



# Etudes Méthodologiques en Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire et en Cristallographie des Protéines Résolue en Temps.

Dominique Bourgeois

## ► To cite this version:

Dominique Bourgeois. Etudes Méthodologiques en Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire et en Cristallographie des Protéines Résolue en Temps.. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier, 1999. <tel-01289090>

**HAL Id: tel-01289090**

<http://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01289090>

Submitted on 6 Apr 2016

**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.

*Université Joseph Fourier, Grenoble I  
Comité d'habilitation de biologie*

*Résumé des travaux de recherche en vue de l'obtention du Diplôme  
d'Habilitation à diriger des Recherches.*

***Etudes Méthodologiques en Imagerie par Résonance  
Magnétique Nucléaire et en Cristallographie des Protéines  
Résolue en Temps.***

*Dominique Bourgeois.*

*Soutenue le 29 janvier 1999 devant la commission d'examen :*

*Prof. M. Robert-Nicoud : Président  
Prof. E. Pebay-Peroula : Rapporteur  
Prof. C. Cambillau : Rapporteur  
Prof. R. Fourme : Rapporteur  
Dr S. Cusack : Examineur*

## Table des matières

<b>1. Curriculum Vitae</b>	<b>2</b>
<b>2. Liste des publications</b>	<b>3</b>
<b>3. Introduction</b>	<b>13</b>
<b>4. Méthodologie en imagerie par résonance magnétique nucléaire</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Introduction</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Imagerie quantitative de mouvements très lents</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Imagerie spectroscopique</b>	<b>14</b>
<b>5. Instrumentation à l'ESRF</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Participation à la construction de la ligne de lumière ID11</b>	<b>16</b>
5.1.1. Détecteurs bi-dimensionnels	16
<b>5.2. Participation à la construction et au développement de la ligne de lumière ID09</b>	<b>16</b>
5.2.1. Caméra Laue simple paquet ('SP Laue')	17
5.2.2. Améliorations	18
5.2.3. Méthode Laue à des échelles de temps plus lentes	19
5.2.4. Spectrophotométrie et piégeage cryogénique.	19
<b>5.3. Participation à la construction de la ligne de lumière ID14</b>	<b>20</b>
5.3.1. Optimisation de l'orientation des monochromateurs	20
5.3.2. Installation du détecteur et logiciel de collecte des données	20
<b>6. Cristallographie des protéines résolue en temps</b>	<b>21</b>
<b>6.1. Cristallographie en temps réel</b>	<b>21</b>
6.1.1. Echelle ns : La méthode 'Single Pulse 'Laue	21
6.1.2. Echelle $\mu$ s-s :	24
<b>6.2. Piégeage cryogénique d'états intermédiaires</b>	<b>26</b>
6.2.1. Nitrite Réductase	26
<b>6.3. 'Soaking' et co-cristallisations</b>	<b>27</b>
6.3.1. Isoméro-réductase	27
<b>7. Traitement des données</b>	<b>28</b>
<b>7.1. Intégration de données faibles et /ou avec recouvrement spatial : PrOW.</b>	<b>28</b>
7.1.1. Théorie	28
7.1.2. Exemples	28
<b>7.2. Optimisation des facteurs de structure différence : Q-weighting</b>	<b>29</b>
7.2.1. Théorie	29
7.2.2. Exemples	30
<b>8. Travail de 'local contact' sur la ligne ID09</b>	<b>32</b>
<b>9. Conclusion et perspectives</b>	<b>33</b>
<b>9.1. Evolution personnelle</b>	<b>33</b>
<b>9.2. Définition d'un projet de recherche</b>	<b>33</b>
9.2.1. Cristallographie résolue en temps	33
9.2.2. Systèmes biologiques	34

# 1. Curriculum Vitae

## Dominique BOURGEOIS

- *Date et lieu de naissance* : 4 Novembre 1964, Paris (XV)
- *Nationalité* : Française.
- *Adresse* : 124 Grande Rue, 38 700 La Tronche, FRANCE.
- *Adresse professionnelle* : European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, FRANCE ;  
LCCP, UPR 9015/IBS, 41 Avenue des Martyrs, 38027 Grenoble Cedex 1, FRANCE
- *Téléphone* : (Domicile) 04 76 63 83 13 (Travail) 04 76 88 24 57
  
- *Emploi actuel* : Depuis Octobre 93, chercheur au CNRS (CR1), travaillant au synchrotron européen (ESRF), dans le groupe de biologie structurale (JSBG), ligne de lumière ID09 ('white beam').
  
- *Sujet principal de recherche* : Cristallographie des protéines résolue en temps.
  
- *Etudes et Emplois précédents* :
  - Juillet 1987* Diplôme d'Ingénieur de l'Ecole Polytechnique, Palaiseau.
  - Juin 1988* Diplôme d'Etudes Approfondies de Génie Biologique et Médical, obtenu à l'Université J. Fourier, Grenoble, France.
  - Juin 1990* Thèse de Génie Biologique et Médical : "Méthodologie en imagerie RMN : imagerie haute résolution ; imagerie spectroscopique ; imagerie de débits.", obtenu à l'Université J. Fourier, Grenoble, France.
  - Janvier 91 --> Février 92* Stage post-doctoral à la division des sciences biologiques du Conseil National de Recherche du Canada (section RMN Biomédicale).
  - Février 92 --> Octobre 92* Stage post-doctoral dans le 'Groupe d'Applications de la RMN à la Neurobiologie' (INSERM U318), Grenoble, France.
  - Octobre 92 --> Octobre 93* Stage post-doctoral au synchrotron européen (ESRF), Groupe Diffraction, Grenoble, France
  
- *Langues étrangères* :
  - Anglais : parlé, lu et écrit couramment
  - Allemand, Espagnol : notions.
  
- *Activités favorites* :
  - Alpinisme, escalade, ski de randonnée, guitare classique.

## 2. Liste des publications

### Publications

- P1 D. Bourgeois, M. Décorps, C.Rémy and A.L. Benabid,  
"High flux signals and spatial localization in high-resolution  $^1\text{H}$  spectroscopy with surface coils",  
*Magn. Reson. Med.*, (1989), **11**, 275-281.
- P2 M. Décorps, C. Rémy, D. Bourgeois, M. Jacrot, M. von Kienlin and A.L. Benabid,  
"Localized spectroscopy of rat brain tumors",  
*Magn. Reson. Med. Biol.*, (1989), **2**, 129-151.
- P3 D. Bourgeois and M. Décorps,  
"A B1 gradient method for the detection of slow coherent motion",  
*J. Magn. Reson.*, (1991), **91**, 128-135.
- P4 M. Décorps and D. Bourgeois,  
"Very slow flow imaging",  
*Magn. Reson. Med.*, (1991), **19**, 270-275.
- P5 D. Bourgeois, C. Rémy, Y. Le Fur, P. Devoulon, A.L. Benabid and M. Décorps,  
"Proton spectroscopic imaging : a tool for studying intracerebral tumor models in rat",  
*Magn. Reson. Med.*, (1991), **21**, 10-20.
- P6 D. Bourgeois and M. Décorps,  
"Quantitative imaging of slow coherent motion by stimulated echoes with suppression of stationary water signal",  
*J. Magn. Reson.*, (1991), **94**, 20-33.
- P7 M. Peres, D. Bourgeois, S. Roussel, Y. Le Fur, P. Devoulon, C. Rémy, B.Barrère, M. Décorps, E. Pinard, D. Riche, A.L. Benabid, and J. Seylaz,  
"Two dimensional  $^1\text{H}$  spectroscopic imaging for evaluating the local metabolic response to focal ischemia in the conscious rat",  
*NMR in Biomed.*, (1992), **5**, 11-19.
- P8 M. Décorps and D. Bourgeois,  
"Localized spectroscopy using static magnetic field gradients : comparison of techniques",  
*NMR Basic Principles and Progress.*, (1992), **27**, 119-149.
- P9 R. Dupeyre, P. Devoulon, D. Bourgeois and M. Décorps,  
"Diffusion measurement using stimulated rotary echoes",  
*J. Magn. Reson.*, (1991), **95**, 589-596.
- P10 D. Bourgeois, and R.Deslauriers,  
"Phasing spin-echo acquired  $^31\text{P}$  spectroscopic images using Complex Conjugate Data Reversal ",  
*Magn. Reson. Med.*, (1992), **28**, 122-128.

- P11 Y. Le Fur, A. Ziegler, D. Bourgeois, M. Décorps and C. Rémy,  
"Phased spectroscopic images : Application to the characterization of the 1H 1.3ppm resonance in intracerebral tumors in the rat ",  
*Magn. Reson. Med.*, (1993), **29**, 431-435.
- P12 D. Bourgeois, and P.Kozlowski,  
"A highly sensitive lactate editing technique for surface coil spectroscopic imaging in vivo",  
*Magn. Reson. Med.*, (1993), **29**, 431-435.
- P13 L.C. Stewart, L.C. Saunders, R. Deslauriers, D. Bourgeois, and J.F. Nedelec,  
"Simultaneous measurement of both lipid and lactate in isolated rat hearts by 1H NMR spectroscopy,  
*Magn. Reson. Med.*, (1993), **30**, 655-660.
- P14 D. Bourgeois, J.P. Moy, O. Svensson, and A. Kwick,  
"The Point Spread Function of X-ray Image Intensifiers/CCD camera and Imaging Plates Systems in Crystallography : assessment and consequences for the dynamic range ".,  
*J. Appl. Cryst.*, (1994), **27**, 868-877.
- P14 M. Wulff, D. Bourgeois, D. Hausermann, and T. Ursby,  
"Laue images from a wundulator",  
*ESRF Newsletter* , **N20**. (not peer reviewed)
- P15 D. Bourgeois, M. Wulff, T. Ursby, F.Epaud and R. Wilcke, W. Schildkamp, C. Pradervand, and A. Legrand,  
"Towards picosecond time resolution in Laue diffraction from proteins",  
*ESRF Newsletter* , **N21**. (not peer reviewed)
- P16 A. Legrand, C. Pradervand, W. Schildkamp, D. Bourgeois, and M. Wulff,  
"An ultrafast mechanical shuttering system for separating single X-ray pulses from a synchrotron",  
*Rev. Sci. Instrum.*, (1995), **66**, 1721.
- P17 D. Bourgeois, T. Ursby, M. Wulff, C. Pradervand, V. Srajer, A. Legrand, W. Schildkamp, S. Labouré, C. Rubin, T.Y Teng, M. Roth, and K. Moffat,  
"Single pulse Laue images from macromolecular crystals recorded at ESRF".  
*SPIE Proc.*, (1995), **2521**, 178-181.
- P18 M. Wulff, T. Ursby, D. Bourgeois, L. Goirand, and M. Sanchez del Rio,  
"The realization of fast diffraction on BL3 at the ESRF".  
*SPIE Proc.*, (1995), **2521**, 197-206.
- P19 P.Kozlowski, D. Bourgeois, A.M. Buchan, D. Xue, J. Shen and J.K. Saunders,  
"31P and 1H spectroscopic imaging studies of focal ischemia in rat brain",  
*Can. J. Appl. Spec.*, (1995), **40**, 1-8.

- P20 D. Bourgeois, T. Ursby, M. Wulff, C. Pradervand, A. Legrand, W. Schildkamp, S. Labouré, V. Srajer, T.Y Teng, M. Roth, and K. Moffat,  
"Feasibility and realization of Single Pulse Laue diffraction on macromolecular crystals at ESRF".  
*J. Synchrotron Rad.*, (1996), **3**, 65-74.
- P21 V. Srajer, T.Y Teng, T. Ursby, C. Pradervand, Z. Ren, S. Adachi, W. Schildkamp, D. Bourgeois, M. Wulff and K. Moffat,  
"Nanosecond time-resolved macromolecular crystallography : photolysis of carbonmonoxy myoglobin".  
*Science*, (1996), **274**, 1726-1729.
- P22 C. Withers-Martinez, F. Carriere, R. Verger, D. Bourgeois & C. Cambillau,  
"A Pancreatic Lipase with a Phospholipase A1 Activity : Crystal Structure of a Chimeric Pancreatic Lipase-Related Protein 2 from Guinea Pig".  
*Structure*, (1996), **4**, 1363-1374
- P23 S. Spinelli, L. Frenken, D. Bourgeois, L. De Ron, W. Bos, T. Verrips, C. Anguille, C. Cambillau. & M. Tegoni,  
"The crystal structure of a llama heavy chain variable domain".  
*Nature Struc. Biol.*, (1996), **3**, 752-757.
- P24 M. Wulff, T. Ursby, D. Bourgeois, F. Schotte, F. Zontone & M. Lorentzen,  
"New Opportunities for Time-Resolved X-ray scattering at the ESRF",  
*J. Chim. Phys.*, (1996), **93**, 1915-1937
- P25 D. Bourgeois, S. Longhi, M. Wulff and C. Cambillau,  
"Accuracy of structural information obtained at the ESRF from very rapid Laue data collection on macromolecules."  
*J. Appl. Cryst.*, (1997), **30**, 153-163.
- P26 T. Ursby and D. Bourgeois,  
"Improved estimation of structure factor difference amplitudes from poorly accurate data".  
*Acta. Cryst. A*, (1997), **53**, 564-575.
- P27 M. Wulff, F. Schotte, G. Naylor, D. Bourgeois, K. Moffat & G. Mourou,  
"Single-Pulse Laue diffraction, Stroboscopic Data Collection and FemtoSecond Flash Photolysis on Macromolecules".  
*Nucl. Instr. Meth.*, (1997), **A398**, 69-84.
- P28 D. Nurrizo, M.C. Silvestrini, M. Mathieu, F. Cutruzzola, D. Bourgeois, V. Fülöp, J. Hajdu, M. Brunori, M. Tegoni & C. Cambillau,  
"N-Terminal Arm Exchange is Observed in the Crystal Structure of Oxidized Nitrite Reductase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å Resolution".  
*Structure*, (1997), **5**, 1157-1171.
- P29 D. Bourgeois, D. Nurrizo, R. Kahn & C. Cambillau,  
"An Integration Routine Based on Profile Fitting with Optimized Fitting Area for the Evaluation of Weak and/or Overlapped 2-Dimensional Laue or Monochromatic

