

I would like to thank Professor K.C. Holmes and Dr J. Barrington Leigh for helpful discussions, and Mrs G. Eulefeld for her assistance with the diagrams. I am particularly grateful to Dr E. Mandelkow, who provided the TMV data, and generously made available his own results.

References

- ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I. A. (1965). *Handbook of Mathematical Functions*. New York: Dover.
- BARRETT, A. N., BARRINGTON LEIGH, J., HOLMES, K. C., LEBERMAN, R., MANDELKOW, E., VON SENGBUSCH, P., & KLUG, A. (1971). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36**, 433–448.
- BARRINGTON LEIGH, J. (1970). *Method for the X-ray diffraction Analysis of a Helical Virus*. Thesis, Univ. of Cambridge.
- COHEN, C. & HOLMES, K. C. (1963). *J. Mol. Biol.* **6**, 423–432.
- ELLIOT, A. (1968). *Symposium on Fibrous Proteins*, Edited by W. G. CREWETHER. Sydney: Butterworths.
- FRANKLIN, R. E. & GOSLING, R. G. (1953). *Acta Cryst.* **6**, 678–685.
- FRASER, R. D. B., MACRAE, T. P., PARRY, D. A. D. & SUZUKI, E. (1971). *Polymer*, **12**, 35–56.
- HALL, C. E. (1958). *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 2556–2557.
- HOLMES, K. C. (1959). *X-ray Diffraction Studies on Tobacco Mosaic Virus and Related Substances*. Thesis, Univ. of London.
- HOLMES, K. C. & BARRINGTON LEIGH, J. (1974). *Acta Cryst.* **A30**, 635–638.
- LANGRIDGE, R., WILSON, H. R., HOOPER, C. W., WILKINS, M. H. F., & HAMILTON, L. D. (1960). *J. Mol. Biol.* **2**, 19–37.
- MANDELKOW, E. (1973). *Röntgenstrukturuntersuchung am Tabakmosaicvirus*. Thesis, Univ. of Heidelberg.
- WILLIAMS, R. C. & STEERE, R. L. (1951). *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 2057–2061.

Acta Cryst. (1974). **A30**, 645

Morphologie et Propriétés Optiques des Cristaux de Lysozyme de Poule de Type Quadratique et Orthorhombique

PAR BERNARD CERVELLE, FABIEN CESBRON ET JEAN BERTHOU

Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie, associé au CNRS, Université de Paris VI, Tour 16, 4 place Jussieu, 75230 Paris Cédex 05, France

ET PIERRE JOLLÉS

Laboratoire de Biochimie, Université de Paris VI, 96 boulevard Raspail, 75272 Paris Cédex 06, France

(Reçu le 12 mars 1974, accepté le 10 avril 1974)

Large crystals of hen egg-white (HEW) lysozyme, both tetragonal and orthorhombic, have been studied with a goniometer and optical methods. As the crystals are particularly stable, some of their optical properties have been measured, mainly the refractive indices determined from reflectance measurements under a photometric microscope. Orthorhombic HEW lysozyme: crystals show the faces (010), (011) and (110). Refractive indices $n_{[001]} = n_g = 1.562$ to 1.547 ($\lambda = 480$ – 640 nm); $n_{[100]} = n_m = 1.560$ to 1.544 ; $n_{[010]} = n_p = 1.550$ to 1.532 . Maximum birefringence 0.013 ($\lambda = 589$ nm). Optic axial angle $2V = 48$ to 51° . Tetragonal HEW lysozyme: crystals formed by the association of a tetragonal $\{110\}$ prism and a $\{101\}$ tetragonal bipyramid. Refractive indices $n_{[001]} = n_e$ and $n_{[100]} = n_o$, with an aging phenomenon in these crystals, n_e varying between 1.580 and 1.545 , n_o between 1.575 and 1.538 ($\lambda = 589$ nm). Maximum birefringence 0.007 . HEW lysozyme crystals are examples of good-quality protein crystals. Their refractive indices are surprisingly high for organic substances.

Introduction

L'obtention de cristaux de protéines de dimensions millimétriques rend possible, en principe, l'étude de leurs propriétés optiques. Peu d'études ont été consacrées à ces problèmes depuis celles que Perutz, Bragg & Pippard ont faites en 1953 sur des cristaux d'hémoglobine. Ceci s'explique par le fait que la cristallographie vise essentiellement à la connaissance de la structure moléculaire de la protéine et non à celle des propriétés physiques du cristal, et d'autre part parce qu'une telle étude présente de nombreuses difficultés.

