

Laboratoire de radiocristallographie

Contacts :

■ [Jean-Luc Popot](#)

■ [Inès Gallay](#) responsable du fonctionnement du laboratoire de cristallographie et de l'accueil des utilisateurs extérieurs (tél. 01 5841 5099)

La création d'un laboratoire de radiocristallographie à l'Institut de Biologie Physico-Chimique répond à la nécessité de doter la communauté scientifique du site de la Montagne Sainte-Geneviève de l'outil le plus puissant qui permette d'accéder à la structure à haute résolution des macromolécules biologiques—acides nucléiques et protéines sur lesquelles travaillent les Instituts du campus. Ce laboratoire est opérationnel depuis le début de l'année 2003 et de premiers résultats ont été obtenus.

1. Le laboratoire

Le laboratoire est doté d'un générateur de rayons X (RIGAKU modèle Micro7) équipé du système optique de miroirs Osmic (MSC), d'un détecteur par plaques photosensibles MAR345 et d'un système cryogénique X-Stream. Cette installation permet de collecter des données de diffraction à haute résolution (jusqu'à 1.6Å), sur de petits cristaux (taille de l'ordre de 100µm), et à des températures allant de l'ambiante à -180 °C. Un robot de cristallisation a été testé et son acquisition est en cours. Celle-ci accélérera notablement le travail des cristallographes, et elle devrait encore accentuer le caractère attractif du laboratoire pour les biologistes du campus, qui hésitent souvent devant le travail très lourd que représentent l'identification et l'optimisation des conditions de cristallisation d'une macromolécule biologique.

L'équipement nécessite peu de maintenance : depuis sa mise en fonctionnement, il est resté à plein régime pratiquement sans interruption. Sa brillance est dix fois supérieure à celle d'un générateur Rigaku de première génération tel que celui actuellement installé à l'Institut Pasteur; elle est équivalente à celle dont disposaient les utilisateurs de la ligne de lumière D41 de LURE, et seulement 4 à 5 fois inférieure à celle de la ligne DW32 (estimations communiquées par A.Bentley, responsable de D41).

Le département des Sciences de la Vie du CNRS, dont l'importante mise de fonds initiale a été complétée par des contributions de l'ARC et de la région Île-de-France, a également puissamment contribué au succès de l'opération en donnant à la FRC550 la possibilité d'embaucher un ingénieur de recherches affecté au laboratoire de radiocristallographie. Le recrutement de Mme Inès Gallay, qui a pris effet à l'automne 2002, a permis d'effectuer dans d'excellentes conditions l'installation et la mise en route du matériel. La compétence et la disponibilité de Mme Gallay constituent des facteurs décisifs pour faciliter l'initiation à la cristallisation de chercheurs de l'Institut et du campus travaillant dans des laboratoires où le recours à la radiocristallographie n'est pas encore une approche de routine.

L'implantation actuelle du laboratoire n'est pas définitive. Le lancement des travaux de rénovation de l'IBPC ayant pris du retard, la direction de l'IBPC et la Délégation Régionale du CNRS ont en effet pris la décision d'installer la radiocristallographie dans des locaux provisoires rénovés. Il convient de souligner à quel point cette décision, qui n'allait pas de soi car elle entraînait pour la Délégation d'importantes dépenses non budgétisées, a été opportune : elle nous aura fait gagner au moins 18 mois de fonctionnement, durant lesquels beaucoup de travail utile aura été effectué. L'installation définitive du laboratoire de radiocristallographie dans une aile reconstruite du bâtiment de l'IBPC est en effet actuellement programmée au plus tôt pour la mi-2004.