- Patterns".  
*J. Appl. Cryst.*, (1998), **31**, 22-35.
- P30 B. Perman, V. Srajer, Z. Ren, T.Y. Teng, C. Pradervand, T. Ursby, D. Bourgeois, F. Schotte, M. Wulff, R. Cort, K. Hellingwerf & K. Moffat,  
 "Energy Transduction on the Nanosecond Time Scale : Early Structural Events in a Xanthopsin Photocycle".  
*Science*, (1998), **279**, 1946-1950.
- P31 R. Ravelli, M. Raves, Z. Ren, D. Bourgeois, M. Roth, J. Kroon, I. Silman & J. Sussman,  
 "Static Laue Diffraction Studies on Acetylcholineesterase".  
*Acta Cryst. D*, (1998), **54**, 1359-1366.
- P32 D. Nurizzo, F. Cutruzzola, M. Arese, D. Bourgeois, M. Brunori, M. Tegoni & C. Cambillau,  
 "Conformational Changes Occurring upon Reduction and NO Binding in Nitrite Reductase from *P. Aeruginosa*".  
*Biochemistry*, 1998, in press.
- P33 G.W.J.C. Heunen, A. Puig-Molina, S.H.W. Sheres, C. Shulze, D. Bourgeois & H. Graafsma,  
 "Broad Energy Band Techniques for Perturbation Crystallography".  
*SPIE Proc.*, 1998, in press.
- P34 W.P. Burmeister, D. Bourgeois, R. Kahn, H. Belrhali, E.P. Mitchell, S.M. McSweeney & S. Wakatsuki,  
 "Diamonds, a Multilayer and a Sagittally Focusing Crystal as Optical Element on the ID14/Quadriga-3 Beamline at ESRF".  
*SPIE Proc.*, 1998, in press.
- P35 S. Wakatsuki, H. Belrhali, E.P. Mitchell, W.P. Burmeister, S.M. McSweeney, R. Kahn, D. Bourgeois, M. Yao, T. Tomizaki & P. Théveneau,  
 "ID14 'Quadriga', a beamline for protein crystallography at the ESRF".  
*J. Synchrotron. Rad.*, (1998), **5**, 215-221.
- P36 D. Nurizzo, F. Cutruzzola, M. Arese, D. Bourgeois, M. Brunori, C. Cambillau & M. Tegoni,  
 "Does the reduction of c heme trigger the conformational changes of crystalline nitrite reductase".  
*J. Biol. Chem.*, 1998, submitted.

### *Livres*

- L1 M. Décorps, R. Dupeyre, C. Rémy, Y. Le Fur, P. Devoulon and D. Bourgeois,  
 "Spectroscopic Imaging"  
 in "*Spectroscopic imaging in textbook of magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine. Functional and pathological tissue characterization*",  
 de Certaines, Bovée and Podo Eds, pp. 111-132, Pergamon Press, Oxford, 1992.



- L2 D. Bourgeois and M. Décorps,  
 "Phase sensitive imaging techniques for the measurement of very slow flow",  
 in *"Diffusion and Perfusion Magnetic Resonance Imaging"*, vol in press Raven Press,  
 New-York, 1995.
- L3 M. Wulff, D. Bourgeois, T. Ursby & G. Mourou,  
 "The Realization of 100 ps Laue diffraction on ID09 and Shortcuts to 100 fs Time-  
 Resolution in X-Ray Scattering Experiments.",  
 in *"Time-Resolved diffraction"*, Ed. by J.R. Helliwell and P.M. Rentzepis, Clarendon  
 Press, (1997), 195-228.

### *Mémoires*

- M1 D. Bourgeois,  
 "Méthodologie en imagerie RMN : imagerie haute résolution, imagerie  
 spectroscopique, imagerie de débits",  
 Thèse de doctorat, Spécialité Génie Biologique et Médical, Université J. Fourier  
 (Grenoble I) (1990)

### *Communications*

- C1 C. Rémy, M. Peres, D. Bourgeois, S. Roussel, M. von Kienlin, B. Barrère, M.  
 Décorps, E. Pinard, A.L. Benabid and J. Seylaz.  
 "MR imaging and localized 1H spectroscopy in vivo : a study of focal ischemia in rat  
 middle cerebral artery occlusion model"  
*7th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, San Francisco (USA) (1988).
- C2 D. Bourgeois, B. Authier and M. Décorps.  
 "Flow measurements in the rotating frame"  
*Second European Congress of NMR in Med. and Biol.*, Berlin (W. Germany) (1988).
- C3 A. François, D. Bourgeois, J.L. Leviel, M. von Kienlin, C. Rémy, S. Lotito, M.F.  
 Nissou, M.F. Foray, A.L. Benabid and M. Décorps.  
 "Growth of rat brain tumor followed in situ by 31P and 1H NMR spectroscopy"  
*Second European Congress of NMR in Med. and Biol.*, Berlin (W. Germany) (1988).
- C4 C. Rémy, D. Bourgeois, A.L. Benabid and M. Décorps.  
 "Spatial localization and study of intracerebral tumors in rat by proton spectroscopy"  
*International Congress of Radiology : ICR 89 satellite Congress.*, Lyon (France)  
 (1989).
- C5 D. Bourgeois, M. Décorps, C. Rémy and A.L. Benabid.  
 "Spectroscopic imaging using stimulated echoes"  
*International Congress of Radiology : ICR 89 satellite Congress.*, Lyon (France)  
 (1989).
- C6 M. Décorps, D. Bourgeois, C. Rémy and A.L. Benabid.  
 "Localization techniques for in vivo spectroscopic studies"

- International Congress of Radiology : ICR 89 satellite Congress.*, Lyon (France) (1989).
- C7 C. Rémy, M. Peres, D. Bourgeois, S. Roussel, M. von Kienlin, B. Barrère, M. Décorps, E. Pinard, A.L. Benabid and J. Seylaz.  
"Etude in vivo de l'ischémie cérébrale chez le rat par imagerie et spectroscopie RMN 1H localisée"  
*GERM XI : perspectives nouvelles en Résonance Magnétique.*, Bombannes (France) (1989).
- C8 M. Décorps, D. Bourgeois, J.L. Leviel, R. Chamel, C. Rémy and A.L. Benabid.  
"L'imagerie RMN en biologie et en physicochimie: instrumentation, méthodes et perspectives."  
*GERM XI : perspectives nouvelles en Résonance Magnétique.*, Bombannes (France) (1989).
- C9 A.L. Benabid, M. Décorps, D. Bourgeois, M. von Kienlin, S. Lotito, A. François and C. Rémy.  
"In vivo multinuclear NMR spectroscopy study of intracerebral brain tumor in rat"  
*10th meeting of the International Society of Magnetic Resonance (ISMAR).*, Morzine (France) (1989).
- C10 D. Bourgeois and M. Décorps.  
"A new method for detection of low coherent motion using B1 gradients"  
*10th meeting of the International Society of Magnetic Resonance (ISMAR).*, Morzine (France) (1989).
- C11 D. Bourgeois and M. Décorps.  
"A new method for detection of ultra slow coherent motion using B0 gradients"  
*8th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, Amsterdam (The Netherlands) (1989).
- C12 D. Bourgeois and M. Décorps.  
"A new method for detection of low coherent motion using B1 gradients"  
*8th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, Amsterdam (The Netherlands) (1989).
- C13 M. Décorps, D. Bourgeois, A.L. Benabid and C. Rémy.  
"Quantitative analysis and high-flux signals in 1H NMR spectroscopy with surface coils"  
*Topical workshop on "quantitation in MRS and data collection"*, Amsterdam (The Netherlands) (1989).
- C14 M. Peres, C. Rémy, S. Roussel, D. Bourgeois, M. Von Kienlin, B. Barrère, M. Décorps, E. Pinard, A.L. Benabid and J. Seylaz.  
"Monitoring of a focal cerebral ischemia by MR imaging and localized 1H spectroscopy in conscious rats"  
*Brain 89*, Bologne (Italie) (1989).

- C15 M. Décorps, C. Rémy, D. Bourgeois, M. JACROT, M. Von Kienlin and A.L. Benabid.  
"Localized spectroscopy of rat brain tumors"  
*International Society of Magnetic Resonance, Division of Biology and Medicine : Workshop on localized in vivo NMR Spectroscopy, Altavilla Micilia (Italie) (1989).*
- C16 D. Bourgeois, C. Rémy, Y. Le Fur, P. Devoulon, A.L. Benabid and M. Décorps.  
"Chemical shift imaging : a tool for studying intracerebral tumor models in rat"  
*Workshop on in vivo Magnetic Resonance Spectroscopy., San Francisco (USA) (1990).*
- C17 M. Décorps and D. Bourgeois,  
"Very slow flow imaging",  
*Future directions in MRI of diffusion and microcirculation, Workshop of the Soc. of Magn. Reson. in Med., Washington.(USA) (1990).*
- C18 D. Bourgeois, C. Rémy, Y. Le Fur, P. Devoulon, A.L. Benabid and M. Décorps.  
"Chemical shift imaging : a tool for studying intracerebral tumor models in rat"  
*7th annual European Congress of NMR in Med. and Biol., Strasbourg (France) (1990).*
- C19 D. Bourgeois and M. Décorps.  
"Quantitative flow imaging with stationary water signal suppression."  
*7th annual European Congress of NMR in Med. and Biol., Strasbourg (France) (1990).*
- C20 C. Rémy, M. Décorps, D. Bourgeois, Y. Le Fur, P. Devoulon and A.L. Benabid.  
"1H spectroscopic imaging study of intracerebral tumor models in rat"  
*9th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med., New York (USA) (1990).*
- C21 M. Décorps and D. Bourgeois.  
"Quantitative imaging of slow coherent motion with stationary water suppression"  
*9th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med., New York (USA) (1990).*
- C22 M. Peres, Y. Le Fur, S. Roussel, D. Bourgeois, P. Devoulon, B. Barrère, C. Rémy, M. Décorps, E. Pinard, J. Seylaz and A.L. Benabid.  
"Two dimensionnal 1H spectroscopic imaging for evaluating local metabolic response to focal ischemia in the conscious rat"  
*9th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med., New York (USA) (1990).*
- C23 Y. Le Fur, C. Rémy, D. Bourgeois, P. Devoulon, M.F. Nissou, R. Dupeyre, H. Reutenauer, M. Décorps and A.L. Benabid.  
"Imagerie RMN spectroscopique (proton) de tumeurs intracérébrales chez le rat"  
*10ième séminaire RMN Bruker., Ile des Embiez (France) (1990).*
- C24 C. Rémy, D. Bourgeois, Y. Le Fur, P. Devoulon, M.F. Nissou, R. Dupeyre, A. Ziegler, A. François, H. Reutenauer, M. Décorps, J.F. Le Bas and A.L. Benabid.  
"Imagerie RMN spectroscopique (proton) de tumeurs intracérébrales chez le rat"  
*Journée de la recherche. Faculté de médecine de Grenoble., Grenoble (France) (1990).*

- C25 P. Devoulon, C. Rémy, D. Bourgeois, Y. Le Fur, M.F. Nissou, R. Dupeyre, H. Reutenauer, M. Décorps and A.L. Benabid.  
"Observation de tumeurs intracérébrales par imagerie RMN spectroscopique chez le rat"  
*IIIème congrès sur la recherche en imagerie médicale*, Bordeaux (France) (1990).
- C26 C. Rémy, D. Bourgeois, Y. Le Fur, P. Devoulon, A.L. Benabid, M. Peres, S. Roussel, J. Seylaz and M. Décorps.  
"Etudes in vivo de pathologies cérébrales chez le rat par imagerie spectroscopique du proton"  
*4ième Réunion du Groupe Thématique Magnétisme Nucléaire et Biologie*, Evieux (France) (1990).
- C27 Y. Le Fur, P. Devoulon, A. Ziegler, D. Bourgeois, C. Rémy, R. Dupeyre and M. Décorps.  
"Développements méthodologiques en imagerie spectroscopique proton : identification de résonances et mesure de temps de relaxation T1"  
*4ième Réunion du Groupe Thématique Magnétisme Nucléaire et Biologie*, Evieux (France) (1990).
- C28 C. Rémy, A. Ziegler, P. Devoulon, Y. Le Fur, D. Bourgeois, E. Le Bars, R. Dupeyre, M. Décorps and A.L. Benabid.  
"Etude par imagerie spectroscopique proton de tumeurs intracérébrales chez le rat"  
*4ième congrès du GRAMM*, Marseille (France) (1991).
- C29 Y. Le Fur, P. Devoulon, A. Ziegler, D. Bourgeois, C. Rémy, R. Dupeyre and M. Décorps.  
"Methodological development in proton spectroscopic imaging : resonance identification"  
*8th annual European Congress of NMR in Med. and Biol.*, Zürich (Suisse) (1991).
- C30 P. Kozlowski, A. Jasinski, D. Bourgeois, J. Shen, A. Buchan, D. Xue and J.K. Saunders.  
"Temporal profile of infarct volume and 31P and 1H spectroscopic images following rat middle cerebral artery occlusion"  
*10th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, San Francisco (USA) (1991).
- C31 D. Bourgeois and R. Deslauriers.  
"Phasing spin-echo acquired 31P spectroscopic images using Complex Conjugate Data Reversal"  
*10th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, San Francisco (USA) (1991).
- C32 D. Bourgeois, and P.Kozlowski  
"A one-shot lactate editing sequence for surface coil spectroscopic imaging *in vivo*",  
*11th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, Berlin (USA) (1992).
- C33 P.Kozlowski, A. Buchan, D. Bourgeois, J. Shen, J. Lee, D. Xue, K.W. Butler and J.K. Saunders  
"Temperature modulation of regional lactate accumulation, pH and energy status