La plupart des cristaux de protéine sont très sensibles à toute variation du milieu de cristallisation et ne supportent d'en être séparés qu'un court laps de temps. Beaucoup d'autres sont instables dans le temps et passent à l'état amorphe plus ou moins rapidement.

Le cas qui été choisi dans cette étude, les cristaux de lysozyme de blanc d'oeuf de poule (EC 3.2.1.17), était intéressant à plus d'un titre. D'une part la structure cristalline de lysozyme a été déterminée (Blake, Mair, North, Phillips & Sarma, 1967) à partir de cristaux quadratiques, appelés dans cette étude cristaux de type *A*. D'autre part, une deuxième forme cristal-

line a récemment été décrite (Jollés & Berthou, 1972; Berthou & Jollés, 1974), orthorhombique, appelée forme *B*, et il existe entre les deux formes une transition de phase *A* → *B* aux environs de 25°C; les cristaux de cette forme *B* présentaient l'avantage d'être d'une stabilité remarquable.

Même si la structure moléculaire du lysozyme est la même dans les deux systèmes cristallins, il devenait intéressant de comparer les propriétés optiques de ces cristaux. En effet, la position et l'orientation des molécules étant connues dans la forme *A*, on pouvait se demander ce qu'elles devenaient dans la forme *B*. Il était important de pouvoir conclure à l'homologie paramétrique par exemple, et de caractériser la direction où la densité de matière était la plus grande.

Méthodes

I. Etude morphologique

Une étude au goniomètre à deux cercles a été entreprise sur des cristaux de 0,3 à 1 mm. Il n'a pas été possible de faire des mesures sur des cristaux dans leur état normal d'hydratation, les différentes tentatives en vue de vernir leurs faces dès leur sortie de la solution mère s'étant révélées infructueuses. Les mesures ont donc été faites sur des cristaux partiellement déshydratés, en supposant que la contraction des paramètres, due à cette dessiccation et différente suivant les directions, n'était pas assez importante pour modifier profondément la morphologie cristalline et pour introduire une ambiguïté sur la notation des faces, celles-ci devant par ailleurs avoir des indices $\{hkl\}$ simples.

II. Détermination des propriétés optiques: technique des mesures

Compte tenu des difficultés de manipulation de ces cristaux extrêmement fragiles, une méthode indirecte de détermination des indices de réfraction de ces protéines a été utilisée. Elle consiste à mesurer, au microscope polarisant en lumière réfléchie, les réflectances principales – c'est-à-dire parallèlement aux directions de vibrations privilégiées – de faces orientées naturelles de ces cristaux (Cervelle, 1971; Caye & Cervelle, 1968). Dans une direction résultant de l'intersection du plan de polarisation avec la surface cristalline, la réflectance *R* est liée à l'indice de réfraction *n* de la substance immergée dans un milieu isotrope d'indice *N* par la relation de Fresnel appliquée à un milieu transparent:

$$R = \frac{(n - N)^2}{(n + N)^2} .$$

Dans l'air, $N = 1$, d'où

$$n = \frac{1 + \sqrt{R}}{1 - \sqrt{R}} ,$$

pour une longueur d'onde donnée et dans la direction définie ci-dessus.

Le microréfectomètre utilisé se compose d'une source 6V/5A, hautement stabilisée, d'un monochromateur à prisme ($\Delta\lambda_{\text{moyen}} = 6\text{nm}$), d'un microscope polarisant en réflexion muni d'un prisme de Berek, de diaphragmes d'ouverture, de champ et de mesure pour canaliser le faisceau lumineux, d'un photomultiplicateur à cathode S 20, enfin d'un voltmètre numérique à quatre chiffres et six gammes de mesure, permettant de mesurer le microvolt.

Pour chaque mesure, le cristal a été placé sur une tête goniométrique qui, posée sur la platine du microscope, a permis, par autocollimation, d'orienter la face cristalline à mesurer perpendiculairement à l'axe du microscope (incidence normale), après orientation préalable au goniomètre.

