Vycor) (Bellissent-Funel et al., 1995).

Our study complemented a previous IINS study concerning vibrational water motions in the intracellular matrix. Ford and coworkers have measured the inelastic neutron spectra of water in yeast cells and cardiac tissue at cryogenic temperature (Ford et al., 2004). They have found that about 25-30 % of the water present in these cells was interfacial, with altered vibrational behaviour at temperatures lower than 20 K. Interfacial water librational and translational intermolecular optical regions were both perturbed compared to the pure water spectrum. The librational peak was broadened and shifted to lower energy. At room temperature, our quasielastic measurements revealed only one water population with pure-like diffusive motions. At very low temperatures, water may be trapped either in the interfacial layer close to the surface or in the external layers that form ice, and could not switch from the interfacial to the external layers or *vice versa*. The dynamics of a strictly interfacial water contribution could hence be observed. At room temperature, however, the water very close to the macromolecular surface is not confined in the interfacial layer but free to exchange with its neighbour molecules from the external layers and reversely. Since the characteristic parameters associated to the slow motions of the protons along macromolecular surfaces are much longer than those associated to the exchange from interfacial layers to external layers, exchange would dominate and room temperature interfacial water would not behave like the slow interfacial water observed at very low temperature.

### 3.1.6 References

- Bastos, M., Castro, V., Mrevlishvili, G. and Teixeira, J. (2004) Hydration of ds-DNA and ss-DNA by neutron quasielastic scattering. *Biophys J*, **86**, 3822-3827.
- Bée, M. (1988) *Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*, Philadelphia.
- Bellissent-Funel, M.C., Chen, S.H. and Zanotti, J.M. (1995) Single-particle dynamics of water molecules in confined space. *Phys Rev E*, **51**, 4558-4569.
- Bellissent-Funel, M.C., Zanotti, J.M. and Chen, S.H. (1996) Slow dynamics of water molecules on the surface of a globular protein. *Faraday Discuss*, **103**, 281-294.
- Beta, I.A., Michalarias, I., Ford, R.C., Li, J.C. and Bellissent-Funel, M.C. (2003) Quasi-elastic neutron scattering study of hydrated DNA. *Chem Phys*, **292**, 541-542.
- Bon, C., Dianoux, A.J., Ferrand, M. and Lehmann, M.S. (2002) A model for water motion in crystals of lysozyme based on an incoherent quasielastic neutron-scattering study. *Biophys J*, **83**, 1578-1588.
- Chen, S.H., Teixeira, J. and Nicklow, R.M. (1982) Incoherent quasielastic neutron scattering from water in supercooled regime. *Phys Rev A*, **26**, 3477-3482.
- Fitter, J., Lechner, R.E. and Dencher, N.A. (1999) Interactions of hydration water and biological membranes studied by neutron scattering. *J Phys Chem B*, **103**, 8036-8050.
- Ford, R.C., Ruffle, S.V., Ramirez-Cuesta, A.J., Michalarias, I., Beta, I., Miller, A. and Li, J. (2004) Inelastic incoherent neutron scattering measurements of intact cells and tissues and detection of interfacial water. *J Am Chem Soc*, **126**, 4682-4688.
- Gabel, F., Bicout, D., Lehnert, U., Tehei, M., Weik, M. and Zaccai, G. (2002) Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q Rev Biophys*, **35**, 327-367.
- Halle, B. (2004) Protein hydration dynamics in solution: a critical survey. *Phil Trans R Soc Lond B*, **359**, 1207-1224.
- LAMP, the Large Array Manipulation Program.  
[http://wwwold.ill.fr/data\\_treat/lamp/front.html](http://wwwold.ill.fr/data_treat/lamp/front.html).
- Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, **4**, 91-98.
- Mentré, P. (2001) An introduction to "Water in the cell": tamed Hydra? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **47**, 709-715.
- MODES. A graphic user interface for IRIS data analysis.  
[http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes\\_manual.pdf](http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes_manual.pdf).

- Modig, K., Liepinsh, E., Otting, G. and Halle, B. (2004) Dynamics of protein and peptide hydration. *J Am Chem Soc*, **126**, 102-114.
- Record, M.T., Courtenay, E.S., Cayley, D.S. and Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci*, **23**, 143-148.
- Ruffle, S.V., Michalarias, I., Li, J.C. and Ford, R.C. (2002) Inelastic incoherent neutron scattering studies of water interacting with biological macromolecules. *J Am Chem Soc*, **124**, 565-569.
- Russo, D., Murarka, R.K., Copley, J.R.D. and Head-Gordon, T. (2005) Molecular view of water dynamics near model peptides. *J Phys Chem B*, **109**, 12966-12975.
- Schreiner, L.J., Pintar, M.M., Dianoux, A.J., Volino, F. and Rupprecht, A. (1988) Hydration of NaDNA by neutron quasi-elastic scattering. *Biophys J*, **53**, 119-122.
- Sears, V.F. (1966) *Can J Phys*, **44**, 1299-1311.
- Sposito, G. (1981) *J Chem Phys*, **74**, 6943-6949.
- Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Giudici-Orticoni, M.T., Bruschi, M. and Zaccai, G. (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Rep*, **5**, 66-70.
- Tehei, M., Franzetti, B., Wood, K., Gabel, F., Fabiani, E., Jasnin, M., Zamponi, M., Oesterhelt, D., Zaccai, G., Ginzburg, M. and Ginzburg, B.Z. (2007) Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 766-771.
- Teixeira, J., Bellissent-Funel, M.C., Chen, S.H. and Dianoux, A.J. (1985) *Phys Rev A*, **31**, 1913-1917.
- Teixeira, J. and Luzar, A. (1999) IOS, Amsterdam.
- Trantham, E.C., Rorschach, H.E., Clegg, J.S., Hazlewood, C.F., Nicklow, R.M. and Wakabayashi, N. (1984) Diffusive properties of water in *Artemia* cysts as determined from quasi-elastic neutron scattering spectra. *Biophys J*, **45**, 927-938.
- Zaccai, G. (2000) How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, **288**, 1604-1607.
- Zanotti, J.M., Bellissent-Funel, M.C. and Parello, J. (1999) Hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and NMR: the case of the typical EF-hand calcium-binding parvalbumin. *Biophys J*, **76**, 2390-2411.

## **3.2 Conclusion & Perspectives for future work**

Water molecules in the intracellular space move while interacting with many biological components and it has long been accepted that intracellular water diffusion was hindered by macromolecular crowding and restriction effects. However, very few *in vivo* measurements of intracellular water dynamics have been performed. A previous QENS study of Trantham and coworkers have found that the majority of cell water in *Artemia* cysts presented a reduced translational and rotational mobility (Trantham et al., 1984). The measurements have been performed on cysts at low hydration values, between 0.10 and 1.2 grams H<sub>2</sub>O per gram of dry cysts. The study on *E. coli* shed light on the intimate relationship between the amount of cytoplasmic water and the dynamical properties of intracellular water. The number of layers was found to be the central player of intracellular water dynamics in this mesophilic bacterium. The study showed that water diffusion in *E. coli* is not “tamed” by macromolecular confinement, but pure-like, at physiological temperature and hydration.

The conclusion drawn for intracellular water dynamics in *E. coli* drives new questions concerning global intracellular dynamics. Water may not be the only cellular molecule, which behaves differently in low hydration systems and in the cell. The coupling between hydration water and macromolecules has been the subject of many studies, provoking heated debate and controversy (Caliskan et al., 2006; Chen et al., 2006; Cornicchi et al., 2005; Wood, 2007). All the studies, however, have shown that hydration water was necessary for the protein to become fully active and functional (Fenimore et al., 2004). The question that arises, therefore, is to what extent macromolecular internal dynamics may be enhanced or reduced at cellular hydration, compared to that measured in hydrated powder or in solution. Could the effect of cellular hydration on water dynamics be extended to the internal dynamics in macromolecules? This question is addressed in Chapter 4, which presents results on the internal molecular motions measured directly in living *E. coli* by QENS.

The work on *E. coli* enhanced the specificity of the *H. marismortui* organism, in which a very slow water population has been discovered. The paper, which presented a detailed description of the very slow water component detected in this halophilic bacterium, is in Appendix 6 (Tehei et al., 2007). I contributed to this work for *E. coli* sample preparation and for water dynamics measurements on the BSS neutron spectrometer (Forschungszentrum Jülich, see [www.jcns.info](http://www.jcns.info) for further details). Understanding the mechanism behind the very slow water component found in this extreme halophile is crucial for the understanding of molecular adaptation to life in extreme saline conditions. Halophilic organisms thrive in very saline

environments and function with large amounts of salt in their cytoplasm. It was hypothesized that the slow cell water component found in *H. marismortui* could be bound by the protein-salt ion structures that halophilic protein have been shown to form (reviewed by (Madern et al., 2000); (Ginzburg and Ginzburg, 1975)). In contrast to *E. coli*, cellular  $K^+$  is retained within the *H. marismortui* cells, even in the absence of metabolism (Ginzburg and Ginzburg, 1982). The question that could be addressed, therefore, is whether or not cellular  $K^+$  is involved in the existence of the slow water component found in *H. marismortui*. A way to answer this question would be to efflux the intracellular  $K^+$  from deuterated *H. marismortui* and measure the QENS signal from such cells containing  $H_2O$ , on the IN16 spectrometer. Ginzburg and coworkers have proposed several protocols that reduce  $K^+$  content up to 90 % in *H. marismortui* (Ginzburg and Ginzburg, 1975; Ginzburg et al., 1971). The methods are based on the adjustment of the pH or of the external NaCl content during growth.



*Les mouvements macromoléculaires internes et globaux au sein d'E. coli*

Ce chapitre repose sur un article publié dans *Biophysical Journal*, qui décrit une étude quasiélastique sur les mouvements internes et globaux des macromolécules au sein d'*E. coli*. Les résultats obtenus *in vivo* ont été comparés à ceux issus d'études sur des poudres hydratées ou en solution. Le chapitre met en lumière l'influence de l'environnement cellulaire, en particulier l'influence de l'encombrement macromoléculaire et de la proportion d'eau intracellulaire, sur la dynamique interne et globale des macromolécules. L'article publié se trouve en Annexe 1.



## 4 INTERNAL AND GLOBAL MACROMOLECULAR MOTIONS IN *E. COLI*

Internal molecular motions on the ps-ns time-scale are the ‘elementary’ motions that lubricate larger amplitude motions on the millisecond time-scale, which are necessary to fundamental biological processes, including ligand binding, intermolecular recognition, enzyme catalysis and signal transduction (Austin et al., 1975; Jimenez et al., 2004; Rousseau and Schymkowitz, 2005; Tousignant and Pelletier, 2004). Beyond the fundamental significance of internal dynamics for the understanding of key biological processes, recent combined studies on protein activity, stability and dynamics have introduced promising applications for drug design. Tehei and coworkers have investigated the internal motions in *E. coli* dihydrofolate reductase (DHFR) (Tehei et al., 2006a; Tehei et al., 2006b), a key enzyme recognized as a drug target for inhibiting DNA synthesis in rapidly proliferating cells such as cancer cells (Huennekens, 1994). The comparison between internal motions in native and immobilized DHFR has revealed that the activation energy for enzyme catalysis may be increased in the immobilized DHFR, leading to the observed decrease in the catalytic reaction rate (Tehei et al., 2006a; Tehei et al., 2006b). The study has shown that DHFR immobilization has implications for the action of drugs on DHFR.

Achieving a good understanding of internal dynamics remains a challenge. The heterogeneity of protein motions has been demonstrated using a variety of techniques, including Mössbauer spectroscopy and neutron scattering (reviewed by (Parak, 2003)). Numerous *in vitro* neutron studies have investigated the complex dynamical landscape in proteins, and led to a rather good understanding of internal dynamics in powder and in solution samples (Dellerue et al., 2001; Doster et al., 1989b; Fitter et al., 1996b; Fitter et al., 1998; Fitter et al., 1999b; Paciaroni et al., 2003; Pérez et al., 1999; Tehei et al., 2006b; Zanotti et al., 1997). The exploration of internal dynamics in living organisms constitutes the following step in the capture of internal motions. The present chapter addresses this delicate task using neutron scattering and proposes a description of internal dynamics in living *E. coli* bacteria. Neutrons are uniquely suited to study internal molecular motions in entire cells, considering the large

incoherent neutron cross section of hydrogen atoms that represent about half of the atoms in biological macromolecules and are distributed nearly homogeneously within the structures.

The chapter relies on an article published in *Biophysical Journal*, which presents a quasielastic neutron study on internal and global macromolecular motions in *E. coli*. It proposes a comparison with previous work on hydrated powder and in solution, and elucidates to what extent the cell environment, including cellular water content and macromolecular crowding, influences internal dynamics compared to *in vitro* measurements. The article can be found in Appendix 1.

## 4.1 *In vivo* measurement of internal and global macromolecular motions in *E. coli*

M. Jasnin<sup>1</sup>, M. Moulin<sup>2</sup>, M. Haertlein<sup>2</sup>, G. Zaccai<sup>1,3</sup>, M. Tehei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Grenoble, France*

<sup>2</sup>*Institut Laue Langevin, Deuteration Laboratory, Grenoble, France*

<sup>3</sup>*Institut Laue Langevin, Grenoble, France*

We present direct quasielastic neutron scattering measurements, *in vivo*, of macromolecular dynamics in *E. coli*. The experiments were performed on a wide range of time-scales, to cover the large panel of internal and self-diffusion motions. Three major internal processes were extracted at physiological temperature: a fast picosecond (ps) process that corresponded to restricted jump diffusion motions, and two slower processes that resulted from reorientational motions occurring in about 40 ps and 90 ps, respectively. The analysis of the fast process revealed that the cellular environment leads to an appreciable increase in internal molecular flexibility and diffusive motion rates compared to those evaluated in fully hydrated powders. The result showed that the amount of cell water plays a decisive role in internal molecular dynamics. Macromolecular interactions and confinement, however, attenuate slightly the lubricating effect of water, as revealed by the decrease of the *in vivo* parameters compared to those measured in solution. The study demonstrated that standard sample preparations do not mimic accurately the physiological environment, and suggested that intracellular complexity participates in functional dynamics necessary to biological activity. Furthermore, the method allowed the extraction of the self-diffusion of *E. coli* macromolecules, which presented similar parameters as those extracted for hemoglobin in red blood cells.

### 4.1.1 Introduction

The study of internal molecular motions on the pico- to nanosecond (ps-ns) time-scale reveals fundamental dynamical processes required for biological activity and stability. Ps-ns local motions in macromolecules act as the lubricant of larger conformational changes on a slower, millisecond, time-scale (Brooks et al., 1988) that are necessary for important biological processes, including ligand binding, intermolecular recognition, enzyme catalysis and signal transduction (Austin et al., 1975; Jimenez et al., 2004; Rousseau and Schymkowitz, 2005; Tousignant and Pelletier, 2004). Incoherent neutron scattering spectroscopy is a powerful

technique for the measurement of atomic motions on the ps-ns time domain. The scattering signal is dominated by hydrogen nuclei, which have a neutron incoherent cross section about forty times larger than the cross section of any other nucleus or isotope. Hydrogen atoms represent up to about half of the atoms in biological macromolecules and are distributed nearly homogeneously within the structures. Their incoherent scattering signal, therefore, reflects internal molecular motions. Neutron studies have revealed that local molecular motions are influenced by environmental conditions, including hydration level and temperature. The temperature dependence of the global atomic mean square displacement (MSD), which corresponds to internal flexibility, has been studied extensively over the last decades (reviewed by (Gabel et al., 2002)). At sufficient hydration, it has been found that, below a dynamical transition temperature at about 180-240 K, atomic motions are harmonic predominantly. The atoms are anchored within the structure, stacked in a given energy state, and they vibrate about their equilibrium position. Above the dynamical transition temperature, the MSD increases significantly due to the contribution of diffusive motions, which may contribute to the sampling of different conformational substates (Frauenfelder et al., 1988). At physiological conditions, the energy barrier separating different free energy states is similar to thermal energy, and the molecular subgroups can overcome rotational barriers. Many but not all macromolecules become fully active and functional only when these diffusive motions can take place. The study of localized diffusive motions, therefore, is of fundamental relevance to understand the origin of functional internal flexibility in macromolecules.

Quasielastic incoherent neutron scattering (QENS) provides accurate information on local diffusive motions occurring in macromolecules (Smith, 1991). The technique has been used extensively to study internal molecular motions in hydrated protein powders (Andreani et al., 1995; Dellerue et al., 2001; Doster et al., 1989; Fitter, 1999; Paciaroni et al., 2003; Pérez et al., 1999; Roh et al., 2006; Zanotti et al., 1997) as well as in the integral membrane protein bacteriorhodopsin in purple membrane stacks (Fitter et al., 1998; Fitter et al., 1996a; Fitter et al., 1996b; Fitter et al., 1997; Fitter et al., 1999). These studies have indicated that internal flexibility decreased when the hydration level was lowered. Pérez and coworkers have compared internal dynamics in dry powder, at several hydration levels, and in solution, for myoglobin and lysozyme (Pérez et al., 1999). They have shown that the surface side chains of the two types of proteins acquired progressively the possibility to diffuse locally, when increasing the hydration level up to complete coverage. Furthermore, both motion amplitudes and internal diffusive motion rates increased significantly in solution compared to fully hydrated powder. The differences in internal dynamics observed between powder and solution

samples lead to another challenging question: what about the internal dynamics in the cell interior? Cell macromolecules move and interact in a crowded intracellular matrix. It has been shown that macromolecular self-diffusion coefficients are reduced in the cell cytoplasm (Doster and Longeville, 2007; Ellis, 2001a; Elowitz et al., 1999; Luby-Phelps, 2000), while macromolecular associations can be favoured (Ellis, 2001b). Very little is known concerning *in vivo* internal macromolecular dynamics. In particular, to what extent internal dynamics could be enhanced or reduced under cellular conditions of hydration and crowding, compared to that measured in hydrated powder or in solution? In the present study, we addressed this question using QENS, and we present direct measurements of global and internal molecular motions in living *E. coli* at physiological temperature.

## **4.1.2 Materials and Methods**

### **Sample preparation**

Native *E. coli* (BLE21 (DE3) strain) were cultivated at 37°C to an optical density value of 2, in Enfors minimum growth medium with glycerol as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at 5000 x rpm in a Beckman centrifuge (JLA 10500 rotor) for 20 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 100 ml of D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-DCl pH 6.6). The cells were pelleted via 20 minutes centrifugation and transferred to aluminium sample holders (4 x 3 x 0.03 cm<sup>3</sup>). After the experiments, a small amount of the pellet was resuspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilutions steps. The number of colonies was compared to that obtained for cells from the fresh culture, and found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after the total beamtime exposure.

### **Neutron scattering measurements**

The experiments were carried out at room temperature using three spectrometers: the time-of-flight spectrometer IN6 (Institut Laue Langevin (ILL), Grenoble; see [www.ill.fr](http://www.ill.fr) for further information), with an energy resolution of 90 μeV (full-width at half-maximum, FWHM); the inverted time-of-flight spectrometer IRIS (Rutherford Appleton Laboratory, Chilton, see [www.isis.rl.ac.uk](http://www.isis.rl.ac.uk)), with an energy resolution of 17 μeV (FWHM); and the backscattering spectrometer IN16 (ILL, Grenoble, FWHM = 0.9 μeV). The scattering was measured over a wave-vector of  $0.5 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q$  is the wave vector transfer modulus).

A vanadium sample (a purely elastic scatterer) was measured to define the instrument resolution and correct for detector efficiency. IRIS, IN6 and IN16 spectra were corrected for detector efficiency, sample container and buffer scattering, normalized, grouped, and converted to  $S(\mathbf{Q},\omega)$  data using the MODES and LAMP data reduction routines (MODES, LAMP), respectively. The transmissions of the samples were  $> 90 \%$  and multiple scattering was neglected.

### **Incoherent neutron scattering from living cells**

An exhaustive description of quasielastic incoherent neutron scattering (QENS) can be found in Bée (Bée, 1988). Hydrogen nuclei have an incoherent cross section forty times larger than that of any other atom and isotope, and they dominate the scattering signal. As the signal relies on incoherent scattering, the dynamics of hydrogenated molecules can be explored in samples that need not be crystalline or even monodisperse, such as living cells (Tehei et al., 2004). Macromolecules make up *ca.* 96 % of the total dry weight of *E. coli*, of which 55 % are proteins, 20 % are ribonucleic acids (RNA) and 9 % are lipids (Madigan et al., 2000). Internal motions of *E. coli* macromolecules were studied by measuring native (natural abundance of H) *E. coli* resuspended in D<sub>2</sub>O buffer. A subtraction of the D<sub>2</sub>O buffer spectra from the spectra measured for the cells gives a valuable approximation of the scattering signal from cell macromolecules. Considering that proteins are the dominant cellular macromolecules by mass and that the hydrogen percentage is higher in proteins compared to every other type of macromolecules (about 50 % for proteins compared to 30 % for RNA and lipids), it is reasonable to assume, therefore, that protein motions dominate the macromolecular scattering signal from living cells.

### **Separation of the diffusive motions using QENS**

The diffusive motions of hydrogen atoms in macromolecules explored here belong to the ps-ns time domain, and can be detected using the combination of different neutron spectrometers. The energy resolution of the spectrometer defines the upper limit of the accessible times of motions. The IN6 spectrometer, which has a FWHM = 90  $\mu\text{eV}$ , is suitable for the measurement of motions with short characteristic times,  $\tau < 15$  ps. The higher resolution of the IRIS spectrometer, FWHM = 17  $\mu\text{eV}$ , resolves slower motions, with  $\tau < 75$  ps. Very slow motions that occur up to about 1 ns can be detected with the very high energy resolution of IN16 (FWHM = 0.9  $\mu\text{eV}$ ). On each spectrometer, the average dynamical behaviour of all



protons diffusing in the time-window is measured. The protons, which move very slowly with respect to the time-scale associated to the spectrometer, are seen as immobile and contribute to the elastic intensity. On the reverse, very fast protons with respect to the energy resolution contribute in a flat background.

## Data analysis

In the quasielastic region of the measured spectra, the calculated scattering function,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , has been described by Bée (Bée, 1988):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \cdot S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega) \quad [4.1]$$

where DW is a Debye-Waller (DW) factor, which accounts for vibrational modes, and  $S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega)$  is a diffusive contribution. The DW factor is simply a scaling factor in  $\omega$ -space, which does not modify the shape of the quasielastic scattering function. In the case of global and internal macromolecular motions in the cell interior,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  can be written as follows (Bée, 1988):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \left[ S_{\text{self}}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes \left( A_0(\mathbf{Q}) \delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q}) L(\Gamma_i, \omega) \right) \right] \quad [4.2]$$

The quasielastic component arises from the convolution of the self-diffusion scattering function,  $S_{\text{self}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , with the internal (localized) scattering function,  $A_0(\mathbf{Q}) \delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q}) L(\Gamma_i, \omega)$ , which are supposed to uncoupled from each other as has been done in previous work on myoglobin in crowded solutions (Busch et al., 2006). The global and internal scattering functions are both described by Lorentzian functions:

$$L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2} \quad [4.3]$$

with  $\Gamma_i$  the half-width at half-maximum (HWHM) of the Lorentzian peak.

The measured scattering function,  $S_{\text{meas}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , is obtained by convoluting  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  with the energy resolution of the spectrometer,  $S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , determined by the vanadium sample:

$$S_{\text{meas}}(Q, \omega) = e^{-\hbar\omega/(2k_B T)} [S_{\text{calc}}(Q, \omega) \otimes S_{\text{res}}(Q, \omega)] + B_0 \quad [4.4]$$

in which  $e^{-\hbar\omega/(2k_B T)}$  is a detailed balance factor and  $B_0$  an inelastic background due to vibrational modes of lowest energy, which reminds the phonons in crystals (Bée, 1988).

For IRIS spectra, the fits were performed over the energy transfer range -0.2 to +0.5 meV, by using the IRIS Bayesian fitting program *QL function* present in the MODES package (MODES). The IN16 and IN6 spectra were fitted over the energy transfer ranges -12  $\mu\text{eV}$  to +12  $\mu\text{eV}$  and -1.5 meV to +1.5 meV, respectively, using the QENS\_FIT routine present in the LAMP package (LAMP).

### 4.1.3 Results and discussion

#### Internal motions in living cells by QENS

In biological macromolecules, many different molecular substructure groups experience localized diffusive motions, which occur, in a large part, with correlation times from 0.1 to 200 ps (Fitter et al., 1996a). As described in *Materials and Methods*, the diffusive motions are related to the Lorentzian functions used to fit QENS data (see Data Analysis). The motions are characterized by the Lorentzian half-widths at half-maximum (HWHM),  $\Gamma_i$ , which are related at high  $Q^2$  values to the inverse of correlation times,  $\tau_{\text{cor},i}$ , and by quasielastic incoherent structure factors (QISF),  $A_i$  with  $i > 0$ . A  $Q^2$ -independent linewidth can account for reorientational motions such as jump diffusion motions between a finite number of sites. In contrast, a non zero extrapolated value of  $\Gamma_i$  at  $Q^2 = 0$ , followed by an increase of the linewidth with  $Q^2$ , reflects diffusive motions within a confined volume. The EISF, which corresponds to the elastic intensity fraction over the total intensity, allows to access the motion geometry as well as the number of the mobile and immobile protons in the experimental energy resolution. The  $Q$ -dependences of  $\Gamma_i$  and the EISF, therefore, provide information on the nature of the motions.

With the aim of capturing the essence of the complex landscape of internal motions in cell macromolecules, we used a finite number of Lorentzians to parameterize the major types of motions depending on their time-scale. The interest was to describe the diffusive motions in a simplified and meaningful way, using only a few phenomenological variables. Each Lorentzian must be understood as an average contribution of the motions that occur in a certain

time- and length-scales. In the following section, we described the motions belonging to the ps-to-ns time-scale, using the three instrumental energy resolutions presented previously. The characteristic length and time parameters of the motions were extracted from the Lorentzian HWHM and EISF as functions of  $Q$ , using both a phenomenological approach and accurate models. The aim of the approach was to determine whether or not internal macromolecular dynamics measured in entire cells was similar to that found in hydrated powder, in membrane or in solution, and to address to what extent the cellular environment influences the diffusive motions in macromolecules.

### **Fast internal motions**

The internal motions captured on IN6 possess characteristic times of a few ps. On this time-scale, the global motions contribute to the scattering function as a very sharp Lorentzian that is much narrower than the instrumental energy resolution. Eq. 4.2 simplifies therefore as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \left[ A_0(\mathbf{Q}) \delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q}) L(\Gamma_i, \omega) \right] \quad [4.5]$$

The data were fitted with a single Lorentzian function using Eq. 4.4, 4.5. The QENS spectra and applied fits are plotted in Figure 1. Considering the large number of molecular subunits that gives rise to a large variety of motions, the single Lorentzian analysis is a rough approximation; it gives, however, a good indication on the average motion type. The  $Q^2$ -dependence of the Lorentzian half-width at half-maximum (HWHM),  $\Gamma_{\text{fast}}$ , is plotted in Figure 2.  $\Gamma_{\text{fast}}$  revealed the existence of diffusive motions within confined space, as indicated by the non-zero intercept,  $\Gamma_{f0}$ , in the low  $Q^2$  region.  $\Gamma_{f0}$  is about 100  $\mu\text{eV}$  at 280 K and 300 K. The low  $Q^2$  profile was well accounted for by the model of Volino and Dianoux, which describes diffusion inside the volume of a sphere (Volino and Dianoux, 1980). The model gave access to the confinement sphere radius.  $\Gamma_{f0}$  follows (Volino and Dianoux, 1980):

$$\Gamma_{f0}(0 < Q < Q_0 = \pi/a) = \frac{4.33 D_{\text{local}}}{a^2} \quad [4.6]$$

where  $D_{local}$  is the diffusion coefficient inside a spherical volume of radius  $a$ .  $a$  was extracted from the EISF variation with  $Q$ . The model predicts that the experimental EISF follows:

$$\text{EISF}(\mathbf{Q}) = p + (1-p) \left\{ \frac{3[\sin(Qa) - (Qa)\cos(Qa)]}{(Qa)^3} \right\}^2 \quad [4.7]$$

with  $p$  the fraction of immobile protons, with respect to the instrumental time-window. The  $Q$ -dependence of the EISF is plotted in Figure 3. We found  $p = 0.61$  and  $a = 3.11 \text{ \AA}$  at 280 K;  $p = 0.56$  and  $a = 3.40 \text{ \AA}$  at 300 K. As revealed by the EISF profile at high  $Q$  values, the values of immobile protons,  $p$ , have large uncertainties. The fit is improved by using a distribution of radii of sphere. The approach with a single sphere radius was chosen to compare with previous work analysed in the same way.

At larger  $Q^2$  values, the linewidth follows the well known jump diffusion behaviour (Bée, 1988).  $\Gamma_{fast}$  increases to approach asymptotically a constant value,  $\Gamma_{\infty}$ .  $\Gamma_{\infty}$  is about 140  $\mu\text{eV}$  at 280 K and 185  $\mu\text{eV}$  at 300 K, which correspond to correlation times,  $1/\Gamma_{\infty}$ , of about 4.7 ps and 3.6 ps, respectively.

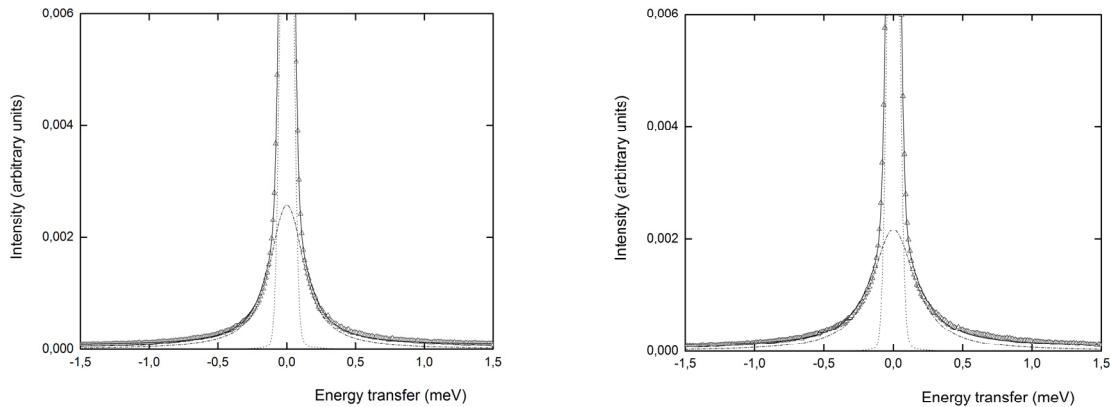


Figure 1. IN6 QENS data of native *E. coli* containing  $\text{D}_2\text{O}$ . QENS spectra at  $Q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$ , at  $T = 280 \text{ K}$  (left) and  $T = 300 \text{ K}$  (right). The fit for each spectrum was performed in the quasi-elastic region for  $-1.5 \text{ meV} < \hbar\omega < 1.5 \text{ meV}$ . The data are indicated by the triangles; the total fitted curve (**bold line**) was obtained using Eq. 4.4, 4.5 with a single Lorentzian function. The elastic peak is represented by a dotted line. The Lorentzian is represented by a dash-dotted line. The highest intensity values (*top of the frame*) in both figures correspond to about one third of the total intensity at  $\hbar\omega=0$ .

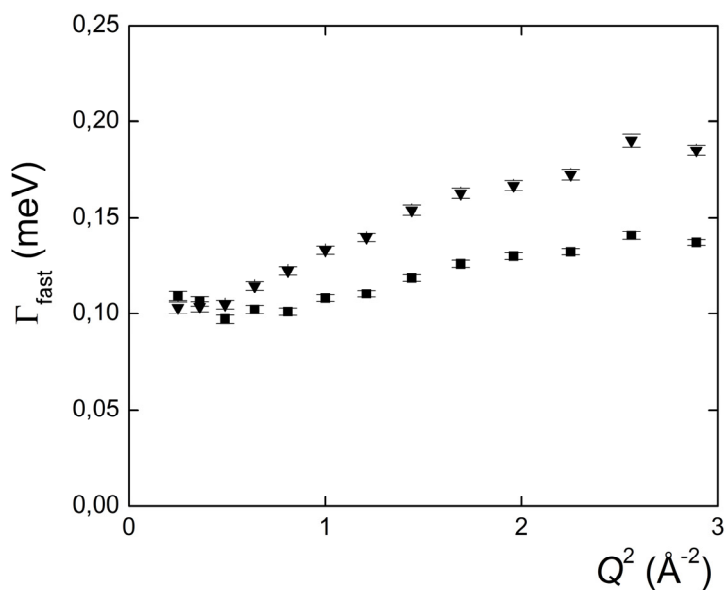


Figure 2. IN6 data. HWHM of the single Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , as a function of  $Q^2$ , at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

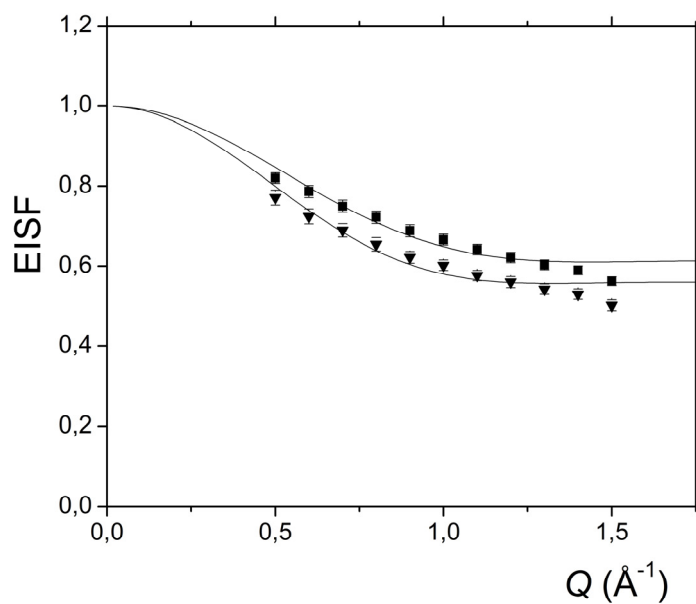


Figure 3. IN6 data. Elastic incoherent structure factor (EISF) as a function of  $Q$ , at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

Previous studies performed on hydrated powder at full hydration (hydration level  $h \sim 0.4$  g water /g protein) and in solution have revealed similar  $Q^2$ -dependences for the single Lorentzian analysis (Appavou et al., 2006; Fitter et al., 1998; Fitter et al., 1996b; Fitter et al.,

1999; Pérez et al., 1999; Tehei et al., 2006; Zanotti et al., 1997). The characteristic parameters, however, appeared to be dependent of the sample type. The length-scale explored by the motions in cell macromolecules, given by the sphere radius of about 3.2 Å, is longer than that explored in fully hydrated powder (Pérez et al., 1999; Zanotti et al., 1997) and in the integral membrane protein bacteriorhodopsin (Fitter et al., 1998; Fitter et al., 1999), which present sphere radii between 0.8 Å and 1.7 Å. In contrast, the volume explored by the atoms in cell macromolecules is similar or smaller than the volume explored by the atoms from proteins in solution, depending on the solution concentration. The sphere radii have been found to be: 2.5 Å for a concentrated solution of 244 mg/ml of dihydrofolate reductase (DHFR) at 285 K (Tehei et al., 2006); 4.1 Å and 4.4 Å for solutions of 60 mg/ml of myoglobin and lysozyme, respectively, at 293 K (Pérez et al., 1999); 3.6 Å for a solution of 85 mg/ml of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) at ambient temperature (Appavou et al., 2006). If we exclude the DHFR case, the extrapolated HWHM at  $Q^2 = 0$  is smaller for cell macromolecules compared to the value of about 150  $\mu\text{eV}$  found for proteins in solution and in membrane (Fitter et al., 1999; Pérez et al., 1999), and higher than the value of about 70  $\mu\text{eV}$  extracted for proteins in fully hydrated powder (Pérez et al., 1999; Zanotti et al., 1997). We recall that lower HWHM correspond to longer correlation times and reflects slower motions. Considering both the length- and time-scales, the average diffusive motions explored in a few ps inside cell macromolecules lie between those found for proteins in hydrated powder and in solution.

### **Slow internal motions**

By using the 17  $\mu\text{eV}$  energy resolution of the IRIS spectrometer, slower processes belonging to a time-scale of a few tens of ps were isolated. As for IN6, the global motions do not contribute to the scattering signal on IRIS. The IRIS spectra were fitted with two Lorentzian functions using Eq. 4.4, 4.5. The HWHM of the broad Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , is plotted in Figure 4, for the 280 K and 300 K temperatures. It revealed a similar profile to that found for IN6 data fitted with one Lorentzian: at low  $Q^2$ ,  $\Gamma_{\text{f0}}$  is about 100  $\mu\text{eV}$  at the two temperatures;  $\Gamma_{\text{fast}}$  increases at larger  $Q^2$  values up to  $\Gamma_{\text{f}\infty}$  values of 140  $\mu\text{eV}$  and 180  $\mu\text{eV}$ , at 280 K and 300 K respectively, which correspond to correlation times of about 4.7 ps and 3.7 ps, respectively. The broad Lorentzian, therefore, was attributed to the fast internal motions isolated previously on IN6 with the single Lorentzian approach.

The HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{slow}}$ , plotted in Figure 5, showed a  $Q^2$ -independent profile, indicating reorientational motions.  $\Gamma_{\text{slow}}$  had a mean value of about 14  $\mu\text{eV}$

at the two temperatures, corresponding to a correlation time of 44 ps. The sharp Lorentzian arises from slower internal motions, compared to the fast processes characterized on IN6. The slow processes can be for example stochastic reorientations of large molecular subunits, such as polypeptide side chains, fatty acid chains or other molecular subunits, as well as rotational motions of smaller groups, such as protons in methyl groups. Molecular dynamics simulations on hydrated lysozyme at 295 K have shown that methyl groups presented a wide range of associated correlation times, with a mean value of about 75 ps (Roh et al., 2006). The  $Q$ -dependence of the QISF associated to the slow motions (*figure not shown*) revealed a profile that suggests a two-site jump diffusion model. It is in good agreement with a previous work on purple membrane (Fitter et al., 1996a), in which Fitter and coworkers have investigated internal molecular motions of bacteriorhodopsin at 297 K, using the same energy resolution on IRIS (Fitter et al., 1996a). They have isolated a “slow” proton population, whose motions were described by a two-site jump diffusion model, with associated relaxation times,  $2/\Gamma_{\text{fast}}$ , of 80-100 ps. It corresponds to correlation times of about 40-50 ps, which are similar to the correlation times found for *E. coli*.

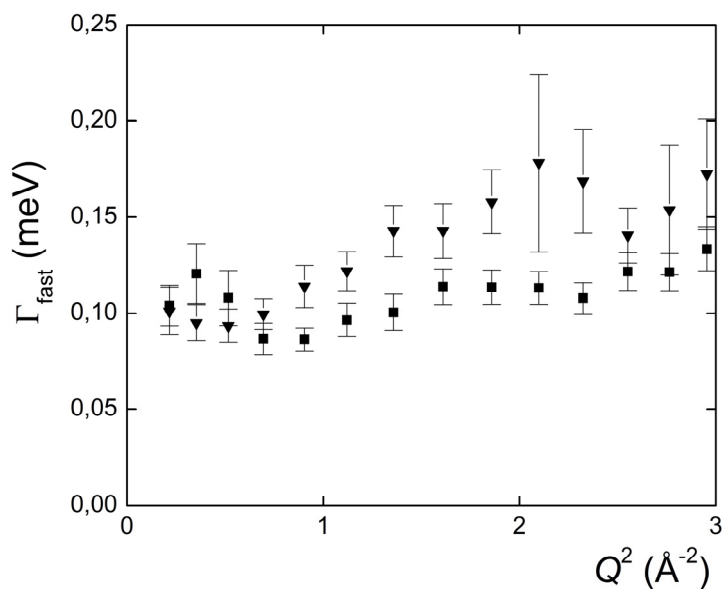


Figure 4. IRIS data. HWHM of the broad Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , as a function of  $Q^2$  at 280 K (*squares*) and 300 K (*triangles*).