- following focal cerebral ischemia",  
*11th annual meeting of the Soc. of Magn. Reson. in Med.*, Berlin (USA) (1992).
- C34 D. Bourgeois, J.P. Moy, O. Svensson, and A. Kvick  
 "The Point Spread Function of X-ray Image Intensifiers/CCD camera and Imaging Plates Systems in Crystallography : assessment and consequences for the dynamic range ".  
*European Symposium on Frontiers in Science and Technology* , Aix en Provence (France) (1994).
- C35 D. Bourgeois, T. Ursby, M. Wulff, C. Pradervand, V. Srajer, A. Legrand, W. Schildkamp, S. Labouré, C. Rubin, T.Y Teng, M. Roth, and K. Moffat.  
 "Clichés de diffraction Laue obtenus à l'ESRF en mode mono paquet sur des cristaux de myoglobine".  
*Congrès de l'association française de cristallographie* , Grenoble (France), (1995).
- C36 D. Bourgeois, T. Ursby, M. Wulff, C. Pradervand, V. Srajer, A. Legrand, W. Schildkamp, S. Labouré, C. Rubin, T.Y Teng, M. Roth, and K. Moffat.  
 "Single pulse Laue images from macromolecular crystals recorded at ESRF".  
*SPIE Conference on Time Resolved Electron and X-Ray diffraction* , San Diego (USA), 1995.
- C37 D. Bourgeois, S. Longhi, M. Wulff and C. Cambillau.  
 "Accuracy of structural information obtained at the ESRF from very fast Laue data collection on macromolecules."  
*48H de Biologie Structurale*, Autrans (France), (1996).
- C38 D. Bourgeois, T. Ursby, F. Schotte and M. Wulff.  
 "Time-resolved macromolecular crystallography at ESRF : results and perspectives".  
*New opportunities for research at third generation light sources*, Lipica (Slovenia ), (1996).
- C39 D. Bourgeois,  
 "Accuracy of Structural Information Obtained at the ESRF from Very Fast Laue Data Collection on Macromolecules."  
*48H de Biologie Structurale*, Autrans (France), (1996).
- C40 : D. Bourgeois,  
 "Time-resolved macromolecular crystallography at ESRF : Results and perspectives".  
*GTBio 96*, Toulouse (France), (1996).
- C41 : D. Bourgeois,  
 "Very Fast Laue Data Collection on Macromolecules at ESRF".  
*IUCR Synchrotron Radiation Satellite Meeting*, Argonne (USA), (1996).
- C42 : D. Bourgeois & M. Wulff,  
 "Time-resolved Macromolecular Crystallography at ESRF : Nanosecond to Second Range".  
*ECM 17*, Lisbon (Portugal), (1997).

- C43 : D. Bourgeois,  
"Data Collection and Reduction Strategies For Underexposed Single-Bunch Data from Macromolecules".  
*ESRF User Meeting*, Grenoble (France), (1998).
- C44 : D. Bourgeois,  
"Determination of the Electron Density from Underexposed Single-Bunch Laue Patterns".  
*Workshop on Ultra-Fast Kinetics of Molecular Assemblies*, ESRF (France), (1998).
- C45 : W.P. Burmeister, D. Bourgeois , R. Kahn, H. Belrhali, E.P. Mitchell, S. McSweeney & S. Wakatsuki,  
"Diamonds, a Multilayer and a Sagittally Focusing Crystal as Optical Elements on the ID14/Quadriga Beamline at the ESRF".  
*AFC*, Orleans (France), (1998).
- C46 : D. Bourgeois, D. Nurizzo, R. Kahn & C. Cambillau,  
"Data Integration Based on Profile Fitting With Optimized Profile Area for the Evaluation of Weak and/or Overlapped 2D Diffraction Patterns".  
*AFC*, Orleans (France), (1998).
- C47 : D. Bourgeois,  
"Recent Developments in Macromolecular Time-Resolved Crystallography".  
*ECM-18*, Prague (Czech Republik), (1998). [Invited Plenary lecture]
- C48 : D. Bourgeois , D. Nurizzo, R. Kahn & C. Cambillau,  
"PrOW : A Program For Data Integration Based on Profile Fitting for the Evaluation of Weak and/or Overlapped 2D Diffraction Patterns".  
*ECM-18*, Prague (Czech Republik), (1998).
- C49 : D. Bourgeois,  
"Comparison of current dectectors used at the ESRF for protein crystallography".  
*Protein Crystallography at the SLS*, Zürich (Switzerland), (1998).

### 3. Introduction

Le résumé des travaux présentés dans ce document ressemble assez à un "pot pourri". Il caractérise en cela la diversité des sujets scientifiques que j'ai abordé jusqu'à présent. Même si ces dix premières années de recherche ont d'une certaine façon manqué de cohérence, elles ont été guidées par un fil directeur : l'intérêt pour la méthodologie à l'interface biologie-physique. Que ce soit dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire *in vivo* ou dans celui de la cristallographie des protéines résolue en temps, j'ai toujours pris plaisir à développer de nouvelles méthodes facilitant l'étude de problèmes biologiques donnés.

Le changement de cap plutôt radical effectué fin 1992, lorsque je suis arrivé au synchrotron européen (ESRF) après 4 années passées dans le domaine de la RMN, résulte d'abord d'un besoin de changement dans mes activités (malgré la qualité difficilement égalable, tant du point de vue scientifique que du point de vue humain, du laboratoire de Michel Décorps) ainsi que d'un fort attrait pour la concentration d'instituts scientifiques internationaux se développant autour de l'ESRF dans le domaine très porteur de la biologie structurale. Bien que finalement bénéfique, ce changement de sujet scientifique, dont j'ai au départ sous-estimé l'ampleur, m'a retardé dans ma capacité à encadrer des étudiants et à définir un sujet de recherche qui me soit vraiment propre.

Au cours de ces dernières années, j'ai participé activement à la construction de plusieurs lignes de lumière de l'ESRF. J'ai appris les bases de la cristallographie et en particulier de la méthode Laue. Je me suis engagé dans plusieurs collaborations avec des équipes de biologistes travaillant à suivre les changements de conformation de protéines le long de leur chemin réactionnel. Ce travail a dans l'ensemble été fructueux, m'a permis d'apprendre énormément, mais m'a souvent laissé l'impression d'accompagner plus que de mener une recherche plutôt choisie par d'autres. Mes contributions les plus personnelles ont concerné le domaine du traitement des données. C'est dans ce domaine que j'ai pu réellement encadrer un étudiant en thèse.

Ce n'est que récemment que j'ai acquis le recul nécessaire pour réfléchir à l'orientation future de mes activités. Au cours des prochaines années, je souhaite profiter de mes acquis de physicien ainsi que de mes forts liens avec l'ESRF pour développer à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) une équipe travaillant sur la cristallographie des protéines résolue en temps. Cette activité difficile, encore très peu représentée en France, semble cependant ouverte à un bel avenir, comme l'ont déjà montré quelques travaux réalisés ces dernières années. Elle constitue pour moi un bon "créneau", où il importera de mettre d'abord l'accent sur la finalité biologique des sujets abordés, plus que sur les méthodes.

Dans ce contexte, je souhaite encadrer dès que possible des étudiants en thèse intéressés par ce sujet, et pour cela obtenir mon diplôme d'habilitation à diriger la recherche.

## **4. Méthodologie en imagerie par résonance magnétique nucléaire**

### **4.1. Introduction**

Les travaux réalisés entre septembre 1988 et septembre 1992 résultent de la préparation d'une thèse de doctorat traitant de méthodologie en imagerie par RMN, effectuée au laboratoire de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine du Centre d'Etude Nucléaire de Grenoble sous la direction de Michel Décorps, et d'un stage post-doctoral effectué au Canada sous la direction de Roxanne Deslauriers, à l'Institut des Sciences Biologiques du Conseil National de la Recherche, portant sur le développement de nouvelles techniques en "imagerie spectroscopique" *in vivo*.

Malgré le plaisir que j'ai eu à travailler dans ce domaine en plein développement, et malgré mon grand attachement au laboratoire de Michel Décorps, mais vu leur éloignement par rapport à ma recherche actuelle, je ne décrirai ces travaux que très succinctement.

### **4.2. Imagerie quantitative de mouvements très lents**

La RMN est une méthode très performante pour mesurer des mouvements cohérents (écoulements) ou incohérents (perfusion, diffusion). Nous nous sommes intéressés aux mouvements cohérents particulièrement lents, tels la montée de la sève dans une tige, et nous avons proposé deux méthodes permettant de les détecter grâce à une suppression intrinsèque des signaux provenant des parties statiques de l'échantillon (P3, P4, P6, P9)<sup>1</sup>. Nous avons pu détecter des vitesses de 10  $\mu\text{m/s}$ . Nous avons en outre couplé ces méthodes à une technique d'imagerie, ce qui nous a permis d'évaluer quantitativement la vitesse en chaque point de l'échantillon. Suite à ces travaux, nous avons été sollicité pour écrire un article de revue portant sur les techniques d'imagerie de vitesses très lentes (L2). Il est intéressant de noter que les techniques d'imagerie fonctionnelle, qui se sont énormément développées ces dernières années, s'appuient dans de nombreux cas sur la mesure d'un mouvement (en particulier le flux sanguin, qui s'accroît dans les zones du cortex stimulées par une action ou une pensée).

### **4.3. Imagerie spectroscopique**

L'imagerie spectroscopique est une méthode de localisation spatiale permettant d'enregistrer simultanément plusieurs spectres localisés au sein de l'échantillon. L'on peut ainsi obtenir des images à basse résolution spatiale de plusieurs métabolites directement impliqués dans de nombreuses pathologies. Cette technique est complémentaire de l'imagerie classique proton, liée à la présence d'eau dans les tissus et qui fournit des images de haute résolution spatiale. Fondée sur l'utilisation de gradients de codage de phase, l'imagerie spectroscopique a l'avantage d'éviter tout artefact de déplacement chimique. Elle est aussi particulièrement avantageuse du point de vue rapport signal sur bruit. Elle s'est rapidement imposée pour l'étude de modèles animaux, et est maintenant employée en routine pour des études cliniques. Nous avons développé deux méthodes d'imagerie spectroscopique destinées à l'étude de pathologies cérébrales chez le rat et le cochon (P5, P10).

Plusieurs problèmes méthodologiques ont été étudiés : élimination des signaux à hauts flux (P1), impulsions de verrouillage d'aimantation (P5), optimisation de la fonction de contamination par modulation du nombre d'accumulations par pas de codage de phase (P8), translation de la grille spectroscopique, (L1), phasage automatique des images

---

<sup>1</sup> Les sigles P (Publications), L (Livres) ou M (Mémoires) renvoient à la liste des publications.



spectroscopiques (P11), techniques de 'zero-filling' (M1). En particulier, j'ai proposé une technique d'éditing du lactate (P12). Cette molécule, dont l'importance biologique est capitale, est en général difficile à observer par RMN, car son signal se superpose à ceux des graisses, plus larges et intenses. La séquence d'impulsion que j'ai proposée permet, en une seule acquisition, et en utilisant une antenne de surface, d'éliminer 99.5% du signal des graisses, tout en conservant l'intégralité du pic du lactate. Contrairement aux autres méthodes d'éditing, cette séquence permet en outre l'observation simultanée d'autres métabolites essentielles comme le N-acetyl-aspartate, la choline ou la créatine.

Plusieurs résultats d'intérêt biologique ont été obtenus, portant sur l'étude de modèles d'ischémie focales chez le rat (P7, P13, P19), et sur la croissance de gliomes intracérébraux (P5). Dans ce dernier cas, des gliomes sont induits par injection de cellules malignes dans l'hémisphère droit du cerveau de l'animal. Des images spectroscopiques sont réalisées une fois par semaine, et corrélées avec des images de haute résolution. Comparé au spectre d'une région saine du cerveau, le spectre caractéristique d'une zone tumorale présente plusieurs modifications importantes : nette diminution du N-acetyl-aspartate (attribuée au remplacement du tissu cérébral sain, riche en neurones, par des cellules d'origine gliale, dépourvues de NAA) ; apparition de lipides et de lactate, attribués respectivement à une dégradation des phospholipides membranaires et à une augmentation de la glycolyse aérobie ou anaérobie ; inversion du rapport créatine-choline (liée à une dégradation membranaire ou à une synthèse accrue des phospholipides membranaires dans les cellules tumorales).

## **5. Instrumentation à l'ESRF**

### **5.1. Participation à la construction de la ligne de lumière ID11**

Lorsque je suis arrivé comme post-doc à l'ESRF en Octobre 1992, aucune ligne de lumière n'était encore construite, et la recherche en cristallographie des protéines ne constituait pas une priorité. Au sein du 'groupe diffraction', dont l'une des principales tâches était de mettre en service la première ligne, ID11, dédiée à la science des matériaux, j'ai pu me former aux principes de base du rayonnement synchrotron. Ma première participation au développement de la ligne fut d'écrire un logiciel capable de déterminer la charge thermique reçue ou transmise en divers points de la ligne en fonction des paramètres (nombre, périodicité et magnétisation des poles, distance d'entrefer) de l'élément d'insertion (un 'wiggler' extrêmement puissant) placé en amont. De cette charge thermique dépendait le choix du système de refroidissement et les conditions d'utilisation tolérables pour divers éléments optiques testés sur la ligne (fentes, atténuateurs, miroirs, monochromateurs).

