Radiocristallographie et biologie structurale

D. Moras

► To cite this version:

D. Moras. Radiocristallographie et biologie structurale. Journal de Physique IV Proceedings, 1996, 06 (C4), pp.C4-3-C4-11. 10.1051/jp4:1996401 . jpa-00254284

HAL Id: jpa-00254284

<https://hal.science/jpa-00254284>

Submitted on 1 Jan 1996

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Radiocristallographie et biologie structurale

D. Moras

Biologie Structurale, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, BP. 136, 67404 Illkirch cedex, France

Introduction

Depuis la mise en évidence du pouvoir diffractant des cristaux de protéines par Bernal dans les années 1930, la radiocristallographie a connu des développements spectaculaires et a donné naissance à un nouveau domaine d'études : la biologie structurale.

Le premier grand résultat biologique que l'on peut attribuer à la diffraction des rayons X a été la découverte, en 1953, de la structure de l'ADN par Crick et Watson qui ont utilisé les clichés de diffraction mettant en évidence le caractère hélicoïdal de la molécule d'ADN pour proposer leur modèle moléculaire. Cette découverte peut être considérée comme le point de départ de la biologie moléculaire et l'une des découvertes les plus importantes de ce siècle.

Depuis lors le développement des méthodes cristallographiques, tant sur le plan théorique (problème de la phase) que sur le plan technique (intensité et qualité optique du faisceau de rayon X, qualité des détecteurs utilisés et performance des ordinateurs) fait que l'on estime aujourd'hui à une structure cristalline de macromolécule par jour la production mondiale d'informations produites par radiocristallographie. Ces développements ont conduit à une révolution de la biologie moléculaire et à un essor considérable des études de relation structure-fonction. Pour des revues détaillées le lecteur peut consulter les ouvrages cités à la fin du texte.

Figure 1. Auto-empolement de deux hélices d'ADN
(d'après Timsit Y. & Moras, D., 1991 *J. Mol Biol.*, 221, 919-940.)

Figure 2. Représentation schématique de la structure d'une myoglobine
(réf. Kendrew, J.-C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davis, D.R.,
Phillips, D.C. & Shore, V.C. (1960) *Nature*, 185, 422-427.)

L'état cristallin en biologie moléculaire

Le passage obligé de toute étude radiocristallographique, et l'une des étapes cruciales de la radiocristallographie biologique, est la cristallisation des molécules dont on veut connaître la structure tridimensionnelle. La difficulté particulière des macromolécules biologiques est qu'elles ne peuvent exister qu'en milieu aqueux et dans des conditions souvent très strictes de pH et de force ionique.

La cristallogénèse consiste à assembler des molécules au sein de ce qui deviendra un cristal tout en conservant la structure de leur conformation active. Un cristal de macromolécule biologique peut être vu comme un ensemble de statuettes molles disposées de façon régulière (dans les trois dimensions) dans une piscine remplie d'eau. Une telle disposition souligne les caractéristiques des cristaux biologiques, à savoir un nombre limité de contacts entre les molécules organisées au sein du cristal, et l'existence de nombreux canaux plus ou moins importants qui peuvent constituer de 30 à 80 % du volume du cristal. Les techniques de cristallisation ont fait des progrès énormes au cours des vingt dernières années, sous la pression constante de la demande pour plus de structures tridimensionnelles. La miniaturisation des échantillons (typiquement 2 microlitres par essai), et l'utilisation de méthodes statistiques de balayage des conditions optimales de cristallisation, sont deux avancées significatives accomplies. Il faut néanmoins souligner que tous ces progrès ne seraient rien sans ceux qui ont été réalisés dans les méthodes de production et de purification du matériel biologique.

La diffraction X et les cristaux biologiques

Lorsqu'on a eu la chance d'obtenir un cristal de macromolécule biologique, il faut procéder à l'enregistrement des données de diffraction. Etant donné le pouvoir diffractant limité des cristaux, dû en partie aux grands paramètres des mailles cristallines (liés à la taille des molécules) qui entraîne un nombre relativement restreint de motifs répétés dans le cristal et en partie à la teneur en solvant, il a longtemps été nécessaire de produire des cristaux de taille importante (de l'ordre du millimètre cube) pour pouvoir espérer observer des taches de diffraction à haute résolution (supérieure à 2 Å). Là encore des progrès significatifs ont été accomplis grâce à trois niveaux de développement technologique :

1) Les sources de rayonnement X

Au laboratoire, la possibilité d'utiliser des générateurs à anode tournante de plus en plus performants, associés à des optiques focalisantes (double miroirs) ayant de bons rendements, a permis de gagner au moins un ordre de grandeur en brillance au cours de ces vingt dernières années. Cependant, le progrès majeur est venu de l'apparition des rayonnements synchrotron. A l'heure actuelle, l'Europe, via l'installation ESRF de Grenoble, possède la source synchrotron la plus puissante au monde. Le rayonnement synchrotron de Grenoble se caractérise non seulement par une brillance extraordinaire (de 3 à 5 ordres de grandeur supérieure aux meilleures sources conventionnelles) mais également une qualité optique (parallélisme et distribution en longueur d'onde) remarquable.