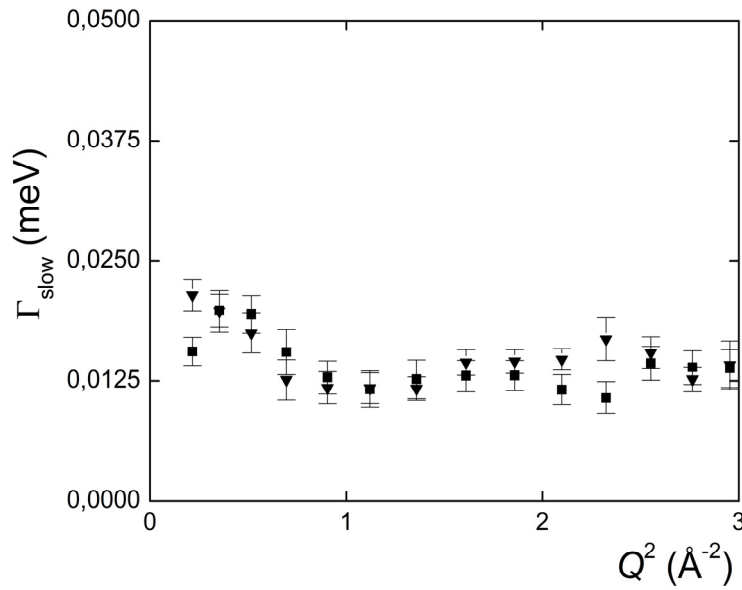


Figure 5. IRIS data. HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{slow}}$ , as a function of  $Q^2$ , at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

### Very slow internal motions and macromolecular self-diffusion

Very slow internal motions were separated from macromolecular self-diffusion using the energy resolution of the IN16 spectrometer (FWHM = 0.9  $\mu\text{eV}$ ), which gives access to characteristic times up to 1 ns. The apparent self-diffusion coefficient,  $D$ , of hemoglobin in red blood cells have been found to be about  $1.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  at 310 K (Doster and Longeville, 2007). Hemoglobin is the main component of red blood cells, with a molecular mass of 64 kDa and a concentration *ca.* 330 mg/ml close to that in the cell cytoplasm (Ellis, 2001b). Cellular macromolecules present a distribution of molecular masses, going from a few tens to a few thousands of kDa. Considering similar macromolecular concentrations, the apparent self-diffusion coefficient of *E. coli* macromolecules, mainly proteins, is expected to be of the same order than the value found for hemoglobin in red blood cells. The QENS broadening arising from global motions of cellular macromolecules coincides therefore with the IN16 energy resolution, and has to be taken into account to extract very slow internal motions from the scattering signal. The global and internal motions were each well described by a single Lorentzian and Eq. 4.2 described in *Materials and Methods* simplified as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \left[ A_{\text{self}}(\mathbf{Q}) L(\Gamma_{\text{self}}, \omega) + A_{\text{broad}}(\mathbf{Q}) L(\Gamma_{\text{very-slow}} + \Gamma_{\text{self}}, \omega) \right] \quad [4.8]$$



The broad Lorentzian arises mainly from the internal contribution,  $\Gamma_{\text{very slow}}$ , and is broadened by the self-diffusion contribution,  $\Gamma_{\text{self}}$ , as described in Eq. 4.8. The results of the fit obtained using Eq. 4.8 are shown in Figure 6.

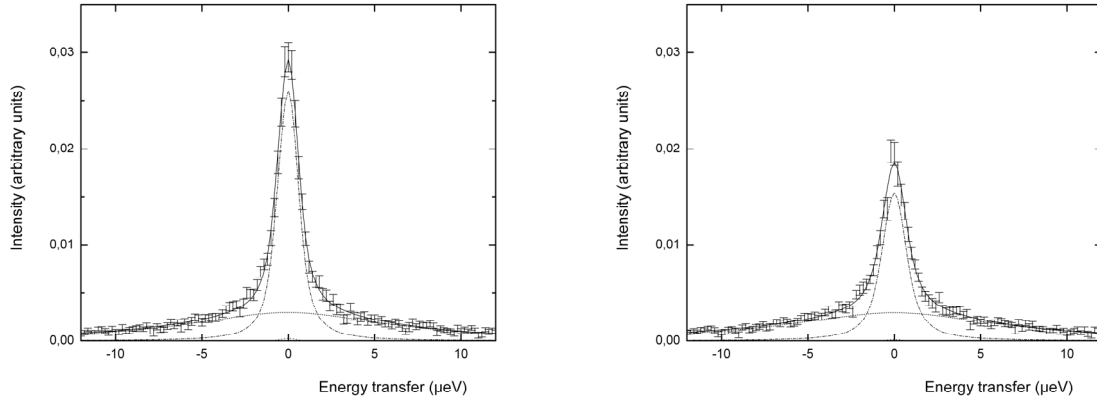


Figure 6. IN16 QENS data and applied fits for native *E. coli* containing  $D_2O$ . QENS spectra at  $Q = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$ , at  $T = 284 \text{ K}$  (left) and  $T = 303 \text{ K}$  (right). The fit for each spectrum was performed in the quasielastic region for  $-12 \text{ } \mu\text{eV} < \hbar\omega < 12 \text{ } \mu\text{eV}$ . The data are indicated with the associated error bars. The bold line is the total fitted curve obtained using Eq. 4.4, 4.8. The broad Lorentzian is shown by a dot-dash line and the sharp Lorentzian by a dash line.

The HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{self}}$ , is plotted in Figure 7. The  $\Gamma_{\text{self}}$  profile revealed long-range translational motions, as indicated by the increase of the linewidth with  $Q$  and the extrapolation to 0 for  $Q \rightarrow 0$ .  $\Gamma_{\text{self}}$  increased up to about  $0.5 \text{ } \mu\text{eV}$  at  $284 \text{ K}$  and  $0.75 \text{ } \mu\text{eV}$  at  $303 \text{ K}$ . The linewidth was well fitted using a jump diffusion model, which describes diffusion between sites with a mean residence time,  $\tau_0$ , at each site (Bée, 1988).  $\Gamma_{\text{self}}$  follows (Bée, 1988):

$$\Gamma_{\text{self}} = \frac{DQ^2}{1 + DQ^2\tau_0} \quad [4.9]$$

where  $D$  represents the apparent translational diffusion coefficient. We found  $D = (0.85 \pm 0.15) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 0.97 \pm 0.08 \text{ ns}$  at  $284 \text{ K}$ , and  $D = (1.06 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 0.59 \pm 0.04 \text{ ns}$  at  $303 \text{ K}$ . The values are consistent with the value of  $1.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  found for hemoglobin in red blood cells at  $310 \text{ K}$  (Doster and Longeville, 2007). The average characteristic distance between two jumps was found to be  $2.2 \text{ \AA}$  at  $284 \text{ K}$  and  $1.9 \text{ \AA}$  at  $303 \text{ K}$ , which are reasonable values for macromolecules with an average radius of gyration of a few tens of  $\text{Å}$ . These values

are also in good agreement with the value of 1.0 Å found by Busch and coworkers at 293 K, for myoglobin in crowded solutions with a concentration close to the cell cytoplasm (Busch et al., 2006). We attributed, therefore, the sharp Lorentzian to the apparent self-diffusion of macromolecules in the *E. coli* interior.

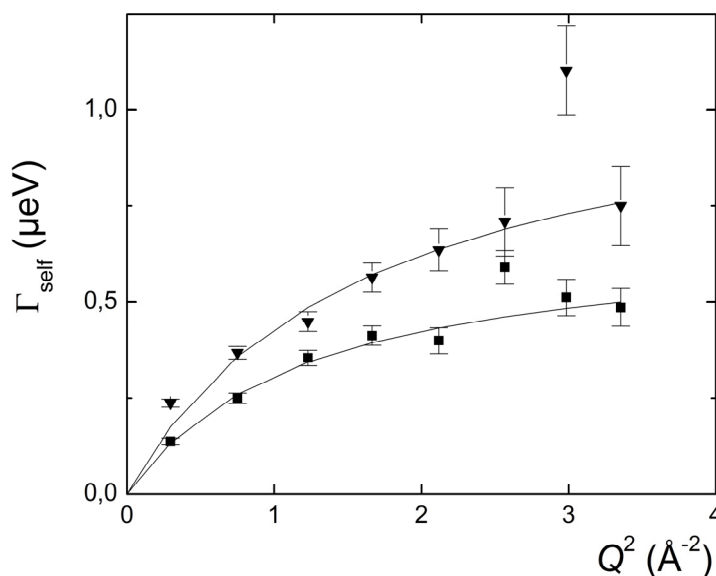


Figure 7. IN16 data. HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{self}}$ , as a function of  $Q^2$  at 284 K (squares) and 303 K (triangles).

The HWHM of the broad Lorentzian, corrected for the broadening arising from the self-diffusion contribution, was extracted and is plotted in Figure 8;  $\Gamma_{\text{very slow}}$  revealed a  $Q^2$ -independent profile. The mean HWHM is 7.0 μeV at 284 K and 7.3 μeV at 303 K, which correspond to correlation times of about 94 ps and 90 ps, respectively.  $\Gamma_{\text{very slow}}$  arises from very slow internal motions from all protons participating for example in librations of buried groups, relative displacements of globular domains, sugar conformational changes, or RNA global bending (Mc Cammon and Harvey, 1987). The correlations times found for *E. coli* macromolecules are close to those found in previous studies on proteins in concentrated solutions (Busch et al., 2006) or in membrane stacks (Fitter et al., 1997) at similar energy resolutions: by using the HFBS spectrometer (FWHM = 0.8 μeV) at NIST (Meyer et al., 2003), Busch and coworkers have found a HWHM = 10 μeV, which corresponds to a correlation time of 65 ps, for myoglobin in concentrated solution with a volume fraction of 0.4 (Busch et al., 2006); by using the IN10 spectrometer (FWHM = 1.8 μeV) at the ILL, Fitter and coworkers

have evaluated a mean HWHM = 5.5  $\mu\text{eV}$  for bacteriorhodopsin in purple membrane stacks, which corresponds to a correlation time of 120 ps (Fitter et al., 1997).

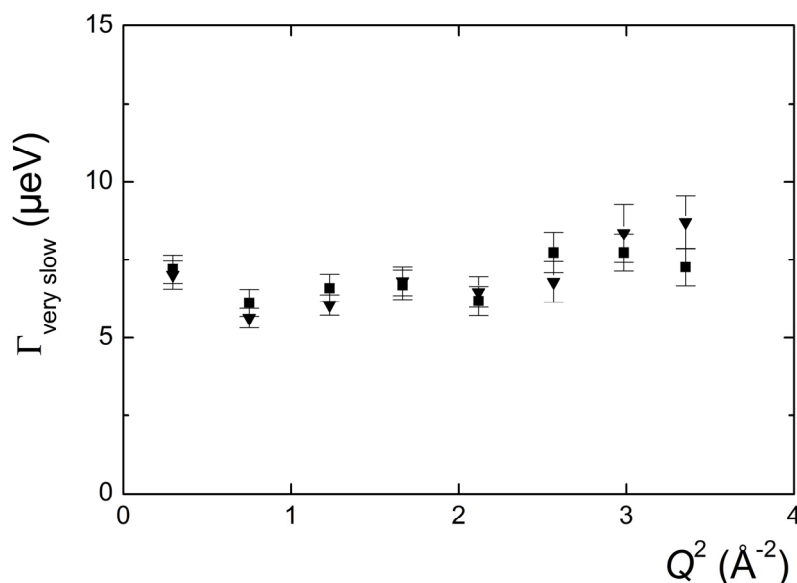


Figure 8. IN16 data. HWHM of the broad Lorentzian corrected for the self-diffusion contribution as a function of  $Q^2$ , at 284 K (squares) and 303 K (triangles).

### Influence of the cellular environment on macromolecular dynamics

The QENS study on *E. coli* led to the first dynamical mapping of macromolecular dynamics *in vivo*, on the full ps-to-ns time-scale accessible through neutron scattering. The large panel of internal macromolecular motions as well as the self-diffusion of cell macromolecules were explored and characterized *in vivo*.

The analysis of the internal motions permitted the separation between a fast ps process and slower (tens of ps) processes. Physiological internal motions were found to be a combination of reorientational and restricted jump diffusion motions. The comparison with previous *in vitro* studies revealed interesting differences between physiological internal motions and those found in hydrated powders or in solution. Both internal molecular flexibility and diffusion rates occurring in a few ps are increased significantly in the cell interior compared to fully hydrated powders. The result showed that the large amount of cell water plays a decisive role in physiological internal dynamics. The effect of water, which was observed mainly on the ps time-scale associated to hydrogen bond breaking and formation,

suggested that the cell water hydrogen bond network influences the hydrogen bond dynamics in macromolecular structures, and contributes to physiological structural flexibility. However, the smaller values found for the parameters measured *in vivo* compared to those measured in solution suggested that weak forces due to the vicinity of macromolecules attenuate the lubricating effect of water.

The work on *E. coli* demonstrated that powders and solutions do not accurately picture the physiological dynamical behaviour of macromolecules. It underlined the central role of cellular water as well as the slight influence of macromolecular crowding on internal macromolecular dynamics in living cells. The study suggested that the intracellular complexity participates in physiological functional dynamics necessary to biological activity.

#### 4.1.4 References

- Andreani, C., Filabozzi, A., Menzinger, F., Desideri, A., Deriu, A. and Di Cola, D. (1995) Dynamics of hydrogen atoms in superoxide dismutase by quasielastic neutron scattering. *Biophys J*, **68**, 2519-2523.
- Appavou, M.S., Gibrat, G. and Bellissent-Funel, M.C. (2006) Influence of pressure on structure and dynamics of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): small angle and quasi-elastic neutron scattering studies. *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 414-423.
- Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. (1975) Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, **14**, 5355-5373.
- Bée, M. (1988) *Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*, Philadelphia.
- Brooks, C.L., Karplus, M. and Pettitt, B.M. (1988) Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Advan Chem Phys*, **71**, 1-249.
- Busch, S., Doster, W., Longeville, S. and Sakai, V.G. (2006) Microscopic protein diffusion at high concentration. *MRS bulletin, QENS proceedings*.
- Dellerue, S., Petrescu, A.J., Smith, J.C. and Bellissent-Funel, M.C. (2001) Radially softening diffusive motions in a globular protein. *Biophys J*, **81**, 1666-1676.
- Doster, W., Cusack, S. and Petry, W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**, 754-756.
- Doster, W. and Longeville, S. (2007) Microscopic diffusion and hydrodynamic interactions of hemoglobin in red blood cells. *Biophys J*, **93**, 1360-1368.
- Ellis, R.J. (2001a) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-119.
- Ellis, R.J. (2001b) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, **26**, 597-604.
- Elowitz, M.B., Surette, M.G., Wolf, P.E., Stock, J.B. and Leibler, S. (1999) Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 197-203.
- Fitter, J., Lechner, R.E., Bueldt, G. and Dencher, N.A. (1996a) Internal molecular motions of bacteriorhodopsin: hydration-induced flexibility studied by quasielastic incoherent neutron scattering using oriented purple membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7600-7605.

- Fitter, J., Lechner, R.E., Büldt, G. and Dencher, N.A. (1996b) Temperature dependence of molecular motions in the membrane protein bacteriorhodopsin from QINS. *Physica B*, **226**, 61-65.
- Fitter, J., Lechner, R.E. and Dencher, N.A. (1997) Picosecond molecular motions in bacteriorhodopsin from neutron scattering. *Biophys J*, **73**, 2126-2137.
- Fitter, J., Ernst, O.P., Hauß, T., Lechner, R.E., Hofmann, K.P. and Dencher, N.A. (1998) Molecular motions and hydration of purple membranes and disk membranes studied by neutron scattering. *Eur Biophys J*, **27**, 638-645.
- Fitter, J., Lechner, R.E. and Dencher, N.A. (1999) Interactions of hydration water and biological membranes studied by neutron scattering *J Phys Chem B*, **103**, 8036 -8050.
- Fitter, J. (1999) The temperature dependence of internal molecular motions in hydrated and dry  $\alpha$ -amylase: The role of hydration water in the dynamical transition of proteins. *Biophys J*, **76**, 1034-1042.
- Frauenfelder, H., Parak, F. and Young, R.D. (1988) Conformational substates in proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **17**, 451-479.
- Gabel, F., Bicout, D., Lehnert, U., Tehei, M., Weik, M. and Zaccai, G. (2002) Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q Rev Biophys*, **35**, 327-367.
- Jimenez, R., Salazar, G., Yin, J., Joo, T. and Romesberg, F.E. (2004) Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3803-3808.
- LAMP, the Large Array Manipulation Program.  
[http://wwwold.ill.fr/data\\_treat/lamp/front.html](http://wwwold.ill.fr/data_treat/lamp/front.html).
- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*, **192**, 189-221.
- Mc Cammon, J.A. and Harvey, S.C. (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, New York.
- Meyer, A., Dimeo, R.M., Gehring, P.M. and Neumann, D.A. (2003) The high-flux backscattering spectrometer at the NIST Center for Neutron Research. *Review of scientific instruments*, **74**, 2759-2777.
- MODES, a graphic user interface for IRIS data analysis  
<http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/iris/>.
- Paciaroni, A., Orecchini, A., Cinelli, S., Onori, G., Lechner, R.E. and Pieper, J. (2003) Protein dynamics on the picosecond timescale as affected by the environment: a quasielastic neutron scattering study. *Chem Phys*, **292** 397-404.

- Pérez, J., Zanotti, J.M. and Durand, D. (1999) Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys J*, **77**, 454-469.
- Roh, J.H., Curtis, J.E., Azzam, S., Novikov, V.N., Peral, I., Chowdhuri, Z., Gregory, R.B. and Sokolov, A.P. (2006) Influence of hydration on the dynamics of lysozyme. *Biophys J*, **91**, 2573-2588.
- Rousseau, F. and Schymkowitz, J. (2005) A systems biology perspective on protein structural dynamics and signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 23-30.
- Smith, J.C. (1991) Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q Rev Biophys*, **24**, 227-291.
- Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Giudici-Orticoni, M.T., Bruschi, M. and Zaccai, G. (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Rep*, **5**, 66-70.
- Tehei, M., Smith, J.C., Monk, C., Ollivier, J., Oetl, M., Kurkal, V., Finney, J.L. and Daniel, R.M. (2006) Dynamics of immobilized and native *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by quasielastic neutron scattering. *Biophys J*, **90**, 1090-1097.
- Tousignant, A. and Pelletier, J.N. (2004) Protein motions promote catalysis. *Chem Biol*, **11**, 1037-1042.
- Volino, F. and Dianoux, A.J. (1980) Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry: general formalism and application to diffusion inside a sphere. *Mol Phys*, **41**, 271-279.
- Zanotti, J.M., Bellissent-Funel, M.C. and Parello, J. (1997) Dynamics of a globular protein as studied by neutron scattering and solid-state NMR. *Physica B*, **234**, 228-230.

## **4.2 Conclusion**

The study validated the possibility of obtaining reliable data on internal molecular motions, *in vivo*, by QENS. The analysis allowed the separation of several dynamical processes occurring from a few ps to 100 ps, by using a combination of different neutron spectrometers. Reorientational and jump diffusion motions were distinguished and analysed with respect to the intracellular environment. The comparison with previous *in vitro* studies revealed that the large amount of water in the cell cytoplasm plays a decisive role in internal dynamics. Macromolecular confinement, however, attenuates slightly the lubricating effect of water. The results showed that standard sample preparations (powder and solution) do not represent accurately the physiological environment, whose complexity participates to functional dynamics necessary to biological activity.

Furthermore, the method allowed the separation between the internal motions in *E. coli* macromolecules and their apparent global diffusion. The latter was found to present similar parameters than those extracted for hemoglobin in red blood cells (Doster and Longeville, 2007).



*L'effet isotopique du solvant sur la dynamique macromoléculaire dans E. coli*

Le chapitre repose sur un article publié dans un numéro spécial de *European Biophysics Journal*, dans le cadre des congrès *Proteins at Work 2007* et *Neutrons in Biology 2007*. Il présente une étude élastique de diffusion de neutrons qui explore l'effet isotopique du solvant sur la dynamique macromoléculaire moyenne *in vivo*. Les amplitudes de fluctuations carrées moyennes, qui quantifient la flexibilité macromoléculaire moyenne, et les constantes de force effectives, associées à la résilience structurale, ont été extraites dans des cellules *E. coli* contenant du H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O, respectivement. L'article publié se trouve en Annexe 1.



## 5 SOLVENT ISOTOPE EFFECT ON MACROMOLECULAR DYNAMICS IN E.COLI

Solvent interactions are essential for macromolecular stability, through hydration, hydrogen bonds, van der Waals' interactions, ion binding and the hydrophobic effect. Macromolecular folding is the result of a delicate balance between hydration and intramolecular interactions. Heavy water (D<sub>2</sub>O) is often used in biophysical studies to replace H<sub>2</sub>O to prevent signal contamination by water H nuclei (NMR and neutron scattering) or to study exchange or other isotope effects (mass spectrometry, FTIR...). The differences in properties between H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O molecules, however, are expected to influence macromolecular stabilisation and dynamics. The role of solvent isotope substitution on protein dynamics has not been thoroughly examined. In particular, the isotope effect on dynamics remained unexplored in the cellular environment.

The following work was published in a special issue of the *European Biophysics Journal* devoted to original contributions from the *Proteins at Work 2007* and *Neutrons in Biology 2007* workshops. It presented an elastic neutron study that explored the solvent dependence of the average macromolecular behaviour *in vivo*. The mean square fluctuation amplitudes, which quantify global macromolecular flexibility, and the effective force constants, associated to structural resilience, were extracted in living *E. coli* containing H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O, respectively. The paper can be found in Appendix 1.

## 5.1 Solvent isotope effect on macromolecular dynamics in *E. coli*

M. Jasnin<sup>1</sup>, M. Tehei<sup>2</sup>, M. Moulin<sup>3</sup>, M. Haertlein<sup>3</sup>, G. Zaccai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Grenoble, France*

<sup>2</sup>*Institut Laue Langevin, Grenoble, France*

<sup>3</sup>*Institut Laue Langevin, Deuteration Laboratory, Grenoble, France*

Elastic incoherent neutron scattering was used to explore solvent isotope effects on average macromolecular dynamics *in vivo*. Measurements were performed on living *E. coli* bacteria containing H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O, respectively, close to physiological conditions of temperature. Global macromolecular flexibility, expressed as mean square fluctuation (MSF) values, and structural resilience in a free energy potential, expressed as a mean effective force constant,  $\langle k' \rangle$ , were extracted in the two solvent conditions. They referred to the average contribution of all macromolecules inside the cell, mostly dominated by the internal motions of the protein fraction. Flexibility and resilience were both found to be smaller in D<sub>2</sub>O than in H<sub>2</sub>O. A difference was expected because the driving forces behind macromolecular stabilization and dynamics are different in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. In D<sub>2</sub>O, the hydrophobic effect is known to be stronger than in H<sub>2</sub>O: it favours the burial of non-polar surfaces as well as their van der Waals' packing in the macromolecule cores. This may lead to the observed smaller MSF values. In contrast, in H<sub>2</sub>O, macromolecules would present more water exposed surfaces, which would give rise to larger MSF values, in particular at the macromolecular surface. The smaller  $\langle k' \rangle$  value suggested a larger entropy content in the D<sub>2</sub>O case due to increased sampling of macromolecular conformational substates.

### 5.1.1 Introduction

Water is the solvent of biological systems, without which macromolecules can not fold and function correctly. Heavy water (D<sub>2</sub>O) is often used in biophysical studies to replace H<sub>2</sub>O to prevent signal contamination by water H nuclei (NMR and neutron scattering) or to study exchange or other isotope effects (mass spectrometry, FTIR...). The solvent environment plays a fundamental role in macromolecular stability, through hydration, hydrogen bonds, van der Waals interactions, ion binding and the hydrophobic effect. These weak interactions govern structure formation and atomic fluctuations, which occur in the pico- to nanosecond (ps-ns)

time-scale and act as the lubricant of slower, millisecond, conformational changes necessary for biological activity (Brooks et al., 1988). The achievement of a good understanding of macromolecular stability is therefore intimately correlated to the understanding of dynamics. Elastic incoherent neutron scattering (EINS) spectroscopy is a technique uniquely suited for the measurement of atomic fluctuations in the ps-ns time-scale, on samples that need not be crystalline or even monodisperse. The atomic fluctuations in proteins have been explored successfully in hydrated powders and in solutions using EINS (Doster et al., 1989a; Ferrand et al., 1993; Gabel et al., 2004; Paciaroni et al., 2002; Tehei et al., 2006; Tehei et al., 2005; Tehei et al., 2001; Tehei and Zaccai, 2007). Tehei and coworkers have performed EINS measurements on bacterial cells adapted to extreme temperatures, and explored global macromolecular dynamics (Tehei et al., 2004). Their results led to the hypothesis that evolution had selected the forces required for macromolecular stability and activity at physiological temperatures. The present study addressed solvent isotope effects on macromolecular dynamics *in vivo*, by direct incoherent neutron scattering measurements on living *E. coli*.

H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O molecules are close in properties, with respect to their shape, size, bond lengths and dipole moment. They differ, however, in their vibrational frequencies due to their differences of mass and moments of inertia (Conway, 1981; Némethy and Scheraga, 1964). As a result, the deuterium bond is 0.24 kcal/mol of higher energy than the hydrogen bond, which leads to stronger D<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O deuterium bond interactions, as well as stronger hydration-bond interactions in D<sub>2</sub>O. The hydrophobic effect is enhanced in D<sub>2</sub>O, which results from the stronger association between D<sub>2</sub>O molecules (Parker and Clarke, 1997) and leads to a lower solubility of apolar groups. The hydrophobic effect has long been regarded as one of the major driving forces behind macromolecular folding and stabilisation (Baldwin, 2007). While an entropic contribution brings together apolar groups in the macromolecule core to minimize water exposed surfaces, van der Waals' packing of apolar groups in the core leads also to an enhanced enthalpic contribution. The differences in properties between H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O are, therefore, expected to influence macromolecular stabilisation and dynamics. *In vitro* studies have reported various results on the stabilizing influence of D<sub>2</sub>O on proteins (Bonneté et al., 1994; Chakrabarti et al., 1999; Efimova et al., 2007; Kuhlman et al., 1998; Maybury and Katz, 1956; Parker and Clarke, 1997; Tehei et al., 2001); in few cases, stability can be unchanged or lower (Kern et al., 1980; Makhatadze et al., 1995). Sasisanker and coworkers have shown that proteins adopt a more compact form in D<sub>2</sub>O (Sasisanker et al., 2004). In contrast to the wealth of data on protein stability, the role of solvent isotope substitution on protein dynamics has not been thoroughly examined. The few studies carried out to date in solution or in hydrated

powder samples, have reported that dynamics-stability relationships were complex. Heavy water can increase protein rigidity (Cioni and Strambini, 2002; Tehei et al., 2001) as well as reduce it (Tehei et al., 2001). Tehei and coworkers have revealed that higher stability was not necessarily associated to higher resilience (Tehei et al., 2001). Furthermore, although a few *in vitro* studies have been reported (Cioni and Strambini, 2002; Gabel et al., 2004; Tehei et al., 2001), the isotope effect on dynamics remains unexplored in the cellular environment. In the present work, we measured macromolecular flexibility and resilience in living *E. coli* containing H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O, to explore the isotope effect on the average macromolecular behaviour in the cell interior.

## **5.1.2 Methods**

### **Sample preparation**

*E. coli* (BLE21 (DE3) strain) were cultivated at 37°C to an optical density of 2, in Enfers minimum growth medium with glycerol as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at 5000 rpm in a Beckman centrifuge (JLA10500 rotor) for 20 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 100 ml of H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris- H(D)Cl pH 6.6). The cells were pelleted via 20 minutes centrifugation and transferred to aluminium sample holders (4 x 3 x 0.03 cm<sup>3</sup>) for the neutron measurements. After the experiments, a small amount of the pellet was resuspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilutions steps. The number of colonies was compared to that obtained for cells from the fresh culture, and found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after the total beamtime exposure.

### **Neutron measurements and data analysis**

#### **Elastic incoherent neutron scattering**

Hydrogen nuclei have an incoherent cross section about forty times larger than that of any other nucleus or isotope, and dominate the neutron scattering signal. The dynamics of hydrogenated components can, therefore, be explored in complex macromolecular systems such as living cells (Tehei et al., 2004). Hydrogen atoms represent about 30-50 % of the atoms present in macromolecules, and are uniformly distributed in the structure. On the appropriate

length and time domains, hydrogen fluctuations reflect the motions of the side chain and backbone atoms to which they are bound (Smith, 1991). The length and time windows of the accessible motions are determined by the wave vector transfer modulus  $Q$  range and the energy resolution of the spectrometer, respectively. At a given temperature, the analysis of the elastic incoherent scattering signal yields a value of the mean square fluctuation amplitude (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ . The motions that are too fast or too slow as compared to the accessible time domain do not contribute to the scattering signal. As pure solvent diffuses in a time-scale two orders of magnitude shorter than macromolecular thermal motions, the measurements can be performed in H<sub>2</sub>O in an appropriate length-time window, without contamination by water scattering (Tehei et al., 2006). Macromolecules make up *ca.* 96 % of the total dry weight of *E. coli*, of which about 55 % are proteins. Considering that the hydrogen percentage is higher in proteins compared to every other type of macromolecules, it is reasonable to assume, therefore, that protein thermal motions dominate macromolecular scattering signal at 75-80%.

### **Neutron scattering experiments and analysis**

The neutron experiments were carried out on the backscattering spectrometer IN13, Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble; see [www.ill.fr](http://www.ill.fr) for further information). The full-width at half-maximum (FWHM) energy resolution defines the upper limit of the associated time-scale of motions. IN13 has a FWHM = 8  $\mu\text{eV}$  and is sensitive to motions that occur in a time-scale up to about 0.1 ns. The elastic incoherent neutron scattering signal was measured and analysed over  $1.27 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.87 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q=4\pi\sin\theta/\lambda$  for elastic scattering, where  $2\theta$  is the scattering angle and  $\lambda$  is the incident neutron wavelength). The elastic intensities were corrected for sample holder and buffer scattering, normalised to a vanadium sample (a purely elastic scatterer) and corrected for sample absorption by using the IN13 data reduction program ELASCAN (information on the program is available on the ILL web site at <http://www.ill.fr>). For each sample, the elastic intensity  $I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  was obtained as a function of temperature,  $T$ , rising from 279 K to 315 K, and  $\ln I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  was plotted against  $Q^2$ . The mean square fluctuation amplitude (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ , was calculated from the slope of the straight-line fit to the experimental data according to the Gaussian approximation (Zaccai, 2000):

$$I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega) = \text{constant} \cdot \exp\left(-\frac{\langle u^2 \rangle}{6} Q^2\right) \quad [5.1]$$

and linearised as:

$$\ln I(Q, 0 \pm \Delta\omega) = \text{constant} - 1/6 \langle u^2 \rangle Q^2 \quad [5.2]$$

The approximation is valid for localized motions of any shape, provided  $\langle u^2 \rangle Q^2$  is smaller or equal to 2. The validity range can be extended, however, to significantly higher  $\langle u^2 \rangle Q^2$  values in the case of certain asymmetric motions such as ellipsoidal motions with axial ratios 1:1:a, with  $0.6 < a < 1.7$ , which could be reasonable approximations for H displacements in protein internal motions within the IN13 length-time window. The value of the root MSF quantifies the global flexibility. It contains, however, contributions from both diffusive and vibrational motions, whose amplitudes remain within the length-energy window defined by the instrumental  $Q$  range and energy resolution (Gabel, 2005). Because of the energy resolution of the IN13 spectrometer, the macromolecular global diffusion within the living cells contribution to the MSF values is expected to be small compared to the internal motions contribution (Gabel, 2005; Tehei et al., 2001). Furthermore, the H<sub>2</sub>O solvent contamination to the scattering signal is restricted to  $Q$  values lower than  $1 \text{ \AA}^{-1}$  (Tehei et al., 2006). The mean resilience,  $\langle k' \rangle$ , which corresponds to a mean effective force constant and defines the average resilience in a free energy potential (Bicout and Zaccai, 2001; Zaccai, 2000), was extracted from the slope of  $\langle u^2 \rangle$  as a function of T, using the following relation:

$$\langle k' \rangle = \frac{0.00276}{d \langle u^2 \rangle / dT} \quad [5.3]$$

### 5.1.3 Results and Discussion

The fits from which the MSF values were extracted are shown in Figure 1. The MSF are plotted as a function of temperature in Figure 2, for cells in H<sub>2</sub>O (*triangles*) and in D<sub>2</sub>O (*squares*). MSF from cells in H<sub>2</sub>O are above those from cells in D<sub>2</sub>O, with mean values of about  $2 \text{ \AA}^2$  and  $1.5 \text{ \AA}^2$ , respectively. Note that macromolecules have larger amplitude motions in H<sub>2</sub>O than in D<sub>2</sub>O.

The mean resilience values were extracted from linear fits performed on the MSF data, using Eq. 5.3. A smaller slope corresponds to a larger resilience and *vice versa*. The mean resilience defines the average macromolecular resilience for all macromolecules inside the cell,



mostly dominated by the protein fraction. Resilience is 0.38 N/m for cells in H<sub>2</sub>O, compared to 0.19 N/m for cells in D<sub>2</sub>O. The value in H<sub>2</sub>O is in good agreement with the previous value found by Tehei and collaborators for *E. coli* (MRE600 strain) in H<sub>2</sub>O, 0.42 N/m (Tehei et al., 2004). The result established that *E. coli* macromolecules have more resilient structures in H<sub>2</sub>O than in D<sub>2</sub>O; they are ‘softer’ in D<sub>2</sub>O.

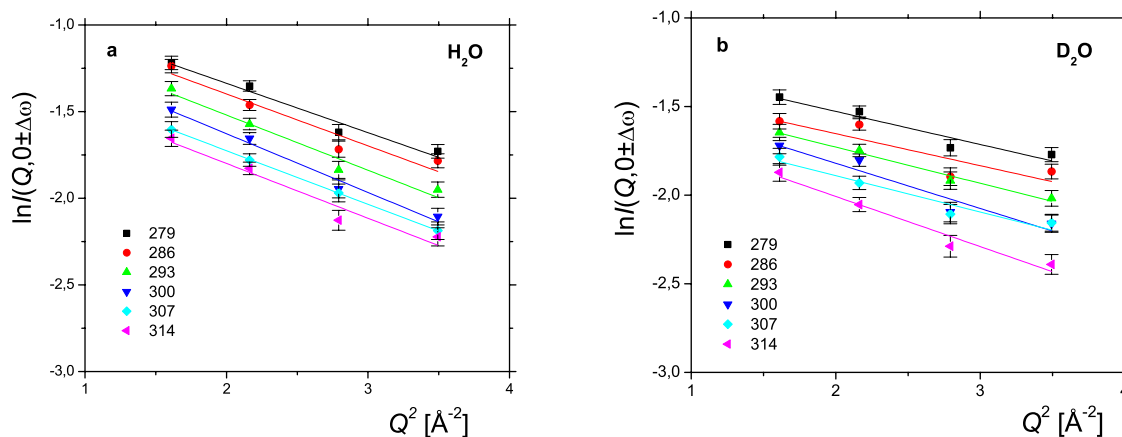


Figure 1. Scattered normalised intensities plotted as  $\ln(I(Q, 0 \pm \Delta\omega))$  as a function of  $Q^2$  from cells in H<sub>2</sub>O (a) and D<sub>2</sub>O (b). Linear fits were performed over the ranges  $1.6 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 3.5 \text{ \AA}^{-2}$  using Eq. 5.2.

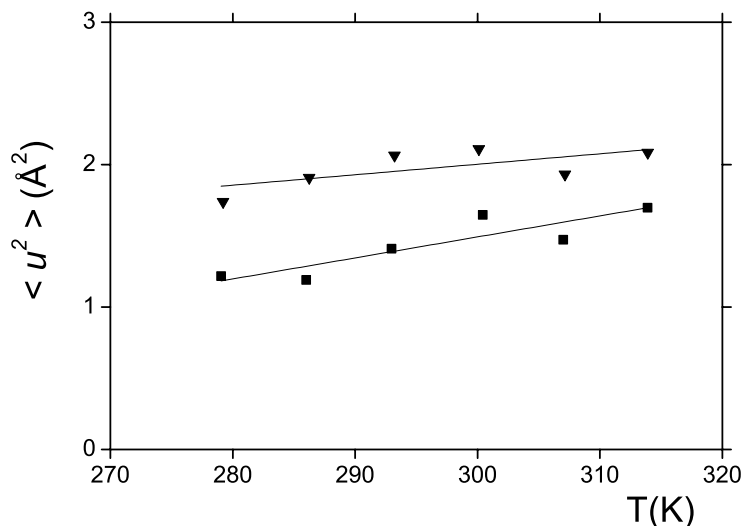


Figure 2. MSF as a function of temperature, from cells in H<sub>2</sub>O (triangles) and cells in D<sub>2</sub>O (squares). Linear fits (bold lines) were performed between the temperature range 279 K – 314 K using Eq. 5.3.

The lower mean resilience value found for *E. coli* macromolecules in D<sub>2</sub>O is consistent with a previous *in vitro* study, in which the flexibility of mesophilic and halophilic proteins have been compared (Tehei et al., 2001). The mesophilic bovine serum albumin protein, BSA, was found to be six times less resilient in D<sub>2</sub>O than in H<sub>2</sub>O; the lower resilience in D<sub>2</sub>O was coupled to higher stability through entropic effects arising from increased sampling of conformational substates in D<sub>2</sub>O. In contrast, the halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*, was more resilient and more stable in D<sub>2</sub>O. Tehei and coworkers have proposed that, in the case of the halophilic malate dehydrogenase, stabilization in D<sub>2</sub>O is dominated by the strong hydration bonds (Tehei et al., 2001). Their prediction was in good agreement with the large proportion of acidic residues present at the protein surface, and their known interactions with solvent ions and water. In *E. coli*, considering that both motion amplitudes and resilience are smaller in D<sub>2</sub>O (Figure 2), we suggested that the effect in D<sub>2</sub>O could arise from the dominance of the hydrophobic effect, resulting in the burial of non-polar surface groups as well as more compact van der Waals' packing in the protein core. In contrast, in H<sub>2</sub>O, stronger resilience associated to larger fluctuation amplitudes, suggested a bigger role of hydration bond interaction in dynamics. Because hydrophobic effect is lower than in D<sub>2</sub>O, macromolecules in H<sub>2</sub>O have the freedom to expose more surfaces to the solvent. Considering that surface amino acids do not pack very tightly (Gerstein and Chothia, 1996) and that fluctuations are larger at the macromolecule surface than in the core (Pérez et al., 1999), an increase in water exposed surface in H<sub>2</sub>O is in good agreement with the higher amplitudes found in H<sub>2</sub>O. It should be mentioned, however, that the increased flexibility measured in the H<sub>2</sub>O case can arise partly from the contribution of exchangeable hydrogens exposed to the solvent, which present fluctuation amplitudes accessible on the IN13 time and length domains. In D<sub>2</sub>O, such hydrogens have been exchanged with deuterium atoms and do not contribute to the MSF values. We should discuss, however, an eventual viscosity effect when the solvent is changed from H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O. In dilute solution, the viscosity is a factor about 1.25 higher in D<sub>2</sub>O, which remains constant in the temperature range of the measurements. Such a viscosity difference would affect both internal and self-diffusion macromolecular dynamics contributions to the MSF values in dilute solution (Gabel, 2005). Applying the ratio to the data in Figure 2, would not influence the slopes and resilience values; in contrast, it would bring the MSF values for the two solvent conditions closer together. The *E. coli* cytoplasm, however, is a complex environment very far from a dilute aqueous solution; it is expected to have an internal viscosity that is strongly influenced by a high concentration of macromolecules as well as smaller organic solutes (Ellis, 2001a). We cannot exclude that there still exists a small viscosity

change between H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O, which may influence MSF values slightly, as was discussed for concentrated solutions of malate dehydrogenase in high salt (Tehei et al., 2001). However, as explained above, the important point is that it would not change the difference in resilience observed between the H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O conditions.