Une fois le faisceau de ID11 bien caractérisé, une large attention a été portée au choix d'un détecteur bi-dimensionnel. Vu l'importance cruciale du détecteur en cristallographie des protéines, je me suis particulièrement impliqué dans ce travail.

#### **5.1.1. Détecteurs bi-dimensionnels**

Mon premier travail de recherche en instrumentation, réalisée avec un étudiant en thèse, Olof Svensson, a consisté à caractériser la fonction de réponse spatiale ('PSF') et la dynamique ('dynamic range') de plusieurs détecteurs bi-dimensionnels : 'image plates' et détecteurs CCD (P14). Pour la plupart des études de diffraction, et en particulier en cristallographie des macromolécules, ces deux paramètres ont une grande importance. La fonction de réponse spatiale, en particulier à bas niveau (typiquement à 1%, voire 0.1% du maximum) détermine directement le nombre d'ordres de diffraction qui peuvent être résolus par un détecteur de taille donnée. Elle affecte aussi le rapport signal sur bruit des pics de diffraction. En général, l'on peut s'attendre à ce que la PSF se dégrade lorsque l'énergie des rayons-X augmente et que ceux-ci pénètrent plus profondément dans l'élément absorbant du détecteur. Nous avons mis en évidence cet effet en la mesurant à plusieurs énergies. En saturant les détecteurs, nous avons aussi pu observer la queue de la PSF. De très importantes différences apparaissent à ces bas niveaux, qui reflètent les différentes techniques de détection employées. La dynamique des détecteurs est aussi un facteur essentiel. La gamme nécessaire peut facilement dépasser 16 bits, par exemple si l'on souhaite collecter des données à très haute résolution en même temps que des données à basse résolution. Nous avons montré que la dynamique réelle des détecteurs était largement affectée par la fonction de réponse spatiale. En effet, une tache faible située à proximité d'une tache intense peut facilement être noyée dans la queue de la PSF de cette dernière.

### **5.2. Participation à la construction et au développement de la ligne de lumière ID09**

Lorsque je suis entré au CNRS, en Octobre 1993, mon projet de recherche consistait pour une grande part à établir une collaboration étroite entre l'IBS et l'ESRF afin de réaliser des études de cristallographie des protéines résolue en temps en utilisant la technique Laue. Afin de profiter de la brillance exceptionnelle disponible à l'ESRF, l'accent a été mis sur l'emploi du mode simple paquet ('single bunch'), permettant d'atteindre des échelles de temps de l'ordre de la centaine de ps, et ce malgré le petit nombre de systèmes biologiques connus pour être bien adaptés. Il serait ainsi possible de 'capturer' la structure tri-dimensionnelle d'un

intermédiaire de très courte durée de vie, sans avoir recours à des techniques visant à ralentir artificiellement les temps de réaction et susceptibles d'introduire des artefacts. Ce 'défi instrumental' a donc été relevé, sur la ligne de lumière ID09 ('white beam'), dirigée par Michael Wulff. J'ai d'abord participé activement à la définition et à la construction de la ligne, effectuant plus un travail d'ingénieur et de technicien qu'un travail de chercheur. Les premiers clichés de diffraction en faisceau blanc ont été obtenus en 1995 avec un cristal de ... lysozyme (P15). Puis j'ai travaillé à la réalisation d'une caméra Laue permettant l'utilisation du mode simple paquet, avec l'aide d'un technicien, Sylvain Labouré, d'un étudiant en thèse, Thomas Ursby, et en collaboration avec l'équipe de Keith Moffat (Université de Chicago).

### 5.2.1. Caméra Laue simple paquet ('SP Laue')

Notre but consistait à déclencher une réaction de façon homogène et synchrone au sein d'un cristal de protéine au moyen d'un laser pulsé, puis, après un délai fixé de l'ordre de la nanoseconde, à enregistrer un cliché de diffraction Laue avec un seul paquet de rayons X. En prenant pour exemple la myoglobine et la photolyse d'un substrat de monoxyde de carbone, nous avons d'abord effectué une simulation prenant en compte le flux de rayons-X disponible en un seul paquet, l'efficacité quantique du détecteur, ainsi qu'un modèle représentatif des changements de structure attendus, et montré que le déplacement du ligand devait être clairement visible. Nous avons ensuite construit la caméra, réalisation assez complexe incluant de nombreux éléments ainsi qu'un dispositif de synchronisation électronique sophistiqué. Ces travaux ont fait l'objet des publications P15-P18 et P20. Un schéma de principe est présenté figure 1.

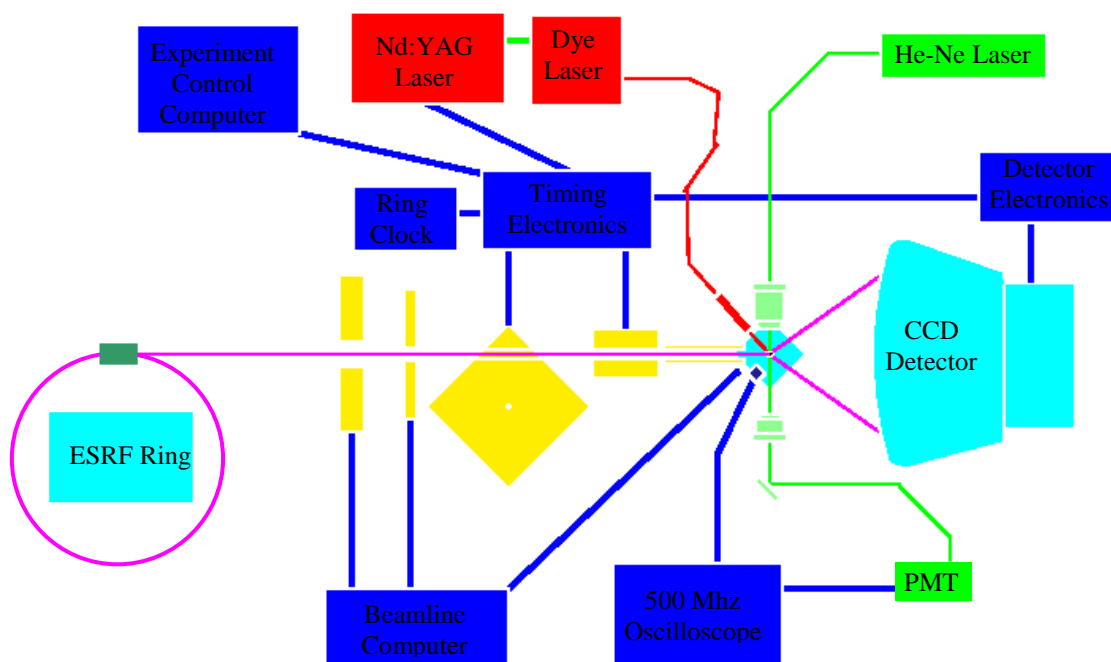


Fig.1 Schéma de principe de la caméra SP Laue. Le mode 'single bunch' est utilisé pour deux raisons : d'une part, avec environ 15mA de courant moyen, ce mode produit la plus forte brillance instantanée ( $> 10^{10}$  photons/paquet) ; d'autre part, grâce à une fréquence de répétition relativement modeste (355 kHz, *ie* toutes les 2.8  $\mu$ s), il permet d'isoler une seule impulsion de rayons-X avec un train d'obturateurs mécaniques. L'obturateur le plus rapide est un 'chopper' en titane, disque tournant à une fréquence de 445 Hz et percé d'un mince canal le long de son diamètre. L'axe de rotation du chopper est placé perpendiculairement au faisceau. Le chopper s'ouvre pendant 3.7  $\mu$ s toutes les 2.25 ms. La rotation du chopper est asynchrone avec l'horloge radio-fréquence

du synchrotron. Si le déphasage entre les deux horloges est défavorable, deux impulsions de rayons X peuvent traverser le chopper ( $3.7 \mu\text{s} > 2.8 \mu\text{s}$ ). Pour parer à ce problème, un dispositif électronique mesure la dérive du chopper, et est capable de prévoir 2.3 ms à l'avance à quel moment les deux horloges seront parfaitement en phase. Ce délai de 2.3 ms est suffisant pour ouvrir un obturateur ms électromagnétique, qui, avec un temps d'ouverture de 1.4 ms, permet au total la sélection d'un seul paquet de rayons-X. Les clichés de diffraction sont enregistrés avec un intensificateur d'image couplé à un détecteur CCD (XRII/CCD), dont la DQE ('Detective Quantum Efficiency') est excellente à bas niveau de signal. Pour photo-dissocier l'échantillon, un laser DYE, pompant la seconde harmonique d'un laser Nd:YAG, est utilisé à 635 nm. Le choix de la longueur d'onde d'excitation est essentiel : la densité optique de l'échantillon à la longueur d'onde choisie doit être suffisamment faible pour assurer une photolyse uniforme au sein du cristal et minimiser la génération de gradients thermiques. Les impulsions laser, de durée 7.5 ns sont amenées à l'échantillon par un système de fibres optiques. La synchronisation de l'expérience est contrôlée par une diode avalanche, sensible à la fois aux rayons-X et à la lumière visible. Une partie du rayonnement diffusé par l'échantillon est captée par cette diode, dont le signal est enregistré sur un oscilloscope numérique. Un spectrophotomètre constitué d'une source laser CW à 532 nm et d'un photomultiplicateur couplé à un oscilloscope, et synchronisé avec l'impulsion laser d'excitation, permet de mesurer le degré de photolyse. Cette information peut ensuite être corrélées aux données cristallographiques. Un refroidissement modéré de l'échantillon est obtenu avec un système FTS. Au total, pas moins de 10 instruments doivent être disposés autour de l'échantillon ! (collimateur RX, détecteur RX, laser d'excitation, laser de contrôle, photomultiplicateur, axe de rotation du goniomètre, 'beam-stop', microscope optique, diode avalanche, système FTS).

### 5.2.2. Améliorations

Ces dernières années, certaines améliorations ont été apportées, qui ont beaucoup amélioré la fiabilité du système (P24, P27 et L3).

#### 5.2.2.1. Détecteur

Les premières expériences ont montré que les clichés de diffraction obtenus avec un seul paquet de rayons-X présentent un rapport signal sur bruit trop faible. Il est donc essentiel de moyenniser plusieurs images pour chaque orientation du cristal. Au lieu d'effectuer cette opération de moyennage lors du traitement des données, nous avons proposé d'accumuler plusieurs expositions au sein même du CCD. Outre une réduction importante de la quantité de données produites, ce système permet, pour N images accumulées, de n'introduire qu'une fois le bruit de lecture du CCD, au lieu de N fois. Cependant, cette amélioration n'est valable que si le courant d'obscurité du détecteur reste faible. C'est pourquoi, une nouvelle caméra CCD refroidie à l'azote liquide a été installée.

#### 5.2.2.2. 'Phase-locked chopper'

Après une étude de plus de trois ans dont j'ai été le responsable, un obturateur rapide synchrone ('phase locked chopper') a été installé sur la ligne. Ce nouvel appareil est beaucoup plus performant que l'ancien, car sa fenêtre d'ouverture est plus courte ( $1.5 \mu\text{s}$ ), sa fréquence de rotation plus importante (900 Hz), et surtout car ce chopper est constamment en phase avec l'horloge radio fréquence de l'ESRF (avec une erreur d'environ 10 ns, ce qui constitue une prouesse mécanique et électronique non négligeable !). En plus d'une simplicité d'utilisation accrue, ce chopper permet d'envisager de nouvelles techniques stroboscopiques de collection de données. Ainsi, des collectes de données monochromatiques simple-paquet ont été réalisées en démonstration avec des cristaux de myoglobine. Malheureusement, aucune application sur des systèmes biologiques n'a été proposée jusqu'à présent, car ceux-ci ne peuvent en général tolérer une excitation laser à une fréquence supérieure à environ 1 Hz.

#### 5.2.2.3. 'Single-line undulator'

Récemment, Michael Wulff a proposé d'installer un nouvel élément d'insertion sur ID09. Il s'agit d'un onduleur dont toutes les harmoniques sauf la première sont très atténuées. Ainsi, par rapport à un 'wiggler' de large bande passante, et classiquement utilisé pour les

expériences Laue, un onduleur 'single line' présente une bande passante beaucoup plus étroite, de l'ordre de 10 à 20%. Pour les expériences de type SP Laue, cet élément d'insertion permet d'améliorer significativement le rapport signal sur bruit par image, essentiellement du fait que le bruit de fond est (à peu près) proportionnel à la bande passante, mais aussi grâce à une réduction importante des recouvrements spatiaux et harmoniques. Cependant, le nombre d'images à des orientations différentes doit être augmenté, et nous avons montré que cet élément d'insertion n'est bien adapté qu'aux systèmes réversibles pouvant tolérer de nombreuses excitations laser.

### 5.2.3. Méthode Laue à des échelles de temps plus lentes

Pour être de bonne qualité, un jeu de données Laue doit être obtenu à partir de plusieurs images (typiquement entre 5 et 20, selon le groupe d'espace), enregistrées à des orientations différentes. Lorsque les changements de structure étudiés sont irréversibles, il est impossible de répéter plusieurs fois l'initiation de la réaction sur le même cristal<sup>2</sup>. Les seules solutions consistent donc soit à enregistrer chaque cliché de diffraction avec un cristal différent, ce qui pose de gros problèmes de mise à l'échelle, soit à n'utiliser qu'un seul cristal, auquel cas la résolution temporelle est avant tout limitée par le temps de lecture du détecteur. Nous avons adapté l'instrumentation mise en place pour les études en mode simple paquet, en installant sur la ligne ID09 un détecteur CCD développé à l'ESRF (appelé FRELON), dont le temps de lecture par image est d'environ 200 ms. Ainsi, en pratique, une résolution temporelle de l'ordre de la seconde peut être atteinte, au dépens d'une dynamique réduite à 14 bits.