Les deux directions de vibrations privilégiées de chaque face, situées à 90° l'une de l'autre, correspondent à un maximum et à un minimum consécutifs de l'intensité de la lumière polarisée réfléchie, quand on tourne de 360° la platine du microscope. L'étalon de comparaison était un verre neutre de réflectance moyenne 4,3%. Les cristaux étant transparents et les dimensions des plages mesurables inférieures à 100 μm, un objectif de grossissement 45 et d'ouverture numérique 0,65 a été utilisé. Dans ces conditions, chaque réflectance doit être mesurée avec le plan de polarisation successivement parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence. La réflectance réelle dans la direction choisie s'obtient en effectuant la moyenne arithmétique de R_{\parallel} et R_{\perp} (Caye, 1970).

Chaque mesure a été répétée trois fois et en ½ h de temps, immédiatement après le prélèvement des cristaux dans leur solution mère, pour neuf longueurs d'onde du spectre visible, tous les 20 nm, de 480 à 640 nm; ceci a permis de tracer les courbes de dispersion des réflectances principales de chaque cristal, de calculer les indices de réfraction correspondants, de déterminer les biréfringences principales, les signes optiques et les angles 2 *V* des axes optiques (pour le lysozyme *B* qui est biaxe). Notons enfin que la température de la salle d'expérience a varié entre 21,7 et 23,5°C au cours des mesures.

Résultats

I. Etude morphologique

Lysozyme de forme *B* (orthorhombique)

Les cristaux représentés sur la Fig. 1 sont relativement gros et peuvent atteindre 1,2 cm. Ils ont parfois un faciès aciculaire, la face (010) pouvant être très réduite. L'angle ϱ observé entre la direction de l'axe *c* et la normale à la face (011) est égal à 26° 10', pour une valeur théorique de 28° 22' sur un cristal hydraté: ceci traduirait une contraction relative plus importante du paramètre *c* par rapport à *a*. L'angle φ observé entre la normale à la face (110) et la direction de *b* est égal à 51° 10', pour une valeur théorique de 52° 40': le paramètre *b* subirait donc une contraction relative plus importante que celle de *a* lors de la dessiccation.

Lysozyme de forme A (quadratique)

Les cristaux, fréquemment biterminés, sont formés par l'association du prisme quadratique {110} et de la dipyramide quadratique {101} (Fig. 2). Le faciès peut varier suivant les conditions de cristallisation, les cristaux pouvant être assez allongés, ou au contraire présenter un prisme très réduit. Ce dernier existe cependant toujours et la pyramide seule n'a jamais été observée.

L'angle ϱ entre la normale à la face (101) et l'axe quaternaire est théoriquement égal à $25^{\circ}36'$ pour un cristal hydraté ($a=b=79,1$, $c=37,9$ Å) et $23^{\circ}46'$ pour un cristal sec ($a=b=71,1$, $c=31,3$ kX; Palmer, Ballantyre & Calvin, 1948). La moyenne des mesures sur trois cristaux ayant donné un angle de $24^{\circ}10'$, il n'y a donc place pour aucune ambiguïté dans la notation des faces: l'angle ϱ pour la face (111) devrait être en effet compris entre $31^{\circ}55'$ et $34^{\circ}07'$.

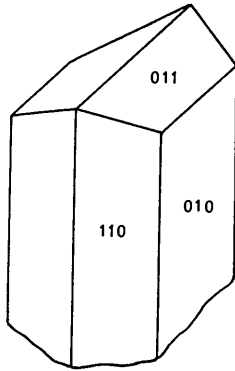


Fig. 1. Cristal de lysozyme orthorhombique de poule.

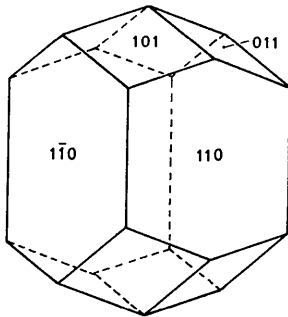


Fig. 2. Cristal de lysozyme quadratique de poule.

II. Détermination des propriétés optiques

Lysozyme de forme B (orthorhombique)

Les réflectances ont été mesurées dans les directions [001] et [100] sur la face (010), et dans la direction $[\bar{1}10]$ sur la face (110). L'application de la relation de Fresnel, $n = 1 + \sqrt{R}/1 - \sqrt{R}$, fournit donc $n_{[100]}$, $n_{[001]}$ et $n_{[\bar{1}10]}$. Il est aisé de calculer $n_{[010]}$ à partir de $n_{[100]}$ et $n_{[\bar{1}10]}$, en connaissant l'angle $\varphi = 51^{\circ}$ entre les normales aux faces (110) et (010), par la relation:

$$n_{[010]} = \frac{n_{[\bar{1}10]} - n_{[100]} \sin^2 \varphi}{1 - \sin^2 \varphi}$$

Le Tableau 1 fournit les valeurs des réflectances mesurées et des indices de réfraction calculées pour les trois directions OX , OY et OZ , pour neuf longueurs d'onde du spectre étudié.