#### 5.1.4 References

- Baldwin, R.L. (2007) Energetics of protein folding. *J Mol Biol*, **371**, 283-301.
- Bicout, D.J. and Zaccai, G. (2001) Protein flexibility from the dynamical transition: a force constant analysis. *Biophys J*, **80**, 1115-1123.
- Bonneté, F., Madern, D. and Zaccai, G. (1994) Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J Mol Biol*, **244**, 436-447.
- Brooks, C.L., Karplus, M. and Pettitt, B.M. (1988) Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Advan Chem Phys*, **71**, 1-249.
- Chakrabarti, G., Kim, S., Gupta, M.L., Jr., Barton, J.S. and Himes, R.H. (1999) Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry*, **38**, 3067-3072.
- Cioni, P. and Strambini, G.B. (2002) Effect of heavy water on protein flexibility. *Biophys J*, **82**, 3246-3253.
- Conway, B.E. (1981) Ionic hydration in Chemistry and Biophysics. In Science, E. *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 12.
- Doster, W., Cusack, S. and Petry, W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**, 754-756.
- Efimova, Y.M., Haemers, S., Wierczinski, B., Norde, W. and van Well, A.A. (2007) Stability of globular proteins in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *Biopolymers*, **85**, 264-273.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-119.
- Ferrand, M., Dianoux, A.J., Petry, W. and Zaccai, G. (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9668-9672.
- Gabel, F., Weik, M., Doctor, B.P., Saxena, A., Fournier, D., Brochier, L., Renault, F., Masson, P., Silman, I. and Zaccai, G. (2004) The influence of solvent composition on global dynamics of human butyrylcholinesterase powders: a neutron-scattering study. *Biophys J*, **86**, 3152-3165.
- Gabel, F. (2005) Protein dynamics in solution and powder measured by incoherent elastic neutron scattering: the influence of *Q*-range and energy resolution. *Eur Biophys J*, **34**, 1-12.
- Gerstein, M. and Chothia, C. (1996) Packing at the protein-water interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10167-10172.

- Kern, D., Zaccai, G. and Giege, R. (1980) Effect of heavy water substitution for water on the tRNA<sup>Val</sup>-valyl-tRNA synthetase system from yeast. *Biochemistry*, **19**, 3158-3164.
- Kuhlman, B., Luisi, D.L., Evans, P.A. and Raleigh, D.P. (1998) Global analysis of the effects of temperature and denaturant on the folding and unfolding kinetics of the N-terminal domain of the protein L9. *J Mol Biol*, **284**, 1661-1670.
- Makhatadze, G.I., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1995) Solvent isotope effect and protein stability. *Nat Struct Biol*, **2**, 852-855.
- Maybury, R.H. and Katz, J.J. (1956) Protein Denaturation in Heavy Water. *Nature*, **177**, 629-630.
- Némethy, G. and Scheraga, H.A. (1964) Structure of Water and Hydrophobic Bonding in Proteins. IV. The Thermodynamic Properties of Liquid Deuterium Oxide. *J Chem Phys*, **41**, 680-689.
- Paciaroni, A., Cinelli, S. and Onori, G. (2002) Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study. *Biophys J*, **83**, 1157-1164.
- Parker, M.J. and Clarke, A.R. (1997) Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochemistry*, **36**, 5786-5794.
- Pérez, J., Zanotti, J.M. and Durand, D. (1999) Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys J*, **77**, 454-469.
- Sasisanker, P., Oleinikova, A., Weingärtner, H., Ravindra, R. and Winter, R. (2004) Solvation properties and stability of ribonuclease A in normal and deuterated water studied by dielectric relaxation and differential scanning/pressure perturbation calorimetry. *Phys Chem Chem Phys*, **6**, 1899-1905.
- Smith, J.C. (1991) Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q Rev Biophys*, **24**, 227-291.
- Tehei, M., Madern, D., Pfister, C. and Zaccai, G. (2001) Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14356-14361.
- Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Giudici-Orticoni, M.T., Bruschi, M. and Zaccai, G. (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared *in vivo* by neutron scattering. *EMBO Rep*, **5**, 66-70.
- Tehei, M., Madern, D., Franzetti, B. and Zaccai, G. (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J Biol Chem*, **280**, 40974-40979.

- Tehei, M., Daniel, R. and Zaccai, G. (2006) Fundamental and biotechnological applications of neutron scattering measurements for macromolecular dynamics. *Eur Biophys J*, **35**, 551-558.
- Tehei, M. and Zaccai, G. (2007) Adaptation to high temperatures through macromolecular dynamics by neutron scattering. *Febs J*, **274**, 4034-4043.
- Zaccai, G. (2000) How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, **288**, 1604-1607.

## **5.2 Conclusion**

A solvent isotope effect on average macromolecular dynamics was identified *in vivo*. Macromolecules are less flexible and less resilient in D<sub>2</sub>O. The results were interpreted using macromolecular stabilization forces. The hydrophobic effect could be responsible for both lower flexibility and resilience in D<sub>2</sub>O. A viscosity effect, however, could explain the differences in macromolecular flexibility between the two solvent conditions. The study confirmed the significant role played by the solvent in macromolecular dynamics, and provided further evidence of the importance to keep it in mind when replacing H<sub>2</sub>O by D<sub>2</sub>O for experimental studies.





## 6 DYNAMIQUE DE L'ARN IN VIVO, PAR MARQUAGE ISOTOPIQUE ET DIFFUSION INCOHERENTE DE NEUTRONS

Ce chapitre présente une approche basée sur le marquage spécifique visant à extraire la dynamique de l'ARN du signal mesuré au sein de cellules entières. Le travail fut initié en début de thèse, en vue de poursuivre l'étude commencée par Tehei et collaborateurs sur la dynamique macromoléculaire *in vivo* (Tehei et al., 2004). Compte tenu du poids protéique sec au sein d'*E. coli* et de la proportion d'atomes d'hydrogène dans ce type de macromolécule, le signal issu de cellules natives (abondance naturelle pour l'hydrogène et le deutérium) est dominé par celui des protéines. Le second composant macromoléculaire majoritaire chez *E. coli* est l'ARN, qui représente 20.5 % du poids sec des macromolécules, contre 55 % pour les protéines. L'utilisation du marquage isotopique constitue, par conséquent, un atout déterminant pour renforcer le signal provenant de l'ARN et réduire celui provenant des protéines.

Le chapitre détaille le protocole mis au point au DLAB avec Martine Moulin et Michael Haertlein pour hydrogéner spécifiquement l'ARN au sein de bactéries *E. coli* deutériées. Il présente les mesures de taux de marquage dans l'ARN, d'une part, et dans les protéines, d'autre part, et retrace les expériences de diffusion incohérente de neutrons réalisées sur les cellules sélectivement marquées. Le chapitre se termine par une discussion sur les limites expérimentales extraites de cette étude et sur les conclusions esquissées.

### 6.1 Matériels et méthodes

#### 6.1.1 Protocole d'hydrogénation de l'ARN cellulaire

Shcherbakova et collaborateurs ont développé une approche permettant de préparer des ribosomes provenant de bactéries *E. coli* partiellement deutériées, avec de l'ARN sélectivement hydrogéné (Shcherbakova et al., 1997). La méthode est basée sur la régulation

métabolique pendant la culture cellulaire et ne nécessite pas d'étape de reconstitution. Le protocole repose sur des cultures implémentées avec des nucléosides hydrogénés (H-nucléosides), en présence d'un milieu de culture contenant jusqu'à 25 % de D<sub>2</sub>O. Avec une concentration de 1 mM en H-nucléosides et 25 % de D<sub>2</sub>O dans le milieu de culture, Shcherbakova et ses collaborateurs ont obtenu des ribosomes avec 98 % d'ARN hydrogéné pour 40 % de protéines hydrogénées (Shcherbakova et al., 1997). Comme l'ARN représente environ les deux tiers du poids sec des ribosomes, pour seulement un tiers de protéines, le comportement dynamique de l'ARN dans de tels ribosomes domine le signal incohérent, et peut être isolé par diffusion incohérente de neutrons. Dans la cellule, par contre, les protéines représentent plus de 50 % du poids sec des macromolécules, pour seulement 20 % d'ARN. Même avec un taux d'hydrogénation de 40 % seulement, les protéines domineraient le signal macromoléculaire.

Le protocole de Shcherbakova fut par conséquent ajusté afin de diminuer au maximum l'incorporation de substrats protonés dans les protéines et autres composants cellulaires à l'exception de l'ARN, tout en permettant aux cellules de pousser de manière optimale. Le protocole détaillé (Protocole 1) est présenté en Annexe 5. Les cellules ont été cultivées dans du milieu entièrement deutérié, supplémenté avec 0.8 mM de chaque type de nucléoside hydrogénée (adénosine, uracil, cytidine et guanosine), concentration permettant la croissance normale des cellules. Des bactéries *E. coli* avec 40.5 % d'ARN hydrogéné pour seulement 5 % de protéines hydrogénées, ont été obtenues. Les mesures des taux de marquage sont détaillées dans la section suivante.

## **6.1.2 Taux de marquage dans l'ARN et les protéines cellulaires**

### **Taux de marquage dans l'ARN par centrifugation analytique**

Le degré d'incorporation de l'hydrogène dans l'ARN fut déterminé par centrifugation analytique, en collaboration avec Christine Ebel du LBM.

#### **Matériels et méthodes**

##### ***Protocole de centrifugation analytique***

Daniel et Banin ont mis au point un protocole permettant de sédimenter de l'ARN natif dans un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl) (Daniel and Banin, 1970). Les

mesures furent réalisées à 40°C afin d'obtenir une solution de CsCl suffisamment dense pour observer une bande d'ARN natif dans la solution concentrée de CsCl. La densité théorique de la phase saturée de CsCl, située à l'interface entre la solution aqueuse de CsCl et le CsCl solide formé au fond du tube, fut utilisée comme référence pour déterminer la densité des bandes dans la phase aqueuse. A partir de ce protocole, Daniel et Banin ont extrait la densité de l'ARN natif ribosomal d'*E. coli* à 40°C. Ils ont également montré qu'il était possible de remplacer le solvant H<sub>2</sub>O par du solvant D<sub>2</sub>O, afin de pouvoir réaliser des mesures équivalentes à 25°C.

Le protocole de Daniel et Banin (Daniel and Banin, 1970) fut appliqué pour mesurer les densités d'ARN isolé de cellules natives (H-ARN), de cellules entièrement deutériées (D-ARN) et de cellules cultivées selon le protocole 1 (HD-ARN). Cette étude comparative s'est avérée efficace pour déterminer le pourcentage d'hydrogénation du HD-ARN, en utilisant les valeurs des H-ARN et des D-ARN comme références. Les mesures furent réalisées en solvant H<sub>2</sub>O et en solvant D<sub>2</sub>O, car les expériences en H<sub>2</sub>O ont révélé que la densité du D-ARN était plus grande que celle de la solution saturée de CsCl en H<sub>2</sub>O à 40°C.

### ***Purification de l'ARN***

L'ARN provenant des trois types de culture cellulaire (H-, D-, et HD-ARN) fut purifié en utilisant des kits RNAeasy Midi, de Qiagen. L'ARN fut élué dans de l'eau ultrapure dépourvue de RNase. Plusieurs mg d'ARN en solution furent obtenus pour chaque type de culture, avec des concentrations comprises entre 200 et 400 µg/ml. La pureté, définie comme le rapport entre les densités optiques mesurées à 260 et 280 nm, fut mesurée dans un tampon 10 mM Tris pH 8; les valeurs obtenues, comprises entre 2.1 et 2.3, correspondent à de très bonnes puretés.

### ***Mesures de centrifugation analytique***

#### ***Mesures en H<sub>2</sub>O***

Les échantillons mesurés par centrifugation analytique en solvant H<sub>2</sub>O furent préparés de la manière suivante (Daniel and Banin, 1970): des solutions de 66.35 % (w/w) de CsCl en H<sub>2</sub>O, contenant quelques µg d'ARN (quelques dizaines de µl) furent préparées et chauffées à 40°C dans un bain marie. A noter qu'une solution saturée de CsCl est constituée à 67.52 % (w/w) de CsCl en H<sub>2</sub>O. La cellule de mesure fut assemblée avec une pièce centrale de 12 mm en epon comportant deux cavités, entourée d'une fenêtre en saphir de part et d'autre. 430 µl de

la solution avec ARN et du tampon furent introduits dans les cavités respectives, et la cellule fut placée dans un rotor préchauffé à 40°C. Les mesures d'équilibre de sédimentation furent réalisées dans une ultracentrifugeuse analytique Beckman, équipée pour des mesures optiques en interférence et en absorbance. Un jeu de mesures en interférence et en absorbance fut réalisé à une vitesse de 42 000 rpm à 40°C. Le gradient de densité fut observé en direct à partir de la redistribution des franges d'interférence. La distribution de l'ARN fut suivie par les mesures d'absorbance à 260 nm. Les échantillons furent centrifugés jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, soit environ pendant 30 h.

### *Mesures en D<sub>2</sub>O*

Les échantillons furent également préparés en D<sub>2</sub>O et mesurés à 40°C afin d'augmenter la densité de la solution saturée de CsCl et de pouvoir observer une bande pour le D-ARN. Les trois types d'ARN furent lyophilisés pendant 30 minutes par centrifugation sous vide (« speed vacuum ») et resuspendu dans du D<sub>2</sub>O. La composition d'une solution saturée de CsCl en D<sub>2</sub>O fut évaluée à 63.33 % (w/w) et des solutions de 62.13 % (w/w) de CsCl en D<sub>2</sub>O, contenant quelques µg d'ARN, furent préparées et chauffées à 40°C dans un bain marie. Le montage des échantillons et les mesures en absorbance et en interférence furent réalisés selon le protocole utilisé en solvant H<sub>2</sub>O.

### **Résultats**

La densité de l'ARN,  $\rho$ , fut calculée selon l'équation (Daniel and Banin, 1970):

$$\rho = \rho_{sat} - \frac{\omega^2}{\beta} r_m (r_{sat} - r) \quad [6.1]$$

avec  $\rho_{sat}$ , la densité de la solution saturée de CsCl;  $\rho_{sat} = 1.9598 \text{ g/cm}^3$  en H<sub>2</sub>O à 40°C

$\omega$ , la vitesse angulaire;  $\omega = \frac{2\pi \cdot 42000}{60} \text{ rad/s}$

$\frac{1}{\beta} = 8.80 \times 10^{-10} \text{ g.cm}^{-5} \cdot \text{s}^2$  (Bruner and Vinograd, 1965)

$r_{sat}$ , la distance séparant l'axe de rotation du rotor et l'interface CsCl solide-aqueux

$r$ , la distance séparant l'axe de rotation du rotor et la bande d'ARN

$r_m$ , la valeur moyenne de  $r_{sat}$  et  $r$

### **Mesures en H<sub>2</sub>O**

Les H-ARN et HD-ARN ont sédimenté dans le gradient de densité de la solution de CsCl réalisé en H<sub>2</sub>O. Les densités des H-ARN et HD-ARN furent calculées selon l'équation 6.1 et évaluées à 1.920 et 1.950 g/cm<sup>3</sup> respectivement. La valeur du H-ARN est similaire à la valeur publiée par Daniel et Banin pour l'ARN ribosomal d'*E. coli*, soit 1.916 g/cm<sup>3</sup> (Daniel and Banin, 1970).

Le D-ARN en solvant H<sub>2</sub>O (D-ARN-H<sub>2</sub>O) sédimente à l'interface entre la solution saturée de CsCl et le CsCl solide, ce qui est significatif qu'il est plus dense que la solution de CsCl saturée en H<sub>2</sub>O. Un calcul théorique de la densité attendue pour le D-ARN-H<sub>2</sub>O, à partir de la densité du H-ARN-H<sub>2</sub>O mesurée, et en supposant que le D-ARN est deutérié à 100 %, avec 100 % des deutérium échangeables échangés, amène à une valeur de 1.967 g/cm<sup>3</sup> pour la densité du D-ARN-H<sub>2</sub>O, qui est effectivement supérieure à la densité de la solution saturée de CsCl en H<sub>2</sub>O. Faute de valeur expérimentale pour le D-ARN-H<sub>2</sub>O, nous n'avons pu déduire le pourcentage d'hydrogénation du HD-ARN-H<sub>2</sub>O. Cependant, les mesures ont permis de valider le protocole, grâce à la bonne adéquation entre la densité du H-ARN mesuré par Daniel et Banin et par nos mesures.

### **Mesures en D<sub>2</sub>O**

En solvant D<sub>2</sub>O, les 3 types d'ARN forment une bande dans la solution de CsCl. La Figure 1 représente l'absorbance mesurée à 260 nm en fonction de la distance  $r - r_{sat}$ . On distingue 3 pics, correspondant respectivement, en allant vers les  $r - r_{sat}$  décroissants, aux pics associés au H-ARN, au HD-ARN, et au D-ARN. Les pics des H-ARN et D-ARN sont relativement fins; le HD-ARN, quant à lui, présente une distribution plus large, qui témoigne d'une certaine inhomogénéité d'hydrogénation au sein de l'ARN sélectivement hydrogéné.

L'interprétation des données en D<sub>2</sub>O fut plus délicate, compte tenu de l'absence de valeur théorique publiée pour la densité de solution saturée de CsCl en fonction de la température. La valeur à 40°C fut évaluée à partir des données expérimentales, en calculant préalablement la valeur théorique attendue pour la densité du H-ARN-D<sub>2</sub>O, à partir de la valeur mesurée de la densité du H-ARN-H<sub>2</sub>O et en supposant que 100% des hydrogènes échangeables étaient échangés. La densité du H-ARN-D<sub>2</sub>O fut évaluée à 1.938 g/cm<sup>3</sup>; la densité de la solution saturée de CsCl à 40°C en D<sub>2</sub>O correspond alors à 1.996 g/cm<sup>3</sup> d'après l'équation 6.1. Les densités des D-ARN-D<sub>2</sub>O et HD-ARN-D<sub>2</sub>O furent extraites en fixant la densité de la

solution saturée de CsCl en D<sub>2</sub>O. Les densités respectives sont 1.964 et 1.981 g/cm<sup>3</sup>. En supposant que le H-ARN-D<sub>2</sub>O et le D-ARN-D<sub>2</sub>O correspondent à un taux de deutériation de 0 et 100 % respectivement, on en déduit que le HD-ARN-D<sub>2</sub>O est deutérié à 40.5 %.

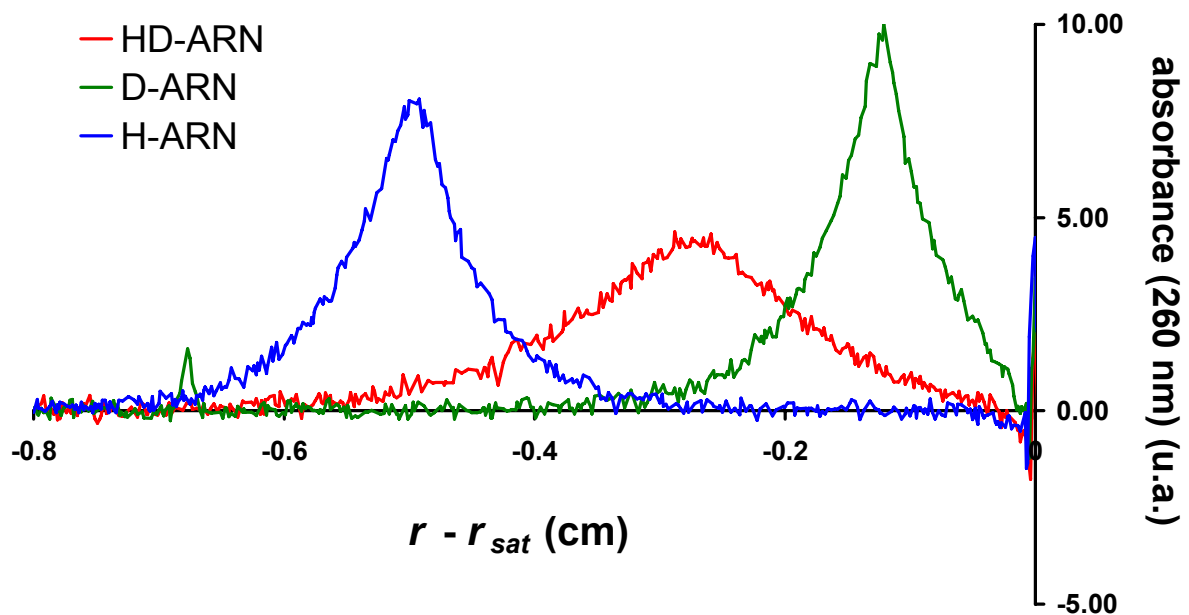


Figure 1. Représentation de l'absorbance à 260 nm en fonction de la distance  $r - r_{sat}$ . Les courbes de gauche à droite, représentent les bandes associées au H-ARN (*bleu*), HD-ARN (*rouge*) et D-ARN (*vert*), respectivement. Le signal d'absorbance a été normalisé afin d'avoir la même absorbance totale pour les trois courbes; il est exprimé en unité arbitraire (u.a.).

### Taux de deutériation dans les protéines par spectrométrie de masse

Le degré d'incorporation du deutérium dans les protéines fut déterminé par spectrométrie de masse, en collaboration avec David Lemaire du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) de l'IBS.

### Matériels et méthodes

#### *Purification de la myoglobine surexprimée chez E. coli*

La myoglobine provenant de trois types de culture cellulaire fut purifiée: de la myoglobine provenant de cellules natives (H-myoglobine), de cellules deutériées (D-

myoglobine), et de cellules cultivées selon le protocole 1 (HD-myoglobine). Des cellules *E. coli* (souche BLE21 (DE3)), contenant le plasmide pet 28a permettant la surexpression de myoglobine de cachalot avec une queue d'histidines (His-Tag), furent induites avec 0.5 mM IPTG pendant 5 h à 30°C. Après une lyse des cellules dans un tampon 20 mM Tris (pH 8) et 500 mM NaCl, les cellules furent soniquées puis purifiées dans une colonne de Cobalt, par élution à l'aide d'un gradient de (0.25 – 1M) NaCl dans un tampon 50 mM Tris pH 8, contenant 10 mM Imidazole. Les fractions de myoglobine furent collectées et rassemblées dans un tampon 50 mM Tris pH 8, avec 250 mM NaCl et 250 mM Imidazole. La purification fut affinée par gel filtration dans un tampon 20 mM Tris pH 8, contenant 20 mM NaCl. Plusieurs mg de myoglobine en solution ont été obtenus pour chaque type de culture, avec des concentrations comprises entre 1.7 et 2.3 mg/ml.

### **Mesures de spectrométrie de masse**

Les échantillons furent mesurés à l'aide d'un spectromètre à Electrospray au LSMP, en collaboration avec David Lemaire. Les mesures furent réalisées en utilisant quelques µl de solution diluée à 0.5 µM. Le tampon utilisé pour la myoglobine (20 mM Tris pH 8 et 20 mM NaCl) a permis d'obtenir un bon signal sur bruit sans avoir besoin de 'désaler' les échantillons au préalable.

### **Résultats**

Les masses moléculaires expérimentales ( $MW_{exp}$ ) obtenus sont présentées dans le Tableau 1. Les valeurs furent déterminées avec une erreur de 1 Dalton (Da), définie par le spectromètre Electrospray. La valeur mesurée pour la H-myoglobine est identique à la masse moléculaire théorique ( $MW_{theo}$ ) de la myoglobine sans méthionine (Met) N-terminale, à 1 Da près. Le détail du calcul des  $MW_{theo}$  pour les H- et D-myoglobines sans Met N-terminale est donné en Annexe 6. On rappelle que la séquence comprend 1070 hydrogènes (respectivement deutériums) non échangeables et 302 hydrogènes échangeables.

Echantillon	MW <sub>exp</sub> (Da)	MW <sub>théo</sub> (Da)	
		sans Met N-terminale	avec Met N-terminale
H-myoglobine	19 363	19 362	19 493
D-myoglobine	20 458	20 432	20 571
HD-myoglobine	20 403		

Tableau 1. MW<sub>exp</sub> et MW<sub>théo</sub> pour les H-, D- et HD-myoglobines.

Un séquençage N-terminal des échantillons fut réalisé par l'intermédiaire de Jean Pierre Andrieu du Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) de l'IBS. L'analyse a révélé que la séquence des trois échantillons (H-, D- et HD-myoglobine) commençait à partir du deuxième acide aminé, *i.e.* était dépourvue de la Méthionine N-terminale. La valeur mesurée pour la H-myoglobine est donc en bon accord avec la valeur théorique. La valeur obtenue pour la D-myoglobine, en revanche, est supérieure à la valeur théorique attendue lorsque tous les deutériums échangeables sont échangés avec les hydrogènes du solvant H<sub>2</sub>O (voir Annexe 6). L'écart obtenu, soit 26, correspond au nombre de deutériums qui n'ont pas été échangés si l'on suppose que la myoglobine était deutériée à 100 %. Par la suite, nous avons effectué une analyse comparative entre les valeurs obtenues pour la D-myoglobine et la HD-myoglobine, en supposant que le même nombre de deutériums avait été échangé dans les deux échantillons, soit 302-26= 276. L'écart entre les MW<sub>exp</sub> de la D-myoglobine et de la HD-myoglobine correspond à 55 Da. On en déduit que 55 deutériums ont été remplacés par des hydrogènes dans la HD-myoglobine, lors de l'hydrogénation de l'ARN via l'ajout des H-nucléosides. Le pourcentage d'hydrogénation de la HD-myoglobine correspond au nombre de deutériums remplacés par des hydrogènes divisé par le nombre de deutériums total, soit :

$\frac{55}{(1372 - 276)} \times 100 = 5.0\%$ . En supposant que l'incorporation des hydrogènes dans la myoglobine représente l'incorporation moyenne dans les protéines d'*E. coli*, on en déduit que 95 % des protéines sont deutériées dans les cellules cultivées en présence de H-nucléosides, par rapport à une culture deutériée usuelle.

### Signal incohérent attendu pour l'ARN cellulaire

Dans les cellules sélectivement marquées en utilisant le protocole 1 (Annexe 5), 40.5 % de l'ARN et 5 % des protéines sont hydrogénées. L'ARN hydrogéné représente, par conséquent,  $40.5 \times 0.205 = 8.3$  % du poids sec cellulaire total, et les protéines hydrogénées 5 x



0.55 = 2.8 %. Les cellules deutériées avec ARN partiellement marqué, sont donc hydrogénées à 10 % (en poids sec).

A partir des taux de marquage évalués, les contributions théoriques respectives de l'ARN et des protéines, au signal provenant de cellules avec ARN sélectivement hydrogéné, furent estimées. Pour cela, la section efficace incohérente d'un acide aminé fictif 'moyen' ( $AA^{moy}$ ), défini à partir de la fréquence d'apparition des acides aminés chez *E. coli*, fut évaluée. La section efficace incohérente de cet acide aminé 'moyen' est définie comme la moyenne des sections incohérentes des acides aminés pondérées par leurs fréquences respectives (voir Annexe 7 pour plus de détail). De façon similaire, la section efficace incohérente d'un nucléotide fictif 'moyen' ( $N_u^{moy}$ ) fut calculée à partir de la proportion respective des bases dans l'ARN d'*E. coli*. La section efficace incohérente de ce nucléotide 'moyen' est définie comme la moyenne des sections efficaces incohérentes des nucléotides pondérées par les contributions respectives de leurs bases (voir Annexe 7). Les sections efficaces incohérentes furent évaluées en ne prenant en compte que les hydrogènes non échangeables et en considérant que 100 % des hydrogènes échangeables étaient échangés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Comme l'ARN et les protéines représentent plus de 75 % du poids sec total des macromolécules, les calculs des contributions théoriques de l'ARN et des protéines cellulaires furent simplifiés en ne considérant que ces deux types de macromolécules. Leurs contributions relatives furent évaluées et sont présentées dans le Tableau 2. IN13 permet de mesurer la fluctuation carrée moyenne des atomes d'hydrogène sur des temps d'environ 100 ps. Ces fluctuations correspondent aux mouvements des groupes plus grands auxquels ils sont attachés, tels que les chaînes principales et latérales dans le cas des protéines, ou les sucres dans le cas de l'ARN. En supposant que les protéines et l'ARN ont la même proportion de mouvements sur les échelles de temps et de longueur accessibles sur IN13, les prédictions suivantes sont attendues pour le signal mesuré sur IN13 (Tableau 2):

- Dans les cellules natives et deutériées, les protéines dominent le signal à  $\approx 85$  % par rapport à l'ARN.
- Dans les échantillons sélectivement marqués, l'ARN contribue à 47 % du signal, pour une contribution de 53 % provenant des protéines. Le protocole d'hydrogénation permettrait donc d'augmenter d'un facteur trois la contribution de l'ARN par rapport à celle mesurée dans des cellules cultivées en milieu hydrogéné ou deutérié. Cependant, l'hydrogénation ne serait pas suffisante pour extraire la dynamique

de l'ARN directement du signal. Le signal mesuré serait une moyenne entre le signal des protéines et celui de l'ARN.

Type de macromolécule	% H	$\sigma_{inc}$ (barns)	Contribution relative (%)
<i>Par brique élémentaire* (MW <math>\approx</math> 330 Da)</i>			
H-ARN (1 N <sub>u</sub> <sup>moy</sup> )	100	623.18	
D-ARN (1 N <sub>u</sub> <sup>moy</sup> )	0	17.78	
H-protéine (3 AA <sup>moy</sup> )	100	1463.31	
D-protéine (3 AA <sup>moy</sup> )	0	39.40	
<i>Dans la cellule, pour une brique élémentaire :</i>			
H-ARN (20.5 % du poids sec)	100	127.75	
D-ARN	0	3.65	
H-protéine (55 % du poids sec)	100	804.82	
D-protéine	0	21.67	
<i>Cellule native</i>			
H-ARN	100	127.75	<b>13.7</b>
H-protéine	100	804.82	<b>86.3</b>
<i>Cellule deutériée</i>			
D-ARN	2	3.65	<b>14.4</b>
D-protéine	2	21.66	<b>85.6</b>
<i>Cellules sélectivement marquées</i>			
HD-ARN	59.5	53.91	<b>47.0</b>
HD-protéine	5	60.83	<b>53.0</b>

Tableau 2. Contributions relatives évaluées pour l'ARN et les protéines, dans des cellules natives, deutériées et avec ARN hydrogéné à 40.5 %.

\* le terme 'brique élémentaire' fait référence à un nucléotide dans le cas de l'ARN, et à 3 acides aminés dans le cas des protéines. Cette définition fut introduite afin de comparer le signal incohérent de l'ARN et des protéines pour une même masse moléculaire, soit environ 330 Da. Par ailleurs, on considère que les deux types de macromolécules ont la même proportion de mouvements sur les gammes de temps et de longueur observées.

## **6.2 Mesures élastiques sur IN13**

### **6.2.1 Matériels et méthodes**

#### **Préparation des échantillons**

Les bactéries *E. coli* deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % furent préparées selon le protocole détaillé en Annexe 5. Les cellules furent centrifugées à 5000 rpm dans une centrifugeuse Beckman (rotor JLA10500) pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant fut prélevé et les cellules furent rincées dans 100 ml de tampon de lavage (Annexe 4) en solvant H<sub>2</sub>O. Un culot cellulaire fut obtenu après 20 minutes de centrifugation et transféré dans un porte échantillon en aluminium (4 x 3 x 0.02 cm<sup>3</sup>), recouvert d'une fine couche d'or. Après les mesures de diffusion de neutrons, une petite portion du culot fut resuspendue dans du tampon de lavage et étalée sur boîtes de pétri, après plusieurs étapes de dilution. Le nombre de colonies fut comparé au nombre de colonies obtenu pour les cellules provenant de la culture fraîche et trouvé similaire, ce qui signifie que la majorité des cellules restent intactes et viables après l'exposition totale au faisceau de neutrons.

Pour chaque expérience, des cellules entièrement deutériées furent également cultivées, dans du milieu Enfors deutérié (Annexe 4) en utilisant les mêmes conditions de croissance (Annexe 5). Elles ont servi d'échantillon de référence afin de contrôler si le signal dans les échantillons sélectivement marqués provenait effectivement du mélange ARN-protéine hydrogéné.

#### **Expériences de diffusion de neutrons**

Les mesures d'intensité élastique furent réalisées à l'aide du spectromètre à rétrodiffusion IN13 à l'ILL, qui possède une résolution instrumentale de 8 µeV (FWHM) et détecte des mouvements avec des temps caractéristiques de 100 ps environ. Le signal incohérent élastique fut mesuré et analysé sur la gamme  $1.27 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.87 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q=4\pi\sin\theta/\lambda$ , avec  $2\theta$  l'angle de diffusion et  $\lambda$  la longueur d'onde). Les intensités élastiques furent corrigées pour la diffusion du porte échantillon et du tampon de lavage, normalisées à un échantillon de vanadium (diffuseur purement élastique) et corrigées pour l'absorption de l'échantillon, en utilisant le programme de réduction de données d'IN13, ELASCAN (des informations sur le programme sont accessibles sur le site de l'ILL à <http://www.ill.fr>). Pour chaque échantillon, l'intensité élastique  $I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  fut obtenue en fonction de la température, pour des

températures allant de 279 K à 315 K, et  $\ln(I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega))$  fut tracé en fonction de  $Q^2$ . L'amplitude carrée moyenne des fluctuations (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ , fut calculée à partir de la pente de la régression linéaire sur les données expérimentales, en utilisant l'approximation Gaussienne (Zaccai, 2000):

$$I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega) = \text{constant} \cdot \exp(-1/6 \langle u^2 \rangle Q^2) \quad [6.2]$$

L'approximation est valable pour des valeurs de  $Q$  vérifiant  $\langle u^2 \rangle Q^2 \approx 2$ . A partir de la droite du MSF en fonction de la température, la résilience  $\langle k' \rangle$  fut extraite en utilisant la relation suivante (Bicout and Zaccai, 2001; Zaccai, 2000):

$$\langle k' \rangle = \frac{0.00276}{d \langle u^2 \rangle / dT} \quad [6.3]$$

Elle s'exprime en  $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ , avec un MSF en  $\text{Å}^2$  et une température en K.

## 6.2.2 Résultats

### Signal provenant de l'ARN cellulaire

La Figure 2 représente les intensités mesurées corrigées, sous la forme de  $\log I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  en fonction de  $Q$ , pour des cellules deutériées en  $\text{H}_2\text{O}$  (*triangles*) et des cellules deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % en  $\text{H}_2\text{O}$  (*carrés*), à 279 K et 315 K. Les petites différences d'intensité mesurées entre les deux types d'échantillons, suggèrent que l'ARN hydrogéné ne contribue que très faiblement au signal mesuré sur IN13. Les cellules sélectivement marquées sont hydrogénées à 10 % d'après la section 6.1.2. Ce pourcentage d'hydrogénation ne serait donc pas suffisant pour mesurer un signal significatif sur IN13 pour ce système d'étude. Le signal reste dominé par la contribution moyenne des macromolécules cellulaires, en particulier celle des protéines. Les *E. coli* deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % ne permettent pas d'observer la dynamique spécifique de l'ARN sur les échelles de temps et de longueur associées à IN13.

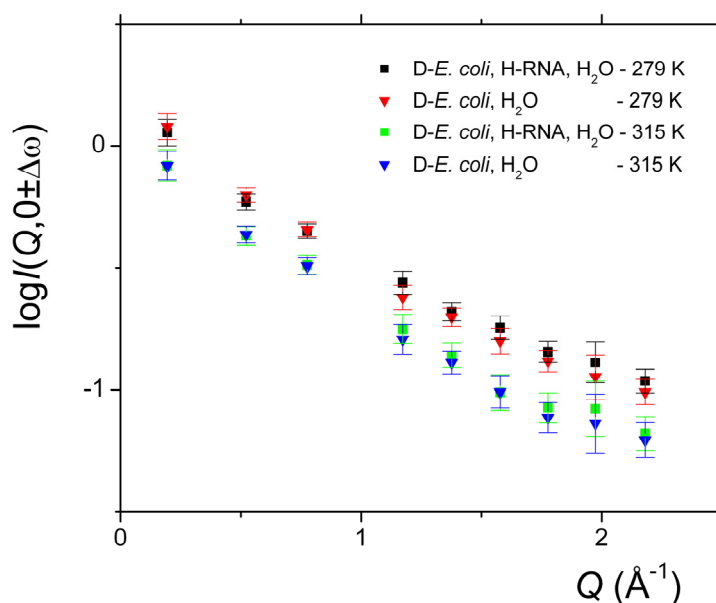


Figure 2. Intensités diffusées normalisées, représentées sous la forme de  $\log I(\mathbf{Q}, 0 \pm \Delta\omega)$  en fonction de  $Q$ , pour des cellules deutériées en  $\text{H}_2\text{O}$  (*triangles*) et des cellules deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % en  $\text{H}_2\text{O}$  (*carrés*), à 279 K et 315 K.

La Figure 3 présente les régressions linéaires à partir desquelles les MSF ont été extraits. La gamme de  $Q$  utilisée correspond à l'échelle de longueur associée à la contribution des mouvements macromoléculaires non contaminée par celle du solvant (Gabel, 2005). Les MSF sont représentés en fonction de la température en Figure 4, pour les cellules deutériées en  $\text{H}_2\text{O}$  (*triangles noirs*) et les cellules deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % en  $\text{H}_2\text{O}$  (*carrés rouges*). Les résiliences moyennes ont été calculées à partir des régressions linéaires réalisées sur les MSF en fonction de la température, en utilisant l'équation 6.3. Les MSF obtenus sont similaires pour les deux types d'échantillon, avec une valeur moyenne autour de  $2.25 \text{ \AA}^2$ . La résilience est égale à  $0.25 \text{ N/m}$  pour les cellules deutériées en  $\text{H}_2\text{O}$ , et à  $0.24 \text{ N/m}$  pour les cellules deutériées avec ARN hydrogéné à 40 % en  $\text{H}_2\text{O}$ . Les similitudes des MSF et des résiliences obtenus pour les deux types d'échantillon, sont en accord avec les conclusions esquissées dans le paragraphe précédent. Les résiliences mesurées correspondent à la valeur moyenne des résiliences associées aux macromolécules deutériées présentes dans les cellules, principalement dominées par la fraction protéique.

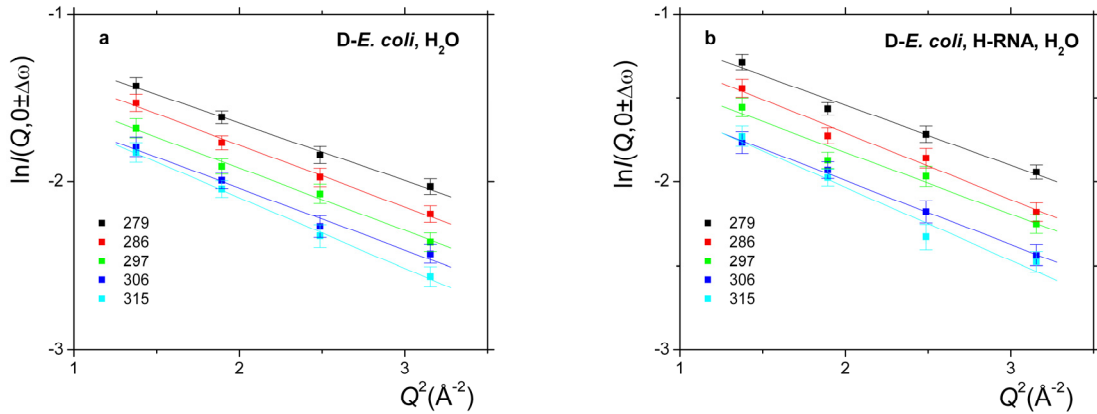


Figure 3.  $\ln(I(Q, 0 \pm \Delta\omega))$  en fonction de  $Q^2$ , pour des cellules deutériées en  $H_2O$  (a) et des cellules deutériées avec ARN partiellement hydrogéné en  $H_2O$  (b). Les régressions linéaires ont été réalisées sur la gamme  $1.38 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 3.15 \text{ \AA}^{-2}$  en utilisant l'équation 6.2.