Ce système a été utilisé pour étudier la phosphorylation en temps réel d'un analogue de transition de la glutathione synthétase (§ 6.1.2.1). La réaction est déclenchée par photolyse d'ATP cagé. Nous avons montré qu'il est inutile, et même néfaste, d'utiliser une source de lumière plus rapide que le temps caractéristique de photo-fragmentation du substrat cagé. Avec un laser ns, par exemple, l'on ne parvient pas à photolyser plus de 50% des sites cagés, probablement à cause d'un effet d'émission stimulée. Il est bien plus efficace d'utiliser une source plus lente, de type lampe flash. Nous avons installé une telle source sur la ligne ID09.

### 5.2.4. Spectrophotométrie et piégeage cryogénique.

Lorsqu'il est possible, en abaissant brusquement la température, de piéger un état intermédiaire précédant une étape limitante de la réaction, il n'est plus besoin d'effectuer de mesures en temps réel par la méthode Laue, et des collectes monochromatiques suffisent. Pour les échelles de temps supérieures au temps de piégeage cryogénique (typiquement plusieurs centaines de ms), cette méthode permet d'éviter les difficultés de la technique Laue. En collaboration avec un étudiant en thèse, Friedrich Schotte, nous avons développé un banc de mesure réunissant un système de refroidissement à 100 K de type Oxford, un microspectrophotomètre (inspiré des études de J. Hadju) et un système d'alignement des cristaux. Le spectrophotomètre fonctionne essentiellement dans la gamme visible 350-700 nm. Le diamètre du faisceau au point focal est inférieure à 50  $\mu\text{m}$ . Ce banc de mesure a été utilisé pour les études sur la nitrite réductase (P32, P36). Nous souhaitons le développer considérablement dans un proche avenir (§ 9.2.1).

#### 5.2.4.1. Logiciels de collecte des données

Un important travail a consisté à écrire différents logiciels de contrôle des expériences résolues en temps, en utilisant le programme SPEC : expériences Laue en mode simple paquet avec excitation laser alternée et moyennation dans le CCD, expériences Laue en mode multi paquets avec excitation par lampe flash suivie de collectes rapides avec la caméra Frelon, ou

---

<sup>2</sup> à moins d'imaginer un système de 'flow-cell' permettant par exemple de diffuser un substrat (cagé) photolysable et d'éliminer le produit de réaction de nombreuses fois.

expériences monochromatiques classiques (impliquant la synchronisation de l'obturateur, du moteur contrôlant l'oscillation et du détecteur).

### ***5.3. Participation à la construction de la ligne de lumière ID14***

J'ai participé à la construction de la ligne de lumière ID14 d'Octobre 96 à Octobre 98 (P34-35). Vu le côté 'exotique' de la ligne ID09, il m'a semblé important, pour augmenter mes connaissances, de m'impliquer dans une équipe plus directement au contact de la cristallographie des protéines 'standard'. Du point de vue instrumentation, mon apport a été limité.

#### ***5.3.1. Optimisation de l'orientation des monochromateurs***

La ligne ID14, véritable usine à cristallographie des protéines, est constituée de 4 stations expérimentales (EH1-EH4) arrangées en série selon le principe 'Troika'. A partir d'un seul faisceau blanc, trois faisceaux monochromatiques sont produit latéralement par des monochromateurs constitués de cristaux synthétiques de diamant. Les longueurs d'onde qui ne sont pas diffractées par l'un des diamants sont transmises. Celles qui ont traversé les trois diamants arrivent vers un quatrième monochromateur desservant une station dédiée aux études MAD. La connaissance de toutes les longueurs d'onde diffractées par l'un des diamants est importante car ces longueurs d'ondes ne sont plus disponibles pour les stations situées en aval. Elles forment des trous ('glitches') dans le spectre transmis. La prédiction des 'glitches' revient exactement à calculer un diagramme de diffraction Laue sur un angle solide de  $4\pi$  stéradians. J'ai écrit un logiciel permettant de trouver l'orientation d'un cristal de diamant qui, la longueur d'onde du faisceau monochromatique sélectionnée par ce cristal étant donnée, minimise le nombre de 'glitches'. Les prédictions obtenues par ce logiciel ont été vérifiées de manière expérimentale avec Wim Burmeister, et les cristaux de diamant de ID14 ont été orientés en fonction de celles-ci.

#### ***5.3.2. Installation du détecteur et logiciel de collecte des données***

Je me suis occupé de l'installation du premier détecteur de type MARCCD sur la station EH3, et en particulier des opérations de communication entre le détecteur et l'ordinateur de contrôle de la station. J'ai aussi écrit le programme de collecte de données monochromatiques, qui a par la suite été amélioré en ajoutant une interface graphique.

## 6. Cristallographie des protéines résolue en temps

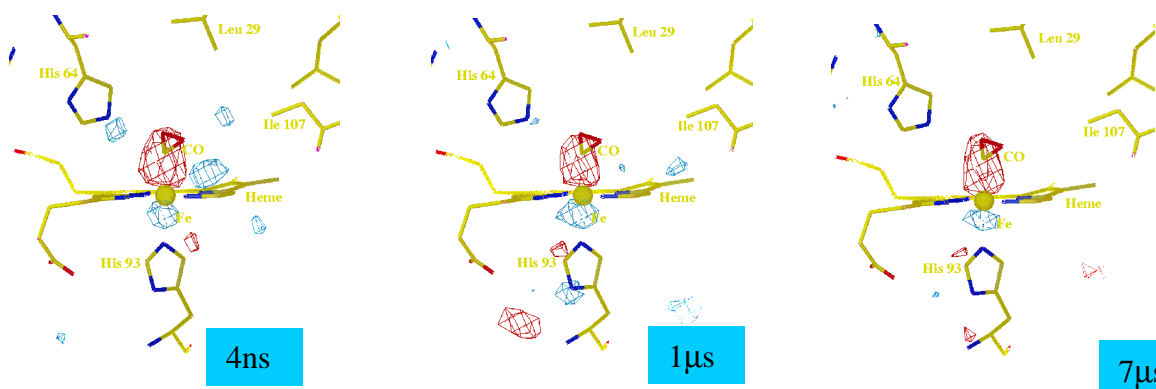
### 6.1. Cristallographie en temps réel

#### 6.1.1. Echelle ns : La méthode 'Single Pulse 'Laue

La technique SP Laue, décrite dans le paragraphe 5.2.1 ne convient qu'à très peu de systèmes biologiques pour deux raisons principales. D'une part, pour pouvoir atteindre une résolution temporelle de l'ordre de la ns, il est nécessaire que l'initiation de la réaction dans toutes les molécules du cristal se produise à une échelle de temps encore plus rapide. La seule méthode connue consiste à utiliser une source de lumière pulsée, et l'on ne peut alors utiliser que des systèmes biologiques 'directement' sensibles à la lumière. Les systèmes 'indirectement' sensibles (utilisant des composés cagés), ne conviennent pas, car le déclenchement de la réaction ne se produit pas immédiatement après l'absorption d'un photon, mais seulement après une étape supplémentaire de photo-fragmentation en général trop longue. D'autre part, les cristaux doivent avoir un pouvoir diffractant excellent, et être très résistant à l'effet des radiations laser et X.

#### 6.1.1.1. Myoglobine

Les cristaux de myoglobine répondent à ces contraintes. La première étude que nous avons réalisée, en étroite collaboration avec l'équipe de Keith Moffat concerne la relaxation de la myoglobine après photolyse d'un substrat de monoxyde de carbone (P21). Des cartes de densité électronique différence à 2.0 Å de résolution ont été obtenues par Thomas Ursby pour 6 intervalles de temps entre l'excitation laser et l'impulsion de rayons X : 4 ns, 1 µs, 7 µs, 50 µs, 350 µs et 1.9 ms (Figure 2). Plusieurs informations importantes ont résulté de cette étude : (i) les cartes différence portent une information sur la cinétique de recombinaison du ligand, bien corrélée aux observations spectroscopiques conduites en parallèle ; (ii) les cinétiques de déplacement de l'atome de fer de l'hème et du ligand sont simultanées ; (iii) la présence d'un site de fixation temporaire du ligand ('docking site'), déjà prédit par d'autres études (spectroscopie infrarouge ou RX à basse température) est confirmée ; (iv) un mouvement de l'histidine distale en direction de l'emplacement laissé vacant par le CO est observé ; (v) plusieurs tâches de densité au niveau des résidus entourant la cavité hémique apparaissent avec un certain retard ou persistent plus longtemps, suggérant un délai entre la photolyse du ligand et la relaxation de la protéine ; (vi) le taux de photolyse observé (d'environ 45%) suggère l'existence d'une phase de recombinaison directe du CO ('geminate recombination') inobservable car extrêmement rapide, et pouvant être corrélée au point (v). Malgré l'intérêt de ces observations, il est clair que le rapport signal sur bruit des cartes différence est trop défavorable pour révéler sans ambiguïté les changements de conformation attendus de certaines hélices entourant la cavité hémique. De ce fait, aucun affinement de la structure photolysée n'a été envisagé.



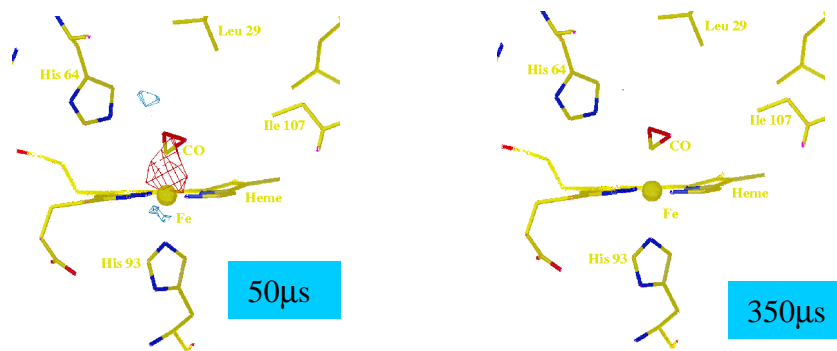


Fig. 2 : Cartes de Fourier différence obtenus à différents délais après photolyse, et contourées à +3.5 sigma (bleu) et -3.5 sigma (rouge). Le traitement des donnée a été effectué par Thomas Ursby (en parallèle avec le traitement effectué à Chicago), en utilisant les méthodes décrites aux paragraphes 7.1 et 7.2.

### 6.1.1.2. Etude de faisabilité : cutinase

Suite aux expériences menées sur la myoglobine, j'ai proposé de réaliser une étude de faisabilité visant à estimer la qualité des données pouvant être obtenues par la méthode SP Laue (P25). Pour cela j'ai utilisé des cristaux de cutinase, une hydrolase à sérine de 22 kD au fort pouvoir diffractant, et dont un modèle à 1Å de résolution a été obtenu par Sonia Longhi (AFMB, Marseille). A partir d'un modèle fortement biaisé (le modèle du mutant R196E, cristallisant dans un groupe d'espace différent de l'enzyme native), et de données SP Laue collectées à 1.5 Å de résolution (!) sur l'enzyme native, j'ai affiné un modèle de cette dernière, lors d'un séjour de 6 mois effectué dans le laboratoire de Christian Cambillau. J'ai ensuite comparé ce modèle 'SP Laue' au modèle 'cible' à 1Å de résolution. Au total 57 paquets de rayons-X (19 orientations du cristal, avec une accumulation de 3 paquets par image) ont été envoyés sur l'échantillon, soit un temps total d'exposition de 8.55 ns. L'intensité intégrée médiane des tâches de diffraction est de 215 photons, soit une erreur largement supérieure à 7%. Cependant, les cartes de densité calculées avec les facteurs de structure ( $F_{SP\ Laue} - F_{calc\ mutant}$ ) ont permis d'identifier sans difficulté le résidu muté (Figure 3). Le modèle 'SP Laue', obtenu après remplacement moléculaire à partir du modèle du mutant, est de très bonne qualité ( $R = 19.3\%$ ,  $R_{free} = 24.2\%$ ). Par exemple la déviation standard entre la chaîne principale du modèle de départ et du modèle cible est de 0.23 Å, alors qu'elle n'est plus que de 0.08 Å entre le modèle 'SP Laue' et le modèle cible. A partir d'un sous ensemble du jeu de données monochromatique à 1Å de résolution ne retenant que la portion d'espace réciproque mesurée lors de l'expérience SP Laue, Sonia Longhi a affiné un nouveau modèle de la cutinase native, qui s'est révélé à peine meilleur que le modèle 'SP Laue'. Ainsi, nous avons montré que l'incomplétude des données Laue constituait un facteur nettement plus limitant que leur médiocre rapport signal sur bruit.

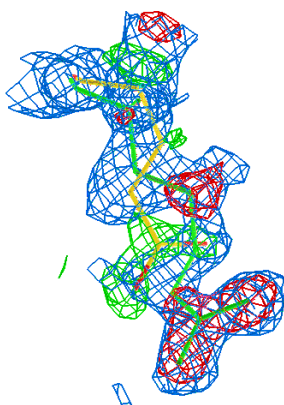


Fig. 3 : Cartes  $2F_{SP-Laue} - F_{calc-mutant}$  (contourée à  $1\sigma$ ) et  $F_{SP-Laue} - F_{calc-mutant}$  (contourée à  $-3\sigma$  (vert) et  $+3\sigma$  (rouge)), au niveau du résidu 196. Le modèle de l'arginine native est représenté en vert.



Cette étude n'est que partiellement représentative. Dans les cas réels, les principales difficultés consistent à déclencher la réaction au sein du cristal : le taux de photolyse est en général faible et de petits cristaux doivent être employés, plusieurs espèces intermédiaires pouvant en outre cohabiter.

