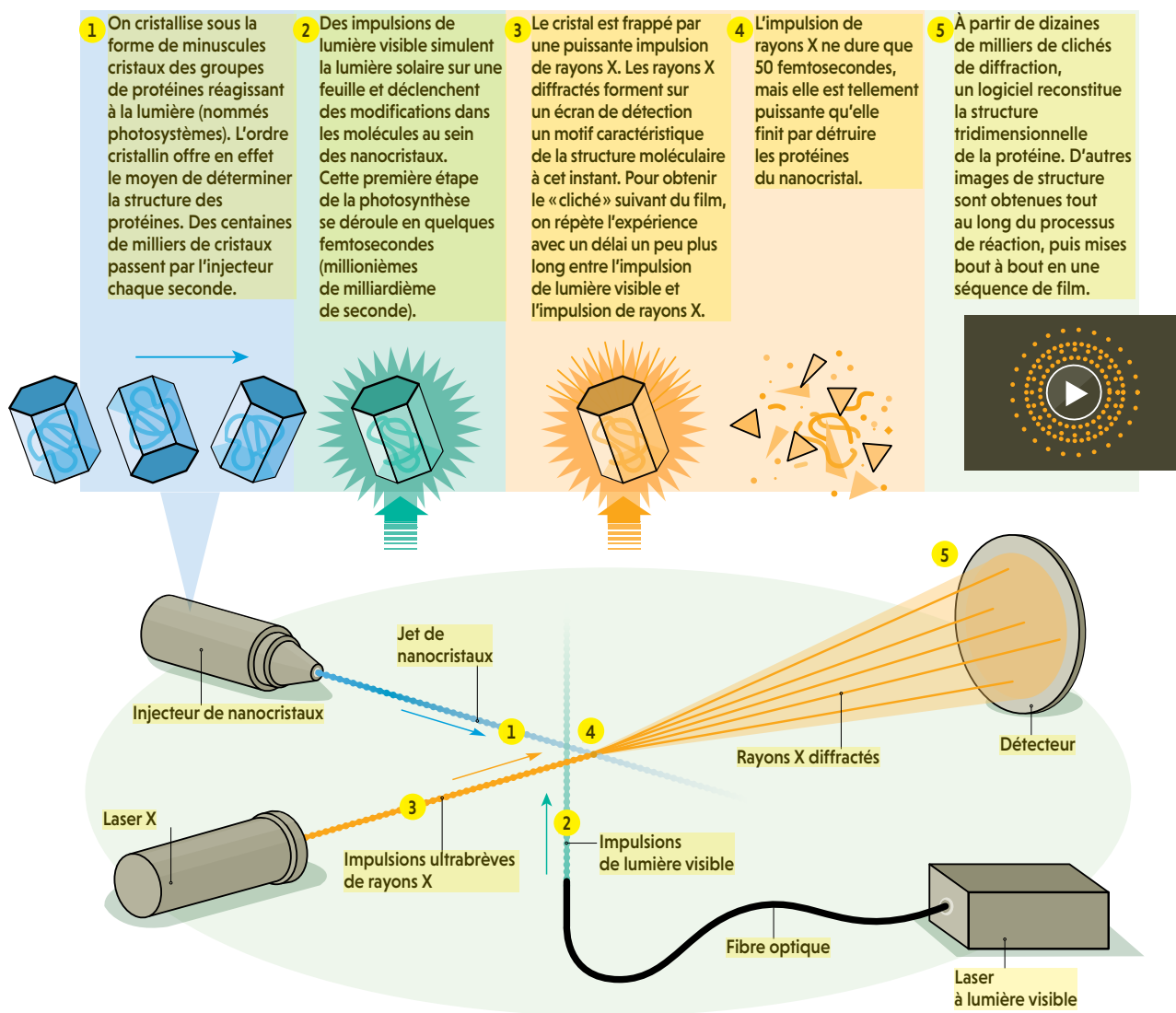


FILMER À L'ÉCHELLE DES MOLÉCULES

C'est grâce à la photosynthèse, qui convertit la lumière solaire en énergie chimique, que la vie sur Terre est possible. La compréhension précise de ce processus est l'un des grands défis de la biochimie. Un nouveau type de film moléculaire a fourni aux scientifiques certains détails inédits des réactions mises en œuvre. Les chercheurs utilisent de la lumière visible pour simuler la lumière solaire éclairant une

feuille et inciter les protéines en jeu, préalablement cristallisées, à déclencher la photosynthèse. Puis ils sondent les modifications de ces protéines à l'aide d'impulsions très brèves d'un puissant laser à rayons X. Ils enregistrent ainsi des images de ces protéines dans les fractions de seconde avant leur destruction. Ces images sont réalisées en cinq étapes (présentées ci-dessous) et combinées en un film.



généralement qu'avec un laser X, qui concentre des rayons X très énergétiques en un puissant faisceau, les choses seraient encore pires.

La forte lumière du laser à elle seule peut percer un trou dans de l'acier. Il était donc légitime de penser qu'une fragile biomolécule n'aurait pas la moindre chance de résister. Il nous fallait prendre de vitesse les dégâts causés par les rayons X et enregistrer une image en quelques femtosecondes seulement. Pour

donner une idée des ordres de grandeur en jeu, la différence entre une femtoseconde et une seconde équivaut à la différence entre une seconde et 32 millions d'années...

La clé de la technique SFX se situe dans cet infime intervalle de temps qui sépare l'instant où la molécule est frappée par l'impulsion X et celui où les électrons sont arrachés à ses atomes par l'énergie des rayons X. Déshabillées de leurs électrons, les sous-structures

moléculaires, positivement chargées, se repoussent mutuellement, et les molécules finissent par se disloquer.