2) Détecteurs

Une caractéristique des spectres de diffraction X de macromolécules est le grand nombre de taches de diffraction que l'on peut observer. Ce nombre directement corrélé à la taille de la maille cristalline unitaire, typiquement $100 \times 100 \times 100 \text{ \AA}^3$, est de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers, voire dans le cas de cristaux de virus, de millions de réflexions. Pour pouvoir mesurer une telle quantité d'informations, il a fallu étendre et développer des méthodes connues et employées en cristallographie et en physique. Quand cela n'a pas suffi, il a été nécessaire de mettre au point de nouveaux instruments et de nouvelles méthodes d'analyse.

Le premier progrès significatif a été obtenu par l'utilisation des détecteurs bidimensionnels à fil. Ceux-ci ont pour la première fois permis de mesurer plusieurs centaines de taches de diffraction simultanément et en temps réel. La résolution spatiale de ces détecteurs (pas élémentaire de 100 à 200 microns) et leur taille limitée (512×512 , ou plus récemment 1024×1024) ont rapidement marqué les limites de ces outils. C'est alors que sont apparues les plaques photosensibles à sel de baryum ("image plate") qui ont permis de combiner l'avantage de taille et de résolution spatiale des anciennes plaques photographiques, puisqu'il est maintenant courant d'utiliser des plaques de plus de 30 cm de diamètre avec des grains de l'ordre de 100 microns, avec l'un des grands avantages des détecteurs électroniques, la faiblesse du bruit de fond. En fait, ces nouvelles plaques photographiques n'ont pratiquement pas de bruit de fond propre et, en outre, elles peuvent

être réutilisées indéfiniment. Elles sont balayées par un système de lecture laser et régénérées en moins de 3 minutes.

La dernière avancée dans le domaine a été marquée par l'apparition des détecteurs CCD. Il s'agit de détecteurs beaucoup plus rapides, indispensables car la situation actuelle est paradoxale du fait de la différence considérable entre le temps nécessaire à l'acquisition des données sur une source synchrotron (temps d'exposition de l'ordre de la seconde) et le temps de lecture des données (de l'ordre de 180 secondes). On s'oriente actuellement vers de compteurs CCD précis de grande surface et disposant d'un système d'extraction de données rapides. Ces WASPS (pour Wafer-scale array for protein crystallography systems) sont des CCD mosaïques de technologie "avancée". Leur ouverture atteindra 112 mm x 111 mm avec 4096 x 4096 pixels de 27 μm^2 . La lecture se fera en une seconde et chaque pixel sera doté d'une dynamique de 8×10^5 . Le bruit de fond attendu sera inférieur à 1 photon/pixel. L'efficacité (DQE) de 0.85 à 10 photons (8 keV). La résolution (point spread fonction PSF) est inférieure à 2 pixels. Il sera ainsi possible avec de tels compteurs dont il existe déjà des prototypes, de résoudre 500 ordres de diffraction avec une collimation de 100 μ , un bouleversement dans le domaine.

3) Le traitement informatique des mesures expérimentales

Le progrès des méthodes d'analyse des mesures expérimentales est indissociable des développements technologiques précités pour expliquer l'explosion des méthodes cristallographiques. La puissance des ordinateurs disponibles a permis de développer des programmes ultra performants qui analysent les mesures brutes fournies par le détecteur et les transforment en facteurs de structure directement utilisables dans la deuxième partie de l'étude cristallographique, la détermination de la phase et le calcul des densités électroniques.

Parmi les avancées méthodologiques que les développements techniques (rayonnement synchrotron, détecteurs et moyens de calcul) ont permises, nous pouvons citer l'utilisation de la méthode de Laue, qui s'inspire d'une des premières expériences de diffraction effectuées par Max von Laue au début du siècle. Cette méthode s'appuie sur la diffraction d'un rayonnement polychromatique, en fait une bande passante de 0,7 Å à 2 Å fournie par un rayonnement synchrotron. L'utilisation des rayonnements polychromatiques permet de gagner un ordre de grandeur sur la quantité

d'informations que l'on peut extraire d'un cristal dans une limite de temps donnée. Combinée à la puissance du rayonnement synchrotron, cette méthode permet d'accélérer la mesure de données expérimentales à un point tel qu'il est possible aujourd'hui d'enregistrer l'intégralité d'un espace de diffraction en quelques secondes. Cette approche permet d'envisager des études structurales d'espèces ayant une durée de vie limitée. C'est ainsi qu'il est possible d'étudier un mécanisme de réaction en observant les images des structures apparues au cours des différentes étapes de la réaction.