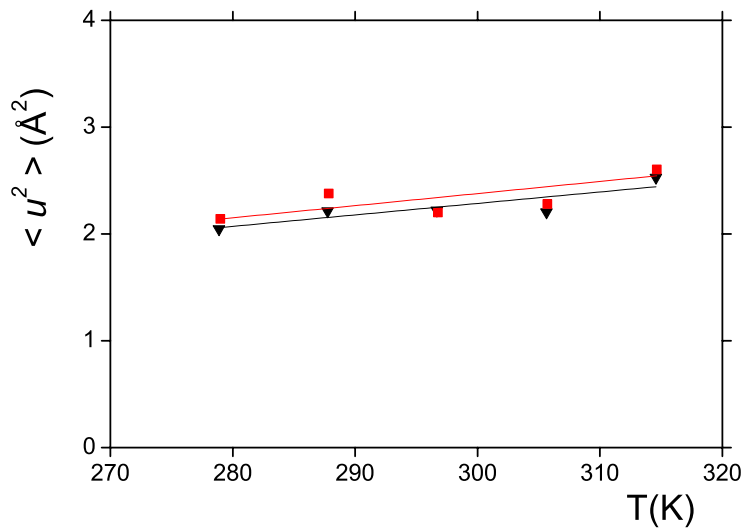


Figure 4. MSF en fonction de la température, pour des cellules deutériées en  $H_2O$  (triangles noirs) et des cellules deutériées avec ARN partiellement hydrogéné en  $H_2O$  (carrés rouges). Les régressions linéaires (lignes continues) ont été réalisées sur la gamme de température 279 K – 314 K en utilisant l'équation 6.3.

## **Influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire**

Les MSF obtenus pour des *E. coli* deutériées en H<sub>2</sub>O (*triangles noirs*) et des *E. coli* natives en H<sub>2</sub>O (*carrés bleus*) sont représentés en fonction de la température en Figure 5. En solvant H<sub>2</sub>O, la résilience moyenne des macromolécules deutériées est légèrement plus petite que celle des macromolécules natives, avec une valeur de 0.25 N/m comparée à 0.38 N/m (voir chapitre 5), respectivement. Les macromolécules deutériées en H<sub>2</sub>O sont donc un peu moins résilientes, ou encore plus molles, que les macromolécules hydrogénées en H<sub>2</sub>O. Les amplitudes de fluctuations dans les macromolécules deutériées sont légèrement plus grandes que celles mesurées dans les macromolécules natives, avec des valeurs moyennes de 2.25 Å<sup>2</sup> et 2 Å<sup>2</sup>, respectivement. Les macromolécules deutériées sont un peu plus flexibles que les macromolécules natives en H<sub>2</sub>O.

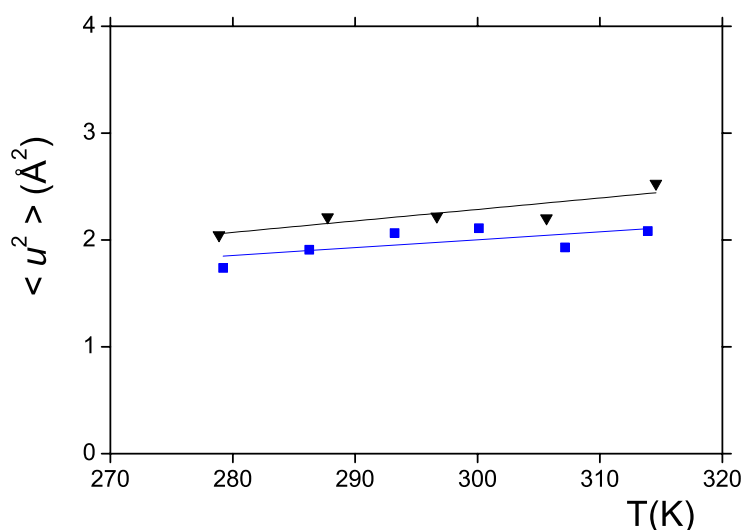


Figure 5. MSF en fonction de la température, pour des cellules deutériées en H<sub>2</sub>O (*triangles noirs*) et des cellules natives en H<sub>2</sub>O (*carrés bleus*). Les régressions linéaires (*lignes continues*) ont été réalisées sur la gamme de température 279 K – 314 K en utilisant l'équation 6.3.

L'utilisation du marquage isotopique s'appuie sur une hypothèse forte selon laquelle la deutériation n'affecte ni la structure des macromolécules ni leur activité biologique. Il existe cependant peu d'études qui ont sondé l'effet de la deutériation sur les propriétés structurales et fonctionnelles des macromolécules biologiques. Des études cristallographiques récentes ont mis en évidence que les structures des protéines hydrogénées et deutériées étaient similaires, avec une déviation carrée moyenne, entre les carbones C<sub>α</sub> ou les chaînes principales, inférieure

à 0.3 Å (Artero et al., 2005; Budayova-Spano et al., 2006; Liu et al., 2007; Meilleur et al., 2005). Dans une des ces études cependant, la structure deutériée a un cœur un peu moins hydrophobe que la structure hydrogénée, qui serait par conséquent plus compacte (Liu et al., 2007). Deux autres études ont également montré que la deutérioration spécifique de résidus ou de peptides pouvait empêcher le repliement observé dans la conformation native, nécessaire à la fonction biologique (Cooper et al., 1998; Dennison et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'utilisation du marquage isotopique reste appropriée, mais soulignent qu'elle peut générer, dans certains cas, des modifications structurales fines ayant des conséquences sur la fonction biologique.

L'influence de la deutérioration sur la dynamique, par contre, restait peu explorée. Les mesures élastiques sur *E. coli* ont révélé une petite baisse de la résilience après deutérioration, ainsi qu'une petite augmentation de la flexibilité. Ces résultats peuvent être interprétés à la lumière des forces de stabilisation macromoléculaire. Les liaisons hydrogènes ainsi que les liaisons C–H sont plus courtes lorsque les hydrogènes sont remplacés par des deutériums, du fait de la différence de masse entre l'hydrogène et le deutérium. Hattori et al ont montré que les liaisons C–D étaient moins hydrophobes que les liaisons C–H (Hattori et al., 1965); cette observation fut illustrée par une étude récente qui a révélé une baisse de 10 % des résidus hydrophobes non accessibles au solvant après deutérioration (Liu et al., 2007). L'effet hydrophobe joue un rôle clef dans le repliement et la stabilité des protéines (Baldwin, 2007). Si l'effet hydrophobe est diminué dans les macromolécules deutériées, elles ont la liberté d'exposer plus de surface au solvant. En surface, les acides aminés se compactent moins bien (Gerstein and Chothia, 1996) et les amplitudes de mouvement sont plus grandes que dans le cœur de la protéine (Pérez et al., 1999). Une augmentation de la surface exposée à l'eau pourrait expliquer l'augmentation des amplitudes de mouvements observée dans les macromolécules deutériées. La plus petite valeur trouvée pour la résilience des macromolécules deutériées suggère une augmentation de l'entropie après deutérioration, due à un plus grand échantillonnage des sous-états conformationnels macromoléculaires.



### **6.3 Conclusion**

Cette étude n'apporte pas l'information attendue concernant la dynamique de l'ARN, mais elle met en lumière plusieurs points clefs, essentiels à l'analyse et à la réalisation d'expériences utilisant le marquage isotopique.

L'étude révèle l'importance du contrôle négatif entièrement deutérié lors de l'analyse des données provenant d'échantillons marqués, afin de vérifier que le signal observé correspond effectivement aux composants hydrogénés présents dans la matrice deutériée (l'ARN hydrogéné dans les cellules deutériées dans notre cas). Une évaluation théorique des contributions attendues, compte tenu des taux de marquage et du poids massique des composants, n'est pas suffisante pour conclure que le signal observé correspond à la partie sélectivement marquée du système, comme le souligne la faible différence d'intensité mesurée sur IN13 entre l'échantillon totalement deutérié et l'échantillon avec ARN hydrogéné à 40 %. L'évaluation des contributions relatives aux différents composants du système est d'autant plus difficile que ces contributions dépendent des échelles de temps et de longueurs accessibles sur le spectromètre, qui limitent les mouvements observables. D'après le tableau 1 présenté dans le chapitre 2 (p. 18), l'ARN présente surtout des mouvements se produisant sur des temps de l'ordre de la ps ou de la ns, avec des amplitudes de l'ordre de l'Angström. La résolution instrumentale d'IN13, associée à des temps de 100 ps environ, n'est peut-être pas la plus appropriée pour les études des mouvements dans l'ARN. Cependant, des mesures quasiélastiques sur IN16 (FWHM = 0.9  $\mu\text{eV}$ ), qui donne accès à des mouvements sur des temps caractéristiques allant jusqu'à 1 ns environ, furent également réalisées sur les deux types d'échantillons, en solvant D<sub>2</sub>O. Les données n'ont pas révélé de différences significatives au niveau des intensités mesurées pour les deux types d'échantillons, ce qui suggère que la difficulté expérimentale principale de notre étude réside dans le taux d'hydrogénation trop faible de l'ARN cellulaire. L'étude indique qu'un pourcentage d'hydrogénation de 10 % n'est pas suffisant pour observer la dynamique de parties hydrogénées au sein de cellules deutériées.

Par ailleurs, les mesures élastiques sur les cellules deutériées ont permis d'évaluer l'influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire. La deutériation induit une petite augmentation de la flexibilité structurale ainsi qu'une petite baisse de la résilience. Ces effets pourraient provenir d'une baisse de l'hydrophobicité après deutériation, combinée à une augmentation de l'entropie due à un plus grand échantillonnage des sous-états conformationnels macromoléculaires. Ces résultats montrent cependant que l'influence de la

deutériation reste petite, et justifie l'utilisation du marquage isotopique pour étudier la dynamique macromoléculaire.

## 7 CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

L'intérêt de la technique de diffusion élastique incohérente de neutrons pour étudier la dynamique intracellulaire, a été établie avant ce travail de thèse (Tehei et al., 2004). La thèse intègre la diffusion quasi-élastique incohérente de neutrons et le marquage isotopique H/H<sup>2</sup> pour compléter l'étude des fluctuations atomiques dans les macromolécules cellulaires, par celle des mouvements diffusifs internes et globaux dans les (macro)molécules cellulaires. La cartographie dynamique de la cellule a été élargie, en incluant la dynamique de l'eau cellulaire, d'une part, et, d'autre part, les mouvements internes et globaux des macromolécules biologiques. Par ailleurs, l'effet isotopique du solvant ainsi que l'influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire moyenne ont été étudiés.

Les mesures quasi-élastiques sur des cellules *E. coli* deutériées contenant du H<sub>2</sub>O, ont permis d'extraire les mouvements diffusifs de l'eau cellulaire. Les résultats ont infirmé le paradigme établi, selon lequel la diffusion de l'eau cellulaire est fortement ralentie par l'encombrement macromoléculaire et les interactions spécifiques eau-macromolécule. L'étude a établi que la diffusion de l'eau dans *E. coli* est similaire à celle de l'eau pure (volumique), à température physiologique. Ce travail a mis en lumière l'intime relation liant la proportion d'eau cytoplasmique aux propriétés dynamiques de l'eau intracellulaire, en établissant que le nombre de couches d'eau joue un rôle déterminant dans la dynamique de l'eau cellulaire. Par ailleurs, les conclusions esquissées pour l'eau intracellulaire dans *E. coli* ont renforcé la spécificité des bactéries halophiles *H. marismortui*, qui présentent une population d'eau extrêmement ralentie (d'un facteur 250 par rapport à l'eau volumique). La compréhension du mécanisme à l'origine de cette eau très lente, pourrait permettre de capturer l'essence de l'adaptation moléculaire aux conditions de salinité extrêmes.

Les mouvements moléculaires internes dans les macromolécules ont été étudiés *in vivo*, par diffusion quasi-élastique sur des *E. coli* natives contenant du D<sub>2</sub>O. Trois processus majeurs ont été extraits à température physiologique: un processus rapide se produisant sur des temps proches de la ps, qui consiste en une combinaison de mouvements réorientationnels et diffusifs avec sauts, et deux processus plus lents, associés à des temps de corrélation de 40 ps et

90 ps, respectivement, correspondant à des mouvements réorientationnels. La diffusion globale des macromolécules dans le cytoplasme d'*E. coli* a également été évaluée. L'analyse des mouvements rapides a révélé qu'à l'intérieur de la cellule, la flexibilité moléculaire et les taux de diffusion internes sont augmentés de façon significative par rapport à ceux évalués en poudre hydratée; ils restent cependant plus petits que ceux observés en solution peu concentrée. Ces résultats ont mis en évidence que la proportion d'eau intracellulaire est un facteur déterminant dans la dynamique interne des macromolécules *in vivo*. L'effet lubrifiant de l'eau cellulaire sur les mouvements moléculaires internes est toutefois atténué par l'encombrement macromoléculaire. L'étude montre que les échantillons standards (poudres et solutions) ne miment pas l'environnement physiologique.

L'effet du solvant sur la dynamique macromoléculaire moyenne a été exploré *in vivo*, par diffusion élastique incohérente sur des cellules *E. coli* contenant du H<sub>2</sub>O et du D<sub>2</sub>O, respectivement. La flexibilité et la résilience moyennes ont été trouvées plus faibles en D<sub>2</sub>O. Ces observations furent interprétées à la lumière des forces de stabilisation macromoléculaire. L'effet hydrophobe, renforcé en D<sub>2</sub>O, peut expliquer les baisses de flexibilité et de résilience observées en D<sub>2</sub>O, en favorisant l'enfouissement des surfaces non polaires et leur entassement dans le coeur de la protéine via des interactions de van der Waals. Les macromolécules en H<sub>2</sub>O présenteraient plus de surfaces exposées à l'eau, ce qui augmenterait la flexibilité, en particulier en surface des macromolécules. Cependant, la différence de viscosité entre les deux solvants peut également contribuer à baisser la valeur expérimentale de la flexibilité mesurée en D<sub>2</sub>O, sans influencer la résilience. Les plus petites résiliences en D<sub>2</sub>O suggèrent par ailleurs une plus grande entropie dans le cas du D<sub>2</sub>O, due à un plus grand échantillonnage des sous-états conformationnels macromoléculaires.

Ce travail de thèse élargit notre compréhension des relations qui lient les composants de la cellule et participent à leur dynamique. La dynamique de l'eau cellulaire n'est ni confinée ni ralentie par l'encombrement macromoléculaire. Par ailleurs, l'eau cellulaire et sa nature isotopique influencent fortement la dynamique interne des macromolécules. Au delà des résultats expérimentaux apportés sur la dynamique intracellulaire, ce travail esquisse les points forts et les limitations de la technique de diffusion incohérente de neutrons couplée au marquage isotopique, pour explorer la dynamique au sein de systèmes complexes, comme la cellule. La compréhension de la dynamique intracellulaire a été possible grâce à l'intégration des mesures quasi-élastiques et à l'utilisation de plusieurs spectromètres, qui a permis de recouper les différentes gammes de temps et de longueurs associées au comportement dynamique des (macro)molécules biologiques. Les mesures quasiélastiques sur IRIS ont

confirmé que le signal provenant de l'eau intracellulaire consiste en un bruit de fond sur la gamme d'IN13 associée aux mouvements macromoléculaires, même pour un système entièrement deutérié. Par ailleurs, le travail de thèse a dégagé des limitations expérimentales associées à l'utilisation du marquage isotopique. La dynamique spécifique de l'ARN n'a pas pu être extraite de cellules hydrogénées à 10 % en poids sec. L'étude sur l'ARN souligne l'importance du contrôle négatif lors des mesures sur des échantillons sélectivement marqués, d'une part, et, d'autre part, montre qu'un taux de marquage conséquent (> 10 %) est nécessaire pour observer la dynamique d'un composant spécifique. L'étude de la dynamique des lipides dans les membranes cellulaires, par exemple, serait difficile même avec un taux d'hydrogénation de 100 %, compte tenu qu'ils représentent seulement 9 % du poids sec d'une cellule. Cette limitation provient du fait que le deutérium possède une section efficace incohérente non nulle qui donne lieu à un signal non négligeable à partir d'un certain pourcentage massique. Ce dernier point a permis d'étudier l'influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire moyenne sur IN13. La comparaison des MSF et des résiliences obtenues au sein de cellules natives et de cellules deutériées a mis en évidence une fine augmentation de la flexibilité interne après deutériation, ainsi qu'une petite baisse de la résilience. Ces résultats soulignent que la deutériation a un effet sur la dynamique macromoléculaire, qui reste cependant suffisamment faible pour justifier l'utilisation de la deutériation spécifique dans les mesures de dynamique.



8 *ANNEXE 1: PUBLICATIONS*

# Down to atomic-scale intracellular water dynamics

Marion Jasnin<sup>1</sup>, Martina Moulin<sup>2</sup>, Michael Haertlein<sup>2</sup>, Giuseppe Zaccai<sup>1,3+</sup> & Moeava Tehei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, CEA-CNRS-UJF, <sup>2</sup>Deuteration Laboratory, Institut Laue Langevin, and <sup>3</sup>Institut Laue Langevin, Grenoble, France

**Water constitutes the intracellular matrix in which biological molecules interact. Understanding its dynamic state is a main scientific challenge, which continues to provoke controversy after more than 50 years of study. We measured water dynamics *in vivo* in the cytoplasm of *Escherichia coli* by using neutron scattering and isotope labelling. Experimental timescales covered motions from pure water to interfacial water, on an atomic length scale. In contrast to the widespread opinion that water is 'tamed' by macromolecular confinement, the measurements established that water diffusion within the bacteria is similar to that of pure water at physiological temperature.**

Keywords: QENS; neutron scattering; *Escherichia coli*; water diffusion; *in vivo* measurement

EMBO reports (2008) 9, 543–547. doi:10.1038/embor.2008.50

## INTRODUCTION

More than 20 years ago, J.S. Clegg described the long-lasting challenge posed by gaining an understanding of water diffusion in the cell (Clegg, 1984). Important progress has been made since then, but many questions remain unanswered. The apparent diffusion coefficient of water in biological tissues and in the brain has been measured by using nuclear magnetic resonance. The measurements showed that diffusion of cell water on a micrometric scale is reduced by a factor of 2–10 when compared with that of pure water in aqueous media; the reduction could be explained partly by tortuosity effects, macromolecular crowding and confinement effects (reviewed by Le Bihan, 2007). This observation led to the emergence of diffusion magnetic resonance imaging to study the brain (Le Bihan, 2003, 2007). By contrast, very little is known at present about the dynamics of cell water on a submicrometric scale. The question can be addressed by using quasi-elastic neutron scattering (QENS) spectroscopy, which monitors the diffusive motions of hydrogen atoms over a few Ångströms, on a pico- to nanosecond timescale. Here, we address the nature of intracellular water dynamics, by using isotope

labelling and incoherent neutron scattering, and present a direct measurement of water diffusion in live *Escherichia coli* at physiological temperature, revealing the intrinsic physical properties of water in the cell interior on an atomic scale.

## RESULTS AND DISCUSSION

Neutron scattering spectroscopy relies on incoherent scattering and can be performed on complex macromolecular systems such as living cells (Tehei *et al*, 2004). Hydrogen <sup>1</sup>H nuclei have an incoherent neutron scattering signal at least 40 times larger than that of deuterium (<sup>2</sup>H) or any other nucleus or isotope in biological material. We performed QENS experiments on deuterated *E. coli* containing natural abundance water. Deuterium labelling allowed a strong attenuation of the scattering signal from the deuterated cell components, revealing the water contribution. Intracellular water dominated the scattering signal at more than 93% in the spectra (see Methods). The measurements were carried out on two neutron spectrometers, IN6 and IRIS, with complementary timescales and atomic length scale resolution (see Methods). The combined timescale covered diffusive motions from pure water to interfacial water. The IN6 spectrometer is well suited for the measurement of rotational and translational contributions of pure water (Table 1); the IRIS spectrometer is optimal for the detection of reduced-mobility interfacial water, as well as the translational motions of pure water.

In the case of simple exponential diffusion processes, the QENS spectra can be fitted mathematically by Lorentzian functions, as described in Methods. The dependence of the Lorentzian half-width at half-maximum (HWHM) on the wave-vector transfer modulus  $Q$  provides information on the diffusion coefficient and other parameters of the process. Water dynamics parameters of *E. coli* extracted from IRIS data are shown in Fig 1 and Table 1. The QENS spectra were each fitted with one Lorentzian, which was attributed to translational motions of cell water (see Methods). The HWHM,  $\Gamma_T$  (Fig 1), was extracted and best fitted using a jump diffusion model (Bée, 1988), which describes the diffusion of water protons between sites with a mean residence time  $\tau_0$  at each site:

$$\Gamma_T = \frac{D_T Q^2}{1 + D_T Q^2 \tau_0} \quad (1)$$

where  $D_T$  represents the translational diffusion coefficient. We found translational diffusion coefficients that are very close to those of pure water at corresponding temperatures, with residence

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

<sup>2</sup>Deuteration Laboratory, Institut Laue Langevin, and

<sup>3</sup>Institut Laue Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France

+Corresponding author. Tel: +33 (0)4 76 20 76 79; Fax: +33 (0)4 76 20 71 20;

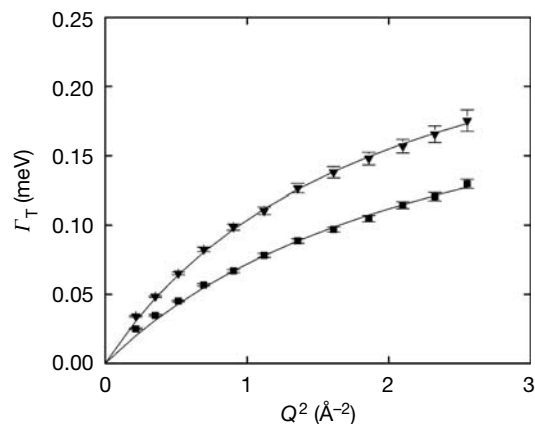
E-mail: zaccai@ill.fr



**Table 1** | Translational and rotational parameters of water in the pure state, in the cell and in the buffer

Spectrometer (FWHM, $\mu\text{eV}$ )	Origin of water ( $T$ , K)	$D_T (\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$	$\tau_0$ (ps)	$\tau_{\text{cor,R}}$ (ps)	References
IRIS (17)	<i>E. coli</i> cells (281)	$1.53 \pm 0.05$	$2.63 \pm 0.11$		This work
IN6 (90)	<i>E. coli</i> cells (281)	$1.78 \pm 0.08$	$2.95 \pm 0.11$	$1.96 \pm 0.07$	This work
IRIS (17) and IN6 (90)*	<i>E. coli</i> buffer (281)	$1.68 \pm 0.04$	$1.48 \pm 0.07$	$1.89 \pm 0.07$	This work
IN6 (100)	Pure (285)	1.6	1.66		Teixeira et al (1985)
MIBEMOL (28; 96)	Pure (298)	2.3	1.1	3.3	Bellissent-Funel et al (1995)
IRIS (17)	<i>E. coli</i> cells (301)	$2.39 \pm 0.05$	$2.16 \pm 0.05$		This work
IN6 (90)	<i>E. coli</i> cells (301)	$2.94 \pm 0.40$	$2.28 \pm 0.27$	$1.54 \pm 0.08$	This work
IRIS (17) and IN6 (90)*	<i>E. coli</i> buffer (301)	$2.72 \pm 0.17$	$1.04 \pm 0.15$	$1.47 \pm 0.08$	This work

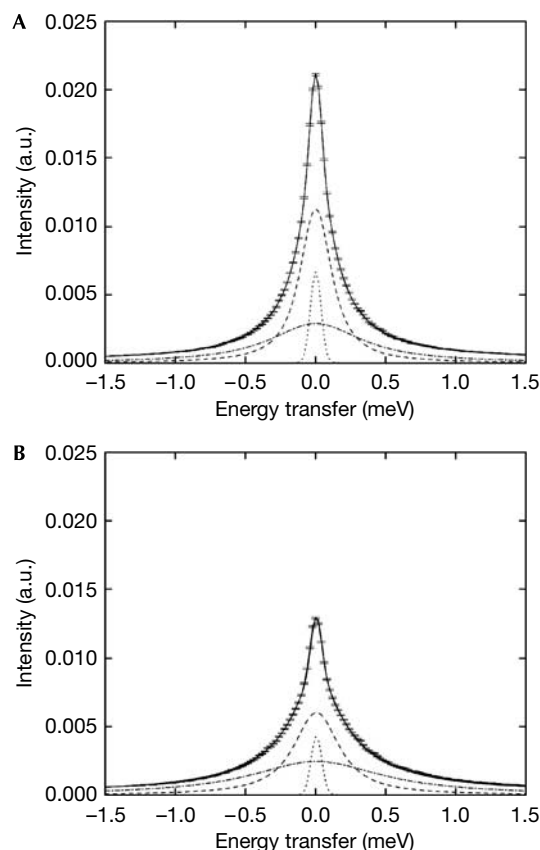
\**E. coli* buffer was measured both on IRIS and IN6. The translational parameters were identical on the two spectrometers. The rotational correlation times were extracted from the IN6 data.  $D_T$ , translational diffusion coefficient; FWHM, full-width at half maximum;  $T$ , temperature;  $\tau_{\text{cor,R}}$ , rotational correlation times;  $\tau_0$ , residence time.



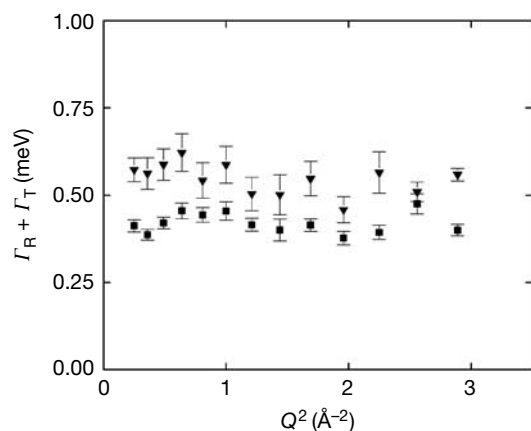
**Fig 1** | IRIS data. Half-width at half-maximum of the translational Lorentzian,  $\Gamma_T$ , as a function of  $Q^2$ , at 281 K (filled squares) and 301 K (filled triangles).  $\Gamma_T$  was best fitted (solid lines) using a jump diffusion model (Bée, 1988; equation (1)). We found  $D_T = (1.53 \pm 0.05) \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 2.63 \pm 0.11 \text{ ps}$  at 281 K and  $D_T = (2.39 \pm 0.05) \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 2.16 \pm 0.05 \text{ ps}$  at 301 K.  $D_T$ , translational diffusion coefficient;  $\tau_0$ , residence time.

times  $\tau_0$  about twice as long (Teixeira et al, 1985; Bellissent-Funel et al, 1995; Table 1). Furthermore, the behaviour of  $\Gamma_T$  at low  $Q$  values indicated that the water in *E. coli* cells does not act as if it is being confined (Fig 1). The IRIS results, although obtained on a timescale optimal for the detection of reduced-mobility interfacial water, therefore showed that the translational contribution of *E. coli* water was neither confined nor significantly slowed down when compared with pure water.

The IN6 QENS spectra were fitted with two Lorentzian functions (see Methods). The translational and rotational motions of cell water were extracted from the narrow and broad Lorentzians, respectively (Fig 2). Parameters for translational diffusion identical to those found on IRIS were extracted from IN6 data (Table 1). In addition, the rotational contribution to the motions emerged (Fig 3). The HWHM of the broad Lorentzian shows a  $Q$ -independent profile, as expected for rotational motions



**Fig 2** | IN6 QENS data and applied fits using equations (4) and (5) for *E. coli* cell water. Quasi-elastic spectra at  $Q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$ , at (A)  $T = 281 \text{ K}$  and (B)  $T = 301 \text{ K}$ . The data are shown with the associated error bars. The solid and dotted lines represent the total fitted curve and the elastic peak, respectively. The narrow Lorentzian (dashed line) was attributed to translational motions and the broad component (dash-dot line) was attributed to rotational motions of cell water, broadened by the translational contribution (see Methods). a.u., arbitrary units;  $Q$ , wave-vector transfer modulus; QENS, quasi-elastic neutron scattering;  $T$ , temperature.



**Fig 3** | IN6 data. Half-width at half-maximum of the broad Lorentzian,  $\Gamma_R + \Gamma_T$ , as a function of  $Q^2$ , at 281 K (filled squares) and 301 K (filled triangles). The rotational correlation times,  $\tau_{\text{cor,R}} = 1/\Gamma_R$ , were extracted from the broad Lorentzian after correction for the broadening arising from the translational contribution, and were found to be  $1.96 \pm 0.07$  ps at 281 K and  $1.54 \pm 0.08$  ps at 301 K.  $Q$ , wave-vector transfer modulus;  $R$ , rotational;  $T$ , translational.

(Sears, 1966). Rotational correlation times are close to the values extracted for the buffer under the same conditions and of the same order as the values measured for pure water by QENS (Teixeira *et al*, 1985) and nuclear magnetic resonance (Sposito, 1981). Rotational relaxation times of protein hydration water are reduced by a factor of 5–10 when compared with pure water (Halle, 2004). Therefore, we concluded that diffusive motions of *E. coli* water measured over atomic distances are dominated by a cell water component that is similar to pure water at physiological temperature.

These results are in contrast to the idea that the cell somehow ‘tames’ water and renders it different to pure water (Mentré, 2001). In combination with previous studies, this work confirms that the degree of hydration has a crucial role in the dynamic state of water in confined geometries. Studies of water dynamics in deuterated C-phycoyanin found an increase in the mobility of water when hydration coverage reached one layer of water molecules (Bellissent-Funel *et al*, 1996). Reduced mobility of cellular water on an atomic scale has so far been observed only at cryogenic temperatures (Ford *et al*, 2004), in low-hydrated *Artemia* shrimp cysts (Trantham *et al*, 1984) or in extreme halophiles (Tehei *et al*, 2007). *E. coli* contains approximately 2.6 g of cellular water per gram of macromolecule, and the first hydration layer accounts for about 0.5 g of water per gram of macromolecule (Record *et al*, 1998). On average, cell water would therefore correspond to about five layers of water molecules around macromolecular surfaces. We noted, however, that the residence time was found to be higher by a factor of 2 than that of pure water. This average might reflect the longer time spent by the water molecules in the hydration shells. Once released, however, exchange with external layers would take place with a diffusion rate similar to that of pure water.

The concept derived from indirect experimental observations that the cell interior is a gel- or colloidal-like structure, in which confined water is interfacial with properties that are significantly different to those of pure water, has influenced current opinion in certain sections of the biological community. Pollack *et al* (2006)

state in the preface that “...practically all cell water is interfacial”; however, this claim remains controversial, as reviewed by Ball (2008). Our data are derived from the direct measurement of water properties *in situ* and *in vivo* on a wide range of timescales, and refute this concept. By contrast, they show that water forms a network of communication in the crowded cell interior that is as fluid as pure water. Tehei *et al* (2007) have established that *E. coli* does not contain a water component that is slower than interfacial hydration water by two orders of magnitude, as was observed in the special case of Dead Sea Archaea (Tehei *et al*, 2007). The origin of the slow water component in these extreme halophiles is still under investigation; it is unrelated to molecular crowding or the high-salt solution and was interpreted as owing to specific interactions involving macromolecules, water and salt ions, which are yet to be defined.

Our data showed that water dynamics are different on micrometric and atomic scales. Micrometric-scale measurements probe cell water diffusion across the entire length of the cell, along which water can encounter a large number of obstacles (for a review, see Le Bihan, 2007). Water in the extracellular matrix might also contribute appreciably to the micrometric-scale measurements, depending on the sample state and experimental design. Differences could emerge between different types of cell, such as prokaryotic and eukaryotic cells, arising for example, from the presence of the cytoskeleton and the nucleus. The magnitude of the viscosity also depends strongly on the length scale that is probed, as described previously (Lavalette *et al*, 1999). The results obtained for intracellular water dynamics on an atomic scale suggest that the atomic-scale viscosity in the cell cytoplasm is close to the viscosity of pure water (viscosity is often calculated by using diffusion parameters, according to the Stokes–Einstein relation).

Finally, it is important to emphasize the fundamental biological relevance of these results. It is likely that the remarkable properties of bulk water are essential for cell viability, in particular for functional macromolecular folding, stabilization and activity, transport, membrane formation and protein insertion into membranes. Whenever interfacial water has been obtained in the presence of biological macromolecules, it has always been after these were already synthesized, correctly folded, stabilized and the bulk water subsequently dried or frozen out. Our data show that the water between macromolecules in the *in vivo* intracellular environment has properties that are essentially the same as those of pure water and can therefore participate as such in all the interactions described above.

To conclude, borrowing from the poetic terms that have been used to describe cell water incorrectly, this study shows that water is not ‘tamed’ by the cell environment (Mentré, 2001) nor is ‘life...water dancing to the tune of macromolecules’ (Albert Szent-Gyorgyi, cited in Pollack *et al*, 2006) but vice versa.

## METHODS

**Samples.** Deuterated *E. coli* (BLE21(DE3) strain) were grown at 37°C to stationary phase, with an optical density of 1.5, in deuterated Enfors minimum growth medium with deuterated glycerol (d8) as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at 5,000 r.p.m. in a Beckman centrifuge (JLA10500 rotor) for 20 min at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 200 ml of H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM

Tris–HCl (respectively Tris–DCl) pH 6.6). The cells were pelleted by centrifugation for 20 min, transferred to aluminium sample holders (4 cm × 3 cm × 0.02 cm) and sealed with an indium ‘o’ ring for the neutron measurements. After the experiments, a small amount of the pellet was resuspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilution steps. The number of colonies was compared with that obtained for cells from the fresh culture and was found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after total beamtime exposure. The rest of the cell pellet was dried in an oven at 80 °C for 3 days; the quantity of extracellular water was evaluated taking into account that the proportion of intracellular water would be about 72% of the total cell weight of *E. coli* (Record et al, 1998). The extracellular water content was found to be less than 7% of the total water.

**Neutron measurements.** The full-width at half-maximum (FWHM) energy resolution of a neutron spectrometer defines the upper limit of the motions timescale. IN6 (FWHM = 90 μeV), at the Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble; see www.ill.eu for more information), is suitable for the measurement of motions with characteristic times of  $\tau < 15$  ps, whereas IRIS (FWHM = 17 μeV), at ISIS (Chilton, UK; http://www.isis.rl.ac.uk), can resolve slower motions with  $\tau < 75$  ps. The scattering was measured over a wave-vector range of  $0.5 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$ , associated with atomic length scale, for each spectrometer. A vanadium sample (a purely incoherent elastic scatterer) was measured to define the instrument resolution and to correct for detector efficiency. IRIS spectra were corrected for detector efficiency, sample container and *E. coli* macromolecular contribution (see the next paragraph), normalized, grouped and transferred into energy transfer spectra using the IRIS data reduction program Ionian from the MODES package (MODES, 1998–2006). IN6 spectra were corrected in the same way, normalized and the scattering function,  $S(\mathbf{Q}, \omega)$ , where  $\omega$  is the energy transfer, was extracted by using the LAMP data reduction routines (LAMP, 2007). The sample transmissions were greater than 90% on both instruments and multiple scattering was neglected.

**Data collection.** Cell water dynamics was studied by measuring two samples: deuterated cell pellets resuspended in H<sub>2</sub>O buffer; and deuterated cell pellets resuspended in D<sub>2</sub>O buffer. A subtraction of the cell spectra measured in D<sub>2</sub>O from that measured in H<sub>2</sub>O, scaled by the sample mass, provided a good approximation to the scattering signal from the water present in the samples. We found extracellular water content to be less than 7% of the total water. The intracellular water, therefore, dominated the scattering signal by more than 93% in the spectra corrected for macromolecular contribution, as explained above. A sample of H<sub>2</sub>O buffer alone was also measured on each spectrometer and used as a reference for interpreting the data.

**Data analysis.** In the case of translational diffusion and rotational motions of water, the calculated scattering function,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , can be expressed phenomenologically as follows (Bée, 1988):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-(x^2)Q^2/3} [A_{1,T}(\mathbf{Q})L(\Gamma_T, \omega) \otimes (A_{0,R}(\mathbf{Q})\delta(\omega) + A_{1,R}(\mathbf{Q})L(\Gamma_R, \omega))] \quad (2)$$

Here,  $e^{-(x^2)Q^2/3}$  is a Debye–Waller (DW) factor, which accounts for vibrational modes; the DW factor is simply a scaling factor in  $\omega$ -space that does not modify the shape of the quasi-elastic scattering function; the symbol  $\otimes$  denotes convolution. The quasi-elastic component arises from the convolution of the

translational and rotational scattering functions, which are described by Lorentzian functions:

$$L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2} \quad (3)$$

where  $\Gamma_i$  is the HWHM of the Lorentzian peak. Equation (2) simplifies as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-(x^2)Q^2/3} [A_1(\mathbf{Q})L(\Gamma_T, \omega) + A_2(\mathbf{Q})L(\Gamma_R + \Gamma_T, \omega)] \quad (4)$$

The experimental scattering function,  $S_{\text{exp}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , is obtained by convoluting  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  with the energy resolution of the spectrometer,  $S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , determined by the vanadium sample:

$$S_{\text{exp}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\hbar\omega/2k_B T} [(e^{-(x^2)Q^2/3} A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)) \otimes S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)] + B_0 \quad (5)$$

where  $e^{-\hbar\omega/2k_B T}$  is a detailed balance factor,  $A_0$  is the elastic incoherent structure factor arising from the slow motions that are not resolved by the instrumental resolution and  $B_0$  is an inelastic background owing to vibrational modes of lowest energy, which recalls the ‘lattice phonons’ in crystals (Bée, 1988).

On IRIS, the rotational motions of cellular water contribute to the scattering signal only as a flat background. The IRIS spectra were fitted well according to equations (4) and (5) by a single Lorentzian, arising from the translational diffusion of cell water. The fits were performed for the energy transfer range  $-0.2$  to  $+0.5$  meV by using the IRIS Bayesian fitting program *QL function*, from the MODES package (MODES, 1998–2006).