### 6.1.1.3. Photoactive Yellow Protein

Malgré ces inconvénients, la technique SP Laue convient bien à l'étude de la protéine PYP ('Photoactive Yellow Protein'). Cette petite protéine de 125 acides aminés, présente dans le cytosole de certaines bactéries halophiles, est un récepteur de lumière. Son rôle, pense-t-on, est associé à une réponse phototactique négative : suite à l'absorption d'un photon (à 446 nm), un photocycle est déclenché et induit la transduction d'un signal actionnant un moteur flagellaire qui éloigne la bactérie de la surface du lac, et la protège ainsi d'un excès de lumière bleue. L'activation par la lumière est assurée par un chromophore enfoui dans le coeur hydrophobique de la protéine. Le photocycle est représenté sur la figure 4. La structure de l'intermédiaire I2 a déjà été résolue au NSLS par Ulrich Genick en utilisant la méthode Laue. L'intermédiaire I1 se formant en quelques ns, nous avons utilisé la méthode SP Laue pour l'étudier, toujours en collaboration avec l'équipe de Keith Moffat (P30). La structure de cet intermédiaire est extrêmement importante, car elle révèle la manière dont la protéine est capable de stocker très rapidement l'énergie du photon absorbé sous forme chimique, évitant ainsi une dégradation sous d'autres formes (fluorescence par exemple). L'hypothèse avancée est que ce stockage s'effectue grâce à une isomérisation trans-cis du chromophore, dont la structure serait transitoirement distordue pour compenser les problèmes d'encombrement stérique. La relaxation des résidues de la poche hydrophobique conduirait alors, plus lentement, à l'espèce I2. L'expérience menée à l'ESRF a permis d'affiner un modèle de l'espèce I1 à 1.9 Å de résolution. La carte de densité différence entre l'état I1 et l'état non excité est présentée figure 5. Les principales conclusions de Ben Perman dans P30, sont que (i) l'isomérisation trans-cis est entièrement réalisée en moins de quelques ns ; (ii) cette isomérisation s'accompagne d'une rotation partielle de la liaison thio-ester et de la rupture de la liaison entre le groupe carbonyle du chromophore et la chaîne principale ; (iii) un réarrangement des liaisons hydrogènes apparaît au niveau de la partie distale du chromophore, légèrement déplacée.

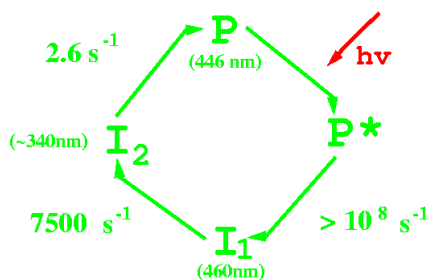


Fig. 4 : Photocycle (simplifié) de la protéine PYP.

En août 98, j'ai été invité à donner une conférence plénière sur la cristallographie des protéines résolue en temps, au congrès de l'ECM 18, à Prague. L'inspection critique de la carte de la figure 5, ainsi que de nombreuses discussions au sujet de ces résultats, en particulier avec Ulrich Genick, m'ont amené à douter de l'exactitude du modèle affiné par Ben Perman - sans pour autant prouver qu'il doive être remis en cause -. Il est clair que ce modèle ne rend pas bien compte des tâches de densité différence observées. Bien que les données expérimentales soient de bonne qualité, de nombreuses précautions doivent être prises lors des procédures d'affinement afin d'éviter de tomber dans un 'faux minimum'. Par

exemple, fixer la position de la majorité des résidus et n'affiner que les résidus clés afin d'augmenter le rapport données/paramètres est une procédure suspecte, qui a pour effet de regrouper les erreurs de mesure provenant de l'ensemble de la protéine au niveau du site intéressant. D'autre part, les facteurs R et  $R_{\text{free}}$  sont relativement insensibles aux faibles mouvements du chromophore, et ne constituent pas un bon critère d'évaluation. Enfin, il me semble qu'un affinement dans l'espace direct aurait peut-être été plus opportun, le signal étant très localisé au niveau du chromophore.

Pour ces raisons, Ulrich Genick et Elisabeth Getzoff ont proposé de répéter l'expérience, en utilisant la technique SP Laue, mais avec le mode de remplissage '1/3 filling' de l'ESRF, de manière à obtenir des 'super-impulsions' de 1  $\mu\text{s}$  au lieu de 150 ps. Ce temps d'exposition, compatible avec la durée de vie de l'espèce I1, donne évidemment un bien meilleur rapport signal sur bruit. Les données sont actuellement en cours de traitement.

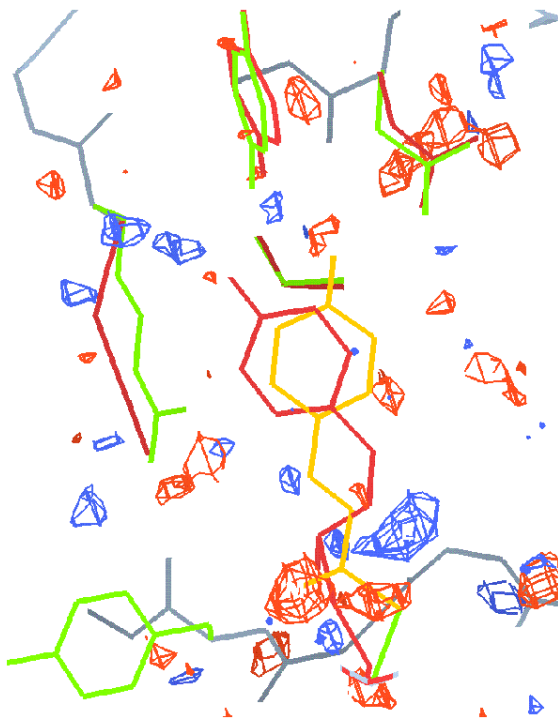


Fig. 5 : Carte de Fourier différence  $F_{1\text{ns}} - F_{\text{dark}}$  contourée à  $+ 2.6 \sigma$  (en bleu) et  $- 2.6 \sigma$  (en rouge). Le modèle de la protéine PYP avant illumination ('dark state') est représenté en vert et jaune pour le chromophore. Le modèle après illumination ('1ns state') est représenté en rouge foncé. D'après Perman *et al* (P30).

### 6.1.2. Echelle $\mu\text{s}$ -s :

La plupart des changements de conformation tertiaire associés à des réactions enzymatiques (irréversibles) se produisent à des vitesses plus lentes ( $\mu\text{s}$ -s), souvent nettement ralenties dans la phase cristalline à cause des contraintes d'empilement. Je participe à deux études qui sont toujours en cours, et qui reposent sur l'utilisation de composés cagés.

#### 6.1.2.1. Glutathione synthétase

La glutathione synthétase catalyse la formation de la glutathione (un tripeptide fortement réducteur, impliqué dans l'élimination des déchets cellulaires) à partir d'un dipeptide ( $\gamma$ -Glu-Cys) et de glycine. Deux co-substrats sont essentiels au fonctionnement de l'enzyme : l'ATP et l'ion  $\text{Mg}^{2+}$ . Au cours de la réaction, un intermédiaire acyl-phosphate se forme ( $\gamma$ -Glu-Cys-phosphate), suivi d'une attaque nucléophile de la glycine, pour donner la

glutathione, de l'ADP et du phosphate inorganique (figure 6). L'équipe de Hiro Kato, qui mène ce projet à l'université de Kyoto, a proposé de suivre l'étape de phosphorylation, non pas du dipeptide, substrat particulièrement instable, mais d'un analogue de transition ayant plus d'affinité pour le site actif. L'intérêt de cette expérience consiste à suivre le mouvement de deux boucles proches du site actif, l'une bloquant l'accès à celui-ci pour prévenir toute hydrolyse par entrée d'eau, et l'autre, plus petite, ('phosphate gripping loop') accompagnant – ou provoquant – le mouvement du phosphate  $\gamma$  de l'ATP en direction de l'intermédiaire acyl-phosphate. En utilisant de l'ATP cagé, la réaction est déclenchée avec une impulsion de lumière ultra-violet produite par une lampe flash. L'évolution au cours du temps du rapport ADP/ATP, mesuré par HPLC, a permis d'estimer que l'étape de phosphorylation est achevée en 1-2 minutes. Ainsi, en collectant les images Laue avec la caméra Frelon au rythme d'une par seconde, nous espérons observer la progression de la phosphorylation. Ma participation dans ce travail a consisté à préparer et à réaliser les collectes de données Laue (un travail assez compliqué), puis à optimiser le traitement des données (ce qui m'a permis d'être invité pendant 15 jours à Kyoto). Les résultats de ces travaux ne sont pas encore publiés, bien que nous soyons déjà parvenu à obtenir des cartes de type 'omit maps', 10 s, 40 s et 300 s après photolyse, qui indiquent (à 2.8 Å de résolution) le site de phosphorylation et le mouvement de la petite boucle. Deux problèmes limitent la portée de ces résultats. D'une part, la qualité des cartes est encore insuffisante, qu'elles aient été obtenues en mettant à l'échelle des données enregistrées avec plusieurs cristaux à des délais constants après la photolyse, ou avec un seul cristal, ce qui introduit un flou dans la résolution temporelle. Pour résoudre cette difficulté, j'ai proposé de tenter des collectes monochromatiques après piégeage par congélation. De telles collectes ont été réalisées récemment mais ont montré une grande mosaïcité des cristaux. Elles sont en cours de traitement. D'autre part, dans la mesure où l'on ne sait pas s'il existe – et si oui où la chercher – d'étape limitante lors du processus de phosphorylation, il n'est pas certain qu'un intermédiaire de réaction amenant des informations structurales intéressantes soit observable.

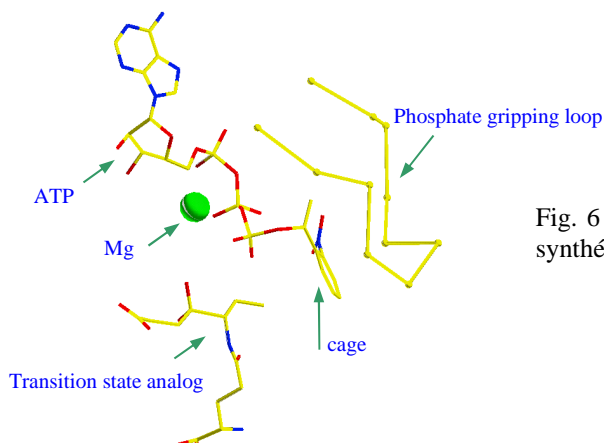


Fig. 6 : Modèle du site actif de la glutathione synthétase

#### 6.1.2.2. Acetylcholine-estérase

Une approche méthodologique similaire (composé cagé et méthode Laue) a été proposée pour étudier le mécanisme de réaction de l'acetylcholinestérase. Cette enzyme dont l'une des principales fonctions est l'hydrolyse de l'acetylcholine au niveau des jonctions synaptiques, est l'une des plus rapides que l'on connaisse et son 'turnover' est essentiellement limité par la diffusion. Elle possède un large moment dipolaire, ce qui explique pourquoi le substrat, qui est chargé, accède facilement au site actif pourtant profondément enfoui. Par contre, la façon

dont le produit, également chargé, parvient à quitter le site actif malgré ce moment dipolaire est encore inconnue. Le but de ce projet est de répondre à cette question. Une étude préliminaire a consisté à enregistrer un jeu de données Laue sur un cristal statique, après trempage d'un inhibiteur réversible (P31). Des cartes de très bonne qualité ont été obtenues par Raimond Ravelli, permettant d'identifier sans ambiguïté la présence de l'inhibiteur. La suite du projet, dans lequel je vais m'impliquer beaucoup plus activement, consiste, à partir de choline cagée, à suivre le chemin emprunté par le produit pour quitter la protéine, soit par diffraction Laue, soit par piégeage cryogénique.

## 6.2. Piégeage cryogénique d'états intermédiaires

L'avantage évident des techniques de piégeage par congélation rapide est de permettre l'utilisation de collectes monochromatiques pour déterminer la structure des intermédiaires de réaction ainsi isolés. Il y a deux façons d'utiliser ces techniques. La première consiste à congeler d'abord le cristal pour ne déclencher qu'ensuite la réaction. Celle-ci progresse alors selon la loi d'Arrhenius, jusqu'à ce que l'énergie thermique du système soit trop faible pour surmonter une barrière de potentiel. L'on peut ainsi *a priori* piéger un état intermédiaire dont la durée de vie à température ambiante serait extrêmement courte. Cependant, à très basse température, le système n'évolue pas forcément le long du chemin réactionnel physiologique, et l'on court le risque d'observer une structure artéfactuelle. L'autre façon consiste à déclencher d'abord la réaction, à laisser évoluer le système pendant un certain temps (éventuellement à une température modérément froide) puis à congeler le cristal aussi rapidement que possible. Dans ce cas, il y a moins de risques d'observer une structure non physiologique. Cependant, il est nécessaire que la vitesse de réaction soit – ou puisse être rendue – lente par rapport au temps de congélation (de l'ordre de plusieurs centaines de ms).