2. Mode de fonctionnement

Le laboratoire de radiocristallographie est avant tout à la disposition des

laboratoires du campus, mais il est également ouvert aux autres cristallographes de la région parisienne. Les frais de fonctionnement sont actuellement couverts grâce aux seuls moyens financiers alloués à cette fin par le CNRS à la FRC550, aucune contribution financière n'étant demandée aux utilisateurs. Les groupes les plus intéressés par la mise en place du laboratoire (à l'IBPC, l'UMR7099 et les UPR 9073 et 9080 ; à l'Institut Curie, l'UMR 144) ont, en revanche, facilité celle-ci en acquérant sur leurs fonds propres des matériels complémentaires (étuves thermostatées, microscopes, matériel de cryogénie) dont l'utilisation est généralement partagée entre eux. Il nous paraît essentiel que le laboratoire de radiocristallographie continue à disposer d'un financement propre permettant d'assurer son fonctionnement et sa maintenance. L'un de nos objectifs principaux, en effet, est de faciliter l'accès à la cristallographie de laboratoires qui n'y ont pas actuellement recours, et il serait contre-productif de les en dissuader en leur facturant la moindre prestation de service. Les utilisateurs réguliers, en revanche, seront invités à s'associer aux futures demandes de crédits concernant, notamment, les opérations de jouvence et l'acquisition de matériels complémentaires. Les consommables nécessaires aux expériences de cristallisation (boîtes et kits de cristallisation, notamment) sont à la charge des unités concernées.

On notera que la mise en service du laboratoire de radiocristallographie coïncide avec l'arrêt de LURE, lequel prive toute une communauté de cristallographes de l'accès aux deux lignes de lumière de ce synchrotron qui étaient dédiées à la cristallographie biologique. En donnant à certains de ces utilisateurs l'accès à son laboratoire, la FRC550 limite les conséquences pour ceux-ci de la perte de cet outil de travail et contribue à souder la communauté des cristallographes d'Île-de-France et, par là, à préparer dans de bonnes conditions le lancement de Soleil.

Les demandes de temps d'utilisation sont actuellement effectuées directement auprès de l'ingénieur responsable du laboratoire. Un calendrier d'utilisation a été mis en place à cet effet, accessible à partir du site Internet de l'association de la montagne Sainte-Genève. Des quotas plus formalisés (typiquement, $\frac{3}{4}$ du temps pour les utilisateurs réguliers du campus, $\frac{1}{4}$ pour les expériences préliminaires et les utilisateurs extérieurs au campus) seront mis en place lorsque la demande deviendra par trop supérieure à l'offre.

Le générateur a fonctionné en permanence depuis son installation, sauf pendant deux semaines du mois d'août. Nous avons commencé à tenir le calendrier d'utilisation à partir du mois de février. Le taux d'utilisation pour la période du 1^{er} février au 14 novembre a été de 58% pour les utilisateurs du campus, 8% pour les utilisateurs extérieurs, 1,5% d'arrêts techniques pour maintenance et 0,5% pour des séances de démonstration aux clients d'ELEXCIENCE (ce générateur est le premier de ce type mis en service en France). Hors période estivale, le taux d'utilisation approche désormais les 100%.

3. Les premiers résultats

L'un des principaux objectifs de l'installation du laboratoire de radiocristallographie était de mettre cette approche à la disposition de laboratoires de biologie du campus qui ne l'utilisent pas actuellement, et de susciter le lancement par ces laboratoires de programmes de cristallisation. Au sein de l'UPR9073 de l'IBPC (Dir. M. Springer), les projets actuellement les plus avancés concernent l'étude cristallographique de l'endoribonuclease Z (3' tRNase) de *Bacillus subtilis* et celle de la RNase M5. L'étude de la RNaseZ est conduite par O. Pellegrini, H. Putzer et C. Condon (1). Des conditions préliminaires de cristallisation à 18°C et 4°C ont été récemment identifiées grâce au robot de cristallisation. Leur optimisation est en cours. Concernant la RNase M5, l'instabilité de la protéine et le fait qu'elle soit activée par la protéine ribosomale L18 ont conduit F. Allemand & C. Condon à privilégier la cristallisation de complexes binaires (M5/L18) et ternaires (M5/L18/ARN).

Au sein de l'UPR9080 de l'IBPC (Dir. R. Lavery), Y. Timsit étudie les acides nucléiques et les complexes acides nucléiques/protéines. Trois thèmes de recherche ont été abordés au cours de l'année 2003 : la structure de la protéine ribosomique L20 (collaboration avec M. Springer, UPR9073), la structure d'un ARN catalytique et la structure d'un site abasique de l'ADN. La protéine ribosomique L20 se fixe sur la sous-unité 50S du