The IN6 spectra were fitted according to equations (4) and (5) by two Lorentzians for the energy transfer range  $-1.5$  to  $+1.5$  meV, by using the QENS\_FIT routine present in the LAMP package (LAMP, 2007). The narrow Lorentzian arises from the translational diffusion of cell water. The broad Lorentzian arises mainly from the rotational contribution, which was broadened, however, by the translational contribution as described in equation (4). The rotational correlation times  $\tau_{\text{cor,R}} = 1/\Gamma_R$  were extracted from the broad Lorentzian after correction for the broadening arising from the translational contribution.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the ILL and the ISIS neutron facilities for providing beam time. We acknowledge M. Koza (ILL, France) and M.F. Telling (ISIS, Rutherford Laboratory, UK) for assistance with the neutron measurements. M.J. acknowledges support from a French Science Ministry doctoral fellowship. M.T. acknowledges the ILL, the CNRS and the Institut de Biologie Structurale (UMR 5075) for financial support of this work. This work was supported by the European Union, under two contracts from the Deuteration Laboratory (ILL, France; HPRI-CT-2001-50035 and RII3-CT-2003-505925), and by the Integrated Infrastructure Initiative for Neutron Scattering and Muon Spectroscopy (NMI3).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Ball P (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev* **108**: 74–108
- Bée M (1988) *Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*. Philadelphia: Adam Hilger
- Bellissent-Funel MC, Chen SH, Zanotti JM (1995) Single-particle dynamics of water molecules in confined space. *Phys Rev E* **51**: 4558–4569

- Bellissent-Funel MC, Zanotti JM, Chen SH (1996) Slow dynamics of water molecules on the surface of a globular protein. *Faraday Discuss* **103**: 281–294
- Clegg JS (1984) Intracellular water and the cytomatrix: some methods of study and current views. *J Cell Biol* **99**: 167s–171s
- Ford RC, Ruffle SV, Ramirez-Cuesta AJ, Michalarias I, Beta I, Miller A, Li J (2004) Inelastic incoherent neutron scattering measurements of intact cells and tissues and detection of interfacial water. *J Am Chem Soc* **126**: 4682–4688
- Halle B (2004) Protein hydration dynamics in solution: a critical survey. *Philos Trans R Soc London B* **359**: 1207–1224
- LAMP (2007) The Large Array Manipulation Program. [http://wwwold.ill.fr/data\\_treat/lamp/front.html](http://wwwold.ill.fr/data_treat/lamp/front.html) (accessed April 2008)
- Lavalette D, Tetreau C, Tourbez M, Blouquit Y (1999) Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment. *Biophys J* **76**: 2744–2751
- Le Bihan D (2003) Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci* **4**: 469–480
- Le Bihan D (2007) The 'wet mind': water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol* **52**: R57–R90
- Mentré P (2001) An introduction to 'water in the cell': tamed hydra? *Cell Mol Biol* **47**: 709–715
- MODES (1998–2006) A graphic user interface for IRIS data analysis. [http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes\\_manual.pdf](http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes_manual.pdf) (accessed April 2008)
- Pollack GH, Cameron IL, Wheatley DN (2006) *Water and the Cell*. Dordrecht, the Netherlands: Springer
- Record MT, Courtenay ES, Cayley DS, Guttman HJ (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci* **23**: 143–148
- Sears VF (1966) Theory of cold neutron scattering by homonuclear diatomic liquids: II. Hindered rotation. *Can J Phys* **44**: 1299–1311
- Sposito G (1981) Single-particle motions in liquid water. II. The hydrodynamic model. *J Chem Phys* **74**: 6943–6949
- Tehei M, Franzetti B, Madern D, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Giudici-Ortoni MT, Bruschi M, Zaccai G (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared *in vivo* by neutron scattering. *EMBO Rep* **5**: 66–70
- Tehei M et al (2007) Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 766–771
- Teixeira J, Bellissent-Funel MC, Chen SH, Dianoux AJ (1985) Experimental determination of the nature of diffusive motions of water molecules at low temperatures. *Phys Rev A* **31**: 1913–1917
- Tranham EC, Rorschach HE, Clegg JS, Hazlewood CF, Nicklow RM, Wakabayashi N (1984) Diffusive properties of water in *Artemia* cysts as determined from quasi-elastic neutron scattering spectra. *Biophys J* **45**: 927–938

# In Vivo Measurement of Internal and Global Macromolecular Motions in *Escherichia coli*

M. Jasnin,<sup>\*‡</sup> M. Moulin,<sup>†</sup> M. Haertlein,<sup>†</sup> G. Zaccai,<sup>\*‡</sup> and M. Tehei<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Grenoble, France; <sup>†</sup>Institut Laue Langevin, Deuteration Laboratory, Grenoble, France; and <sup>‡</sup>Institut Laue Langevin, Grenoble, France

**ABSTRACT** We present direct quasielastic neutron scattering measurements, in vivo, of macromolecular dynamics in *Escherichia coli*. The experiments were performed on a wide range of timescales to cover the large panel of internal and self-diffusion motions. Three major internal processes were extracted at physiological temperature: a fast picosecond process that corresponded to restricted jump diffusion motions and two slower processes that resulted from reorientational motions occurring in ~40 ps and 90 ps, respectively. The analysis of the fast process revealed that the cellular environment leads to an appreciable increase in internal molecular flexibility and diffusive motion rates compared with those evaluated in fully hydrated powders. The result showed that the amount of cell water plays a decisive role in internal molecular dynamics. Macromolecular interactions and confinement, however, attenuate slightly the lubricating effect of water, as revealed by the decrease of the in vivo parameters compared with those measured in solution. The study demonstrated that standard sample preparations do not mimic accurately the physiological environment and suggested that intracellular complexity participates in functional dynamics necessary for biological activity. Furthermore, the method allowed the extraction of the self-diffusion of *E. coli* macromolecules, which presented similar parameters as those extracted for hemoglobin in red blood cells.

## INTRODUCTION

The study of internal molecular motions on the pico- to nanosecond (ps-ns) timescale reveals fundamental dynamical processes required for biological activity and stability. Ps-ns local motions in macromolecules act as the lubricant of larger conformational changes on a slower, millisecond, timescale (1) that are necessary for important biological processes, including ligand binding, intermolecular recognition, enzyme catalysis, and signal transduction (2–5). Incoherent neutron scattering spectroscopy is a powerful technique for the measurement of atomic motions on the ps-ns time domain. The scattering signal is dominated by hydrogen nuclei, which have a neutron incoherent cross section ~40 times larger than the cross section of any other nucleus or isotope. Hydrogen atoms represent up to about half of the atoms in biological macromolecules and are distributed nearly homogeneously within the structures. Their incoherent scattering signal, therefore, reflects internal molecular motions. Neutron studies have revealed that local molecular motions are influenced by environmental conditions, including hydration level and temperature. The temperature dependence of the global atomic mean-square displacement, which corresponds to internal flexibility, has been studied extensively over recent decades (reviewed by Gabel et al. (6)). At sufficient hydration, it has been found that, below a dynamical transition temperature at

~180–240 K, atomic motions are harmonic predominantly. The atoms are anchored within the structure, stacked in a given energy state, and they vibrate about their equilibrium position. Above the dynamical transition temperature, the mean-square displacement increases significantly because of the contribution of diffusive motions, which may contribute to the sampling of different conformational substates (7). At physiological conditions, the energy barrier separating different free energy states is similar to the thermal energy, and the molecular subgroups can overcome rotational barriers. Many but not all macromolecules become fully active and functional only when these diffusive motions can take place. The study of localized diffusive motions, therefore, is of fundamental relevance to an understanding of the origin of functional internal flexibility in macromolecules.

Quasielastic incoherent neutron scattering (QENS) provides accurate information on local diffusive motions occurring in macromolecules (8). The technique has been used extensively to study internal molecular motions in hydrated protein powders (9–16) as well as in the integral membrane protein bacteriorhodopsin in purple membrane stacks (17–21). These studies have indicated that internal flexibility decreased when the hydration level was lowered. Pérez et al. (16) have compared internal dynamics in dry powder, at several hydration levels, and in solution for myoglobin and lysozyme. They have shown that the surface side chains of the two types of proteins acquired progressively the ability to diffuse locally as the hydration level increased progressively up to complete coverage. Furthermore, both motion amplitudes and internal diffusive motion rates increased significantly in solution compared with fully hydrated powder. The differences in internal dynamics observed between powder

---

Submitted October 24, 2007, and accepted for publication March 7, 2008.

Address reprint requests to G. Zaccai, Institut Laue Langevin, Grenoble, France. E-mail: zaccai@ill.fr.

M. Jasnin's present address is Institut Laue Langevin, Grenoble, France.

M. Tehei's present address is the University of Wollongong, School of Chemistry, Wollongong, Australia.

Editor: Elliot L. Elson.

and solution samples led to another challenging question: what about the internal dynamics in the cell interior? Cell macromolecules move and interact in a crowded intracellular matrix. It has been shown that macromolecular self-diffusion coefficients are reduced in the cell cytoplasm (22–25), although macromolecular associations can be favored (26). Very little is known concerning in vivo internal macromolecular dynamics. In particular, to what extent can internal dynamics be enhanced or reduced under cellular conditions of hydration and crowding, compared with that measured in hydrated powder or in solution? In this study, we addressed this question using QENS, and we present direct measurements of global and internal molecular motions in living *Escherichia coli* at physiological temperature.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample preparation

Native *E. coli* (BLE21 (DE3) strain) were cultivated at 37°C to an optical density value of 2 in Enfors minimum growth medium with glycerol (Cambridge Isotopes, Cambridge, MA) as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at  $5000 \times g$  in a Beckman (Fullerton, CA) centrifuge (JLA 10500 rotor) for 20 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the cells were washed twice with 100 ml of D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-DCl, pH 6.6). The cells were pelleted via 20 min centrifugation and transferred to aluminum sample holders ( $4 \times 3 \times 0.03 \text{ cm}^3$ ). After the experiments, a small amount of the pellet was re-suspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilution steps. The number of colonies was compared with that obtained for cells from the fresh culture and found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after the total beamtime exposure.

### Neutron scattering measurements

The experiments were carried out at room temperature using three spectrometers: the time-of-flight spectrometer IN6 (Institut Laue Langevin (ILL), Grenoble, France; see [www.ill.eu](http://www.ill.eu) for further information), with an energy resolution of 90  $\mu\text{eV}$  (full width at half-maximum, FWHM); the inverted time-of-flight spectrometer IRIS (Rutherford Appleton Laboratory, Chilton, UK; see [www.isis.rl.ac.uk](http://www.isis.rl.ac.uk)), with an energy resolution of 17  $\mu\text{eV}$  (FWHM); and the backscattering spectrometer IN16 (ILL, Grenoble; FWHM = 0.9  $\mu\text{eV}$ ). The scattering was measured over a wave-vector of  $0.5 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.7 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q$  is the wave vector transfer modulus). A vanadium sample (a purely elastic scatterer) was measured to define the instrument resolution and correct for detector efficiency. IRIS, IN6, and IN16 spectra were corrected for detector efficiency, sample container, and buffer scattering, normalized, grouped, and converted to  $S(\mathbf{Q}, \omega)$  data using the MODES and LAMP data-reduction routines (27,28), respectively. The transmissions of the samples were  $>90\%$ , and multiple scattering was neglected.

### Incoherent neutron scattering from living cells

An exhaustive description of QENS can be found in Bée (29). Hydrogen nuclei have an incoherent cross section 40 times larger than that of any other atom and isotope, and they dominate the scattering signal. Because the signal relies on incoherent scattering, the dynamics of hydrogenated molecules can be explored in samples that need not be crystalline or even monodisperse, such as living cells (30). Macromolecules make up  $\sim 96\%$  of the total dry weight of *E. coli*, of which 55% are proteins, 20% are RNA, and 9% are lipids (see Table 1) (31). Internal motions of *E. coli* macromolecules were studied by measuring native (natural abundance of H) *E. coli* resuspended in D<sub>2</sub>O

**TABLE 1** Chemical composition of *E. coli* (from Madigan et al. (31))

Molecules	Percentage of dry weight
Total macromolecules	96
Protein	55
Polysaccharide	5
Lipid	9.1
Lipopolysaccharide	3.4
DNA	3.1
RNA	20.5
Total monomers	3
Amino acids and precursors	0.5
Sugars and precursors	2
Nucleotides and precursors	0.5
Inorganic ions	1
Total	100

buffer. A subtraction of the D<sub>2</sub>O buffer spectra from the spectra measured for the cells gives a valuable approximation of the scattering signal from cell macromolecules. Because proteins are the dominant cellular macromolecules by mass, and the hydrogen percentage is higher in proteins compared with every other type of macromolecule ( $\sim 50\%$  for proteins compared with 30% for RNA and lipids), it is reasonable to assume that protein motions dominate the macromolecular scattering signal from living cells.

### Separation of the diffusive motions using QENS

The diffusive motions of hydrogen atoms in macromolecules explored here belong to the ps-ns time domain and can be detected using the combination of different neutron spectrometers. The energy resolution of the spectrometer defines the upper limit of the accessible times of motions. The IN6 spectrometer, which has a FWHM = 90  $\mu\text{eV}$ , is suitable for the measurement of motions with short characteristic times,  $\tau < 15 \text{ ps}$ . The higher resolution of the IRIS spectrometer, FWHM = 17  $\mu\text{eV}$ , resolves slower motions, with  $\tau < 75 \text{ ps}$ . Very slow motions that occur up to  $\sim 1 \text{ ns}$  can be detected with the very high energy resolution of IN16 (FWHM = 0.9  $\mu\text{eV}$ ). On each spectrometer, the average dynamical behavior of all protons diffusing in the time window is measured. The protons, which move very slowly with respect to the time-scale associated with the spectrometer, are seen as immobile and contribute to the elastic intensity. On the reverse, very fast protons with respect to the energy resolution contribute in a flat background.

### Data analysis

In the quasielastic region of the measured spectra, the calculated scattering function,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , has been described by Bée (29):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \cdot S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega), \quad (1)$$

where DW is a Debye-Waller (DW) factor, which accounts for vibrational modes, and  $S_{\text{diff}}(\mathbf{Q}, \omega)$  is a diffusive contribution. The DW factor is simply a scaling factor in  $\omega$ -space that does not modify the shape of the quasielastic scattering function. In the case of global and internal macromolecular motions in the cell interior,  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  can be written as follows (29):

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \left[ S_{\text{self}}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes \left( A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega) \right) \right]. \quad (2)$$

The quasielastic component arises from the convolution of the self-diffusion scattering function,  $S_{\text{self}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , with the internal (localized) scattering

function,  $A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega)$ , which are supposed to be uncoupled from each other as has been done in previous work on myoglobin in crowded solutions (32). The global and internal scattering functions are both described by Lorentzian functions:

$$L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2} \quad (3)$$

with  $\Gamma_i$  the half width at half-maximum (HWHM) of the Lorentzian peak.

The measured scattering function,  $S_{\text{meas}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , is obtained by convoluting  $S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega)$  with the energy resolution of the spectrometer,  $S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)$ , determined by the vanadium sample:

$$S_{\text{meas}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\hbar\omega/(2k_B T)} [S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)] + B_0 \quad (4)$$

in which  $e^{-\hbar\omega/(2k_B T)}$  is a detailed balance factor and  $B_0$  an inelastic background caused by vibrational modes of lowest energy, also called phonons in crystals (29).

For IRIS spectra, the fits were performed over the energy transfer range  $-0.2$  to  $+0.5$  meV, using the IRIS Bayesian fitting program *QL function* present in the MODES package (27). The IN16 and IN6 spectra were fitted over the energy transfer ranges  $-12$   $\mu\text{eV}$  to  $+12$   $\mu\text{eV}$  and  $-1.5$  meV to  $+1.5$  meV, respectively, using the QENS\_FIT routine present in the LAMP package (28).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Internal motions in living cells by QENS

In biological macromolecules, many different molecular substructure groups experience localized diffusive motions, which occur, in a large part, with correlation times from 0.1 to 200 ps (18). As described in Materials and Methods, the diffusive motions are related to the Lorentzian functions used to fit QENS data (see ‘‘Data analysis’’). The motions are characterized by the Lorentzian HWHM,  $\Gamma_i$ , which are related at high  $Q^2$  values to the inverse of correlation times,  $\tau_{\text{cor},i}$ , and by quasielastic incoherent structure factors,  $A_i$  with  $i > 0$ . A  $Q^2$ -independent linewidth can account for reorientational motions such as jump diffusion motions among a finite number of sites. In contrast, a nonzero extrapolated value of  $\Gamma_i$  at  $Q^2 = 0$ , followed by an increase of the linewidth with  $Q^2$ , reflects diffusive motions within a confined volume. The elastic incoherent structure factor (EISF), which corresponds to the elastic intensity fraction over the total intensity, makes it possible to access the motion geometry as well as the number of mobile and immobile protons in the experimental energy resolution. The  $Q$  dependences of  $\Gamma_i$  and the EISF, therefore, provide information on the nature of the motions.

With the aim of capturing the essence of the complex landscape of internal motions in cell macromolecules, we used a finite number of Lorentzians to parameterize the major types of motions depending on their timescale. The interest was to describe the diffusive motions in a simplified and meaningful way, using only a few phenomenological variables. Each Lorentzian must be understood as an average contribution of the motions that occur in a certain time- and length scales. In the following section, we describe the motions belonging to the ps-to-ns timescale, using the three in-

strumental energy resolutions presented previously. The characteristic length and time parameters of the motions were extracted from the Lorentzian HWHM and EISF as functions of  $Q$ , using both a phenomenological approach and accurate models. The aim of the approach was to determine whether or not internal macromolecular dynamics measured in entire cells was similar to that found in hydrated powder, in membrane, or in solution and to address to what extent the cellular environment influences the diffusive motions in macromolecules.

### Fast internal motions

The internal motions captured on IN6 possess characteristic times of a few picoseconds. On this timescale, the global motions contribute to the scattering function as a very sharp Lorentzian that is much narrower than the instrumental energy resolution. Equation 2 simplifies, therefore, as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW \left[ A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega) \right]. \quad (5)$$

The data were fitted with a single Lorentzian function using Eqs. 4 and 5. The QENS spectra and applied fits are plotted in Fig. 1. Considering the large number of molecular subunits that gives rise to a large variety of motions, the single-Lorentzian analysis is a rough approximation; it gives, however, a good indication of the average motion type. The  $Q^2$ -dependence of the Lorentzian HWHM,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , is plotted in Fig. 2.  $\Gamma_{\text{fast}}$  revealed the existence of diffusive motions within confined space, as indicated by the nonzero intercept,  $\Gamma_{f0}$ , in the low  $Q^2$  region.  $\Gamma_{f0}$  is  $\sim 100$   $\mu\text{eV}$  at 280 K and 300 K. The low  $Q^2$  profile was well accounted for by the model of Volino and Dianoux, which describes diffusion inside the volume of a sphere (33). The model gave access to the confinement sphere radius.  $\Gamma_{f0}$  follows (33):

$$\Gamma_{f0}(0 < Q < Q_0 = \pi/a) = \frac{4.33D_{\text{local}}}{a^2}, \quad (6)$$

where  $D_{\text{local}}$  is the diffusion coefficient inside a spherical volume of radius  $a$ .  $a$  was extracted from the EISF variation with  $Q$ . The model predicts that the experimental EISF follows

$$\text{EISF}(\mathbf{Q}) = p + (1 - p) \left\{ \frac{3[\sin(Qa) - (Qa)\cos(Qa)]}{(Qa)^3} \right\}^2 \quad (7)$$

with  $p$  the fraction of immobile protons, with respect to the instrumental time window. The  $Q$  dependence of the EISF is plotted in Fig. 3. We found  $p = 0.61$  and  $a = 3.11$   $\text{\AA}$  at 280 K;  $p = 0.56$  and  $a = 3.40$   $\text{\AA}$  at 300 K. As revealed by the EISF profile at high  $Q$  values, the values of immobile protons,  $p$ , have large uncertainties. The fit is improved by using a distribution of radii of sphere. The approach with a single

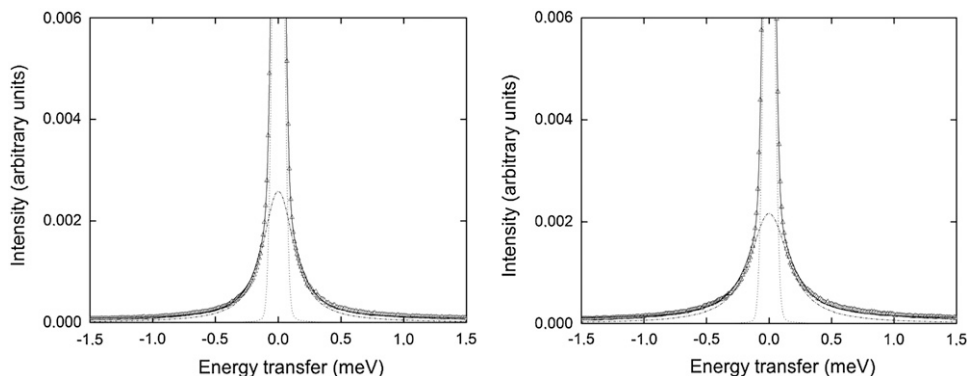


FIGURE 1 IN6 QENS data of native *E. coli* containing  $D_2O$ . QENS spectra at  $Q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$ , at  $T = 280 \text{ K}$  (left) and  $T = 300 \text{ K}$  (right). The fit for each spectrum was performed in the quasielastic region for  $-1.5 \text{ meV} < \hbar\omega < 1.5 \text{ meV}$ . The data are indicated by the triangles; the total fitted curve (bold line) was obtained using Eqs. 4 and 5 with a single Lorentzian function. The elastic peak is represented by a dotted line. The Lorentzian is represented by a dash-dotted line. The highest intensity values (top of the frame) in both figures correspond to  $\sim 1/3$  of the total intensity at  $\hbar\omega = 0$ .

sphere radius was chosen to compare with previous work analyzed in the same way.

At larger  $Q^2$  values, the linewidth follows the well-known jump diffusion behavior (29).  $\Gamma_{\text{fast}}$  increases to approach asymptotically a constant value,  $\Gamma_{\text{fast}} \sim \Gamma_{\text{fast}}^{\infty}$ .  $\Gamma_{\text{fast}}^{\infty}$  is  $\sim 140 \mu\text{eV}$  at 280 K and  $185 \mu\text{eV}$  at 300 K, which correspond to correlation times,  $1/\Gamma_{\text{fast}}^{\infty}$ , of  $\sim 4.7 \text{ ps}$  and  $3.6 \text{ ps}$ , respectively.

Previous studies performed on hydrated powder at full hydration (hydration level  $h \sim 0.4 \text{ g water/g protein}$ ) and in solution have revealed similar  $Q^2$  dependences for the single Lorentzian analysis (15–17,19,21,34,35). The characteristic parameters, however, appeared to be dependent on the sample type. The length scale explored by the motions in cell macromolecules, given by the sphere radius of  $\sim 3.2 \text{ \AA}$ , is longer than that explored in fully hydrated powder (15,16) and in the integral membrane protein bacteriorhodopsin (17,21), which present sphere radii between  $0.8 \text{ \AA}$  and  $1.7 \text{ \AA}$ . In contrast, the volume explored by the atoms in cell macromolecules is similar or smaller than the volume explored by the atoms from proteins in solution, depending on the solution concentration. The sphere radii have been found to be  $2.5$

$\text{\AA}$  for a concentrated solution of  $244 \text{ mg/ml}$  of dihydrofolate reductase at  $285 \text{ K}$  (35);  $4.1 \text{ \AA}$  and  $4.4 \text{ \AA}$  for solutions of  $60 \text{ mg/ml}$  of myoglobin and lysozyme, respectively, at  $293 \text{ K}$  (16); and  $3.6 \text{ \AA}$  for a solution of  $85 \text{ mg/ml}$  of bovine pancreatic trypsin inhibitor at ambient temperature (34). If we exclude the dihydrofolate reductase case, the extrapolated HWHM at  $Q^2 = 0$  is smaller for cell macromolecules compared with the value of  $\sim 150 \mu\text{eV}$  found for proteins in solution and in membrane (16,21) and higher than the value of  $\sim 70 \mu\text{eV}$  extracted for proteins in fully hydrated powder (15,16). We recall that lower HWHM corresponds to longer correlation times and reflects slower motions. Considering both the length and timescales, the average diffusive motions explored in a few picoseconds inside cell macromolecules lie between those found for proteins in hydrated powder and in solution.

### Slow internal motions

By using the  $17 \mu\text{eV}$  energy resolution of the IRIS spectrometer, slower processes belonging to a timescale of a few

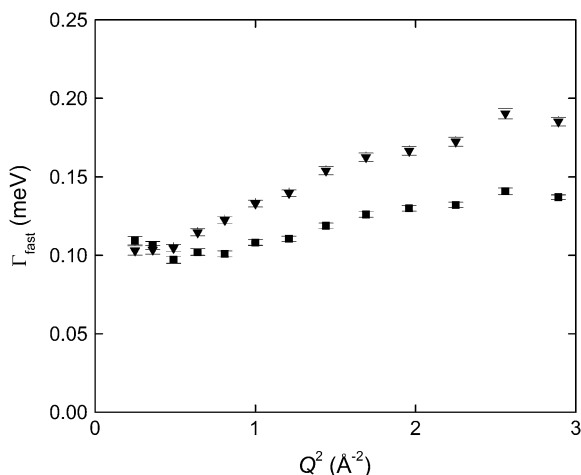


FIGURE 2 IN6 data. HWHM of the single Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , as a function of  $Q^2$  at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

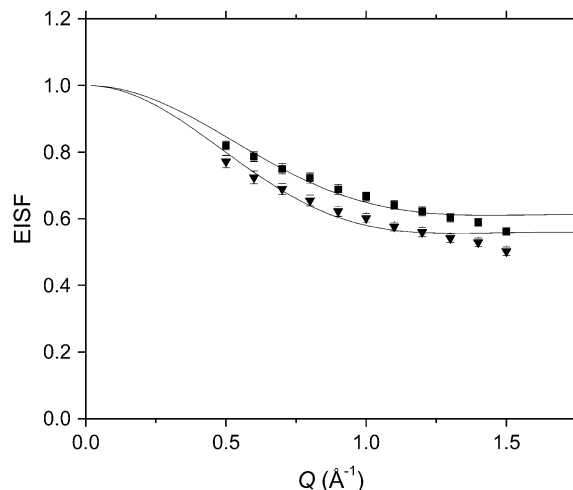


FIGURE 3 IN6 data. EISF as a function of  $Q$ , at 280 K (squares) and 300 K (triangles).



tens of picoseconds were isolated. As for IN6, the global motions do not contribute to the scattering signal on IRIS. The IRIS spectra were fitted with two Lorentzian functions using Eqs. 4 and 5. The HWHM of the broad Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , is plotted in Fig. 4 for the 280 K and 300 K temperatures. It revealed a similar profile to that found for IN6 data fitted with one Lorentzian: at low  $Q^2$ ,  $\Gamma_{\text{fast}}$  is  $\sim 100 \mu\text{eV}$  at the two temperatures;  $\Gamma_{\text{fast}}$  increases at larger  $Q^2$  values up to  $\Gamma_{\text{fast}}$  values of  $140 \mu\text{eV}$  and  $180 \mu\text{eV}$  at 280 K and 300 K, respectively, which correspond to correlation times of  $\sim 4.7$  ps and 3.7 ps, respectively. The broad Lorentzian, therefore, was attributed to the fast internal motions isolated previously on IN6 with the single-Lorentzian approach.

The HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{slow}}$ , plotted in Fig. 5 showed a  $Q^2$ -independent profile, indicating reorientational motions.  $\Gamma_{\text{slow}}$  had a mean value of  $\sim 14 \mu\text{eV}$  at the two temperatures, corresponding to a correlation time of 44 ps. The sharp Lorentzian arises from slower internal motions, compared with the fast processes characterized on IN6. The slow processes can be, for example, stochastic reorientations of large molecular subunits, such as polypeptide side chains, fatty acid chains, or other molecular subunits, as well as rotational motions of smaller groups such as protons in methyl groups. Molecular dynamics simulations on hydrated lysozyme at 295 K have shown that methyl groups presented a wide range of associated correlation times, with a mean value of  $\sim 75$  ps (14). The  $Q$  dependence of the quasielastic incoherent structure factors associated with the slow motions (figure not shown) revealed a profile that suggests a two-site jump diffusion model. It is in good agreement with a previous work on purple membrane (18), in which Fitter et al. have investigated internal molecular motions of bacteriorhodopsin at 297 K, using the same energy resolution on IRIS (18). They have isolated a “slow” proton population, whose motions were described by a two-site jump diffusion model, with associated relaxation times,  $2/\Gamma_{\text{fast}}$ , of 80–100 ps. It

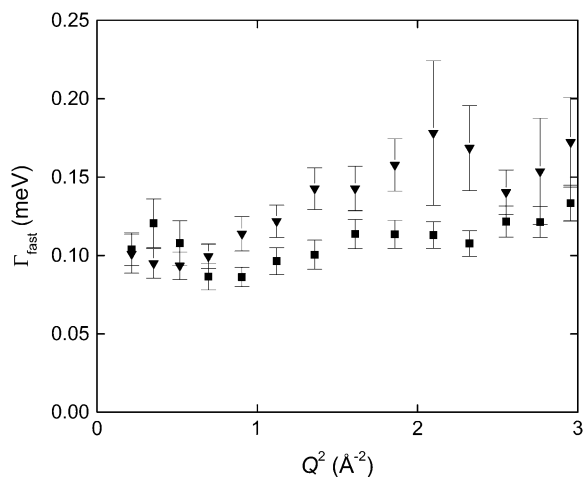


FIGURE 4 IRIS data. HWHM of the broad Lorentzian,  $\Gamma_{\text{fast}}$ , as a function of  $Q^2$  at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

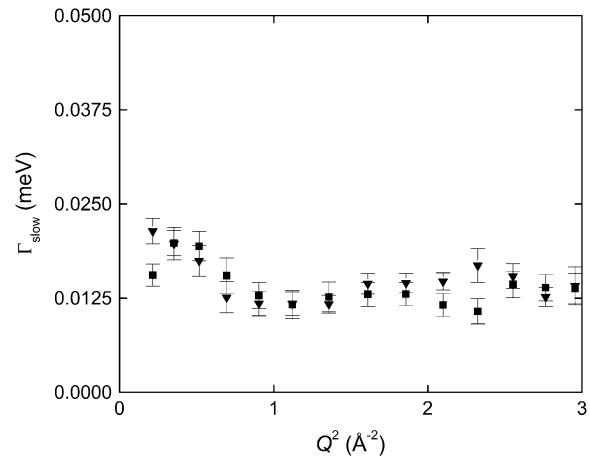


FIGURE 5 IRIS data. HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{slow}}$ , as a function of  $Q^2$ , at 280 K (squares) and 300 K (triangles).

corresponds to correlation times of  $\sim 40$ – $50$  ps, which are similar to the correlation times found for *E. coli*.

### Very slow internal motions and macromolecular self-diffusion

Very slow internal motions were separated from macromolecular self-diffusion using the energy resolution of the IN16 spectrometer (FWHM =  $0.9 \mu\text{eV}$ ), which gives access to characteristic times up to 1 ns. The apparent self-diffusion coefficient,  $D$ , of hemoglobin in red blood cells has been found to be  $\sim 1.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  at 310 K (25). Hemoglobin is the main component of red blood cells, with a molecular mass of 64 kDa and a concentration  $\sim 330 \text{ mg/ml}$ , close to that in the cell cytoplasm (26). Cellular macromolecules present a distribution of molecular masses, going from a few tens to a few thousands of kilodaltons. Considering similar macromolecular concentrations, the apparent self-diffusion coefficient of *E. coli* macromolecules, mainly proteins, is expected to be of the same order as the value found for hemoglobin in red blood cells. The QENS broadening arising from global motions of cellular macromolecules coincides, therefore, with the IN16 energy resolution and has to be taken into account to extract very slow internal motions from the scattering signal. The global and internal motions were each well described by a single Lorentzian, and Eq. 2 described in Materials and Methods simplified as follows:

$$S_{\text{calc}}(\mathbf{Q}, \omega) = DW[A_{\text{self}}(\mathbf{Q})L(\Gamma_{\text{self}}, \omega) + A_{\text{broad}}(\mathbf{Q})L(\Gamma_{\text{very-slow}} + \Gamma_{\text{self}}, \omega)]. \quad (8)$$

The broad Lorentzian arises mainly from the internal contribution,  $\Gamma_{\text{very slow}}$ , and is broadened by the self-diffusion contribution,  $\Gamma_{\text{self}}$ , as described in Eq. 8. The results of the fit obtained using Eq. 8 are shown in Fig. 6.

The HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{self}}$ , is plotted in Fig. 7. The  $\Gamma_{\text{self}}$  profile revealed long-range translational

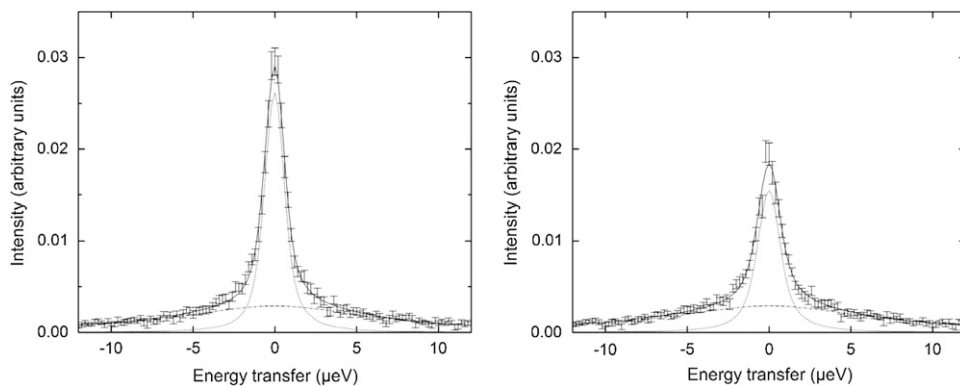


FIGURE 6 IN16 QENS data and applied fits for native *E. coli* containing  $D_2O$ . QENS spectra at  $Q = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$ , at  $T = 284 \text{ K}$  (left) and  $T = 303 \text{ K}$  (right). The fit for each spectrum was performed in the quasielastic region for  $-12 \text{ } \mu\text{eV} < \hbar\omega < 12 \text{ } \mu\text{eV}$ . The data are indicated with the associated error bars. The bold line is the total fitted curve obtained using Eqs. 4 and 8. The broad Lorentzian is shown by a dot-dash line, and the sharp Lorentzian by a dashed line.

motions, as indicated by the increase of the linewidth with  $Q$  and the extrapolation to 0 for  $Q \rightarrow 0$ .  $\Gamma_{\text{self}}$  increased up to  $\sim 0.5 \text{ } \mu\text{eV}$  at 284 K and  $0.75 \text{ } \mu\text{eV}$  at 303 K. The linewidth was well fitted using a jump diffusion model, which describes diffusion between sites with a mean residence time,  $\tau_0$ , at each site (29).  $\Gamma_{\text{self}}$  follows (29):

$$\Gamma_{\text{self}} = \frac{DQ^2}{1 + DQ^2\tau_0}, \quad (9)$$

where  $D$  represents the apparent translational diffusion coefficient. We found  $D = (0.85 \pm 0.15) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 0.97 \pm 0.08 \text{ ns}$  at 284 K, and  $D = (1.06 \pm 0.11) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\tau_0 = 0.59 \pm 0.04 \text{ ns}$  at 303 K. The values are consistent with the value of  $1.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  found for hemoglobin in red blood cells at 310 K (25). The average characteristic distance between two jumps was found to be  $2.2 \text{ \AA}$  at 284 K and  $1.9 \text{ \AA}$  at 303 K, which are reasonable values for macromolecules with an average radius of gyration of a few tens of angstroms. These values are also in good agreement with the value of  $1.0 \text{ \AA}$  found by Busch et al. at 293 K for myoglobin in crowded solutions with a concentration close to the cell cytoplasm (32). We attributed,

therefore, the sharp Lorentzian to the apparent self-diffusion of macromolecules in the *E. coli* interior.

The HWHM of the broad Lorentzian, corrected for the broadening arising from the self-diffusion contribution, was extracted and is plotted in Fig. 8;  $\Gamma_{\text{very slow}}$  revealed a  $Q^2$ -independent profile. The mean HWHM is  $7.0 \text{ } \mu\text{eV}$  at 284 K and  $7.3 \text{ } \mu\text{eV}$  at 303 K, which correspond to correlation times of  $\sim 94 \text{ ps}$  and  $90 \text{ ps}$ , respectively.  $\Gamma_{\text{very slow}}$  arises from very slow internal motions from all protons participating, for example, in librations of buried groups, relative displacements of globular domains, sugar conformational changes, or RNA global bending (36). The correlation times found for *E. coli* macromolecules are close to those found in previous studies on proteins in concentrated solutions (32) or in membrane stacks (20) at similar energy resolutions: using the HFBS spectrometer (FWHM =  $0.8 \text{ } \mu\text{eV}$ ) at NIST (37), Busch et al. found a HWHM =  $10 \text{ } \mu\text{eV}$ , which corresponds to a correlation time of  $65 \text{ ps}$  for myoglobin in concentrated solution with a volume fraction of 0.4 (32); using the IN10 spectrometer (FWHM =  $1.8 \text{ } \mu\text{eV}$ ) at the ILL, Fitter et al. evaluated a mean HWHM =  $5.5 \text{ } \mu\text{eV}$  for bacteriorhodopsin in purple membrane stacks, which corresponds to a correlation time of  $120 \text{ ps}$  (20).

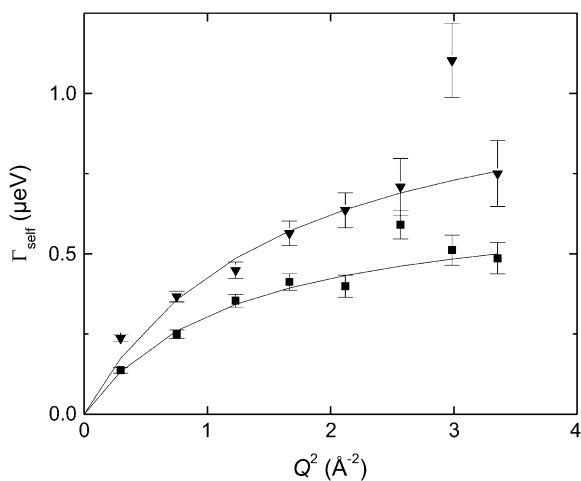


FIGURE 7 IN16 data. HWHM of the sharp Lorentzian,  $\Gamma_{\text{self}}$ , as a function of  $Q^2$  at 284 K (squares) and 303 K (triangles).

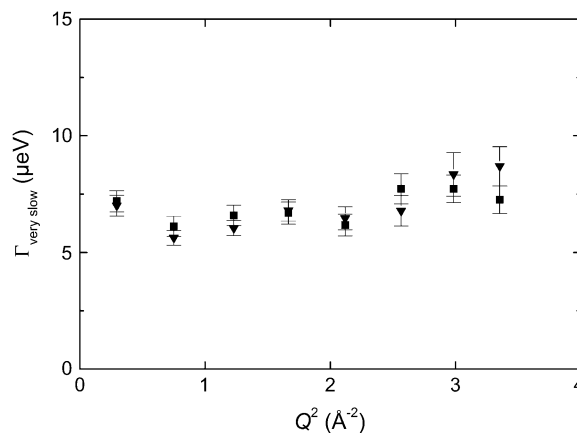


FIGURE 8 IN16 data. HWHM of the broad Lorentzian corrected for the self-diffusion contribution as a function of  $Q^2$ , at 284 K (squares) and 303 K (triangles).

## Influence of the cellular environment on macromolecular dynamics

The QENS study on *E. coli* led to the first dynamical mapping of macromolecular dynamics in vivo, on the full ps-ns timescale accessible through neutron scattering. The large panel of internal macromolecular motions as well as the self-diffusion of cell macromolecules were explored and characterized in vivo.

The analysis of the internal motions permitted the separation between a fast picosecond process and slower (tens of picoseconds) processes. Physiological internal motions were found to be a combination of reorientational and restricted jump diffusion motions. The comparison with previous in vitro studies revealed interesting differences between physiological internal motions and those found in hydrated powders or in solution. Both internal molecular flexibility and diffusion rates occurring in a few picoseconds are increased significantly in the cell interior compared with fully hydrated powders. The result showed that the large amount of cell water plays a decisive role in physiological internal dynamics. The effect of water, which was observed mainly on the picosecond timescale associated with hydrogen bond breaking and formation, suggested that the cell water hydrogen bond network influences the hydrogen bond dynamics in macromolecular structures and contributes to physiological structural flexibility. However, the smaller values found for the parameters measured in vivo compared with those measured in solution suggested that weak forces caused by the vicinity of macromolecules attenuate the lubricating effect of water.

The work on *E. coli* demonstrated that powders and solutions do not accurately picture the physiological dynamical behavior of macromolecules. It underlined the central role of cellular water as well as the slight influence of macromolecular crowding on internal macromolecular dynamics in living cells. The study suggests that the intracellular complexity participates in physiological functional dynamics necessary to biological activity.

We thank the ILL and the ISIS neutron facilities for providing beam time. We acknowledge Dr. M. Koza and Dr. B. Frick (ILL, France) for assistance with the IN6 and IN16 measurements, and Dr. S. Rols (ILL, France) for help with the QENS\_fit routine handling. We thank Dr. M. F. Telling (ISIS, Rutherford Laboratory, UK) for help with the IRIS measurements and the MODES program.

M.J. acknowledges support of a French Science Ministry doctoral fellowship. M.T. acknowledges the ILL, the CNRS, and the IBS (UMR 5075) for financial support of this work. The research was supported by the European Union under the two contracts for the Deuteration Laboratory (ILL, France), HPRI-CT-2001-50035 and RII3-CT-2003-505925, and by the Integrated Infrastructure Initiative for Neutron Scattering and Muon Spectroscopy (NMI3).