Le problème de la phase

La détermination de toute structure cristalline passe par la résolution du problème de la phase, c'est-à-dire la détermination des phases associées aux modules des facteurs de structure observés expérimentalement. Là encore, les progrès ont été spectaculaires au cours des trente dernières années. Si la plupart des structures cristallines de molécules originales nécessitent une détermination expérimentale de la phase à l'aide de la méthode de la série isomorphe initialement découverte par Max Perutz, il est de plus en plus courant d'utiliser les homologues de structures tridimensionnelles détectables à partir des homologues des séquences des molécules étudiées pour débloquent le problème de la phase par la méthode dite du "remplacement moléculaire". Cette méthode, implantée en biologie structurale par Michael Rossmann au début des années 60, connaît maintenant un succès foudroyant grâce à l'accumulation de structures tridimensionnelles dans les bases de données et au développement des outils informatiques, qui permettent maintenant de faire en quelques secondes des opérations de recherche de positionnement jadis très coûteuses (fonction de rotation, fonction de translation).

Une des caractéristiques des cristaux de macromolécules biologiques est que souvent ils possèdent ce que l'on appelle une symétrie non cristallographique, c'est-à-dire plusieurs copies d'une même molécule non reliées par des éléments de symétrie cristallographique au sein de l'unité asymétrique. Le spectre de diffraction des cristaux correspondants contient une redondance d'informations dont l'utilisation fait également partie de ce qu'il est convenu d'appeler le remplacement moléculaire. Mais dans ce cas il permet d'utiliser cette information même quand on ne connaît pas de structure voisine de celle de la molécule étudiée. L'utilisation de la symétrie non cristallographique et de techniques dérivées associées (nivellement de

solvant) a conduit à certains des résultats les plus spectaculaires de la biologie structurale comme la détermination de la structure de virus.

4) Interprétation des cartes de densité électronique et modélisation moléculaire.

Cette dernière étape de l'étude cristallographique a également subi une accélération importante liée au progrès des techniques informatiques. Les stations graphiques actuelles permettent de manipuler en temps réel des objets très complexes comme les cartes de densité électronique et les modèles moléculaires de protéines de plusieurs milliers d'atomes. Les outils d'analyse de densités électroniques qui ont été mis au point ont fait gagner un temps précieux et amélioré la précision des résultats obtenus.

Figure 3. Cliché de Laue. Aspartyl-tRNA synthétase de *Thermus thermophilus*.

Figure 4. Structure schématique du complexe tRNA^{Gln} - GlnRS d'*E. coli* (a) et AspRS-tRNA^{Asp} de levure (b).
(d'après Moras, D. (1992) *TIBS*, 17,159 - 164).

Conclusion

Si aujourd'hui la communauté des cristallographes s'intéressant aux objets biologiques produit plus d'une structure tridimensionnelle par jour en moyenne, on peut encore s'attendre à une accélération de cette production dans les années à venir. C'est ainsi qu'il est permis d'imaginer qu'à moyen terme nous pourrions connaître la structure tridimensionnelle de la plupart des molécules composant les cellules des principaux organismes du monde vivant. Ceci se fera par la combinaison des études cristallographiques et l'analyse, grâce aux outils bioinformatiques, des innombrables séquences produites quotidiennement.

La radiocristallographie nous permet d'aller au-delà de la description systématique des composants cellulaires (protéines, acides nucléiques, ...). D'ores et déjà les chercheurs de ce domaine s'intéressent aux interactions moléculaires et aux mécanismes de reconnaissance des différentes macromolécules au cours des étapes fonctionnelles de leur existence. La reconstitution des chaînes de transfert d'information et de régulation de l'activité biologique est la prochaine frontière que nous pourrions atteindre grâce à la cristallographie. Il est amusant de constater qu'une méthode

apparemment consacrée à l'étude de l'état solide, donc figé, sera probablement l'outil essentiel pour atteindre les mécanismes moléculaires de reconnaissance et de transmission de l'information, propriété dynamique par excellence, à l'échelle atomique.

Ouvrages et articles de référence

Drenth, J. (1994). Principles of Protein X-ray Crystallography. *Ed. by Springer-Verlag*

Methods in Enzymology. (1985) Vol. 114 et 115. *Ed. by Wyckoff H. D., Hirs C. H. and Timasheff S. N.*

Time-resolved Macromolecular Crystallography (1992) *Ed. by Cruickshank, Helliwell, J.R. and Johnson L.N., The Royal Society, Oxford Univeristy Press.*

Watson J. D. and Crick F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature*, **171**, 732-738.

Figures

Figure 1 : Auto-emboîtement de deux hélices d'ADN (d'après Timsit Y., & Moras, D., 1991 *J. Mol Biol.*, **221**, 919-940.

Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'une myoglobine (réf. Kendrew, J.-C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davis, D.R., Phillips, D.C. & Shore, V.C. (1960)*Nature*, **185**, 422-427.)

Figure 3 : Cliché de Laue. Aspartyl-tRNA synthétase de *Thermus thermophilus*.

Figure 4 : Structure schématique du complexe tRNA^{Gln} - GlnRS d'*E. coli* (a) et AspRS-tRNA^{Asp} de levure (b). (d'après Moras, D. (1992) *TIBS*, **17**, 159 - 164).