Il ressort que

$$\begin{aligned} n_{[001]} || OZ &= n_g \\ n_{[100]} || OX &= n_m \\ n_{[010]} || OY &= n_p \end{aligned}$$

La biréfringence maximale est de 0,013 (pour $\lambda = 589$ nm). Le signe optique est négatif (B^-) et l'angle $2V$ des axes optiques subit une dispersion d'environ 14° sur l'étendue du spectre étudié.

Lysozyme de forme A (quadratique)

Les réflectances ont été mesurées dans les directions [001] et [100] sur une face (110) du prisme quadratique. Le calcul fournit $n_{[001]}$ parallèlement à OZ et $n_{[100]}$ parallèlement à OX .

Trois cristaux du lysozyme quadratique ont été prélevés à quelques jours d'intervalle dans la même solution mère, et ont été mesurés chaque fois immédiatement après le prélèvement. Les résultats apparaissent dans le Tableau 2.

Il ressort que $n_e = n_{[001]} > n_o = n_{[100]}$. Le cristal est donc uniaxe positif (U^+). Sa biréfringence maximale, pour $\lambda = 589$ nm, est de l'ordre de 0,007.

Discussion

Des mesures répétitives espacées dans le temps sur différents cristaux de la forme B orthorhombique, tirés de leur solution mère immédiatement avant l'expérience, ont fourni des résultats voisins, à la précision des mesures près (Tableau 1).

Tableau 1. Réflectances (%), indices de réfraction principaux et angle des axes optiques d'un cristal de lysozyme orthorhombique (B) de poule

λ (nm)	480	500	520	540	560	580	600	620	640
$R_{[001]}$	4,81	4,77	4,74	4,71	4,68	4,66	4,64	4,63	4,62
$R_{[100]}$	4,78	4,74	4,70	4,67	4,64	4,62	4,60	4,58	4,57
$R_{[\bar{1}10]}$	4,73	4,68	4,64	4,61	4,58	4,56	4,54	4,52	4,51
$n_{[001]} = n_g$	1,562	1,559	1,557	1,554	1,552	1,550	1,549	1,548	1,547
$n_{[100]} = n_m$	1,560	1,557	1,554	1,551	1,549	1,547	1,546	1,545	1,544
$n_{[\bar{1}10]}$	1,556	1,552	1,549	1,547	1,545	1,543	1,541	1,540	1,539
$n_{[010]} = n_p$	1,550	1,547	1,544	1,541	1,539	1,537	1,535	1,533	1,532
$2V$	48°	51°	54°	56°	57°	58°	59°	60°	61°
Précisions					$R: \pm 0,07\%$	$n: \pm 0,008$	$2V: \pm 2^{\circ}$		

Tableau 2. Réflectances (%) et indices de réfraction principaux de trois cristaux de lysozyme quadratique (A) de poule, issus de la même solution mère: trois mesures, chacune à quatre jours d'intervalles

λ (nm)		480	500	520	540	560	580	600	620	640
1 ^e mesure	$R_{\{001\}}$	5,18	5,15	5,12	5,10	5,08	5,06	5,04	5,03	5,02
		$R_{\{100\}}$	5,11	5,08	5,05	5,03	5,01	4,99	4,97	4,96
	$n_e = n_{\{001\}}$	1,590	1,587	1,585	1,583	1,582	1,580	1,579	1,578	1,577
	$n_o = n_{\{100\}}$	1,584	1,582	1,580	1,578	1,577	1,575	1,574	1,573	1,572
2 ^e mesure (+ 4 jours)	$R_{\{001\}}$	5,05	5,02	4,99	4,97	4,95	4,94	4,93	4,92	4,91
		$R_{\{100\}}$	4,97	4,94	4,92	4,90	4,89	4,87	4,86	4,84
	$n_e = n_{\{001\}}$	1,580	1,577	1,575	1,573	1,572	1,571	1,570	1,569	1,569
	$n_o = n_{\{100\}}$	1,574	1,571	1,570	1,569	1,568	1,567	1,566	1,565	1,564
3 ^e mesure (+ 8 jours)	$R_{\{001\}}$	4,68	4,66	4,64	4,62	4,60	4,59	4,58	4,57	4,56
		$R_{\{100\}}$	4,60	4,58	4,56	4,54	4,53	4,51	4,50	4,49
	$n_e = n_{\{001\}}$	1,553	1,550	1,548	1,547	1,546	1,545	1,544	1,543	1,542
	$n_o = n_{\{100\}}$	1,546	1,544	1,542	1,540	1,539	1,538	1,537	1,536	1,535