## REFERENCES

- Brooks, C. L., M. Karplus, and B. M. Pettitt. 1988. Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Adv. Chem. Phys.* 71:1–249.
- Austin, R. H., K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, and I. C. Gunsalus. 1975. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry.* 14:5355–5373.
- Rousseau, F., and J. Schymkowitz. 2005. A systems biology perspective on protein structural dynamics and signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:23–30.
- Tousignant, A., and J. N. Pelletier. 2004. Protein motions promote catalysis. *Chem. Biol.* 11:1037–1042.
- Jimenez, R., G. Salazar, J. Yin, T. Joo, and F. E. Romesberg. 2004. Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:3803–3808.
- Gabel, F., D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik, and G. Zaccai. 2002. Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q. Rev. Biophys.* 35:327–367.
- Frauenfelder, H., F. Parak, and R. D. Young. 1988. Conformational substates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17:451–479.
- Smith, J. C. 1991. Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q. Rev. Biophys.* 24:227–291.
- Andreani, C., A. Filabozzi, F. Menzinger, A. Desideri, A. Deriu, and D. Di Cola. 1995. Dynamics of hydrogen atoms in superoxide dismutase by quasielastic neutron scattering. *Biophys. J.* 68:2519–2523.
- Dellerue, S., A. J. Petrescu, J. C. Smith, and M. C. Bellissent-Funel. 2001. Radially softening diffusive motions in a globular protein. *Biophys. J.* 81:1666–1676.
- Doster, W., S. Cusack, and W. Petry. 1989. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature.* 337:754–756.
- Fitter, J. 1999. The temperature dependence of internal molecular motions in hydrated and dry  $\alpha$ -amylase: The role of hydration water in the dynamical transition of proteins. *Biophys. J.* 76:1034–1042.
- Paciaroni, A., A. Orecchini, S. Cinelli, G. Onori, R. E. Lechner, and J. Pieper. 2003. Protein dynamics on the picosecond timescale as affected by the environment: a quasielastic neutron scattering study. *Chem. Phys.* 292:397–404.
- Roh, J. H., J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, and A. P. Sokolov. 2006. Influence of hydration on the dynamics of lysozyme. *Biophys. J.* 91:2573–2588.
- Zanotti, J. M., M. C. Bellissent-Funel, and J. Parello. 1997. Dynamics of a globular protein as studied by neutron scattering and solid-state NMR. *Physica B (Amsterdam).* 234:228–230.
- Pérez, J., J. M. Zanotti, and D. Durand. 1999. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys. J.* 77:454–469.
- Fitter, J., O. P. Ernst, T. Hauß, R. E. Lechner, K. P. Hofmann, and N. A. Dencher. 1998. Molecular motions and hydration of purple membranes and disk membranes studied by neutron scattering. *Eur. Biophys. J.* 27:638–645.
- Fitter, J., R. E. Lechner, G. Büldt, and N. A. Dencher. 1996. Internal molecular motions of bacteriorhodopsin: hydration-induced flexibility studied by quasielastic incoherent neutron scattering using oriented purple membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:7600–7605.
- Fitter, J., R. E. Lechner, G. Büldt, and N. A. Dencher. 1996. Temperature dependence of molecular motions in the membrane protein bacteriorhodopsin from QINS. *Physica B (Amsterdam).* 226:61–65.
- Fitter, J., R. E. Lechner, and N. A. Dencher. 1997. Picosecond molecular motions in bacteriorhodopsin from neutron scattering. *Biophys. J.* 73:2126–2137.
- Fitter, J., R. E. Lechner, and N. A. Dencher. 1999. Interactions of hydration water and biological membranes studied by neutron scattering. *J. Phys. Chem. B.* 103:8036–8050.
- Ellis, R. J. 2001. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:114–119.
- Elowitz, M. B., M. G. Surette, P. E. Wolf, J. B. Stock, and S. Leibler. 1999. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:197–203.
- Luby-Phelps, K. 2000. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192:189–221.

25. Doster, W., and S. Longeville. 2007. Microscopic diffusion and hydrodynamic interactions of hemoglobin in red blood cells. *Biophys. J.* 93:1360–1368.
26. Ellis, R. J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 26:597–604.
27. MODES. A graphic user interface for IRIS data analysis. <http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/iris/>.
28. LAMP. The Large Array Manipulation Program. [http://wwwold.ill.fr/data\\_treat/lamp/front.html](http://wwwold.ill.fr/data_treat/lamp/front.html).
29. Bée, M. 1988. Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science. Adam Hilger, Philadelphia.
30. Tehei, M., B. Franzetti, D. Madern, M. Ginzburg, B. Z. Ginzburg, M. T. Giudici-Ortoni, M. Bruschi, and G. Zaccai. 2004. Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared *in vivo* by neutron scattering. *EMBO Rep.* 5:66–70.
31. Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2000. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Engelwood Cliffs, NJ.
32. Busch, S., W. Doster, S. Longeville, and V. G. Sakai. 2007. Microscopic protein diffusion at high concentration. MRS Bulletin. Quasielastic Neutron Scattering Conference 2006, p.117–116.
33. Volino, F., and A. J. Dianoux. 1980. Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry: general formalism and application to diffusion inside a sphere. *Mol. Phys.* 41:271–279.
34. Appavou, M. S., G. Gibrat, and M. C. Bellissent-Funel. 2006. Influence of pressure on structure and dynamics of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): small angle and quasi-elastic neutron scattering studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764:414–423.
35. Tehei, M., J. C. Smith, C. Monk, J. Ollivier, M. Oettl, V. Kurkal, J. L. Finney, and R. M. Daniel. 2006. Dynamics of immobilized and native *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by quasielastic neutron scattering. *Biophys. J.* 90:1090–1097.
36. Mc Cammon, J. A., and S. C. Harvey. 1987. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge University Press, New York.
37. Meyer, A., R. M. Dimeo, P. M. Gehring, and D. A. Neumann. 2003. The high-flux backscattering spectrometer at the NIST Center for Neutron Research. *Rev. Sci. Instrum.* 74:2759–2777.

## Solvent isotope effect on macromolecular dynamics in *E. coli*

Marion Jasnin · Moeava Tehei · Martine Moulin ·  
Michael Haertlein · Giuseppe Zaccai

Received: 14 September 2007 / Revised: 20 December 2007 / Accepted: 30 January 2008 / Published online: 20 February 2008  
© EBSA 2008

**Abstract** Elastic incoherent neutron scattering was used to explore solvent isotope effects on average macromolecular dynamics in vivo. Measurements were performed on living *E. coli* bacteria containing H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O, respectively, close to physiological conditions of temperature. Global macromolecular flexibility, expressed as mean square fluctuation (MSF) values, and structural resilience in a free energy potential, expressed as a mean effective force constant,  $\langle k' \rangle$ , were extracted in the two solvent conditions. They referred to the average contribution of all macromolecules inside the cell, mostly dominated by the internal motions of the protein fraction. Flexibility and resilience were both found to be smaller in D<sub>2</sub>O than in H<sub>2</sub>O. A difference was expected because the driving forces behind macromolecular stabilization and dynamics are different in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. In D<sub>2</sub>O, the hydrophobic effect is known to be stronger than in H<sub>2</sub>O: it favours the burial of non-polar surfaces as well as their van der Waals' packing in the macromolecule cores. This may

lead to the observed smaller MSF values. In contrast, in H<sub>2</sub>O, macromolecules would present more water-exposed surfaces, which would give rise to larger MSF values, in particular at the macromolecular surface. The smaller  $\langle k' \rangle$  value suggested a larger entropy content in the D<sub>2</sub>O case due to increased sampling of macromolecular conformational substates.

**Keywords** Neutron scattering · In vivo macromolecular dynamics · H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O isotope effect · Global macromolecular flexibility · Structural resilience · Hydrophobic effect

### Introduction

Water is the solvent of biological systems, without which macromolecules cannot fold and function correctly. Heavy water (D<sub>2</sub>O) is often used in biophysical studies to replace H<sub>2</sub>O to prevent signal contamination by water H nuclei (NMR and neutron scattering) or to study exchange or other isotope effects (mass spectrometry, FTIR etc.). The solvent environment plays a fundamental role in macromolecular stability, through hydration, hydrogen bonds, van der Waals interactions, ion binding and the hydrophobic effect. These weak interactions govern structure formation and atomic fluctuations, which occur in the pico-nanosecond (ps–ns) time-scale and act as the lubricant of slower, millisecond, conformational changes necessary for biological activity (Brooks et al. 1988). The achievement of a good understanding of macromolecular stability is therefore intimately correlated to the understanding of dynamics. Elastic incoherent neutron scattering (EINS) spectroscopy is a technique uniquely suited for the measurement of atomic fluctuations in the ps–ns time-scale, on

---

Advanced neutron scattering and complementary techniques to study biological systems. Contributions from the meetings, “Neutrons in Biology”, STFC Rutherford Appleton Laboratory, Didcot, UK, 11–13 July and “Proteins at Work 2007”, Perugia, Italy, 28–30 May 2007.

---

M. Jasnin (✉)  
Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF,  
41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France  
e-mail: jasnin@ill.fr

M. Tehei · G. Zaccai  
Institut Laue Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP 156,  
38042 Grenoble Cedex 9, France

M. Moulin · M. Haertlein  
Deuteration Laboratory, Institut Laue Langevin,  
6 rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France

samples that need not be crystalline or even monodisperse. The atomic fluctuations in proteins have been explored successfully in hydrated powders and in solutions using EINS (Doster et al. 1989; Ferrand et al. 1993; Gabel et al. 2004; Paciaroni et al. 2002; Tehei et al. 2001, 2005, 2006; Tehei and Zaccai 2007). Tehei et al. 2004 have performed EINS measurements on bacterial cells adapted to extreme temperatures, and explored global macromolecular dynamics. Their results led to the hypothesis that evolution had selected the forces required for macromolecular stability and activity at physiological temperatures. The present study addressed solvent isotope effects on macromolecular dynamics in vivo, by direct incoherent neutron scattering measurements on living *E. coli*.

H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O molecules are close in properties, with respect to their shape, size, bond lengths and dipole moment. They differ, however, in their vibrational frequencies due to their differences of mass and moments of inertia (Conway 1981; Némethy and Scheraga 1964). As a result, the deuterium bond is 0.24 kcal mol<sup>-1</sup> of higher energy than the hydrogen bond, which leads to stronger D<sub>2</sub>O–D<sub>2</sub>O deuterium bond interactions, as well as stronger hydration-bond interactions in D<sub>2</sub>O. The hydrophobic effect is enhanced in D<sub>2</sub>O, which results from the stronger association between D<sub>2</sub>O molecules (Parker and Clarke 1997) and leads to a lower solubility of apolar groups. The hydrophobic effect has long been regarded as one of the major driving forces behind macromolecular folding and stabilisation (Baldwin 2007). While an entropic contribution brings together apolar groups in the macromolecule core to minimize water-exposed surfaces, van der Waals' packing of apolar groups in the core leads also to an enhanced enthalpic contribution. The differences in properties between H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O are, therefore, expected to influence macromolecular stabilisation and dynamics. In vitro studies have reported various results on the stabilizing influence of D<sub>2</sub>O on proteins (Bonneté et al. 1994; Chakrabarti et al. 1999; Efimova et al. 2007; Kuhlman et al. 1998; Maybury and Katz 1956; Parker and Clarke 1997; Tehei et al. 2001); in few cases, stability can be unchanged or lower (Kern et al. 1980; Makhatazde et al. 1995). Sasisanker et al. have shown that proteins adopt a more compact form in D<sub>2</sub>O (Sasisanker et al. 2004). In contrast to the wealth of data on protein stability, the role of solvent isotope substitution on protein dynamics has not been thoroughly examined. The few studies carried out to date in solution or in hydrated powder samples, have reported that dynamics-stability relationships were complex. Heavy water can increase protein rigidity (Cioni and Strambini 2002; Tehei et al. 2001) as well as reduce it (Tehei et al. 2001). Tehei et al. have revealed that higher stability was not necessarily associated to higher resilience (Tehei et al. 2001). Furthermore, although a few in vitro studies have

been reported (Cioni and Strambini 2002; Gabel et al. 2004; Tehei et al. 2001), the isotope effect on dynamics remains unexplored in the cellular environment. In the present work, we measured macromolecular flexibility and resilience in living *E. coli* containing H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O, to explore the isotope effect on the average macromolecular behaviour in the cell interior.

## Experimental

### Sample preparation

*E. coli* (BLE21 (DE3) strain) were cultivated at 37°C to an optical density of two, in Enfors minimum growth medium with glycerol as the carbon source. Cells were pelleted by centrifugation at 5,000 rpm in a Beckman centrifuge (JLA10500 rotor) for 20 min at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with 100 ml of H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O buffer solution (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris–H(D)Cl pH 6.6). The cells were pelleted via 20 min centrifugation and transferred to aluminium sample holders (4 × 3 × 0.03 cm<sup>3</sup>) for the neutron measurements. After the experiments, a small amount of the pellet was resuspended in the buffer and layered on Petri dishes after several dilutions steps. The number of colonies was compared to that obtained for cells from the fresh culture, and found to be similar, which indicated that most of the cells remained intact and viable after the total beamtime exposure.

### Neutron measurements and data analysis

#### *Elastic incoherent neutron scattering*

Hydrogen nuclei have an incoherent cross section about 40 times larger than that of any other nucleus or isotope, and dominate the neutron scattering signal. The dynamics of hydrogenated components can, therefore, be explored in complex macromolecular systems such as living cells (Tehei et al. 2004). Hydrogen atoms represent about 30–50% of the atoms present in macromolecules, and are uniformly distributed in the structure. On the appropriate length and time domains, hydrogen fluctuations reflect the motions of the side chain and backbone atoms to which they are bound (Smith 1991). The length and time windows of the accessible motions are determined by the wave vector transfer modulus  $Q$  range and the energy resolution of the spectrometer, respectively. At a given temperature, the analysis of the elastic incoherent scattering signal yields a value of the mean square fluctuation amplitude (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ . The motions that are too fast or too slow as

compared to the accessible time domain do not contribute to the scattering signal. As pure solvent diffuses in a time-scale two orders of magnitude shorter than macromolecular thermal motions, the measurements can be performed in H<sub>2</sub>O in an appropriate length-time window, without contamination by water scattering (Tehei et al. 2006). Macromolecules make up ca. 96% of the total dry weight of *E. coli*, of which about 55% are proteins. Considering that the hydrogen percentage is higher in proteins compared to every other type of macromolecules, it is reasonable to assume, therefore, that protein thermal motions dominate macromolecular scattering signal at 75–80%.

### Neutron scattering experiments and analysis

The neutron experiments were carried out on the back-scattering spectrometer IN13, Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble; see <http://www.ill.fr> for further information). The full-width at half-maximum (FWHM) energy resolution defines the upper limit of the associated time-scale of motions. IN13 has a FWHM = 8 μeV and is sensitive to motions that occur in a time-scale up to about 0.1 ns. The elastic incoherent neutron scattering signal was measured and analysed over  $1.27 \text{ \AA}^{-1} < Q < 1.87 \text{ \AA}^{-1}$  ( $Q = 4\pi \sin \theta/\lambda$  for elastic scattering, where  $2\theta$  is the scattering angle and  $\lambda$  is the incident neutron wavelength). The elastic intensities were corrected for sample holder and buffer scattering, normalised to a vanadium sample (a purely elastic scatterer) and corrected for sample absorption by using the IN13 data reduction program ELASCAN (information on the program is available on the ILL web site at <http://www.ill.fr>). For each sample, the elastic intensity  $I(Q, \theta \pm \Delta\omega)$  was obtained as a function of temperature,  $T$ , rising from 279 to 315 K, and  $\ln I(Q, \theta \pm \Delta\omega)$  was plotted against  $Q^2$ . The mean square fluctuation amplitude (MSF),  $\langle u^2 \rangle$ , was calculated from the slope of the straight-line fit to the experimental data according to the Gaussian approximation (Zaccai 2000):

$$I(Q, 0 \pm \Delta\omega) = \text{constant} \times \exp(-1/6\langle u^2 \rangle Q^2) \quad (1)$$

and linearised as:

$$\ln I(Q, 0 \pm \Delta\omega) = \text{constant} - 1/6\langle u^2 \rangle Q^2 \quad (2)$$

The approximation is valid for localized motions of any shape, provided  $\langle u^2 \rangle Q^2$  is smaller or equal to 2. The validity range can be extended, however, to significantly higher  $\langle u^2 \rangle Q^2$  values in the case of certain asymmetric motions such as ellipsoidal motions with axial ratios 1:1: $a$ , with  $0.6 < a < 1.7$ , which could be reasonable approximations for H displacements in protein internal motions within the IN13 length-time window. The value

of the root MSF quantifies the global flexibility. It contains contributions from both diffusive and vibrational motions, whose amplitudes remain within the length-time window defined by the instrumental  $Q$  range and energy resolution (Gabel 2005). Because of the time-scale resolution of the IN13 spectrometer, the macromolecular global diffusion within the living cells contribution to the MSF values is expected to be small compared to the internal motions contribution (Gabel 2005; Tehei et al. 2001). Furthermore, the H<sub>2</sub>O solvent contamination to the scattering signal is restricted to  $Q$  values lower than  $1 \text{ \AA}^{-1}$  (Tehei et al. 2006). The mean resilience,  $\langle k' \rangle$ , which corresponds to a mean effective force constant and defines the average resilience in a free energy potential (Bicout and Zaccai 2001; Zaccai 2000), was extracted from the slope of  $\langle u^2 \rangle$  as a function of  $T$ , using the following relation:

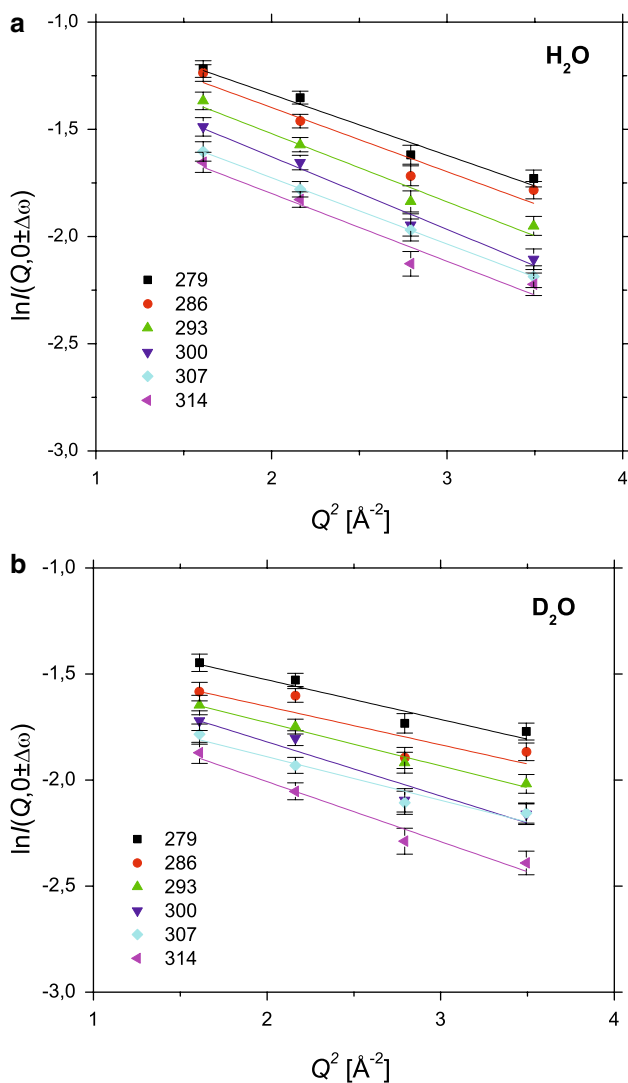
$$\langle k' \rangle = \frac{0.00276}{d\langle u^2 \rangle/dT} \quad (3)$$

### Results and discussion

The fits from which the MSF values were extracted are shown in Fig. 1. The MSF are plotted as a function of temperature in Fig. 2, for cells in H<sub>2</sub>O (triangles) and in D<sub>2</sub>O (squares). MSF from cells in H<sub>2</sub>O are above those from cells in D<sub>2</sub>O, with mean values of about 2 and 1.5 Å<sup>2</sup>, respectively. Note that macromolecules have larger amplitude motions in H<sub>2</sub>O than in D<sub>2</sub>O.

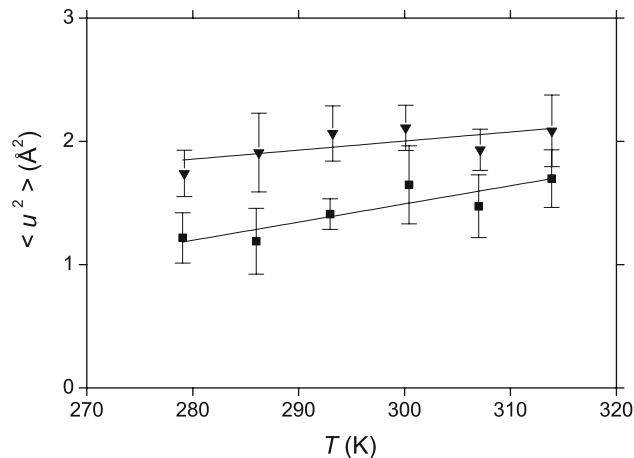
The mean resilience values were extracted from linear fits performed on the MSF data, using Eq. 3. A smaller slope corresponds to a larger resilience and vice versa. The mean resilience defines the average macromolecular resilience for all macromolecules inside the cell, mostly dominated by the protein fraction. Resilience is 0.38 N·m<sup>-1</sup> for cells in H<sub>2</sub>O, compared to 0.19 N·m<sup>-1</sup> for cells in D<sub>2</sub>O. The value in H<sub>2</sub>O is in good agreement with the previous value found by Tehei and collaborators for *E. coli* (MRE600 strain) in H<sub>2</sub>O, 0.42 N·m<sup>-1</sup> (Tehei et al. 2004). The result established that *E. coli* macromolecules have more resilient structures in H<sub>2</sub>O than in D<sub>2</sub>O; they are “softer” in D<sub>2</sub>O.

The lower mean resilience value found for *E. coli* macromolecules in D<sub>2</sub>O is consistent with a previous in vitro study, in which the flexibility of mesophilic and halophilic proteins have been compared (Tehei et al. 2001). The mesophilic bovine serum albumin protein, BSA, was found to be six times less resilient in D<sub>2</sub>O than in H<sub>2</sub>O; the lower resilience in D<sub>2</sub>O was coupled to higher stability through entropic effects arising from increased sampling of conformational substates in D<sub>2</sub>O. In contrast, the halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*, was more resilient and more stable in D<sub>2</sub>O. Tehei et al. have



**Fig. 1** Scattered normalized intensities plotted as  $\ln I(Q, \theta \pm \Delta\omega)$  as a function of  $Q^2$  from cells in  $\text{H}_2\text{O}$  (a) and  $\text{D}_2\text{O}$  (b). Linear fits were performed over the ranges  $1.6 \text{ \AA}^{-2} < Q^2 < 3.5 \text{ \AA}^{-2}$  using Eq. 2

proposed that, in the case of the halophilic malate dehydrogenase, stabilization in  $\text{D}_2\text{O}$  is dominated by the strong hydration bonds (Tehei et al. 2001). Their prediction was in good agreement with the large proportion of acidic residues present at the protein surface, and their known interactions with solvent ions and water. In *E. coli*, considering that both motion amplitudes and resilience are smaller in  $\text{D}_2\text{O}$  (Fig. 2), we suggested that the effect in  $\text{D}_2\text{O}$  could arise from the dominance of the hydrophobic effect, resulting in the burial of non-polar surface groups as well as more compact van der Waals' packing in the protein core. In contrast, in  $\text{H}_2\text{O}$ , stronger resilience associated to larger fluctuation amplitudes, suggested a bigger role of hydration bond interaction in dynamics. Because hydrophobic effect is lower than in  $\text{D}_2\text{O}$ , macromolecules in  $\text{H}_2\text{O}$  have the freedom to expose more surfaces to the solvent.



**Fig. 2** MSF as a function of temperature, from cells in  $\text{H}_2\text{O}$  (triangles) and cells in  $\text{D}_2\text{O}$  (squares). Linear fits (bold lines) were performed between the temperature range 279–314 K using Eq. 3

Considering that surface amino acids do not pack very tightly (Gerstein and Chothia 1996) and that fluctuations are larger at the macromolecule surface than in the core (Pérez et al. 1999), an increase in water exposed surface in  $\text{H}_2\text{O}$  is in good agreement with the higher amplitudes found in  $\text{H}_2\text{O}$ . It should be mentioned, however, that the increased flexibility measured in the  $\text{H}_2\text{O}$  case can arise partly from the contribution of exchangeable hydrogens exposed to the solvent, which present fluctuation amplitudes accessible on the IN13 time and length domains. In  $\text{D}_2\text{O}$ , such hydrogens have been exchanged with deuterium atoms and do not contribute to the MSF values. We should discuss, furthermore, an eventual viscosity effect when the solvent is changed from  $\text{H}_2\text{O}$  to  $\text{D}_2\text{O}$ . In dilute solution, the viscosity is a factor about 1.25 higher in  $\text{D}_2\text{O}$ , which remains constant in the temperature range of the measurements. Such a viscosity difference would affect both internal and self-diffusion macromolecular dynamics contributions to the MSF values in dilute solution (Gabel 2005). Applying the ratio to the data in Fig. 2, would not influence the slopes and resilience values; in contrast, it would bring the MSF values for the two solvent conditions closer together. The *E. coli* cytoplasm, however, is a complex environment very far from a dilute aqueous solution; it is expected to have an internal viscosity that is strongly influenced by a high concentration of macromolecules as well as smaller organic solutes (Ellis 2001). We cannot exclude that there still exists a small viscosity change between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ , which may influence MSF values slightly, as was discussed for concentrated solutions of malate dehydrogenase in high salt (Tehei et al. 2001). However, as explained above, the important point is that it would not change the difference in resilience observed between the  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$  conditions.



**Acknowledgments** We thank the CRG-IN13 and the ILL for support and for providing the neutron facilities used for this work. M.J. acknowledges support of a French Science Ministry doctoral fellowship. The research was supported by the European Union, under the two contracts for the Deuteration Laboratory (ILL, France), HPRI-CT-2001-50035 and RII3-CT-2003-505925, and by the integrated infrastructure initiative for neutron scattering and muon spectroscopy (NMI3).

## References

- Baldwin RL (2007) Energetics of protein folding. *J Mol Biol* 371:283–301
- Bicout DJ, Zaccai G (2001) Protein flexibility from the dynamical transition: a force constant analysis. *Biophys J* 80:1115–1123
- Bonneté F, Madern D, Zaccai G (1994) Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase “adapt” to solvent conditions. *J Mol Biol* 244:436–447
- Brooks CL, Karplus M, Pettitt BM (1988) Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Adv Chem Phys* 71:1–249
- Chakrabarti G, Kim S, Gupta ML Jr., Barton JS, Himes RH (1999) Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry* 38:3067–3072
- Cioni P, Strambini GB (2002) Effect of heavy water on protein flexibility. *Biophys J* 82:3246–3253
- Conway BE (1981) Ionic hydration in chemistry and biophysics. In: *Studies in physical and theoretical chemistry*, vol 12. Amsterdam
- Doster W, Cusack S, Petry W (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature* 337:754–756
- Efimova YM, Haemers S, Wierczinski B, Norde W, van Well AA (2007) Stability of globular proteins in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *Biopolymers* 85:264–273
- Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26:597–604
- Ferrand M, Dianoux AJ, Petry W, Zaccai G (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9668–9672
- Gabel F (2005) Protein dynamics in solution and powder measured by incoherent elastic neutron scattering: the influence of *Q*-range and energy resolution. *Eur Biophys J* 34:1–12
- Gabel F, Weik M, Doctor BP, Saxena A, Fournier D, Brochier L, Renault F, Masson P, Silman I, Zaccai G (2004) The influence of solvent composition on global dynamics of human butyrylcholinesterase powders: a neutron-scattering study. *Biophys J* 86:3152–3165
- Gerstein M, Chothia C (1996) Packing at the protein-water interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10167–10172
- Kern D, Zaccai G, Giege R (1980) Effect of heavy water substitution for water on the tRNA<sup>Val</sup>-valyl-tRNA synthetase system from yeast. *Biochemistry* 19:3158–3164
- Kuhlman B, Luisi DL, Evans PA, Raleigh DP (1998) Global analysis of the effects of temperature and denaturant on the folding and unfolding kinetics of the *N*-terminal domain of the protein L9. *J Mol Biol* 284:1661–1670
- Makhatadze GI, Clore GM, Gronenborn AM (1995) Solvent isotope effect and protein stability. *Nat Struct Biol* 2:852–855
- Maybury RH, Katz JJ (1956) Protein denaturation in heavy water. *Nature* 177:629–630
- Némethy G, Scheraga HA (1964) Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. IV. The thermodynamic properties of liquid deuterium oxide. *J Chem Phys* 41:680–689
- Paciaroni A, Cinelli S, Onori G (2002) Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study. *Biophys J* 83:1157–1164
- Parker MJ, Clarke AR (1997) Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochemistry* 36:5786–5794
- Pérez J, Zanutti JM, Durand D (1999) Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys J* 77:454–469
- Sasisanker P, Oleinikova A, Weingärtner H, Ravindra R, Winter R (2004) Solvation properties and stability of ribonuclease A in normal and deuterated water studied by dielectric relaxation and differential scanning/pressure perturbation calorimetry. *Phys Chem Chem Phys* 6:1899–1905
- Smith JC (1991) Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q Rev Biophys* 24:227–291
- Tehei M, Madern D, Pfister C, Zaccai G (2001) Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14356–14361
- Tehei M, Franzetti B, Madern D, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Giudici-Ortoni MT, Bruschi M, Zaccai G (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared in vivo by neutron scattering. *EMBO Rep* 5:66–70
- Tehei M, Madern D, Franzetti B, Zaccai G (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J Biol Chem* 280:40974–40979
- Tehei M, Daniel R, Zaccai G (2006) Fundamental and biotechnological applications of neutron scattering measurements for macromolecular dynamics. *Eur Biophys J* 35:551–558
- Tehei M, Zaccai G (2007) Adaptation to high temperatures through macromolecular dynamics by neutron scattering. *FEBS J* 274:4034–4043
- Zaccai G (2000) How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science* 288:1604–1607



## 9 ANNEXE 2: MILIEU DE CULTURE ENFORS HYDROGENE ET DEUTERIE

Les bactéries *E. coli* cultivées au DLAB proviennent de la souche BL21 (DE3), couramment utilisée pour l'expression de protéines recombinantes. Les bactéries utilisées pour les expériences de diffusion de neutrons contenaient le plasmide pet 28a permettant d'exprimer la myoglobine de cachalot avec une queue poly-histidine (His-Tag), ainsi qu'un gène de résistance à la kanamycine. Ces bactéries sont cultivées dans du milieu minimum Enfors et peuvent être adaptées au deutérium. L'adaptation consiste à resuspendre un petit volume de cellules natives dans du milieu partiellement deutérié, dont on augmente le pourcentage de D<sub>2</sub>O à mesure des passages. Plusieurs passages dans un milieu 100 % deutérié permettent de sélectionner une culture cellulaire adaptée au deutérium, qui pousse dans des conditions normales de croissance.

### Milieu de culture minimum Enfors

Pour 1 litre de culture:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.86 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6.48 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -H-citrate	0.49 g
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
Solution minérale 1M	1 ml
Glycérol	5 g (7.8 ml)
+ Kanamycine 10 mM	3 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

Le milieu de culture est stérilisé par filtration à travers une membrane de 0.2 µm (Millipore). Le pH obtenu après ajout des différents composants est d'environ 6.8, optimum pour la

croissance des cellules *E. coli*. L'antibiotique (la kanamycine) est ajouté lors de l'innoculation des cultures et permet de sélectionner les bactéries qui contiennent le plasmide.

### **Solution minérale**

Pour 1 litre de solution:

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	16.7 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.18 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.16 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.15 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.18 g
EDTA	20.1 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

### **Milieu de culture deutérié**

Pour préparer 1L de milieu deutérié, les quatre composés solides, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O et (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-H-citrate, sont dissous dans environ 100 ml de D<sub>2</sub>O déionisé. La solution est ensuite évaporée par évaporation rapide au rotovapor. La pâte obtenue est rediluée dans 50 ml de D<sub>2</sub>O. L'opération est répétée trois fois afin de remplacer tous les hydrogènes labiles (OH, NH, NH<sub>2</sub>) présents dans les composés par des deutériums. Le milieu est finalement complété jusqu'à environ 900 ml de D<sub>2</sub>O, auxquels sont ajoutés 1 ml de solution deutériée de MgSO<sub>4</sub> 1M, 1 ml de solution minérale deutériée et 5 g de glycérol deutérié. Finalement, le milieu est filtré à travers une membrane 0.2 µm (Millipore).

### **Tampon de lavage des cellules *E.coli***

Pour 1 litre de tampon :

NaCl	8.77 g
KCl	0.37 g
Tris 1M pH 6.6	10 ml

Les tampons de lavage sont préparés soit avec du H<sub>2</sub>O soit avec du D<sub>2</sub>O déionisé, en fonction des conditions expérimentales requises.

## 10 ANNEXE 3: PROTOCOLE D'HYDROGENATION DE L'ARN DANS DES CELLULES *E. COLI* DEUTERIEES

### Solutions stocks de 100 mM H-nucléosides

Cytidine	24.3 mg/ml
Uridine	24.4 mg/ml
Adénosine	26.7 mg/ml
Guanosine	28.3 mg/ml

Les nucléosides en poudre sont dissous dans du milieu Enfors deutérié. L'adénosine et la guanosine sont difficiles à solubiliser à 100 mM ; ils sont préparés ml par ml dans des endorfs de 1.5 ml puis chauffés à 100°C jusqu'à dissolution de la solution et immédiatement ajouté au milieu de culture.

### Culture de cellules *E. coli* deutériées avec ARN sélectivement hydrogénés

Pour 500 ml de culture:

Milieu deutérié	432.5 ml
Kanamycine 10 mM (en D <sub>2</sub> O)	1.5 ml
H-Cytidine 100 mM	4 ml
H-Uridine 100 mM	4 ml
H-Adénosine 100 mM	4 ml
H-Guanosine 100 mM	4 ml
<i>E. coli</i> deutériées OD $\approx$ 3	50 ml

Les constituants sont ajoutés successivement, dans l'ordre ci-dessus. La culture est lancée avec une densité optique à 600 nm (OD<sub>600</sub>) comprise entre 0.3 et 0.4. Si l'OD<sub>600</sub> de départ est plus basse, les cultures ne parviennent pas à pousser ou poussent avec une courbe de croissance perturbée (plateaux et faible OD<sub>600</sub> finale). Les cellules furent cultivées à 37°C et 150 rpm, jusqu'à une OD<sub>600</sub> finale proche de 2.



*11 ANNEXE 4: MASSE MOLECULAIRE DE LA  
MYOGLOBINE SANS METHIONINE N-TERMINALE*

acide aminé (AA)	MW (H-AA, H <sub>2</sub> O)	nombre d'AA (N)	N x MW (H-AA, H <sub>2</sub> O)	D non échangeables	MW (D-AA, H <sub>2</sub> O)	N x MW (D-AA, H <sub>2</sub> O)
Ala A	71.08	17	1208.34	4	75.08	1276.34
Arg R	156.19	5	780.94	7	163.19	815.94
Asn N	114.10	2	228.21	3	117.10	234.21
Asp D	115.09	6	690.53	3	118.09	708.53
Cys C	103.14	0	0.00	3	106.14	0.00
Glu E	129.12	14	1807.62	5	134.12	1877.62
Gln Q	128.13	5	640.65	5	133.13	665.65
Gly G	57.05	14	798.73	2	59.05	826.73
His H	137.14	19	2605.68	5	142.14	2700.68
Ile I	113.16	9	1018.44	10	123.16	1108.44
Leu L	113.16	19	2150.03	10	123.16	2340.03
Lys K	128.17	19	2435.31	9	137.17	2606.31
Met M	131.20	3	393.60	8	139.20	417.60
Phe F	147.18	6	883.06	8	155.18	931.06
Pro P	97.12	5	485.58	7	104.12	520.58
Ser S	87.08	11	957.86	3	90.08	990.86
Thr T	101.11	5	505.53	5	106.11	530.53
Trp W	186.21	2	372.43	8	194.21	388.43
Tyr Y	163.18	3	489.53	7	170.18	510.53
Val V	99.13	9	892.19	8	107.13	964.19
end effect	18.00	1	18.00		18.00	18.00
Total		156	<b>19362.25</b>	1070		<b>20432.25</b>





## 12 ANNEXE 5: SECTIONS EFFICACES INCOHERENTES DES ACIDES AMINES ET DES NUCLEOTIDES DANS DES E. COLI NATIVES ET DEUTERIEES

### 12.1 Sections efficaces incohérentes des acides aminés dans des *E. coli* natives et deutériées

La fréquence d'apparition des acides aminés dans les protéines présentes chez *E. coli* fut déterminée à l'aide d'un tableau d'utilisation des codons pour *E. coli* (accessible sur le site [http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT\\_NEW.cgi](http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT_NEW.cgi) (Sundararaj et al., 2004)). Elle se trouve dans la colonne nommée 'ratio' du tableau 1. Les sections efficaces incohérentes des acides aminés hydrogénés (H-AA),  $\sigma_{inc}^{H-AA}$ , et deutériés (D-AA),  $\sigma_{inc}^{D-AA}$ , furent déterminées à l'aide de la formule chimique des acides aminés (Tableau 1). Finalement, la section incohérente d'un acide aminé fictif 'moyen' (AA<sup>moy</sup>), défini à partir de la fréquence d'apparition des acides aminés chez *E.coli*, fut évaluée. La section efficace incohérente de cet acide aminé 'moyen' est définie comme la moyenne des sections incohérentes des acides aminés pondérées par leurs fréquences respectives. Les contributions des sections incohérentes des H-AA et D-AA aux sections incohérentes des H-AA<sup>moy</sup> et D-AA<sup>moy</sup>, respectivement, sont données dans les colonnes  $\sigma_{inc}^{H-AA/AA^{moy}}$  et  $\sigma_{inc}^{D-AA/AA^{moy}}$  du tableau.

Les sections efficaces incohérentes furent évaluées en ne prenant en compte que les hydrogènes non échangeables et en considérant que 100 % des hydrogènes échangeables (H<sub>éch</sub>) étaient échangés.

acide aminé (AA)	Formule chimique	ratio (%)	$H_{\text{éch}}$	$\sigma_{\text{inc}}^{\text{H-AA}}$ (barns)	$\sigma_{\text{inc}}^{\text{H-AA} / \text{AA}^{\text{moy}}}$ (barns)	$\sigma_{\text{inc}}^{\text{D-AA}}$ (barns)	$\sigma_{\text{inc}}^{\text{D-AA} / \text{AA}^{\text{moy}}}$ (barns)
Ala A	$\text{C}_3\text{NOH}_5$	9.48	1	321.58	30.49	8.71	0.83
Arg R	$\text{C}_6\text{N}_4\text{OH}_{13}$	5.53	6	563.89	31.18	16.38	0.91
Asn N	$\text{C}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{H}_6$	3.94	3	241.81	9.53	7.16	0.28
Asp D	$\text{C}_4\text{NO}_3\text{H}_4$	5.12	1	241.31	12.36	6.66	0.34
Cys C	$\text{C}_3\text{NOSH}_5$	1.16	2	241.31	2.80	6.66	0.08
Glu E	$\text{C}_5\text{NO}_3\text{H}_6$	5.72	1	401.85	22.99	10.77	0.62
Gln Q	$\text{C}_5\text{N}_2\text{O}_2\text{H}_8$	4.42	3	402.35	17.78	11.27	0.50
Gly G	$\text{C}_2\text{NOH}_3$	7.32	1	161.04	11.79	4.61	0.34
His H	$\text{C}_6\text{N}_3\text{OH}_{6.5}$	2.26	1.5	402.85	9.10	11.77	0.27
Ile I	$\text{C}_6\text{NOH}_{11}$	5.97	1	803.20	47.95	21.03	1.26
Leu L	$\text{C}_6\text{NOH}_{11}$	10.62	1	803.20	85.30	21.03	2.23
Lys K	$\text{C}_6\text{N}_2\text{OH}_{13}$	4.38	4	723.43	31.69	19.48	0.85
Met M	$\text{C}_5\text{NOSH}_9$	2.77	1	642.66	17.80	16.93	0.47
Phe F	$\text{C}_9\text{NOH}_9$	3.9	1	642.66	25.06	16.93	0.66
Pro P	$\text{C}_5\text{NOSH}_7$	4.43	0	562.39	24.91	14.87	0.66
Ser S	$\text{C}_3\text{NO}_2\text{H}_5$	5.81	2	241.31	14.02	6.66	0.39
Thr T	$\text{C}_4\text{NO}_2\text{H}_7$	5.39	2	401.85	21.66	10.77	0.58
Trp W	$\text{C}_{11}\text{N}_2\text{OH}_{10}$	1.53	2	643.16	9.84	17.43	0.27
Tyr Y	$\text{C}_9\text{NO}_2\text{H}_9$	2.86	2	562.39	16.08	14.87	0.43
Val V	$\text{C}_5\text{NOH}_9$	7.07	1	642.66	45.44	16.93	1.20
<b>AA<sup>moy</sup></b>					<b>487.77</b>		<b>13.13</b>

Tableau 1. Contributions relatives des sections efficaces incohérentes des H-AA et D-AA aux sections incohérentes des H-AA<sup>moy</sup> et D-AA<sup>moy</sup>, respectivement.