### 6.2.1. Nitrite Réductase

En collaboration avec Didier Nurizzo, Mariella Tegoni et Christian Cambillau (AFMB, Marseille), et dans le cadre d'un projet Biotech, nous avons utilisé une technique de piégeage cryogénique pour caractériser l'état red-ox de la nitrite réductase de *Pseudomonas Aeruginosa* (Nir-Pa). Cette enzyme participe au cycle de dénitrification en réduisant le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) en oxyde nitrique (NO). C'est un dimère de 120 kD, qui contient deux hèmes par monomère (un hème c et un hème d<sub>1</sub>) (P28). *In vivo* le cytochrome C<sub>551</sub> donne un électron à l'hème c. Cet électron est ensuite transféré à l'hème d<sub>1</sub> où le substrat est réduit. Didier Nurizzo a montré qu'il existe d'importantes différences entre les structures de Nir-Pa à l'état entièrement (ie hèmes c et d<sub>1</sub>) oxydé et à l'état entièrement réduit (P32). Le transfert d'électron entre les deux hèmes constitue une étape limitante de la réaction ( $k_{\text{cat}} = 0.2 \text{ s}^{-1}$ ). Il est donc possible, en diffusant un agent réducteur (de l'ascorbate) dans le cristal initialement sous forme oxydé, et en congelant celui-ci après un délai d'attente variable, de piéger la protéine dans un état intermédiaire hème c réduit et hème d<sub>1</sub> oxydé (P36). L'identification de l'état red-ox de la protéine se fait par spectrophotométrie d'absorption (figure 7). La résolution de la structure de Nir-Pa dans cet état intermédiaire a montré qu'il n'y a pas de changements structuraux majeurs par rapport à l'état entièrement oxydé. Nous en avons conclu que les changements de conformation observés dans l'état entièrement réduit n'étaient pas dûs à la réduction de l'hème c, mais plutôt à celle de l'hème d<sub>1</sub>, ou au transfert d'électron qui la précède (ce qui expliquerait que cette étape soit lente). Ce résultat s'interprète de la manière suivante : les changements de conformation observés dans l'état réduit (en particulier le mouvement de la tyrosine 10) permettent de libérer l'accès du substrat au site actif. Il importe donc qu'ils ne se produisent qu'une fois l'hème d<sub>1</sub> réduit, pour éviter que le nitrite ne se lie à l'hème d<sub>1</sub> dans l'état oxydé, ce qui aurait tendance à bloquer l'enzyme.

Ma participation à ce projet a consisté à aider aux collectes de données réalisées à l'ESRF, au traitement de celles-ci, et à l'obtention des spectres d'absorption.

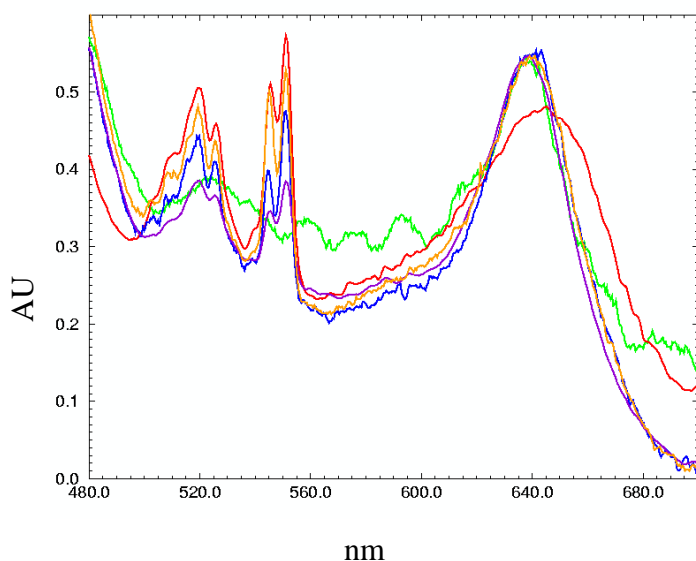


Fig. 7 : Spectres d'absorption de cristaux de Nir-Pa congelés à 100 K, sous la forme entièrement oxydée (vert), entièrement réduite (rouge), et dans l'état intermédiaire (hème c réduit à 15% (violet), 50% (bleu) et 90% (orange)).

### 6.3. 'Soaking' et co-cristallisations

Pour obtenir la structure cristallographique d'états intermédiaires, l'on peut modifier chimiquement la protéine et/ou le(s) (co-)substrat(s) ou utiliser comme substrat un analogue de transition. En diffusant ce(s) dernier(s) avant ou après cristallisation, la réaction se bloque dans un certain état intermédiaire. L'on peut alors collecter des données statiques. Ces techniques, faisant largement appel à la chimie et la biologie moléculaire, et utilisées pour l'étude de mécanismes réactionnels dans de nombreux laboratoires, dépassent largement le cadre de la cristallographie résolue en temps, bien que le but reste exactement le même.

#### 6.3.1. Isoméro-réductase

En collaboration avec Valérie Biou (LCM, IBS) et Renaud Dumas (CNRS/Rhône-Poulenc), je me suis intéressé à l'isoméro-réductase, une enzyme présente uniquement dans les végétaux, et impliquée dans la synthèse de deux acides aminés branchés, la valine et l'isoleucine. Cette enzyme constitue une cible intéressante pour la mise au point d'herbicides. Lors de l'étape de réduction, deux co-substrats sont nécessaires : le NADPH et l'ion  $Mg^{2+}$ . Afin d'avancer dans la compréhension du mécanisme de réaction, nous avons cherché à connaître la structure de l'enzyme après l'étape d'isomérisation, mais avant l'étape de réduction. Pour cela, j'ai co-cristallisé l'isoméro-réductase en présence de  $NADP^+$  (au lieu de NADPH), d'ion  $Co^{2+}$  (au lieu de  $Mg^{2+}$ ) et de l'intermédiaire naturel de réaction. J'ai obtenu de très bonnes données à 2.0 Å de résolution, dans le groupe d'espace P3<sub>1</sub>21 (au lieu de P2<sub>1</sub> pour l'enzyme native). Malheureusement, malgré une solution apparemment correcte obtenue par remplacement moléculaire, je ne suis pas encore parvenu (peut-être à cause d'un problème de 'twinning', mais surtout par manque de temps ...) à affiner un modèle de cet intermédiaire. Ce travail est toujours en cours.

## 7. Traitement des données

Durant les trois dernières années, la partie la plus importante et la plus originale de mon travail a consisté à développer de nouvelles méthodes permettant d'améliorer le traitement de jeux de données de faible rapport signal sur bruit. A l'origine, cette recherche a été motivée par l'obtention d'images 'SP Laue', mais je l'ai étendue ensuite au cas de données monochromatiques particulièrement difficiles.

### 7.1. Intégration de données faibles et /ou avec recouvrement spatial : PrOW.

J'ai développé un logiciel d'intégration appelé PrOW ('Profile fitting for Overlapped and Weak spots'), permettant de déconvoluer les taches recouvertes spatialement et d'améliorer le rapport I/SigI des taches faibles (P29). Ce logiciel, qui fonctionne en deux modes ('Laue' et 'monochromatique'), et qui est accompagné d'une interface graphique, est maintenant utilisé dans quelques laboratoires, en France, aux Etats-Unis et au Japon. Outre son intérêt scientifique, le développement de PrOW m'a beaucoup appris quant aux difficultés qu'il y a à proposer un nouveau programme, imparfait il est vrai, à une communauté scientifique parfois assez conservatrice et *a priori* sceptique, surtout lorsqu'on est un jeune chercheur inconnu, bien naïf, et de surcroît passablement incompetent en informatique ! Je ne peux prédire l'avenir de PrOW, mais malgré les opérations de sauvetage qu'il a permis de réaliser sur des jeux de données bien compromis, et les nombreuses améliorations que j'y ai apporté depuis sa création, je crains qu'il ne reste dans l'ombre tant qu'il n'aura pas été utilisé pour résoudre une structure à fort 'coefficient d'impact' ...

#### 7.1.1. Théorie

Deux idées principales caractérisent PrOW : la première est d'étendre une technique de déconvolution des recouvrements spatiaux par moindre carrés, déjà proposée pour les images Laue, au cas des données monochromatiques, ce qui est intéressant lorsque celles-ci sont enregistrées avec un détecteur trop petit, lorsque la mosaïcité des cristaux se dégrade au cours de la collecte, lorsque l'orientation de cristaux montés dans des boucles est défavorable, enfin lorsque une stratégie de collecte inadéquate a été adoptée. La deuxième idée est d'utiliser une optimisation dynamique (*ie* tache par tache) de la surface utilisée pour réaliser l'opération de 'profile fitting' ('profile fitting area'), ce qui permet d'améliorer de façon significative le rapport I/SigI des taches faibles. D'autres améliorations ont été ajoutées : (i) possibilité de créer des masques de n'importe quelle forme pour éliminer des zones d'ombres ; (ii) interpolation de Fourier pour compenser les écarts de position dus à l'échantillonnage des données ; (iii) sélection rigoureuse des taches de référence, pouvant être étendue aux images voisines de l'image traitée ; (iv) intégration par sommation des taches fortes pour lesquelles le 'profile fitting' n'est pas profitable ; (v) élimination avant mise à l'échelle des réflexions non crédibles ('outliers'), résultant par exemple de 'zingers' avec un détecteur CCD ou de taches de glace, en utilisant la statistique de Wilson. Le programme PrOW ne comporte pas de routine d'auto-indexation ni d'affinement, mais utilise les prédictions obtenues avec Lauegen, pour les données Laue, et avec Denzo, et bientôt Mosflm, pour les données monochromatiques. Il a été écrit avec le logiciel commercial IDL, mais il est distribuable gratuitement.

#### 7.1.2. Exemples

Outre les jeux de données Laue collectés sur ID09 (myoglobine, PYP, cutinase, glutathione synthétase ...) où parfois plus de 80% des taches doivent être déconvoluées, un certain

nombre de jeux de données monochromatiques ont été traités avec PrOW, et améliorés de façon significative par rapport aux traitements classiques : nitrite-réductase (avec l'aide importante de Didier Nurizzo), virus de la langue bleue (sérotipe 10), thymidilate kinase, ... Un exemple concernant une transférase (dont la structure est en cours d'affinement) est présenté figure 8. Les données ont été collectées par Ed Mitchell sur la ligne ID14 de l'ESRF avec un détecteur MarCCD. Dans ce cas, de nombreuses taches à haute résolution, recouvertes spatialement, ont pu être récupérées par PrOW, permettant d'obtenir une bien meilleure complétude et une plus grande redondance. Le facteur  $R_{\text{sym}}$  est amélioré à haute résolution et reste globalement inchangé. En outre, l'accroissement de la redondance a permis d'éliminer un certain nombre d'outliers, pour la plupart dûs à des 'zingers'. Avec un traitement classique (par Denzo ou Mosflm), ces réflexions, n'étant mesurées qu'une seule fois, n'étaient pas rejetées, et étaient ainsi à l'origine d'une dégradation de la mise à l'échelle des données se traduisant par un très mauvais facteur  $\langle I/\text{SigI} \rangle$  pour certaines images.

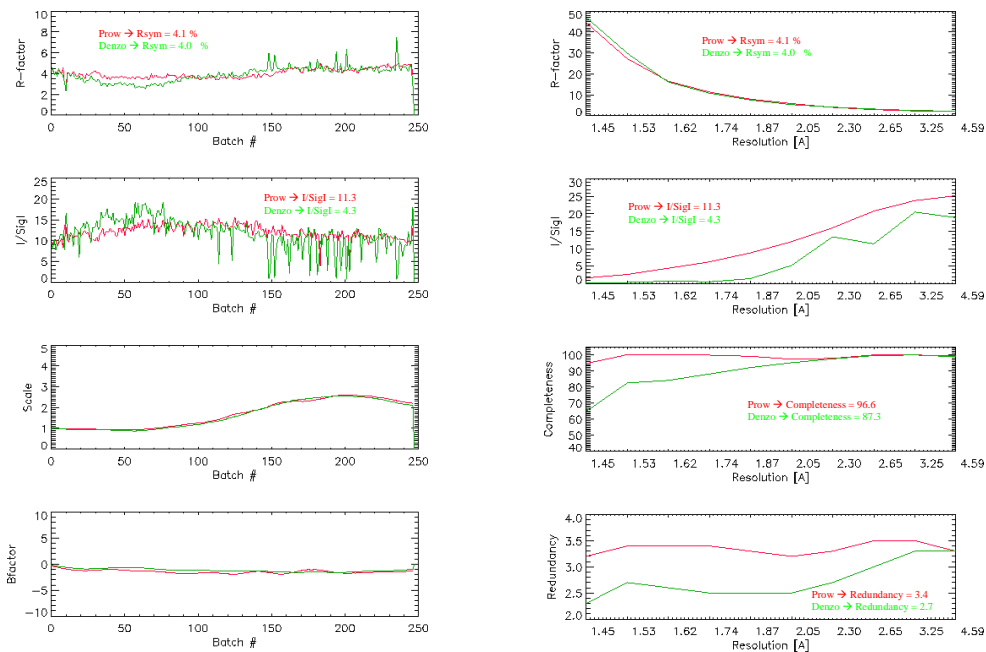


Fig. 8 : Comparaison entre le traitement effectué avec Denzo (vert) et avec PrOW (rouge).  $R_{\text{sym}}$ ,  $I/\text{SigI}$ , complétude et redondance sont donnés en fonction du numéro de l'image (a) ou de la résolution (b).

## 7.2. Optimisation des facteurs de structure différence : Q-weighting

Le traitement des données SP Laue de myoglobine a vite montré que la qualité des cartes de Fourier différence était compromise par un rapport signal sur bruit trop faible. Dans l'espace réciproque, ce problème se manifeste par un élargissement de la distribution des facteurs de structure différence  $\Delta F_{\text{obs}}$ , essentiellement dû à une convolution du signal réel avec le bruit résultant d'une mauvaise statistique de mesure. J'ai suggéré à Thomas Ursby de travailler à une méthode de pondération permettant de réduire l'amplitude des facteurs de structure différence mesurés avec trop d'imprécision. La méthode mise au point par Thomas (P26) a constitué une part importante de son travail de thèse.