ribosome et régule sa traduction en se fixant sur une région opératrice de son ARN messager. La connaissance de sa structure tridimensionnelle constitue une étape indispensable à la compréhension de son mode de reconnaissance de ses deux séquences cibles. La protéine substituée par de la sélénio-méthionine a été cristallisée dans le groupe d'espace P1. Les cristaux diffractant à 2,8 Å de résolution ont permis d'obtenir de nombreux jeux de données à l'ESRF. Sa structure cristallographique a été résolue par la méthode MAD. Deux dimères contenant chacun deux atomes de sélénium sont en relation par un axe 2 non cristallographique dans la maille triclinique. La structure est en cours d'affinement au laboratoire. Y. Timsit a également cristallisé une séquence d'ARN 13-mère contenant un site GAAA capable de s'autocliner en présence d'ions Mn^{2+} (collaboration avec S. Bombard, UMR8601, CNRS-Université Paris-5, dir. D. Mansuy). Cette séquence cristallise sous forme de duplex et diffracte à très haute résolution (1,3 Å). Sa structure a été résolue par la méthode MAD en utilisant un duplex substitué par de la bromo-cytidine. La structure affinée révèle sans ambiguïté les sites de fixation des cations divalents. Les ions Mn^{2+} ont été identifiés par carte de différence anormale et clairement discriminés des ions Mg^{2+} , qui ne présentent pas de signal anormal aux longueurs d'ondes utilisées. Un article est en cours de rédaction. Finalement, des cristaux d'un dodécamère d'ADN contenant une lésion prémutagène (un site abasique) ont été obtenus. Les cristaux diffractent à 2,7 Å de résolution. Des jeux de données ont également été collectés sur un analogue dont les thymines ont été remplacées par de la bromo-uridine. La structure est en cours de détermination par remplacement moléculaire et remplacement isomorphe.

L'UMR7099 de l'IBPC (Dir. J.-L. Popot) se consacre à l'étude des membranes biologiques. Un succès particulièrement spectaculaire a été obtenu cette année par D. Stroebel et D. Picot, qui ont résolu la structure d'un complexe membranaire très important de la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse oxygénique, le complexe cytochrome b_6f (2). La forme active du cytochrome b_6f est un dimère de 2×100 kDa, composé de 2×8 sous-unités différentes, totalisant 26 segments transmembranaires, et comprenant de nombreux cofacteurs associés: hèmes, chlorophylle, carotène, centre Fe_2S_2 , quinone, lipides liés...

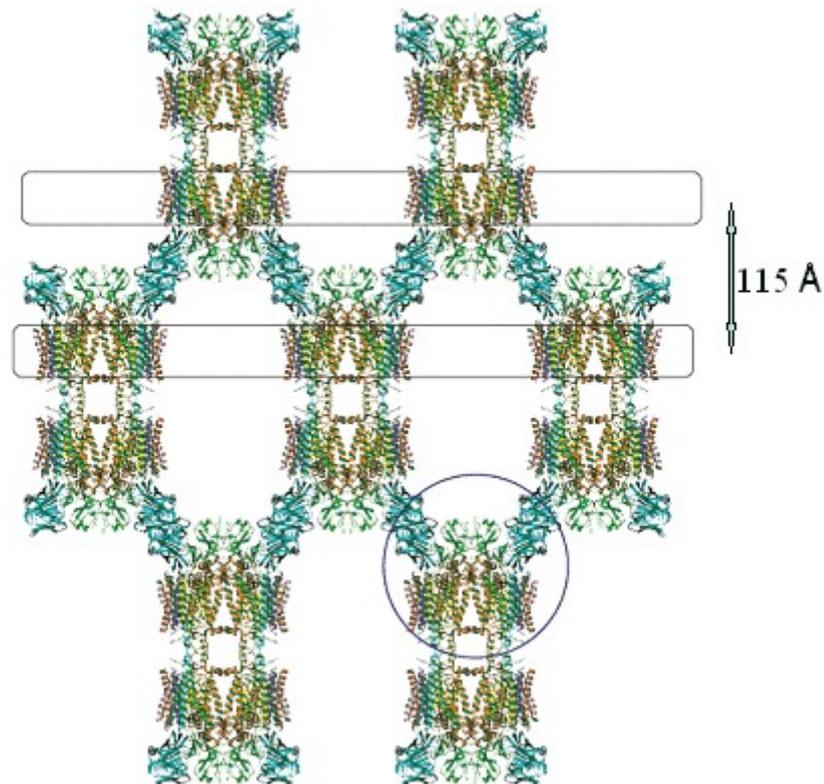


Figure 1. Arrangement des dimères de cytochrome b_6f dans l'édifice cristallin. Le cercle entoure un dimère.
Les rectangles horizontaux indiquent la position approximative des régions transmembranaires (réf. 2)