## 12.2 Sections efficaces incohérentes des nucléotides dans des cellules

### *E. coli* natives et deutériées

Les proportions des bases dans l'ARN d'*E. coli* se trouvent dans la colonne 'ratio' du tableau 2. Les sections incohérentes des nucléotides hydrogénés ( $H-N_u$ ),  $\sigma_{inc}^{H-N_u}$ , et deutériés ( $D-N_u$ ),  $\sigma_{inc}^{D-N_u}$  furent déterminées à partir de la formule chimique des nucléotides. Comme pour les acides aminés, la section incohérente d'un nucléotide fictif 'moyen' ( $N_u^{moy}$ ), défini à partir de la proportion des bases dans l'ARN d'*E. coli*, fut évaluée. La section incohérente de ce nucléotide 'moyen' est définie comme la moyenne des sections incohérentes des nucléotides pondérées par les contributions respectives de leurs bases. Les contributions des sections incohérentes des  $H-N_u$  et  $D-N_u$  aux sections incohérentes des  $H-N_u^{moy}$  et  $D-N_u^{moy}$ , respectivement, sont données dans les colonnes  $\sigma_{inc}^{H-N_u / N_u^{moy}}$  et  $\sigma_{inc}^{D-N_u / N_u^{moy}}$  du tableau.

Les sections incohérentes ont été évaluées en ne prenant en compte que les hydrogènes non échangeables et en considérant que 100 % des hydrogènes échangeables ( $H_{éch}$ ) étaient échangés.

nucléotide ( $N_u$ )	Formule chimique	ratio (%)	$H_{éch}$	$\sigma_{inc}^{H-N_u}$ (barns)	$\sigma_{inc}^{H-N_u / N_u^{moy}}$ (barns)	$\sigma_{inc}^{D-N_u}$ (barns)	$\sigma_{inc}^{D-N_u / N_u^{moy}}$ (barns)
Ade A	$PN_5C_{10}O_6H_{11}$	24.7	3	644.67	159.23	18.93	4.68
Gua G	$PN_5C_{10}O_7H_{11}$	26.0	4	564.40	146.74	16.88	4.39
Cyt C	$PN_3C_9O_7H_{11}$	25.7	3	643.66	165.42	17.93	4.61
Uri U	$PN_2C_9O_8H_{10}$	23.6	2	643.16	151.79	17.43	4.11
$N_u^{moy}$					<b>623.18</b>		<b>17.78</b>

Tableau 2. Contributions relatives des sections efficaces incohérentes des  $H-N_u$  et  $D-N_u$  aux sections incohérentes des  $H-N_u^{moy}$  et  $D-N_u^{moy}$ , respectivement.



*13 ANNEXE 6: NEUTRON SCATTERING REVEALS  
EXTREMELY SLOW CELL WATER IN A DEAD SEA  
ORGANISM (ARTICLE)*

# Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism

Moeava Tehei\*<sup>†</sup>, Bruno Franzetti\*, Kathleen Wood\*<sup>§</sup>, Frank Gabel\*, Elisa Fabiani\*\*<sup>‡</sup>, Marion Jasnin\*, Michaela Zamponi<sup>¶</sup>, Dieter Oesterhelts<sup>§</sup>, Giuseppe Zaccai\*<sup>||</sup>, Margaret Ginzburg\*\*<sup>‡</sup>, and Ben-Zion Ginzburg\*\*<sup>‡</sup>

\*Institut de Biologie Structurale, Commissariat à l'Energie Atomique–Centre National de la Recherche Scientifique–Université Joseph Fourier, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France; <sup>†</sup>Institut Laue Langevin, 6 Rue Jules Horowitz BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France; <sup>§</sup>Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung, Membranbiochemie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany; <sup>¶</sup>Institut für Festkörperforschung Forschungszentrum Juelich GmbH D-52425 Juelich, Germany; and \*\*Plant Biophysical Laboratory, Institute of Life Sciences, The Hebrew University, Givat Ram, Jerusalem 91904, Israel

Edited by H. Eugene Stanley, Boston University, Boston, MA, and approved November 21, 2006 (received for review February 28, 2006)

Intracellular water dynamics in *Haloarcula marismortui*, an extremely halophilic organism originally isolated from the Dead Sea, was studied by neutron scattering. The water in centrifuged cell pellets was examined by means of two spectrometers, IN6 and IN16, sensitive to motions with time scales of 10 ps and 1 ns, respectively. From IN6 data, a translational diffusion constant of  $1.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  was determined at 285 K. This value is close to that found previously for other cells and close to that for bulk water, as well as that of the water in the 3.5 M NaCl solution bathing the cells. A very slow water component was discovered from the IN16 data. At 285 K the water-protons of this component displays a residence time of 411 ps (compared with a few ps in bulk water). At 300 K, the residence time dropped to 243 ps and was associated with a translational diffusion of  $9.3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , or 250 times lower than that of bulk water. This slow water accounts for  $\approx 76\%$  of cell water in *H. marismortui*. No such water was found in *Escherichia coli* measured on BSS, a neutron spectrometer with properties similar to those of IN16. It is hypothesized that the slow mobility of a large part of *H. marismortui* cell water indicates a specific water structure responsible for the large amounts of  $\text{K}^+$  bound within these extremophile cells.

*Haloarcula marismortui* | water structure and dynamics | extreme halophile

The study of the specific properties of water in biological systems continues to yield fascinating surprises. *Haloarcula marismortui*, an archaeal extreme halophile isolated from the Dead Sea, attracted our attention some years ago because of its high selectivity for  $\text{K}^+$  ( $[\text{K}_{\text{in}}^+]:[\text{Na}_{\text{in}}^+]:[\text{K}_{\text{out}}^+]:[\text{Na}_{\text{out}}^+] \approx 20,000$ ), despite a high membrane permeability (1). In distinction to other organisms,  $\text{K}^+$  was retained within the cell, even in the absence of metabolism, with a half-time of exchange with the outside medium of  $>24 \text{ h}$  (2). At the time, the only systems known with a very high binding selectivity were antibiotics such as nonactin and valinomycin. The structure responsible for their specificity is a “cage” of six to eight carbonyl oxygen atoms arranged in space according to a definite pattern. If the same principle were to be responsible for  $\text{K}^+$  binding in *H. marismortui*, 24–32 moles oxygen per liter of cell water would be required, enormous amounts of oxygen atoms that cannot be supplied exclusively by the organic components of the cell. It is therefore suggested that the oxygen atoms required might be furnished by the ordering of water molecules forming a tertiary system of water, KCl, and cell proteins.

Evidence in favor of more than a single phase of water in cell pellets of *H. marismortui* came initially from H-NMR measurements (3). The visible intensity of water in such pellets accounted for all of the total water present ( $101 \pm 7\%$ ). When the pellets were slowly cooled to below  $-19^\circ\text{C}$  (the temperature at which the culture medium froze), 40% of the water signal remained visible. From analysis of the dynamic properties of the intracellular water, it was concluded that 55% of the cell water had a translational diffusion coefficient of  $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , a figure three orders of magnitude lower than that of pure bulk water, protein hydration water, or water in

molar solutions of NaCl or KCl (Table 1). The measurements were consistent with differential scanning calorimetric studies (4) in which the enthalpy of evaporation of water in pelleted cells was measured. The enthalpy of evaporation determines the heat needed to convert liquid water to the gaseous phase, and is, therefore, a measure of the strength of interaction between water molecules in the liquid phase. Two populations of water molecules were found; the first (52% of total water) had an enthalpy similar to that of 3.5 M NaCl, whereas the enthalpy of the other population was 13 KJ/mole higher (4). This is roughly equivalent to the enthalpy of one hydrogen bond and suggests that, in roughly half the cell water of *H. marismortui*, the water molecules are more tightly bound to each other, and therefore less mobile, than in 3.5 M NaCl.

Dielectric spectroscopy is another method for measuring molecular dynamics. Suspensions of *Escherichia coli* showed a single  $\beta$ -dispersion centered on 1 MHz with no dispersion at higher frequencies (5). On the other hand, cell pellets of *H. marismortui* examined by means of time domain reflectometry showed two dispersions; the first had a relaxation time of 1–2 ps, characteristic of cell membranes, whereas the second, at a frequency of 250 MHz, gave a relaxation time,  $\tau$ , of 636 ps (6). This second dispersion may probably be identified with water because it had a dielectric decrement of 80, characteristic of this substance, even though  $\tau$  is high compared with that of bulk water ( $\tau_{\text{water}}$  measured by dielectric spectroscopy = 7 ps at 298 K; ref. 6). The volume fraction represented by the second dispersion has recently been calculated to represent 58.5% of total cell water (Y. Hayashi, personal communication).

Thus, observations obtained by three different physical methods led us to conclude that cells of *H. marismortui* contain water with two different types (7). The first consists of water in the physical state characteristic of 3.5M NaCl, whereas the second involves water with a low rate of mobility. Therefore, we planned more direct measurements of water diffusion in intact *H. marismortui* cells by measuring neutron scattering in deuterium-labeled cells.

Neutron scattering is a powerful technique for the study of water and protein dynamics (8, 9). Neutron wavelengths ( $\approx 1 \text{ \AA}$ ) and energies (0.1–1 meV) are similar to H-bond lengths and thermal excitation energies, respectively. Dynamics information on a sample is derived from an analysis of its incoherent neutron scattering as

Author contributions: M.T., B.F., F.G., E.F., D.O., G.Z., M.G., and B.-Z.G. designed research; M.T., B.F., K.W., F.G., M.J., M.Z., D.O., G.Z., M.G., and B.-Z.G. performed research; M.T., B.F., F.G., M.J., M.Z., D.O., and G.Z. contributed new reagents/analytic tools; M.T., K.W., E.F., and G.Z. analyzed data; and M.T., B.F., G.Z., M.G., and B.-Z.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

Abbreviation: QENS, quasielastic neutron scattering.

<sup>†</sup>Present address: Institut Laue Langevin, 6 Rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

<sup>||</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: zaccai@ill.fr.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

**Table 1. Translational and rotational diffusion of water in the pure state, in the cell pellet, and in concentrated solutions of NaCl and KCl**

Method	Origin of water (temperature, K)	Translational diffusion coefficient $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$	$\tau_0^*$ , ps	Rotational diffusion coefficient	$\tau_R$ , ps	$\langle R^2 \rangle^{1/2}$ , Å	Ref.
NMR	Pure	2.5		$10^{11} \text{ s}^{-1}$			3
	Pure (288)				3.68 <sup>†</sup>		27
	Pure (room temperature)	2.4			~4 <sup>‡</sup>		50
QENS	Pure (263)	0.7	6.47				12
	Pure (278)	1.3	2.33				
	Pure (285)	1.6	1.66				
	Pure (298)	2.3	1.10				11
	Pure (273)	1.1	3				19
	Pure (294.4)				3.3 <sup>‡</sup>		51
	4 M NaCl (285)	1.5					F.G., unpublished data
	3 M KCl (285)	>2					
QENS	Pure (room temperature)					0.40	23
	Cell pellet (285)					0.58	This work
Isotopic	Pure (283)	1.67					52
	Pure (298)	2.57					
	3.5 M NaCl (283)	1.26					53
	3 M KCl (283)	1.76					

\*Translational residence time.

†Orientational time constant.

‡Rotational correlation time.

a function of angle and energy change. Because the scattering cross-sections of natural abundance H and  $^2\text{H}$  are very different, specific components in a complex system can be examined by labeling them selectively with deuterium. The incoherent neutron scattering cross-section of  $^1\text{H}$  is 40 times larger than that of  $^2\text{H}$  (D), so that D-labeling a chemical group significantly reduces its contribution to the scattering. The dynamics of bulk water and confined water have been studied successfully at room temperature (10, 11), in supercooled water (10, 12), water in hydrogels (13), in porous systems (11), aqueous solutions (14), and water in membrane stacks (15, 16). Biological molecules impose restrictions on water structure and movement: the dynamics of water associated with amino acids (17) and proteins (18, 19) has been measured by neutron scattering on deuterium-labeled samples and shown to be slower by about one order of magnitude as compared with bulk water. The mass density of hydration shell water around proteins was measured by small angle x-ray and neutron scattering to be significantly higher than 1 (20).

Here, we describe experiments designed to examine the behavior of  $\text{H}_2\text{O}$  in pellets of fully deuterated cells of *H. marismortui* and *E. coli*.

## Results

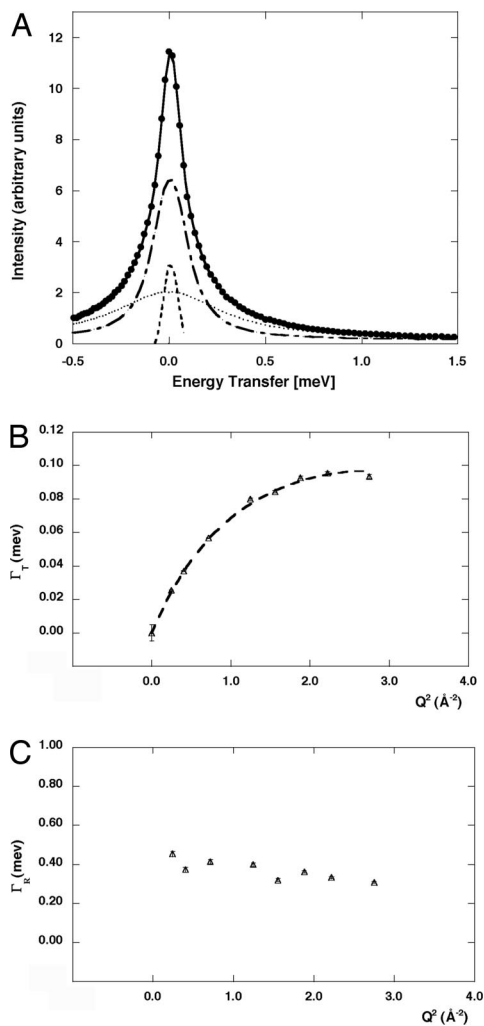
### The Space-Time Window in Quasielastic Neutron Scattering (QENS).

The length scale of atomic motions examined in a QENS experiment is  $\approx 1/Q$ , where  $Q$  is called the scattering vector magnitude. It depends on scattering angle and radiation wavelength and is defined in *Materials and Methods*. The time scale of motions examined is  $\leq 1/\Delta E$ , where  $\Delta E$  is the spectrometer energy resolution, i.e., the ability of the instrument to perceive changes in neutron energy that occur during the scattering process. QENS is measured as a function of both energy transfer and scattering vector. The technique gives access to the correlation function for the atomic motions that are explored for distances of a few angstroms and for times of the order of  $10^{-12}$  to  $10^{-9}$  s. On the energy scale, the elastic scattering appears as a peak centered on zero energy transfer whose width corresponds to the spectrometer resolution. The QENS appears as a significantly broader peak, also centered on zero energy transfer. The shape of the QENS peak and its  $Q$  variation

contain information on the relaxation time and geometry associated with the motion of the scattering particle. In the same way as diffraction by a structure is related to the structure itself by Fourier transformation in crystallography, the energy transfer scattering pattern of a moving particle is related to the time dependence of its motion by Fourier transformation. A diffusing particle is described by an exponential decay function in time; the Fourier transform of such a function is called a Lorentzian, and it corresponds to the peak shape usually observed in QENS. See *Materials and Methods* for the equations used in data analysis. By applying various models to fit the Lorentzian width as a function of  $Q$ , it is possible to calculate rotational relaxation time, translational residence times, and translational and rotational diffusion coefficients for the scattering particle.

**“Normal” Cell Water in *H. marismortui*: IN6 Results.** Incoherent neutron scattering spectra fitted each with an elastic peak and two Lorentzian functions (sharp and broad components) are shown in Fig. 1A.

**The sharp component.** This component was attributed to translational motions of water. The dependence of the half-width at half-maximum of this component ( $\Gamma_T$ ) on the scattering vector squared ( $Q^2$ ) (see *Materials and Methods*) was best fitted by the diffusion model of Singwi and Sjölander (21) in which a molecule, executes oscillatory motions about one position for a mean residence time  $\tau_0$ , then diffuses by continuous motion for a mean time  $\tau_1$  to another position in a repetitive way. In general, the shape of the quasielastic scattering for this model is not Lorentzian and the quasielastic broadening is represented by a long and complicated equation. However, the equation assumes a simple form in two limiting cases, in which the shape of the quasielastic peak is Lorentzian. In case *i*, when  $\tau_0 \ll \tau_1$ , the equation reduces to the simple diffusion formula; in case *ii*, when  $\tau_0 \gg \tau_1$  at low momentum transfer, the broadening corresponds to simple diffusion as in case *i*. An asymptotic value approached at high momentum transfer gives the broadening expected for a jump mechanism (21). With the assumption  $\tau_0 \gg \tau_1$ , the  $\Gamma_T(Q^2)$  dependence reduces to (21)



**Fig. 1.** IN6 data. (A) Quasielastic spectrum at  $T = 285$  K and  $Q = 1.65 \text{ \AA}^{-1}$ . Filled circles indicate the data, and the bold solid line is the fitted curve using Eqs. 5 and 7. The fit of the quasielastic spectra was performed for  $-0.6 < \hbar\omega < 1.5$  meV. The different components correspond to the elastic peak (dashed line), the broad Lorentzian (dotted line), and the sharp Lorentzian (dot-dash line). (B) Half-widths at half-maximum of the sharp Lorentzian  $\Gamma_s$  as a function of  $Q^2$  at  $T = 285$  K. The dashed line results from the fit using Eq. 1. This component was attributed to the translational motions of water. (C) Half-width at half-maximum of the broad Lorentzian  $\Gamma_b$  as a function of  $Q^2$  at  $T = 285$  K. This component was attributed to the rotational motions of water.

$$\Gamma_T = \frac{1}{\tau_0} \left[ 1 - \frac{\exp(-2W)}{1 + Q^2 D_T \tau_0} \right], \quad [1]$$

where  $D_T$  represents the translational diffusion coefficient and  $2W$  is the Debye–Waller factor describing the oscillations. By plotting  $\Gamma_T$  against  $Q^2$ , a curve is obtained from which the values of the three fit parameters,  $\tau_0$ ,  $D_T$  and  $2W$ , 6.12 ps,  $1.29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  and  $0.056 Q^2$ , respectively, can be derived.

The following checks were performed to test the validity of the Singwi and Sjölander model (21, 22).

At the limit of small momentum transfer, Eq. 1 reduces to  $\Gamma_T = D_T Q^2$ , the expression predicted by simple diffusion theory. The same value for  $D_T$  is obtained from data at low  $Q^2$  as from the full fit.

At large  $Q^2$  values, the broadening tends toward the asymptotic value  $\Gamma_T = (1/\tau_0)$ . Again, the same  $\tau_0$  was obtained from the data at high  $Q^2$  values as from the full fit.

The Debye–Waller factor,  $2W$ , equals  $1/6 Q^2 \langle R^2 \rangle$ , where  $\langle R^2 \rangle$  is the mean square radius of the fully developed thermal cloud

in the oscillatory motion, with a value of  $\langle R^2 \rangle / 6 = 0.056 \text{ \AA}^2$ . If the assumption that  $\tau_0 \gg \tau_1$  is justified, then we expect  $2W < Q^2 D_T \tau_0$ ; this is indeed the case because  $2W = 0.056 Q^2 < Q^2 D_T \tau_0 = 0.78 Q^2$ . Brockhouse (23) observed that, in the case of normal water, the angular distribution of the quasielastic scattering is well governed by a factor of the type  $\exp(-2W)$  and has also estimated the numerical value of  $2W$ . It gives a value for  $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$  of  $\approx 0.4 \text{ \AA}$ , which is reasonably consistent with the value observed in this work ( $\sqrt{\langle R^2 \rangle} = 0.58 \text{ \AA}$ ).

Moreover, if the assumption that  $\tau_0 \gg \tau_1$  holds, then we can also expect that the diffusion mechanism will not be primarily through jumps corresponding to the mean distance between water molecules; this is verified because the root mean square diffusion distance is given by  $L = \sqrt{6\tau_0 D_T} = 2 \text{ \AA}$ , which is smaller than the mean distance between water molecules (nearly  $3 \text{ \AA}$ ) (21).

Calculated values for  $D_T$  for water in 3.5 M NaCl at 285 K corresponds to  $1.26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  (Table 1). This value is close to those obtained for *H. marismortui*, i.e.,  $1.29 \pm 0.12 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Therefore, we conclude that the sharp Lorentzian corresponds to “normal” water slightly slowed down with respect to bulk because of the presence of ions, chiefly NaCl.

**The broad component.** This component was attributed to rotational motions of water. The half-width at half-maximum of the broad Lorentzian line,  $\Gamma_R$ , is plotted as a function of  $Q^2$  in Fig. 1C. The curve shows a constant value of  $\Gamma_{R0} = 0.36$  meV. The rotational relaxation of water has been described, using the Sears model (24), corresponding to hindered rotational diffusion of protons on the surface of a sphere of radius  $\rho$ . In the  $Q$  range of the measurements ( $Q \approx 1 \text{ \AA}^{-1}$ ), the first order dominates the Sears approximation (24), and the dynamics structure factor is approximated as (11, 25)

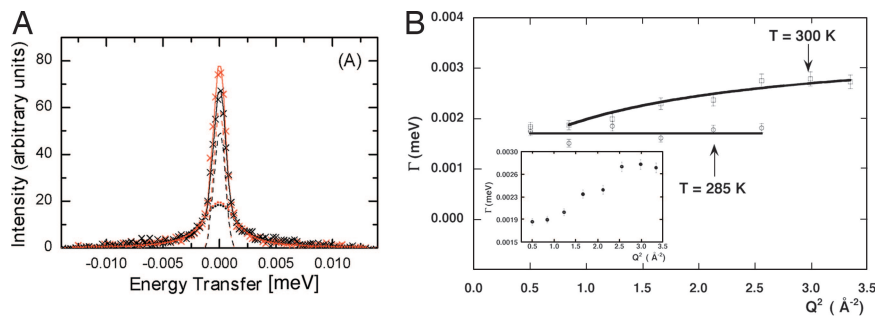
$$S(Q, \omega) = j_0^2(Q\rho) \delta(\omega) + \{1 - j_0^2(Q\rho)\} L(\Gamma_R, \omega), \quad [2]$$

where  $j_0$  is the zero order rotational Bessel function,  $\delta(\omega)$  is the Dirac delta function describing elastic scattering, and  $L(\Gamma_R, \omega)$  represents a Lorentzian of half-width at half-maximum  $\Gamma_R = 2D_R$ .  $D_R$  is the rotational diffusion coefficient, which is approximately independent of  $Q$  and increases with temperature (26). The rotational correlation time  $\tau_R = 1/(2D_R)$  in *H. marismortui* is 1.83 ps, which is reasonably consistent with values for bulk water measured by neutron scattering and NMR (Table 1) (27). Protein hydration water rotational relaxation times have been measured to be higher by a retardation factor between 5 and 10 (28, 29). This finding suggests that it was the bulk water, and not the macromolecule hydration water, that was measured in the IN6 neutron scattering experiments on *H. marismortui*.

**Slow Cell Water in *H. marismortui*: IN16 Results.** Fig. 2A shows data and fitted spectra for natural abundance (H cells) and deuterated (D cells) *H. marismortui* cells in  $\text{H}_2\text{O}$ . The incoherent scattering cross-section of water in the sample accounts for 99% of the total for the D cells  $\text{H}_2\text{O}$  sample and for 70% of the total in the H cells  $\text{H}_2\text{O}$  sample (see *Materials and Methods*). The Lorentzian components of the two samples are identical, indicating that, in this time scale, the quasielastic signal is due to water and contains negligible contributions from cell components.

Each spectrum was fitted reasonably well with an elastic peak and one Lorentzian function. Values of  $\Gamma$  (Lorentzian half-width at half-maximum) were plotted versus  $Q^2$  in Fig. 2B. At 285 K, the values of  $\Gamma$  are independent on  $Q^2$ . This feature has been seen also in the translational line-widths  $\Gamma$  of water in other systems (11, 19).  $\Gamma$  is constant at  $\approx 1.6 \mu\text{eV}$ , a value that corresponds to a residence time of  $1/\Gamma = 411$  ps. At 300 K,  $\Gamma$  shows a constant value  $\Gamma_0$  at low  $Q^2$ , then increases from about  $Q^2 = Q_0^2 = 0.9 \text{ \AA}^{-2}$  to approach asymptotically a constant value  $\Gamma_\infty$  at large  $Q^2$  (Fig. 2B Inset). The first feature indicates that the observed behavior is not free diffusion, but it is a typical characteristic of diffusion in a confined space (22). It can be approximately accounted for by the model of





**Fig. 2.** IN16 data. (A) Quasielastic spectra at  $T = 300$  K and  $Q = 0.7 \text{ \AA}^{-1}$ : the crosses indicate the experimental data and the solid lines are the fitted curves obtained by using equations 5 and 7, for D-cells in  $\text{H}_2\text{O}$  (black) and H-cells in  $\text{H}_2\text{O}$  (red) respectively. The fits of the quasielastic spectra were performed for  $-0.013 < \hbar\omega < +0.013$  meV. The different components correspond to the resolution function (dashed line) and one Lorentzian (dotted line). (B) Half widths at half-maximum of the Lorentzian  $\Gamma$  as a function of  $Q^2$  at  $T = 285$  K and  $T = 300$  K. At 300 K, the bold solid line results from the fit using Eq. 4 from  $Q_0^2 = 0.9 \text{ \AA}^{-2}$ . (Inset) A zoom-in on the data obtained at 300 K.

Volino and Dianoux, in which a particle diffuses inside a sphere of radius  $a$  (30)

$$\Gamma_0(0 < Q < \pi/a) = \text{constant} = 4.33[D_{\text{local}}/a^2], \quad [3]$$

where  $D_{\text{local}}$  is the diffusion coefficient inside a confinement sphere of radius  $a$  and  $a$  is calculated from  $Q_0 = \pi/a$ . Estimating the  $\Gamma_0$  and  $Q_0$  values from Fig. 2B, we obtain the diffusion coefficient  $D_{\text{local}} = 6.15 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  and  $a = 3.31 \text{ \AA}$ .

Beyond  $Q = 1 \text{ \AA}^{-1}$  the line width follows the well-known jump diffusion behavior, given by (22)

$$\Gamma(Q) = \frac{D_T Q^2}{1 + D_T Q^2 \tau_0}, \quad [4]$$

where  $\tau_0$  represents the residence time before the jump and  $D_T$  is the translational diffusion constant. In the high  $Q^2$  region, one observes motion on short length scales. On such scales, local jump motion of the protons becomes dominant. The residence time of a hydrogen atom on a given site between jumps is  $\tau_0 = 1/\Gamma_\infty$  where  $\Gamma_\infty$  is obtained from the asymptotic behavior at high  $Q^2$ ; in this region  $\Gamma$  approaches a constant value. At the top of the  $Q$ -range examined, the  $\Gamma$  value at high  $Q^2$  was still increasing, and had not yet reached a constant value, which could be estimated by curve fitting using Eq. 4 and extrapolating to higher  $Q^2$  (Fig. 2). The translational diffusion constant was also extracted using the curve fitted by use of Eq. 4 (Fig. 2). A similar result has been seen in the  $\Gamma$ 's of hydration water in protein (31); it is also consistent with the restricted jump diffusion model of Hall and Ross (32). Clearly, the  $\Gamma$  of the restricted jump diffusion model exhibits the characters both of diffusion within a restricted volume (here a sphere) model and the jump diffusion model tending to asymptotic values at low and high  $Q^2$  (22). At low  $Q^2$ , we are mainly concerned with a longer length scale, i.e., with the effects of the boundaries, which force the  $\Gamma$  to deviate from the  $DQ^2$  law and approach a finite value,  $\Gamma_0$ . Conversely, at large  $Q^2$  the nature of the local jump motions over shorter length scale predominate and, because the elementary displacements of the particles are not infinitely small, the  $\Gamma$  of the quasielastic component tends to the asymptotic value  $1/\tau_0$ .

At 300 K,  $D_T$  is  $9.34 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  and  $\tau_0$  is 243 ps. These values indicate severely reduced water mobility with respect to bulk cell water.

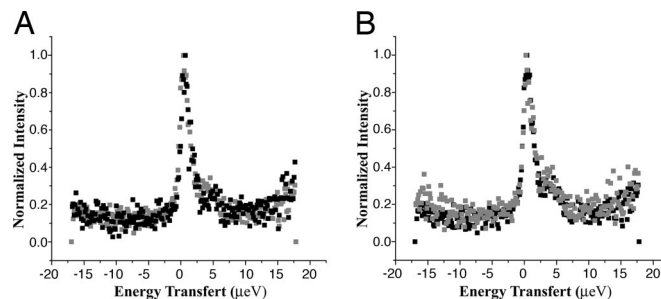
**Proportion of "Slow" to "Normal" Cell Water in *H. marismortui*.** The scattering of vanadium is purely elastic (and therefore independent of the energy resolution of the measuring spectrometer) and is often used to calibrate neutron scattering data. To connect the scattering functions of a sample in the different time windows, we divided the IN6 and IN16 data by the scattering of the same vanadium sample on each instrument. The scattering of the vanadium was then considered as a reference to which the IN6 and IN16 data were renormalized and put on the same scale. This made it possible to make a quantitative comparison of the amounts of water detected by the two instruments. At the same lowest value of  $Q$  accessible on

both instruments, the proportion of "slow" to total water was then calculated from the ratio of the IN16 to IN6 elastic intensities. The slow water was thus found to represent 55% of the total cell pellet water. Because our former experiments had shown that the bacterial cells contained some normal water, we infer that in the quasielastic scattering of the bacterial pellets examined on IN6, both extracellular 3.5 M NaCl and the faster intracellular water is measured. A correction has therefore to be made for the extracellular water content of the bacterial pellets. This is estimated to be 28% of total pellet water under the conditions of centrifugation used (1). The proportions of slow and normal intracellular water detected by neutron scattering in *H. marismortui* could then be calculated and were found to be 76% and 24%, respectively, of cell water. The slow water content found by this method is somewhat higher than that detected by former methods.

**There Is No Slow Water Component in *E. coli*.** BSS normalized quasielastic spectra (see *Materials and Methods*) of deuterated *E. coli* cells measured in  $\text{H}_2\text{O}$  and in  $\text{D}_2\text{O}$  are shown in Fig. 3. A flat background was applied, which could be seen as an extremely broad Lorentzian due to normal cell water. Despite the low statistical accuracy of the results, it is clear that neither the  $Q$  value nor the isotopic nature of the water had any effect on the width of the signal. These observations demonstrate the absence of a slow water component in *E. coli*.

## Discussion and Conclusion

Our results on *H. marismortui* fall into two distinct groups according to the measuring instrument used. On the  $\approx 10$ -ps time scale (IN6 data, Fig. 1), at 285 K  $D_T$  and  $\tau_0$  are  $1.29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  and 6.12 ps, respectively. The  $D_T$  value is slightly lower than that of pure water at 285 K, close to the 278 K value. (Table 1). The  $\tau_0$  value corresponds to that for pure water at 263 K (Table 1). This is consistent with the fact that the water is slightly slowed down with respect to bulk because of the presence of high concentration of ions. The  $D_T$  value is also close to that for 3.5M NaCl and lower than that of 3M KCl solutions (Table 1). This is



**Fig. 3.** Normalized quasielastic spectrum of D cells in  $\text{H}_2\text{O}$  (gray) and  $\text{D}_2\text{O}$  (black) at  $Q = 0.31 \text{ \AA}^{-1}$  (A) and  $Q = 1.86 \text{ \AA}^{-1}$  (B). The quasielastic experiments were performed at 285 K on the BSS spectrometer (FRJ-2, Jülich) using an incident wavelength of  $6.27 \text{ \AA}$ . The elastic energy resolution (FWHM) is  $1.2 \text{ \mu eV}$ .

consistent with the fact that, in the time window of the spectrometer, the data are sensitive to the principal extracellular component (3.5 M NaCl) and to intracellular water with  $D_T$  values similar to the ones found in other cells studied. In the few cells in which the diffusion of cell water has been measured by neutron scattering, its value has been found to be reduced by at most one order of magnitude from that of bulk water, with  $D_T$  in the range from 0.1 to 0.42 of the bulk water value (33–35).

The IN16 and BSS spectrometers (time scale  $\approx 1$  ns) detected a large population of protons with very low mobility in *H. marismortui* (Fig. 2), but not in *E. coli* (Fig. 3). Control experiments using samples with different deuterium labeling established that the signal was strongly dominated by  $H_2O$  protons. The IN16 and BSS spectrometers cannot detect bulk water, nor indeed water retarded by dissolved salts or polymers even at high concentrations, because the rates of diffusion of these substances are outside the range of the instrument. Thus, the water detected by IN16 must be intracellular, providing strong evidence for the presence of water with a very low rate of mobility within *H. marismortui* cells. At 300 K, this water had a  $D_T$  of  $9.34 \times 10^{-8}$   $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  or  $\approx 250$  times lower than that of bulk water at the same temperature (Table 1). The residence time,  $\tau_0$ , of  $\approx 240$  ps is  $\approx 220$  times higher than for bulk water (Table 1). Results showed a strong qualitative effect of temperature (Fig. 2B), with  $H_2O$  protons becoming unable to diffuse over the “jump distance” when the temperature fell by only 15 K (to 285 K).

A possible reason for a lowering of cell water mobility is that this water functions as water of hydration near protein surfaces. The dynamics of hydration water near proteins has been studied by neutron scattering and by NMR. Long-range diffusion coefficients of water close to protein surfaces were found to be reduced 5–6 times as compared with the bulk solvent (36). Measurements of water mobility at the surface of a protein, C-phycocyanin (19) yielded a  $D_T$  of  $1.2 \cdot 10^{-5}$   $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  at 298 K, in comparison with  $D_T = 2.3 \times 10^{-5}$   $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  in bulk water at the same temperature, i.e., there is a relatively small difference between the two. This observation is consistent with NMR measurements of water mobility at the surface of bovine pancreatic trypsin inhibitor, in which the translational retardation factor at 277 K is two (28). Protein solvation has also been studied by hydrodynamics and solution-scattering methods. Of these studies, the most relevant to the present one are those dealing with solvent interactions in purified halophilic proteins. A summary of the 10 halophilic enzymes studied up to 2000 is given in Madern *et al.* (37). Each enzyme molecule is surrounded by a solvation shell composed of 0.2–0.4 g of water and 0.1–0.2 g of NaCl or KCl per gram of protein (38). This is equivalent to 5 M NaCl in NaCl-containing media. In contrast, the solvation shell of homologous mesophilic proteins contains bound water but no ions, and it was concluded that salt binding appears to be a characteristic specific of molecular adaptation to halophilic conditions (38), although it is relatively weak and unspecific. In halophilic proteins, ion binding appears to exert a positive function in that it contributes to preserve the stability and solubility of folded proteins immersed in highly concentrated salt solutions (39). Significant differences in the dynamics of the NaCl and KCl forms of *H. marismortui* malate dehydrogenase have also been found by neutron scattering, with the form binding  $K^+$  displaying higher flexibility and lower resilience at physiological temperatures (40, 41). Halophilic proteins have also been studied by crystallography (42–47). Water and ions in close association with the enzyme molecule have been found in these studies, although the amounts of water and ions detected were far less than in the solution studies, because most of the water molecules in the solvation shell are in a disordered state and therefore invisible in high-resolution electron density maps.

There are two remarkable similarities between the solvent interactions that have been found in purified halophilic proteins

and those known to occur in whole cells of *H. marismortui*: both purified halophilic proteins and whole cells of *H. marismortui* bind water and salt, and both require high salt concentrations in the bathing medium for viability (halophilic proteins unfold below 2 M KCl or NaCl). However, there are also important differences. Halophilic enzyme proteins are active in a wide variety of salt solutions, whereas *H. marismortui* cells have an absolute requirement for NaCl and  $MgSO_4$  in the bathing medium while binding  $K^+$  within the cells; isolated proteins do not appear to be selective for  $Na^+$  or  $K^+$ , whereas intact cells show very high specificity toward these ions. To conclude, the work done so far on isolated proteins explains neither the high selectivity between  $Na^+$  and  $K^+$  found in these cells (1), nor the low water mobility found in the present study. This latter finding confirms the indications for the existence of structured water that were deduced from the NMR, dielectric, and calorimetric measurements described in the Introduction.

Recently, in a long series of papers, MacKinnon and coworkers have described a system demonstrating high specificity between  $K^+$  and  $Na^+$ . This occurs in  $K^+$  channels, molecular structures responsible for  $K^+$ -transport within cell membranes. The work is summarized in MacKinnon's Nobel lecture (48). The arrangement of the water–oxygen atoms in the central cavity of the  $K^+$  channel may serve as model to explain how water in the vicinity of protein can bind  $K^+$  specifically with a very high affinity in *H. marismortui*.

In conclusion, our data demonstrate that the water of *H. marismortui* cells is of exceptionally low mobility, as compared with other cells studied up to now. This low mobility cannot be explained by the hydration interactions of halophilic proteins, as far as they are known at present. Structured water around  $K^+$  ions has been seen by MacKinnon in the central cavity of  $K^+$  channels (48). A similar mechanism might explain our own results.

## Materials and Methods

**Cell Material.** Natural abundance and deuterated *H. marismortui* cells were grown at 37°C to an optical density of 0.8–1 (late logarithmic phase) in medium described (40), in which, for the deuterated material, yeast extract was replaced by deuterated algal extract produced at the Max Planck Institute (Martinsreid, Germany). Deuterated *E. coli* [BLE21(DE3)] were cultivated at 37°C to an optical density value of 1.5, in deuterated Enfors minimum growth medium with deuterated glycerol (d8) as the carbon source.

**Preparation of Samples for Neutron Scattering.** Cells were pelleted by centrifugation at 9,000 rpm in a Beckman centrifuge (JA14 rotor) for 30 min at room temperature. The supernatant was discarded, and the cells were washed twice with 200 ml of  $H_2O$ –saline (200 g/liter NaCl, 46.6 g/liter  $MgSO_4$ , 0.5 g/liter  $CaCl_2$ , 2 g/liter KCl, and 10 mM Tris-HCl at pH 7.6 for the halophiles and 8.766 g/liter NaCl, 0.372 g/liter KCl, and 10 mM Tris-HCl at pH 7.6 for *E. coli*) followed by 15-min centrifugation. Washed pellets of *H. marismortui*, which were naturally bright red whether the cells were natural abundance or deuterated, were transferred to aluminum sample holders ( $4 \times 3 \times 0.03$   $\text{cm}^3$ ). Excess liquid was removed with a capillary or by careful wiping with a tissue and the holder immediately sealed. After the experiments, a portion of the pellets was resuspended in medium. They were found to grow to an OD of 1 within a few days, indicating that most cells were still viable after a total beam time of 20 h. Another portion was completely dried and was found to have contained 1.4 g of water per gram of dry cell material for all samples.

There was very good agreement for the ratio of water to dry cell material (i.e., 1.4 g of water per g of dry cell material), whether measured by NMR, calorimetry, or neutron scattering. Samples of natural abundance and deuterated cells suspended in  $H_2O$  saline were named H cells  $H_2O$  and D cells  $H_2O$ , respectively.

**Neutron Scattering Measurements.** Experiments on *H. marismortui* were performed on the IN6 time of flight and the IN16 backscattering spectrometer at the Institut Laue Langevin (ILL), Grenoble, France. Experiments on *E. coli* were performed on the BSS spectrometer, also a backscattering spectrometer, at the Jülich neutron scattering centre, with a time scale of 1 ns (www.neutron-scattering.de). Incident wavelengths for the three instruments are 5.12, 6.27, and 6.27 Å, respectively. The elastic energy resolutions (FWHM) are 100 μeV for IN6 and 0.9 μeV for IN16 and BSS, corresponding to time scales of 10 ps and 1 ns, respectively. The scattering was measured over a wave-vector range of 0.3 < Q < 2 Å<sup>-1</sup> for IN6 and 0.02 < Q < 1.9 Å<sup>-1</sup> for IN16 and BSS (Q = 4πsinθ/λ, where 2θ is the scattering angle and λ is the neutron wavelength). A vanadium sample (a purely elastic scatterer) was measured to define the instrument resolution and to correct for detector efficiency. The measured spectra were corrected, normalized, grouped, and transformed into energy transfer spectra by using the standard ILL data reduction programs INX and SQW. Correction for multiple scattering was estimated to be negligible because the transmission of all samples was >90%.