Précisions

R: $\pm 0,07\%$ n: $\pm 0,008$

Par contre, le Tableau 2 montre que trois cristaux de la forme A quadratique, prélevés dans la même solution à quelques jours d'intervalle et mesurés aussitôt après, fournissent des indices de réfraction de plus en plus petits: ces indices diminuent en fonction de l'âge de la solution mère.

Plusieurs explications peuvent être proposées, mais la plus plausible repose sur le fait que la forme B est stable dans un domaine de température compris entre +4 et +60° C (Berthou & Jollés, 1974), alors que la forme A est métastable et n'a été observée qu'à une température inférieure à 24° C.

Les mesures ayant été faites à température ambiante, comprise entre 21,7 et 23,5° C, l'influence de celle-ci est grande quand on se rapproche du point de transition.

Le degré d'hydratation de ces cristaux organiques constitue également un facteur dont il faut tenir compte dans la détermination des propriétés optiques. Les résultats fournis dans ce travail doivent donc être pris avec précaution: température et hygrométrie, surtout en ce qui concerne la forme A, peuvent faire varier, de quelques unités, la deuxième décimale des indices de réfraction.

A ces restrictions près, il faut insister sur la qualité optique de ces cristaux de protéine qui est remarquable (transparence, homogénéité). Leurs indices de réfraction sont élevés pour des substances organiques; devant cette constatation, et afin de contrôler la validité de ces mesures effectuées à sec, des tests comparatifs des indices de réfraction des cristaux avec ceux de liqueurs étalons d'indices connus ont été effectués, par la méthode du liseré de Becke. C'est ainsi que l'indice moyen de la forme B a bien été trouvé être compris entre 1,515 et 1,560, confirmant ainsi les données du Tableau 1.

Les valeurs des indices sont les mêmes ou presque pour les deux types A et B. On peut cependant re-

marquer que, d'une façon générale, les indices sont plus grands pour le type A que pour le type B. Cette différence a-t-elle une signification? Il serait tentant de conclure à un réarrangement plus compact dans A que dans B: en effet, ceci expliquerait partiellement pourquoi la teneur en eau est plus grande dans la forme B que dans la forme A, d'environ 10%, fait inattendu puisqu'il s'agit d'une forme obtenue à une température plus élevée que A.

L'existence de ces deux phases cristallines A et B dans les cristaux de lysozyme de poule pose un problème: correspondent-elles à un changement plus ou moins important de la conformation de la protéine, entraînant un réarrangement cristallin différent? Il semble plus probable, et les grandeurs et répartition des indices de réfraction militent en faveur de cette hypothèse, que la molécule n'a subi que des changements discrets locaux, n'affectant en rien la densité de la matière qui reste très voisine dans les deux systèmes cristallins.

Références

- BERTHOU, J. & JOLLÉS, P. (1974). *Biochem. Biophys. Acta*, **336**, 222-227.
- BLAKE, C. C. F., MAIR, G. A., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C. & SARMA, V. R. (1967). *Proc. Roy. Soc. B* **167**, 365.
- BRAGG, W. L. & PIPPARD, A. B. (1953). *Acta Cryst.* **6**, 865-867.
- CAYE, R. (1970). *Bull. Soc. Fr. Minér. Crist.* **93**, 249-254.
- CAYE, R. & CERVELLE, B. (1968). *Bull. Soc. Fr. Minér. Crist.* **91**, 284-288.
- CERVELLE, B. (1971). Thèse, Paris, et *Bull. BRGM*, Section II, n° 5, 9-34.
- JOLLÉS, P. & BERTHOU, J. (1972). *FEBS Lett.* **23**, 21-23.
- PALMER, K. J., BALLANTYRE, M. & CALVIN, J. A. (1948). *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 906.
- PERUTZ, M. F. (1953). *Acta Cryst.* **6**, 859-864.