L'établissement de sa structure cristallographique représente la culmination d'un projet qui s'est étalé sur plus de 12 années. Il constitue le point de départ d'investigations approfondies du mécanisme fonctionnel du complexe. C'est aussi un exploit rare dans le paysage français, où seul un autre laboratoire (celui d'E. Pebay-Peyroula à l'IBS de Grenoble) avait jusqu'à présent réussi à cristalliser une protéine membranaire et à en résoudre la structure. Quelques surprises de taille attendaient les cristallographes, et notamment la présence dans l'un des sites actifs du cytochrome b_6f d'un hème jusque là insoupçonné, dont la position implique qu'il joue un rôle-clef dans les transferts d'électrons (2). Si la plupart des données cristallographiques ont été collectées sur le synchrotron de l'ESRF, à Grenoble, l'installation d'un diffractomètre à l'IBPC a notablement accéléré la fin des travaux – un facteur critique car l'équipe de l'IBPC était engagée dans une vive compétition avec des collègues américains. Elle a notamment permis de collecter plusieurs jeux de données sur des complexes incubés en présence de ligands ou d'inhibiteurs. Des données de diffraction anormale collectées à l'IBPC ont permis de localiser les atomes de fer présents dans le complexe et ainsi fortement contribué à la démonstration de l'existence de l'hème supplémentaire. Le laboratoire de J.L. Popot a lancé deux autres projets cristallographiques portant l'un sur un complexe bactérien (collaboration avec L. Letellier, UMR8619, Orsay, et W. Welte, Université de Constance), l'autre sur une protéine de résistance aux drogues (coll. avec P. Falson, CEA, Saclay). Le diffractomètre est également utilisé en routine pour mettre au point la cristallisation de complexes formés entre des protéines membranaires et les nouveaux tensioactifs développés au sein de ce laboratoire, amphipols et, dans un proche avenir, tensioactifs hémifluorés.

Parmi les autres laboratoires du campus qui ont bénéficié de l'installation du diffractomètre, on citera les équipes d'A. Houdusse (INSERM UMR144; Dir. J.P. Thiéry) et J. de Gunzburg (INSERM UMR528), à l'Institut Curie.

Comme indiqué plus haut, le laboratoire de cristallographie est ouvert à des utilisateurs n'appartenant pas au campus de la Montagne Sainte-Geneviève. Il a notamment permis d'effectuer le criblage de cristaux et/ou de conditions de cryogénie par trois autres laboratoires, le *Laboratoire de minéralogie, cristallographie de Paris* (UMR7590, CNRS-Universités Paris6 et Paris7, campus de Jussieu; Dir. B. Capelle), le *Laboratoire de Virologie Moléculaire & Structurale* (UMR 2472, CNRS-INRA, Gif-sur-Yvette; Dir. F. Rey), et le *Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques* de la Faculté de Pharmacie (UMR8015, CNRS-Université Paris-5; Dir. A. Ducruix). Des données de diffraction ont été collectées sur une annexine (A. Bentley et S. Reti, LURE, Orsay).

4. Conclusion

L'opération d'installation d'un laboratoire de radiocristallographie sur le site de la Montagne Sainte Geneviève, co-financée par le CNRS, l'ARC, et la Région Île-de-France, a débuté sous les meilleurs auspices. Le diffractomètre et le laboratoire sont fonctionnels, les cristallographes du campus se servent activement de l'instrument, qui accueille par ailleurs de nombreux utilisateurs extérieurs, de premiers résultats ont été obtenus, et la création du laboratoire a stimulé la mise en place de programmes de cristallisation. Dans les années à venir, l'effort devra porter dans les trois directions suivantes: améliorer le service offert aux utilisateurs en mettant en service un robot de cristallisation; réussir l'implantation du laboratoire dans ses locaux définitifs; continuer l'effort de sensibilisation des biologistes du campus aux perspectives ouvertes par cette nouvelle ressource mise à leur disposition

Le laboratoire de radiocristallographie a été inauguré le 20 mai 2003

Les nouveaux locaux ont été inaugurés le 21 juin 2005