**Incoherent Neutron Scattering.** An exhaustive description of QENS can be found in Bée (22). Application of this method to protein dynamics has been reviewed by Smith (49) and Gabel *et al.* (9). Hydrogen nuclei dominate incoherent neutron scattering because their cross section is more than an order of magnitude larger than that of other nuclei in biological samples. The approximate incoherent scattering cross sections of H<sub>2</sub>O, H cell, and D cell material were calculated to be 5.3 cm<sup>2</sup>/g, 3.2 cm<sup>2</sup>/g, and 0.08 cm<sup>2</sup>/g, respectively. If all of the sample material scatters in the same time window, we expect 99% of the signal to be from water in D cell H<sub>2</sub>O samples and 70% of the signal to be from water in the H cell H<sub>2</sub>O samples. In incoherent neutron scattering experiments, dynamic information is contained in the scattering function S(Q, ω).

**Data Analysis.** In the quasielastic incoherent approximation, the theoretical scattering function has been described by Bée (22)

$$S_{\text{q.e.theor}}(\mathbf{Q}, \omega) = \left( A_0(\mathbf{Q})\delta(\omega) + \sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega) \right). \quad [5]$$

A<sub>0</sub>(Q) is the elastic incoherent structure factor (EISF).

The quasielastic component  $\sum_{i=1}^n A_i(\mathbf{Q})L(\Gamma_i, \omega)$  is a sum of Lorentzian functions

$$L(\Gamma_i, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma_i(\mathbf{Q})}{\Gamma_i(\mathbf{Q})^2 + \omega^2}, \quad [6]$$

where Γ<sub>i</sub> is the half-width at half-maximum of a Lorentzian peak. Incoherent quasielastic neutron scattering, in the experimental conditions used here, mainly measures motions on the picosecond time scale.

The function in Eq. 5 was fitted to the data with the standard ILL fitting program Profit by using the following relation

$$S_{\text{meas}}(\mathbf{Q}, \omega) = e^{-\hbar|\omega|/2k_B T} [S_{\text{q.e.theor}}(\mathbf{Q}, \omega) \otimes S_{\text{res}}(\mathbf{Q}, \omega)] + B_0. \quad [7]$$

In Eq. 7 a convolution with the spectrometer resolution function S<sub>res</sub>(Q, ω) and a detailed balance factor e<sup>-ħ|ω|/2k<sub>B</sub>T</sup> are applied. B<sub>0</sub> is the inelastic background due to the vibrational modes of lowest energy (the “lattice phonons”; ref. 22). The fits were performed over the energy transfer range -0.6 to +1.5 meV using two Lorentzian functions for the IN6 spectra. For the IN16 spectra, the fits were performed with one Lorentzian function over the energy transfer range -0.013 to +0.013 meV.

The Γ<sub>i</sub> values derived from the analysis were subsequently interpreted in the context of models described in *Results*.

*H. marismortui* culture was obtained from Prof. Aharon Oren (Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Givat Ram, Jerusalem, Israel). We thank Martine Moulin and Michael Haertlein from the DLAB and the Dynamics Club at Institut Laue Langevin, Grenoble, France. M.T. was supported by a doctorate grant from the Région Rhône-Alpes, France, and by the Istituto Nazionale Fisica della Materia, Italy. The work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique GEOMEX program. We acknowledge support from the European Union under the DLAB contracts HPRI-CT-2001-50035 and RII3-CT-2003-505925, and The Integrated Infrastructure Initiative for Neutron Scattering and Muon Spectroscopy (NMI3).

- Ginzburg M, Sachs L, Ginzburg BZ (1970) *J Gen Physiol* 55:187–207.
- Ginzburg BZ, Ginzburg M (1982) in *Biophysics of Water*, eds Franks F, Mathias SF (Interscience, London), pp 340–343.
- Edzes HT (1976) PhD thesis (Univ of Groningen, Groningen, The Netherlands).
- Ginzburg BZ (1981) *Thermochim Acta* 46:249–258.
- Morgan H, Ginzburg M, Ginzburg BZ (1987) *Biochim Biophys Acta* 924:54–66.
- Bone S, Ginzburg BZ, Morgan H, Wilson G, Zaba B (1996) *Phys Med Biol* 41:45–54.
- Ginzburg M, Ginzburg BZ (1975) in *Biomembranes*, eds Eisenberg H, Katchalski-Katzir E, Manson LA (Plenum, New York), Vol 7, pp 219–251.
- Zaccai G (2000) *Science* 288:1604–1607.
- Gabel F, Bicout D, Lehnert U, Tehei M, Weik M, Zaccai G (2002) *Q Rev Biophys* 35:327–367.
- Zanotti JM, Bellissent-Funel MC, Chen SH (1999) *Phys Rev E* 59:3084–3093.
- Bellissent-Funel M, Chen SH, Zanotti J (1995) *Phys Rev E* 51:4558–4569.
- Teixeira J, Bellissent-Funel M, Chen SH, Dianoux AJ (1985) *Phys Rev A* 31:1913–1917.
- Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E, Telling MTF (2003) *J Phys Chem B* 107:8363.
- Bellissent-Funel M-C, Kahn R, Dianoux AJ, Fontana MP, Maisano G, Migliardo P, Wanderling F (1984) *Mol Phys* 52:1479–1486.
- Zaccai G (2004) *Philos Trans R Soc London B* 359:1269–1275; and discussion 1275, 1323–1328.
- Weik M, Lehnert U, Zaccai G (2005) *Biophys J* 89:3639–3646.
- Russo D, Hura G, Head-Gordon T (2004) *Biophys J* 86:1852–1862.
- Bellissent-Funel MC, Teixeira J, Bradley K, Chen S (1992) *J Phys J* 2:995–1001.
- Bellissent-Funel MC, Zanotti JM, Chen SH (1996) *Faraday Dis* 103:281–294.
- Svergun DI, Richard S, Koch MH, Sayers Z, Kuprin S, Zaccai G (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2267–2272.
- Singwi KS, Sjolander A (1960) *Phys Rev* 119:863–871.
- Bée M (1988) *Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science* (Adam Hilger, Philadelphia).
- Brockhouse BN (1958) *Suppl Nuovo Cimento* 9:45.
- Sears VF (1966) *Can J Phys* 44:1299–1311.
- Zanotti JM (1997) PhD thesis (Université de Paris XI, Paris).
- Volino F (1978) in *Microscopic Structure and Dynamics of Liquids*, eds Dupuy J, Dianoux AJ (Plenum, New York), pp 221–300.
- Sposito G (1981) *J Chem Phys* 74:6943–6949.
- Modig K, Liepinsh E, Otting G, Halle B (2004) *J Am Chem Soc* 126:102–114.
- Halle B (2004) *Philos Trans R Soc London B* 359:1207–1223; and discussion 1223–1224, 1323–1328.
- Volino F, Dianoux AJ (1980) *Mol Phys* 41:271–279.
- Bellissent-Funel MC, Teixeira J, Bradley KF, Chen SH, Crespi HL (1992) *Physica B* 180–181:740–744.
- Hall PL, Ross DK (1981) *Mol Phys* 42:673–682.
- Trantham EC, Rorschach HE, Clegg JS, Hazlewood CF, Nicklow RM, Wakabayashi N (1984) *Biophys J* 45:927–938.
- Rorschach HE, Bearden DW, Hazlewood CF, Heidorn DB, Nicklow RM (1987) *Scanning Microsc* 1:2043–2049.
- Neville MC, Paterson CA, Rae JL, Woessner DE (1974) *Science* 184:1072–1074.
- Bon C, Dianoux AJ, Ferrand M, Lehmann MS (2002) *Biophys J* 83:1578–1588.
- Madern D, Ebel C, Zaccai G (2000) *Extremophiles* 4:91–98.
- Ebel C, Costenaro L, Pascu M, Faou P, Kernel B, Proust-De Martin F, Zaccai G (2002) *Biochemistry* 41:13234–13244.
- Ebel C, Zaccai G (2004) *J Mol Recognit* 17:382–389.
- Tehei M, Madern D, Pfister C, Zaccai G (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14356–61.
- Tehei M, Zaccai G (2005) *Biochim Biophys Acta* 1724:404–410.
- Besir H, Zeth K, Bracher A, Heider U, Ishibashi M, Tokunaga M, Oesterhelt D (2005) *FEBS Lett* 579:6595–6600.
- Zeth K, Offermann S, Essen LO, Oesterhelt D (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13780–5.
- Frolow F, Harel M, Sussman JL, Mevarech M, Shoham M (1996) *Nat Struct Biol* 3:452–458.
- Richard SB, Madern D, Garcin E, Zaccai G (2000) *Biochemistry* 39:992–1000.
- Irimia A, Ebel C, Madern D, Richard SB, Cosenza LW, Zaccai G, Vellieux FM (2003) *J Mol Biol* 326:859–873.
- Bieger B, Essen LO, Oesterhelt D (2003) *Structure (London)* 11:375–385.
- MacKinnon R (2003) Nobel Lecture (Stockholm University, Stockholm).
- Smith JC (1991) *Q Rev Biophys* 24:227–291.
- Teixeira J, Luzar A (1999) in *Hydration Processes in Biology: Theoretical and Experimental Approaches*, ed Bellissent-Funel MC (IOS, Amsterdam), Vol 305, pp 35–65.
- Chen SH, Teixeira J, Nicklow R (1982) *Phys Rev A* 26:3477–3482.
- Wang JH (1965) *J Phys Chem* 69:442.
- Wang JH (1954) *J Phys Chem* 58:686–692.



## 14 ABREVIATIONS

<b>AA<sup>moy</sup></b>	Acide aminé fictif ‘moyen’
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>CsCl</b>	Chlorure de Césium
<b>D-ARN</b>	ARN purifié provenant de cellules deutériées
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Eau lourde
<b>DLAB</b>	Laboratoire de Deutériation
<b>D-<i>E. coli</i>, H<sub>2</sub>O</b>	<i>Escherichia coli</i> deutériées, resuspendues en H <sub>2</sub> O
<b>D-<i>E. coli</i>, D<sub>2</sub>O</b>	<i>Escherichia coli</i> deutériées, resuspendues en D <sub>2</sub> O
<b>D-<i>E. coli</i>, HRNA, H<sub>2</sub>O</b>	<i>Escherichia coli</i> deutériées, avec ARN partiellement hydrogéné, resuspendues en H <sub>2</sub> O
<b>D-<i>E. coli</i>, HRNA, D<sub>2</sub>O</b>	<i>Escherichia coli</i> deutériées, avec ARN partiellement hydrogéné, resuspendues en D <sub>2</sub> O
<b>D-protéine</b>	Protéine purifiée provenant de cellules deutériées
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EINS</b>	Diffusion Elastique Incohérente de Neutrons
<b>EISF</b>	Facteur de Structure Elastique Incohérent
<b>eV</b>	electronVolt
<b>FWHM</b>	Largeur à mi-hauteur
<b>H-ARN</b>	ARN purifié provenant de cellules natives (abondance naturelle)
<b>H-ARN-H<sub>2</sub>O</b>	H-ARN resuspendu en H <sub>2</sub> O
<b>H-ARN-D<sub>2</sub>O</b>	H-ARN resuspendu en D <sub>2</sub> O
<b>HD-ARN</b>	ARN purifié provenant de cellules cultivées dans du milieu deutérié avec des H-nucléosides (Protocole 2)
<b>H-<i>E. coli</i>, H<sub>2</sub>O</b>	<i>E. coli</i> natives (abondance naturelle) resuspendues en H <sub>2</sub> O
<b>H-<i>E. coli</i>, D<sub>2</sub>O</b>	<i>E. coli</i> natives resuspendues en D <sub>2</sub> O

<b>H-nucleoside</b>	nucléoside hydrogéné
<b>H-protéine</b>	Protéine purifiée provenant de cellules natives
<b>HD-protéine</b>	Protéine purifiée provenant de cellules cultivées dans du milieu deutérié avec des H-nucléosides (Protocole 2)
<b>HWHM</b>	demi-largeur à mi-hauteur
<b>ILL</b>	Institut Laue Langevin
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>M</b>	Molaire
<b>ml</b>	millilitre
<b>mM</b>	milliMolaire
<b>MSD</b>	Déplacement carré moyen
<b>MSF</b>	Fluctuation carrée moyenne
<b>MW</b>	Masse moléculaire
<b>MW<sub>exp</sub></b>	Masse moléculaire expérimentale
<b>ns</b>	nanoseconde
<b>N<sub>u</sub><sup>moy</sup></b>	Nucléotide fictif 'moyen'
<b>ps</b>	picoseconde
<b>Q</b>	transfert de vecteur d'onde
<b>QENS</b>	Diffusion Quasi-Elastique de Neutrons
<b>rpm</b>	tours par minute
<b>RNase</b>	RiboNucléAse

## 15 ABBREVIATIONS

<b>D-<i>E. coli</i>, H<sub>2</sub>O</b>	Deuterated <i>Escherichia coli</i> resuspended in H <sub>2</sub> O
<b>D-<i>E. coli</i>, D<sub>2</sub>O</b>	Deuterated <i>Escherichia coli</i> resuspended in D <sub>2</sub> O
<b>D-<i>E. coli</i>, HRNA, H<sub>2</sub>O</b>	Deuterated <i>Escherichia coli</i> , with selectively hydrogenated RNA, resuspended in H <sub>2</sub> O
<b>DNA</b>	DesoxyriboNucleic Acid
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EINS</b>	Elastic Incoherent Neutron Scattering
<b>EISF</b>	Elastic Incoherent Scattering Factor
<b>eV</b>	electronVolt
<b>FWHM</b>	Full-Width at Half-Maximum
<b>H-<i>E. coli</i>, H<sub>2</sub>O</b>	Native (natural abundance) <i>Escherichia coli</i> resuspended in H <sub>2</sub> O
<b>H-<i>E. coli</i>, D<sub>2</sub>O</b>	Native <i>Escherichia coli</i> resuspended in D <sub>2</sub> O
<b>HWHM</b>	Half-Width at Half-Maximum
<b>ILL</b>	Institut Laue Langevin
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>M</b>	Molar
<b>MD</b>	Molecular Dynamics
<b>ml</b>	milliliter
<b>mM</b>	milliMolar
<b>MSD</b>	Mean Square Displacement
<b>MSF</b>	Mean Square Fluctuation
<b>MW</b>	Molecular Weight
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>ns</b>	nanosecond
<b>ps</b>	picosecond
<b><i>Q</i></b>	(neutron) wave vector transfer

*Abbreviations*

---

<b>QENS</b>	Quasi-Elastic Neutron Scattering
<b>rpm</b>	round per minute
<b>RNA</b>	RiboNucleic Acid



## 16 REFERENCES

- Andreani, C., Filabozzi, A., Menzinger, F., Desideri, A., Deriu, A. and Di Cola, D. (1995) Dynamics of hydrogen atoms in superoxide dismutase by quasielastic neutron scattering. *Biophys J*, **68**, 2519-2523.
- Andrew, R.D. and MacVicar, B.A. (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience*, **62**, 371-383.
- Appavou, M.S., Gibrat, G. and Bellissent-Funel, M.C. (2006) Influence of pressure on structure and dynamics of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): small angle and quasi-elastic neutron scattering studies. *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 414-423.
- Artero, J.B., Hartlein, M., McSweeney, S. and Timmins, P. (2005) A comparison of refined X-ray structures of hydrogenated and perdeuterated rat  $\gamma$ E-crystallin in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**, 1541-1549.
- Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. (1975) Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, **14**, 5355-5373.
- Baldwin, R.L. (2007) Energetics of protein folding. *J Mol Biol*, **371**, 283-301.
- Ball, P. (2001) Life's matrix: water in the cell. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **47**, 717-720.
- Bastos, M., Castro, V., Mrevlishvili, G. and Teixeira, J. (2004) Hydration of ds-DNA and ss-DNA by neutron quasielastic scattering. *Biophys J*, **86**, 3822-3827.
- Bée, M. (1988) *Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*, Adam Hilger, Philadelphia.
- Bellissent-Funel, M.C., Chen, S.H. and Zanotti, J.M. (1995) Single-particle dynamics of water molecules in confined space. *Phys Rev E*, **51**, 4558-4569.
- Bellissent-Funel, M.C., Zanotti, J.M. and Chen, S.H. (1996) Slow dynamics of water molecules on the surface of a globular protein. *Faraday Discuss*, **103**, 281-294.
- Beta, I.A., Michalarias, I., Ford, R.C., Li, J.C. and Bellissent-Funel, M.C. (2003) Quasi-elastic neutron scattering study of hydrated DNA. *Chem Phys*, **292**, 541-542.
- Bicout, D.J. and Zaccai, G. (2001) Protein flexibility from the dynamical transition: a force constant analysis. *Biophys J*, **80**, 1115-1123.

- Bon, C., Dianoux, A.J., Ferrand, M. and Lehmann, M.S. (2002) A model for water motion in crystals of lysozyme based on an incoherent quasielastic neutron-scattering study. *Biophys J*, **83**, 1578-1588.
- Bonneté, F., Madern, D. and Zaccari, G. (1994) Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J Mol Biol*, **244**, 436-447.
- Bratton, C.B., Hopkins, A.L. and Weinberg, J.W. (1965) Nuclear magnetic resonance studies of living muscle. *Science*, **147**, 738-739.
- Brooks, C.L., Karplus, M. and Pettitt, B.M. (1988) Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Advan Chem Phys*, **71**, 1-249.
- Bruner, R. and Vinograd, J. (1965) The evaluation of standard sedimentation coefficients of sodium RNA and sodium DNA from sedimentation velocity data in concentrated NaCl and CsCl solutions. *Biochim Biophys Acta*, **108**, 18-29.
- Budayova-Spano, M., Fisher, S.Z., Dauvergne, M.T., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N., Myles, D.A. and McKenna, R. (2006) Production and X-ray crystallographic analysis of fully deuterated human carbonic anhydrase II. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**, 6-9.
- Busch, S., Doster, W., Longeville, S. and Sakai, V.G. (2006) Microscopic protein diffusion at high concentration. *MRS bulletin, QENS proceedings*.
- Caliskan, G., Briber, R.M., Thirumalai, D., Garcia-Sakai, V., Woodson, S.A. and Sokolov, A.P. (2006) Dynamic transition in tRNA is solvent induced. *J Am Chem Soc*, **128**, 32-33.
- Careri, G. (1998) Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, **70**, 223-249.
- Cayley, D.S., Guttman, H.J. and Record, M.T., Jr. (2000) Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys J*, **78**, 1748-1764.
- Chadwick, J. (1932a) The existence of a neutron. *Proc Roy Soc A*, **136**, 692-708.
- Chadwick, J. (1932b) Possible existence of a neutron. *Nature*, **129**, 312.
- Chakrabarti, G., Kim, S., Gupta, M.L., Jr., Barton, J.S. and Himes, R.H. (1999) Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry*, **38**, 3067-3072.
- Chen, S.H., Liu, L., Fratini, E., Baglioni, P., Faraone, A. and Mamontov, E. (2006) Observation of fragile-to-strong dynamic crossover in protein hydration water. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9012-9016.

- Chen, S.H., Teixeira, J. and Nicklow, R.M. (1982) Incoherent quasielastic neutron scattering from water in supercooled regime. *Phys Rev A*, **26**, 3477-3482.
- Cioni, P. and Strambini, G.B. (2002) Effect of heavy water on protein flexibility. *Biophys J*, **82**, 3246-3253.
- Conway, B.E. (1981) Ionic hydration in Chemistry and Biophysics. In Science, *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 12.
- Cooper, A. (2000) Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophys Chem*, **85**, 25-39.
- Cooper, S.J., Brockwell, D., Raftery, J., Attwood, D., Barber, J. and Helliwell, J.R. (1998) The X-ray crystal structures of perdeuterated and protiated enzyme elongation factor Tu are very similar. *Chem Comm*, **10**, 1063-1064.
- Cope, F.W. (1969) Nuclear magnetic resonance evidence using D<sub>2</sub>O for structured water in muscle and brain. *Biophys J*, **9**, 303-319.
- Cornicchi, E., Onori, G. and Paciaroni, A. (2005) Picosecond-time-scale fluctuations of proteins in glassy matrices: the role of viscosity. *Phys Rev Lett*, **95**, 158104.
- Daniel, E. and Banin, D. (1970) An internal standard for the determination of buoyant density of RNA in CsCl density gradient. *Biochim Biophys Acta*, **224**, 311-318.
- Darquie, A., Poline, J.B., Poupon, C., Saint-Jalmes, H. and Le Bihan, D. (2001) Transient decrease in water diffusion observed in human occipital cortex during visual stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9391-9395.
- Dellerue, S., Petrescu, A.J., Smith, J.C. and Bellissent-Funel, M.C. (2001) Radially softening diffusive motions in a globular protein. *Biophys J*, **81**, 1666-1676.
- Dennison, S.R., Hauss, T., Dante, S., Brandenburg, K., Harris, F. and Phoenix, D.A. (2006) Deuteration can affect the conformational behaviour of amphiphilic alpha-helical structures. *Biophys Chem*, **119**, 115-120.
- Doster, W., Cusack, S. and Petry, W. (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**, 754-756.
- Doster, W. and Longeville, S. (2007) Microscopic diffusion and hydrodynamic interactions of hemoglobin in red blood cells. *Biophys J*, **93**, 1360-1368.
- Efimova, Y.M., Haemers, S., Wierczinski, B., Norde, W. and van Well, A.A. (2007) Stability of globular proteins in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *Biopolymers*, **85**, 264-273.
- Eggers, D.K. and Valentine, J.S. (2001) Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Sci*, **10**, 250-261.

- Ellis, R.J. (2001a) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-119.
- Ellis, R.J. (2001b) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, **26**, 597-604.
- Ellis, R.J. and Minton, A.P. (2003) Cell biology: join the crowd. *Nature*, **425**, 27-28.
- Elowitz, M.B., Surette, M.G., Wolf, P.E., Stock, J.B. and Leibler, S. (1999) Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 197-203.
- Esposito, L., Vitagliano, L., Zagari, A. and Mazzarella, L. (2000) Experimental evidence for the correlation of bond distances in peptide groups detected in ultrahigh-resolution protein structures. *Protein Eng*, **13**, 825-828.
- Fenimore, P.W., Frauenfelder, H., McMahon, B.H. and Young, R.D. (2004) Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to  $\alpha$ - and  $\beta$ -fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14408-14413.
- Ferrand, M., Dianoux, A.J., Petry, W. and Zaccai, G. (1993) Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9668-9672.
- Fitter, J., Lechner, R.E., Buldt, G. and Dencher, N.A. (1996a) Internal molecular motions of bacteriorhodopsin: hydration-induced flexibility studied by quasielastic incoherent neutron scattering using oriented purple membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7600-7605.
- Fitter, J., Lechner, R.E., Büldt, G. and Dencher, N.A. (1996b) Temperature dependence of molecular motions in the membrane protein bacteriorhodopsin from QINS. *Physica B*, **226**, 61-65.
- Fitter, J., Lechner, R.E. and Dencher, N.A. (1997) Picosecond molecular motions in bacteriorhodopsin from neutron scattering. *Biophys J*, **73**, 2126-2137.
- Fitter, J., Ernst, O.P., Hauß, T., Lechner, R.E., Hofmann, K.P. and Dencher, N.A. (1998) Molecular motions and hydration of purple membranes and disk membranes studied by neutron scattering. *Eur Biophys J*, **27**, 638-645.
- Fitter, J., Lechner, R.E. and Dencher, N.A. (1999) Interactions of hydration water and biological membranes studied by neutron scattering. *J Phys Chem B*, **103**, 8036-8050.
- Ford, R.C., Ruffle, S.V., Ramirez-Cuesta, A.J., Michalarias, I., Beta, I., Miller, A. and Li, J. (2004) Inelastic incoherent neutron scattering measurements of intact cells and tissues and detection of interfacial water. *J Am Chem Soc*, **126**, 4682-4688.

- Frauenfelder, H., Parak, F. and Young, R.D. (1988) Conformational substates in proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **17**, 451-479.
- Frauenfelder, H., Sligar, S.G. and Wolynes, P.G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**, 1598-1603.
- Gabel, F. (2005) Protein dynamics in solution and powder measured by incoherent elastic neutron scattering: the influence of Q-range and energy resolution. *Eur Biophys J*, **34**, 1-12.
- Gabel, F., Bicout, D., Lehnert, U., Tehei, M., Weik, M. and Zaccai, G. (2002) Protein dynamics studied by neutron scattering. *Q Rev Biophys*, **35**, 327-367.
- Gabel, F., Weik, M., Doctor, B.P., Saxena, A., Fournier, D., Brochier, L., Renault, F., Masson, P., Silman, I. and Zaccai, G. (2004) The influence of solvent composition on global dynamics of human butyrylcholinesterase powders: a neutron-scattering study. *Biophys J*, **86**, 3152-3165.
- Gerstein, M. and Chothia, C. (1996) Packing at the protein-water interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 10167-10172.
- Ginzburg, B.Z. and Ginzburg, M. (1982) In *Biophysics of water*. eds Franks F, Mathias SF, (Interscience, London) pp. 340–343.
- Ginzburg, M. and Ginzburg, B.Z. (1975) Factors influencing the retention of K in a Halobacterium. *Biomembranes*, **7**, 219-251.
- Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z. and Tosteson, D.C. (1971) The effect of anions on K<sup>+</sup>-binding in a Halobacterium species. *J membrane Biol*, **6**, 259-268.
- Goodsell, D.S. (1993) *The Machinery of Life*. Springer-Verlag.
- Guinier, A. and Fournet, G. (1955) *Small Angle Scattering of X-Rays*, J. Wiley and Sons, New York.
- Halle, B. (2004) Protein hydration dynamics in solution: a critical survey. *Phil Trans R Soc Lond B* **359**, 1207-1224.
- Hattori, A., Crespi, H.L. and Katz, J.J. (1965) Effect of side-chain deuteration on protein stability. *Biochemistry*, **4**, 1213-1225.
- Hazlewood, C.F., Rorschach, H.E. and Lin, C. (1991) Diffusion of water in tissues and MRI. *Magn Reson Med*, **19**, 214-216.
- Huennekens, F.M. (1994) The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul*, **34**, 397-419.

- Jimenez, R., Salazar, G., Yin, J., Joo, T. and Romesberg, F.E. (2004) Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3803-3808.
- Kasturi, S.R., Chang, D.C. and Hazlewood, C.F. (1980) Study of anisotropy in nuclear magnetic resonance relaxation times of water protons in skeletal muscle. *Biophys J*, **30**, 369-381.
- Kern, D., Zaccai, G. and Giege, R. (1980) Effect of heavy water substitution for water on the tRNA<sup>Val</sup>-valyl-tRNA synthetase system from yeast. *Biochemistry*, **19**, 3158-3164.
- Kuhlman, B., Luisi, D.L., Evans, P.A. and Raleigh, D.P. (1998) Global analysis of the effects of temperature and denaturant on the folding and unfolding kinetics of the N-terminal domain of the protein L9. *J Mol Biol*, **284**, 1661-1670.
- Le Bihan, D. and Breton, E. (1985) Imagerie de diffusion *in vivo* par résonance magnétique nucléaire. *C R Acad Sc Paris* **301**, 1109-1112.
- Le Bihan, D., Breton, E., Lallemand, D., Grenier, P., Cabanis, E. and Laval-Jeantet, M. (1986) MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, **161**, 401-407.
- Le Bihan, D. (2003) Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 469-480.
- Le Bihan, D., Urayama, S., Aso, T., Hanakawa, T. and Fukuyama, H. (2006) Direct and fast detection of neuronal activation in the human brain with diffusion MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8263-8268.
- Le Bihan, D. (2007) The 'wet mind': water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol*, **52**, R57-R90.
- Linderström-Lang, K.U. and Scheliman, J.A. (1959) *Enzyme*, **1**.
- Liu, X., Hanson, B.L., Langan, P. and Viola, R.E. (2007) The effect of deuteration on protein structure: a high-resolution comparison of hydrogenous and perdeuterated haloalkane dehalogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **63**, 1000-1008.
- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*, **192**, 189-221.
- Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, **4**, 91-98.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2000) *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall.

- Makhatadze, G.I., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1995) Solvent isotope effect and protein stability. *Nat Struct Biol*, **2**, 852-855.
- Martin, J. and Hartl, F.U. (1997) The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1107-1112.
- Maybury, R.H. and Katz, J.J. (1956) Protein Denaturation in Heavy Water. *Nature*, **177**, 629-630.
- Mc Cammon, J.A. and Harvey, S.C. (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, New York.
- Meilleur, F., Dauvergne, M.T., Schlichting, I. and Myles, D.A. (2005) Production and X-ray crystallographic analysis of fully deuterated cytochrome P450cam. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**, 539-544.
- Mentré, P. (2001) An introduction to "Water in the cell": tamed Hydra? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **47**, 709-715.
- MODES. A graphic user interface for IRIS data analysis. [http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes\\_manual.pdf](http://www.isis.rl.ac.uk/molecularspectroscopy/osiris/Modes_manual.pdf).
- Modig, K., Liepinsh, E., Otting, G. and Halle, B. (2004) Dynamics of protein and peptide hydration. *J Am Chem Soc*, **126**, 102-114.
- Moseley, M.E., Cohen, Y., Kucharczyk, J., Mintorovitch, J., Asgari, H.S., Wendland, M.F., Tsuruda, J. and Norman, D. (1990) Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*, **176**, 439-445.
- Nagendra, H.G., Sukumar, N. and Vijayan, M. (1998) Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: the crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration. *Proteins*, **32**, 229-240.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*. Freeman, New York.
- Némethy, G. and Scheraga, H.A. (1964) Structure of Water and Hydrophobic Bonding in Proteins. IV. The Thermodynamic Properties of Liquid Deuterium Oxide. *J Chem Phys*, **41**, 680-689.
- Paciaroni, A., Cinelli, S. and Onori, G. (2002) Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study. *Biophys J*, **83**, 1157-1164.
- Paciaroni, A., Orecchini, A., Cinelli, S., Onori, G., Lechner, R.E. and Pieper, J. (2003) Protein dynamics on the picosecond timescale as affected by the environment: a quasielastic neutron scattering study. *Chem Phys*, **292**, 397-404.
- Parak, F.G. (2003) Physical aspects of protein dynamics. *Rep Prog Phys*, **66**, 103-129.

- Parker, M.J. and Clarke, A.R. (1997) Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochem*, **36**, 5786-5794.
- Pérez, J., Zanotti, J.M. and Durand, D. (1999) Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution. *Biophys J*, **77**, 454-469.
- Réat, V., Patzelt, H., Ferrand, M., Pfister, C., Oesterhelt, D. and Zaccai, G. (1998) Dynamics of different functional parts of bacteriorhodopsin: H-<sup>2</sup>H labeling and neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4970-4975.
- Record, M.T., Courtenay, E.S., Cayley, D.S. and Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci*, **23**, 143-148.
- Roh, J.H., Curtis, J.E., Azzam, S., Novikov, V.N., Peral, I., Chowdhuri, Z., Gregory, R.B. and Sokolov, A.P. (2006) Influence of hydration on the dynamics of lysozyme. *Biophys J*, **91**, 2573-2588.
- Rousseau, F. and Schymkowitz, J. (2005) A systems biology perspective on protein structural dynamics and signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 23-30.
- Ruffle, S.V., Michalarias, I., Li, J.C. and Ford, R.C. (2002) Inelastic incoherent neutron scattering studies of water interacting with biological macromolecules. *J Am Chem Soc*, **124**, 565-569.
- Russo, D., Murarka, R.K., Copley, J.R.D. and Head-Gordon, T. (2005) Molecular view of water dynamics near model peptides. *J Phys Chem B*, **109**, 12966-12975.
- Sasisanker, P., Oleinikova, A., Weingärtner, H., Ravindra, R. and Winter, R. (2004) Solvation properties and stability of ribonuclease A in normal and deuterated water studied by dielectric relaxation and differential scanning/pressure perturbation calorimetry. *Phys Chem Chem Phys*, **6**, 1899-1905.
- Schreiner, L.J., Pintar, M.M., Dianoux, A.J., Volino, F. and Rupprecht, A. (1988) Hydration of NaDNA by neutron quasi-elastic scattering. *Biophys J*, **53**, 119-122.
- Sears, V.F. (1966) *Can J Phys*, **44**, 1299-1311.
- Shcherbakova, I.V., Zgurskaya, E.I., Xin Fan, L., Serdyuk, I.N. and Zaccai, G. (1997) Metabolic regulation of selective deuterium incorporation into RNA and protein components of the ribosome. In Stephen Cusack, H.B., Michel Ferrand, Paul Langan and Peter Timmins, *Biological macromolecular dynamics*, Adenine Press, Institut Laue Langevin, pp. 165-169.
- Smith, J.C. (1991) Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q Rev Biophys*, **24**, 227-291.



- Sposito, G. (1981) *J Chem Phys*, **74**, 6943–6949.
- Sundararaj, S., Guo, A., Habibi-Nazhad, B., Rouani, M., Stothard, P., Ellison, M. and Wishart, D.S. (2004) The CyberCell Database (CCDB): a comprehensive, self-updating, relational database to coordinate and facilitate in silico modeling of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **32**, D293-295.
- Tehei, M., Madern, D., Pfister, C. and Zaccai, G. (2001) Fast dynamics of halophilic malate dehydrogenase and BSA measured by neutron scattering under various solvent conditions influencing protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14356-14361.
- Tehei, M., Franzetti, B., Madern, D., Ginzburg, M., Ginzburg, B.Z., Giudici-Ortoni, M.T., Bruschi, M. and Zaccai, G. (2004) Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared *in vivo* by neutron scattering. *EMBO Rep*, **5**, 66-70.
- Tehei, M., Madern, D., Franzetti, B. and Zaccai, G. (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J Biol Chem*, **280**, 40974-40979.
- Tehei, M., Smith, J.C., Monk, C., Ollivier, J., Oetl, M., Kurkal, V., Finney, J.L. and Daniel, R.M. (2006a) Dynamics of immobilized and native *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by quasielastic neutron scattering. *Biophys J*, **90**, 1090-1097.
- Tehei, M., Daniel, R. and Zaccai, G. (2006b) Fundamental and biotechnological applications of neutron scattering measurements for macromolecular dynamics. *Eur Biophys J*, **35**, 551-558.
- Tehei, M., Franzetti, B., Wood, K., Gabel, F., Fabiani, E., Jasnin, M., Zamponi, M., Oesterhelt, D., Zaccai, G., Ginzburg, M. and Ginzburg, B.Z. (2007) Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 766-771.
- Tehei, M. and Zaccai, G. (2007) Adaptation to high temperatures through macromolecular dynamics by neutron scattering. *Febs J*, **274**, 4034-4043.
- Teixeira, J., Bellissent-Funel, M.C., Chen, S.H. and Dianoux, A.J. (1985) *Phys Rev A*, **31**, 1913-1917.
- Teixeira, J. and Luzar, A. (1999), IOS, Amsterdam.
- Tousignant, A. and Pelletier, J.N. (2004) Protein motions promote catalysis. *Chem Biol*, **11**, 1037-1042.

- Trantham, E.C., Rorschach, H.E., Clegg, J.S., Hazlewood, C.F., Nicklow, R.M. and Wakabayashi, N. (1984) Diffusive properties of water in *Artemia* cysts as determined from quasi-elastic neutron scattering spectra. *Biophys J*, **45**, 927-938.
- Volino, F. and Dianoux, A.J. (1980) Neutron incoherent scattering law for diffusion in a potential of spherical symmetry: general formalism and application to diffusion inside a sphere. *Mol Phys*, **41**, 271-279.
- Wood, K. (2007) Dynamical heterogeneity of the purple membrane: a study combining isotope labelling, neutron scattering and molecular dynamics simulations. *Thèse*, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Wood, K., Plazanet, M., Gabel, F., Kessler, B., Oesterhelt, D., Tobias, D., Zaccai, G. and Weik, M. (2007) Coupling of protein and solvent dynamics in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18049-18054.
- Zaccai, G. (2000) How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, **288**, 1604-1607.
- Zanotti, J.M., Bellissent-Funel, M.C. and Parello, J. (1997) Dynamics of a globular protein as studied by neutron scattering and solid-state NMR. *Physica B*, **234**, 228-230.
- Zanotti, J.M., Bellissent-Funel, M.C. and Parello, J. (1999) Hydration-coupled dynamics in proteins studied by neutron scattering and NMR: the case of the typical EF-hand calcium-binding parvalbumin. *Biophys J*, **76**, 2390-2411.
- Zhong, J., Petroff, O.A., Prichard, J.W. and Gore, J.C. (1993) Changes in water diffusion and relaxation properties of rat cerebrum during status epilepticus. *Magn Reson Med*, **30**, 241-246.
- Zimmerman, S.B. and Trach, S.O. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **222**, 599-620.
- Zimmerman, S.B. and Minton, A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 27-65.



L'objectif de la thèse était d'étudier la dynamique des molécules biologiques *in vivo*, sur l'échelle de la pico- à la nanoseconde (ps-ns), en combinant la diffusion incohérente de neutrons et le marquage isotopique hydrogène/deutérium.

Les mouvements diffusifs de l'eau ont été explorés dans le cytoplasme d'*E. coli*. L'étude a établi que la diffusion de l'eau intracellulaire est similaire à celle de l'eau pure, à température physiologique. Ce travail infirme le paradigme établi, selon lequel l'eau cellulaire est fortement ralentie par l'encombrement macromoléculaire.

Les mouvements moléculaires internes et la diffusion globale des macromolécules ont été étudiés *in vivo*. Les résultats montrent que la proportion d'eau intracellulaire est un facteur déterminant dans la dynamique interne des macromolécules *in vivo*. L'encombrement macromoléculaire atténue cependant l'effet lubrifiant de l'eau sur les mouvements moléculaires internes. L'étude témoigne du fait que les échantillons standards (poudres et solutions) ne miment pas l'environnement physiologique.

L'effet isotopique du solvant et l'influence de la deutériation sur la dynamique macromoléculaire moyenne, ont été explorés *in vivo*. Les macromolécules natives sont moins flexibles et moins résilientes en D<sub>2</sub>O. La deutériation augmente légèrement la flexibilité structurale et diminue faiblement la résilience, ce qui suggère que l'utilisation du marquage isotopique est justifiée pour les études dynamiques.

Ce travail souligne l'importance du contrôle négatif lors des mesures sur des échantillons sélectivement marqués et montre qu'un taux de marquage conséquent (> 10 %) est nécessaire pour observer la dynamique d'un composant spécifique.

**Mots clés :** diffusion incohérente de neutrons, marquage isotopique hydrogène/deutérium, *E. coli*, dynamique, ps-ns, eau cellulaire, macromolécules, mouvements internes et globaux, flexibilité, résilience, encombrement macromoléculaire

The aim of the thesis was to investigate the dynamics of biological molecules *in vivo*, on the pico- to nanosecond (ps-ns) time-scale, using a combination of incoherent neutron scattering and hydrogen/deuterium labelling.

We measured water dynamics in the cytoplasm of *E. coli*. The study showed that water diffusion in the bacteria is pure-like at physiological temperature. The work invalidated the established paradigm, according to which cellular water is strongly slowed down by macromolecular confinement.

The internal molecular motions and the self-diffusion of *E. coli* macromolecules were studied *in vivo*. The results demonstrated that the large amount of cell water plays a decisive role in internal dynamics *in vivo*. Macromolecular crowding, however, attenuates slightly the lubricating effect of water. The study showed that standard samples (powders and solutions) do not mimic accurately the physiological environment.

The solvent isotope effect and the influence of macromolecular deuteration on average macromolecular dynamics were explored *in vivo*. Flexibility and resilience were both found to be smaller in D<sub>2</sub>O. Macromolecular deuteration increases slightly structural flexibility and decreases slightly resilience, which suggests that the use of isotopic labelling is justified for dynamics studies.

The work underlines the importance of the negative control for measurements on selectively labelled samples, and shows that a significant labelling ratio (> 10 %) is necessary to investigate the dynamics of a specific component.

**Key words:** incoherent neutron scattering, isotopic hydrogen/deuterium labelling, *E. coli*, dynamics, ps-ns, cell water, macromolecules, internal and global motions, flexibility, resilience, macromolecular crowding