### 7.2.1. Théorie

Pour améliorer l'amplitude des facteurs de structure différence, nous avons utilisé la statistique Bayésienne, en incorporant au calcul les informations *a priori* suivantes : (i) si la

vraie valeur de l'amplitude d'un facteur de structure est  $F_{\text{true}}$ , alors l'intensité observée  $I_{\text{obs}}$  est distribuée autour de  $F_{\text{true}}^2$  selon une loi de Poisson ( $P_{\text{poisson}}$ ) dont la largeur est reliée à l'erreur de mesure  $\sigma_{F_{\text{obs}}}$ ; (ii) l'on peut raisonnablement supposer que les amplitudes différence  $\Delta F_{\text{true}}$  sont distribués selon une statistique de Wilson ( $P_{\text{wilson}}$ ) de largeur  $\sigma_D$ . La valeur de  $\sigma_D$  peut être estimée dans chaque tranche de résolution à partir du comportement statistique globale des données, et préférablement en déconvoluant la contribution des erreurs de mesure. Les zones spéciales de l'espace réciproque (zones centriques et zone 'epsilon') doivent être traitées indépendamment. Le théorème de Bayes indique alors que la meilleure loi de probabilité  $P_{\text{opt}}$  dont on dispose s'exprime par :

$$P_{\text{opt}}(\Delta F / \Delta I_{\text{obs}}, E) \propto P_{\text{poisson}}(\Delta I_{\text{obs}} / \Delta F, E) P_{\text{wilson}}(\Delta F / E)$$

où  $E$  représente l'ensemble des erreurs connues et  $\Delta I_{\text{obs}}$  l'intensité différence mesurée. La valeur de  $\Delta F$  à retenir,  $\Delta F_{\text{opt}}$ , est celle qui se situe au centre de gravité de la distribution  $P_{\text{opt}}$ . Cette valeur est légèrement inférieure à  $\Delta F_{\text{obs}}$ . Sous certaines hypothèses en général satisfaites l'amplitude  $\Delta F_{\text{opt}}$  utilisée pour le calcul des cartes de Fourier différence peut s'exprimer très simplement :

$$\Delta F_{\text{opt}} = m \frac{\sigma_D^2 / 2}{\sigma_D^2 / 2 + \sigma_{F_{\text{obs}}}^2 / 2 + \sigma_{F'_{\text{obs}}}^2 / 2} \Delta F_{\text{obs}} = mq \Delta F_{\text{obs}}$$

$\sigma_{F_{\text{obs}}}$  et  $\sigma_{F'_{\text{obs}}}$  sont les erreurs de mesure de  $F_{\text{obs}}$  et  $F'_{\text{obs}}$  ( $\Delta F_{\text{obs}} = F'_{\text{obs}} - F_{\text{obs}}$ ) et  $m$  est la figure de mérite permettant de prendre en compte l'estimation de l'erreur de phase (donnée par le programme SIGMAA). Un nouveau facteur de pondération  $q$  est ainsi introduit. Une amélioration significative de l'amplitude des facteurs de structure différence n'est observable que si les erreurs  $\sigma_{F_{\text{obs}}}$  et  $\sigma_{F'_{\text{obs}}}$  sont correctement évaluées. Pour certaines réflexions non crédibles ('outliers') ce n'est pas le cas. La méthode habituellement utilisée pour se débarrasser de ces réflexions, qui peuvent détériorer très fortement la qualité des cartes, consiste à les éliminer lorsque leurs intensité dépasse un certain seuil choisi arbitrairement. Au lieu d'utiliser ce procédé sauvage, nous avons proposé d'avoir recours à la loi de probabilité  $P_{\text{wilson}}$ , ce qui est beaucoup plus précis.

Le programme permettant de réaliser la pondération 'Q-weighting' a été écrit par Thomas Ursby avec le logiciel IDL. Il a été accepté dans la bibliothèque CCP4 mais attend un informaticien pour être recodé en langage C avant d'y être inclu.

### 7.2.2. Exemples

Le programme de pondération 'Q-weighting' est maintenant systématiquement utilisé à l'ESRF pour le traitement des données Laue. Son importance est capitale pour les données SP Laue, et en général lorsque le signal est petit par rapport au bruit statistique de mesure – ce qui est presque toujours le cas, y compris pour les données monochromatiques standard, dans les tranches de haute résolution. L'exemple de la myoglobine est donné figure 9. J'ai aussi testé la méthode pour le calcul de cartes de Patterson différence anormale, et obtenu une amélioration du rapport signal sur bruit d'environ 10%. D'une manière générale, les développements que nous avons effectué dans le cadre de la technique Laue pour évaluer des données de faible rapport signal sur bruit, peuvent être facilement adaptées à d'autres techniques confrontées au même problème, en particulier la méthode MAD.



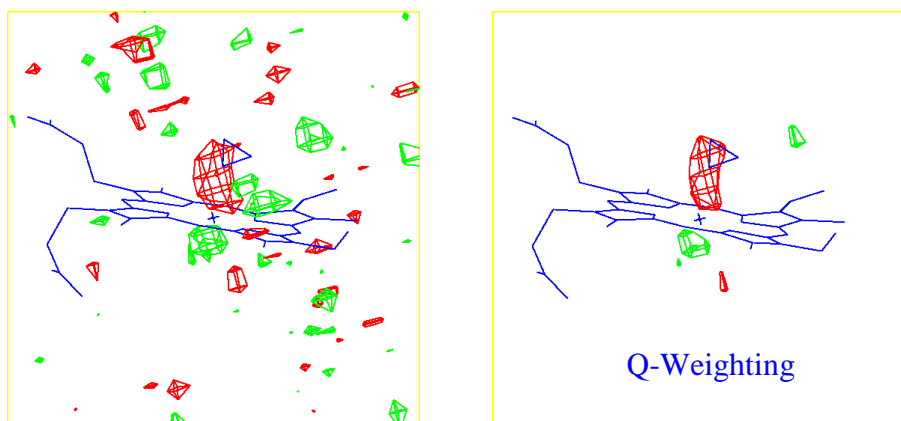


Fig. 9 : Cartes de densité différence obtenues avec des données SP Laue sur des cristaux de myoglobine :  $F_{\text{COphotolysé}} - F_{\text{COlié}}$ . Les cartes sont tracées à + (en vert) ou - (en rouge) la hauteur du pic principal négatif divisé par 1.5 (ceci pour montrer l'amélioration en rapport signal sur bruit, le niveau absolu du bruit restant, lui, pratiquement constant). La carte originale, très bruitée, est pratiquement ininterprétable. La carte obtenue avec la pondération 'Q-weighting' permet d'observer la photolyse du CO, dont une partie semble se fixer au niveau d'un site de 'docking', et le mouvement concomitant, vers le bas, de l'atome de fer.

## ***8. Travail de 'local contact' sur la ligne ID09***

Le travail de 'local contact' à l'ESRF, qui consiste à aider les utilisateurs extérieurs à réaliser leur expérience sur une ligne de lumière m'a permis de connaître de nombreux chercheurs, d'être impliqué dans plusieurs projets, et m'a aussi valu quelques belles nuits blanches. Plusieurs publications concernant la résolution de structures statiques me sont ainsi 'tombées du ciel' (P22, P23, P31) ... Si mon implication scientifique dans ces projets est restée faible, le temps que j'y ai consacré pour préparer la ligne ID09, résoudre nombre de problèmes pratiques, ou donner un 'coup de main' au traitement des données, m'a souvent pris un temps non négligeable.

## ***9. Conclusion et perspectives***

### ***9.1. Evolution personnelle***

Depuis mon entrée au CNRS, mon activité de recherche s'est concentrée autour de trois sujets principaux : instrumentation sur les lignes de lumière de l'ESRF, cristallographie des protéines résolue en temps en utilisant essentiellement la méthode Laue, et développement de nouvelles méthodes de traitement des données. Mon lieu de travail exclusif a été l'ESRF, ce qui a comporté de nombreux avantages (collaborations, accès aux lignes de lumière, budget confortable), mais trois inconvénients majeurs : isolement par rapport à l'aspect biologique des projets menés en collaboration avec des équipes extérieures ; difficulté, en tant que personnel CNRS, à développer un thème de recherche bien défini ; isolement par rapport à la communauté scientifique française. Pour pallier à ces inconvénients sans renoncer aux avantages, j'ai récemment décidé de réintégrer l'IBS pour une large part de mon temps, tout en conservant une activité de collaborateur scientifique à l'ESRF. Dans ce cadre, je propose de centrer ma recherche sur la cristallographie des protéines résolue en temps, en mettant l'accent sur les méthodes de piégeage cryogénique. Au vu de la littérature, et au contact de nombreux collaborateurs, il m'apparaît que ce domaine de recherche est à la fois encore peu développé et extrêmement prometteur. Il n'existe pas actuellement en France de groupe de recherche spécifiquement axé sur cette discipline, et il me semble que ma position (tant scientifique que géographique) est bonne pour en créer un. Evidemment, il me faudra auparavant acquérir de nombreuses connaissances nouvelles, surtout en biochimie et biophysique. Quant à mon rôle à l'ESRF, il consistera désormais à apporter mon aide dans ce même domaine, ainsi que pour le traitement des données Laue.

### ***9.2. Définition d'un projet de recherche***

#### ***9.2.1. Cristallographie résolue en temps***

Durant ces dernières années, j'ai pu me faire les réflexions suivantes : (i) les méthodes de déclenchement de réactions enzymatiques utilisées en cristallographie (diffusion de substrats ou cofacteurs, photolyse de composés cagés) conduisent presque toujours à ne disposer que d'un seul cycle catalytique par cristal ; (ii) les réactions enzymatiques en milieu cristallin se font à des échelles de temps le plus souvent assez lentes ( $> \text{ms}$ ) ; (iii) elles s'accompagnent presque systématiquement d'un fort accroissement transitoire du désordre cristallin. Ainsi, la méthode Laue, bien que 'spectaculaire' et intéressante en soi, n'est pas la méthode devant être essayée en premier lieu. Il me semble que les techniques fondées sur le piégeage par le froid constituent une voie plus prometteuse, et je compte orienter ma recherche future en ce sens. Y compris dans les cas où la diffraction Laue est appropriée, et pour les échelles de temps extrêmement rapides, les techniques cryogéniques ont jusqu'à présent apporté les résultats les plus détaillés – même s'il est vrai que les structures d'états intermédiaires ainsi obtenues ne décrivent pas forcément ce qui se passe à température ambiante. Outre leur efficacité pour les études résolues en temps, ces techniques présentent deux avantages supplémentaires : d'une part elles peuvent être très profitables à bien d'autres projets ne concernant pas directement la cristallographie résolue en temps (par exemple les méthodes de congélation rapide peuvent permettre d'améliorer la mosaïcité des cristaux) et d'autre part elles permettent de découpler la préparation des échantillons et la collecte des données. Cependant, il conviendra avant tout d'être guidé par les systèmes biologiques choisis, les méthodes utilisées devant constituer un

moyen, non une fin. Ainsi, il n'est pas question de renoncer par principe à la diffraction de Laue.

Quelques points importants quant à l'organisation de ce projet de recherche peuvent être mentionnés : j'ai commencé à développer un banc de mesure permettant de déclencher une réaction enzymatique dans un cristal de protéine avec une source de lumière (lampe flash, laser ou autre), de refroidir ce cristal de plusieurs manières (combinaison de plusieurs systèmes de refroidissement : 'cryo spray' ou jet d'hélium à très basse température, jet d'azote à température variable), et de contrôler – si possible - l'avancement de la réaction par microspectrophotométrie. Ce banc de mesure, développé en collaboration avec l'ESRF, constituera un outil de travail essentiel pour trouver les meilleures conditions de piégeage des échantillons étudiés. Celles-ci dépendront non seulement d'un choix approprié des températures, mais aussi de l'optimisation du cryoprotectant, du pH, de la constante diélectrique, de la taille des cristaux, et en général de la biochimie du système. Il conviendra de mettre à profit les transitions de phase qui ont été observées sur plusieurs protéines à des températures de l'ordre de 150 K : à des températures inférieures à la température de transition, la protéine est inactive, alors qu'elle devient brusquement active à des températures supérieures. Il ne faudra pas négliger l'importance du traitement des données : dans de nombreux cas le rapport signal sur bruit des données cristallographiques résolues en temps, correspondent à un mouvement de quelques électrons sur une fraction d'angström, et est comparable à celui obtenu pour les expériences de type MAD. Enfin, le choix des systèmes biologiques sera crucial : avant de commencer une étude par cristallographie, il conviendra de s'assurer de l'existence d'un ou plusieurs état intermédiaires suivis d'étapes limitantes le long du chemin réactionnel, et si possible d'une méthode de contrôle indépendante pour mesurer leur population.

#### 9.2.2. *Systèmes biologiques*

Plusieurs collaborations sont en cours dans le cadre de l'ESRF, qui, j'espère, se poursuivront les prochaines années : nitrite réductase (Christian Cambillau, Marseille, § 6.2.1), PYP (Elizabeth Getzoff, San Diego, § 6.1.1.3), et glutathione synthétase (Hiro Kato, Kyoto, § 6.1.2.1). Deux nouveaux projets viennent d'être démarrés, qui semblent bien 'cadrer' avec le projet de recherche présenté ci-dessus : l'un concerne l'acétylcholinestérase (Joël Sussman, Utrecht & Weizmann Institute, § 6.1.2.2) et l'autre la thymidine et la thymidilate kinase, dans le cadre d'un contrat Biotech dont je suis partenaire, et dont Marc Delarue (Institut Pasteur) est le coordinateur. Ces enzymes participent à la synthèse du TTP, et sont donc impliqués dans le mécanisme de réplication de l'ADN. Elles constituent des cibles de choix pour combattre certaines infections bactériennes ou virales et pour contrôler le métabolisme des cellules cancéreuses. Notre but est de comprendre le mécanisme de phosphorylation de ces enzymes, afin, à long terme, d'aider à la mise au point de médicaments. Un post-doc vient d'être embauché pour travailler sur ce sujet. Il sera fortement impliqué dans le développement des activités de recherche proposées.