Comment fonctionne la technique, en gros ? Tout d'abord, nous nous arrangeons pour que les molécules interagissent de façon à former un minuscule cristal. Puis nous dirigeons sur le microcristal une impulsion laser X puissante et ultrabrève, juste assez longue pour que certains des rayons X soient diffractés par le cristal avant que l'énergie du faisceau ne déchiquette les molécules. Enfin, un détecteur capte les rayons X diffractés, et le motif formé révèle le type et la position des atomes dans la molécule. En enregistrant de nombreuses figures de diffraction d'un flux de cristaux, diversement orientés, qui traversent le faisceau X l'un après l'autre à haute cadence, on peut reconstituer la structure tridimensionnelle de la molécule. Enfin, on peut réaliser des images correspondant à différents instants au cours d'une réaction et mettre les images dans l'ordre, comme les photogrammes d'un film.

UNE DÉMONSTRATION DE PRINCIPE DÈS 2006

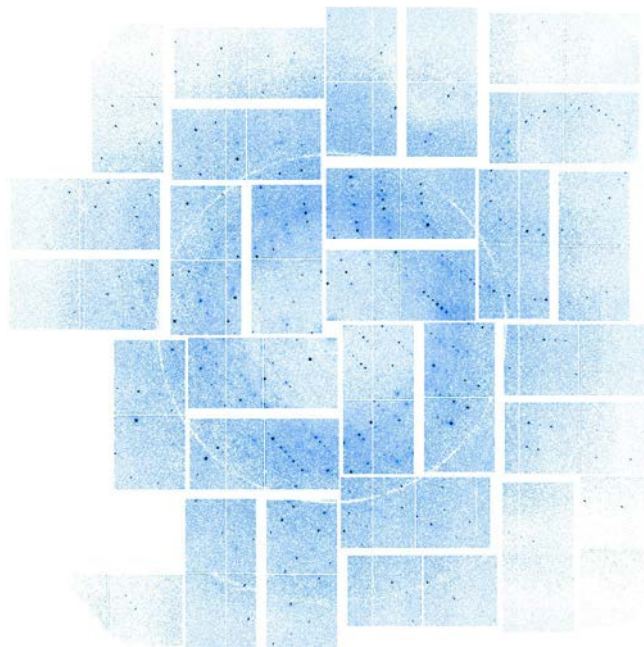
La première étape sur la voie de ces films moléculaires a été franchie en 2000, quand les biophysiciens Janos Hajdu et Richard Neutze, alors à l'université d'Uppsala en Suède, ont calculé que les molécules commenceraient à exploser une dizaine de femtosecondes après avoir été touchées par des rayons X. Il fallait donc prendre un cliché en un temps plus court. C'est ce qu'ont réussi à faire en 2006 Henry Chapman, aujourd'hui au synchrotron allemand Desy (*Deutsches Elektronen-Synchrotron*), et ses collègues : ils ont enregistré une image de basse résolution d'un minuscule motif gravé sur une membrane en nitrure de silicium (Si_3N_4), juste avant qu'il ne soit détruit par l'impulsion de rayons X.

Mais cela fonctionnerait-il pour de délicates molécules biologiques ? Une grande partie de la communauté scientifique était très réservée, et nos dix premières demandes de financement ont toutes été rejetées. Selon les sceptiques, les impulsions laser X ne seraient pas assez brèves, ou les cristaux de protéines seraient trop petits pour produire un signal détectable, ou nous ne serions pas capables de déterminer l'orientation du cristal au moment où il était frappé par l'impulsion laser, information nécessaire à la détermination de sa structure.

Petra Fromme (l'une d'entre nous) et son équipe ont entrepris de faire la démonstration de la SFX avec l'un des tests les plus difficiles que l'on puisse imaginer : le photosystème I. Constitué de 36 protéines et de plus de 300 pigments verts et orangés qui captent la lumière, c'est à ce jour l'une des structures protéiques les plus complexes analysées avec des rayons X.

UN CLICHÉ DE DIFFRACTION

Les points foncés indiquent ici les directions dans lesquelles les rayons X ont été diffractés par un cristal formé de molécules de lysozyme, une enzyme (*les pavés résultent de la structure du détecteur*). La figure de diffraction dépend de l'orientation du cristal ; pour déterminer la structure de la molécule, il faut analyser les clichés correspondant à de nombreuses orientations différentes.



Petra Fromme connaissait intimement le photosystème I, ayant travaillé pendant des années à le cristalliser et à déterminer sa structure par d'autres méthodes. Nous pensions également que la grande taille du complexe moléculaire serait en fait un avantage, parce que même avec un petit nombre de clichés de diffraction, nous pourrions obtenir une image à basse résolution qui serait reconnaissable comme étant le photosystème I. Et c'est ce que nous sommes parvenus à faire en 2009 dans ce laboratoire souterrain.

Pour obtenir notre cliché, nous avons tout d'abord besoin de cristaux du photosystème I. En cristallographie classique, on fait croître de gros cristaux, afin que la diffusion des rayons X soit suffisamment importante pour que l'on puisse reconstituer la structure de la molécule. Mais il faut parfois des années d'expériences pour réaliser de gros cristaux de bonne qualité de certaines protéines. Cela s'est parfois révélé presque impossible, notamment pour le photosystème I.

DES CRISTAUX MICROSCOPIQUES

Au lieu de cela, la SFX utilise des cristaux d'une fraction de micromètre, qu'il est beaucoup plus facile d'obtenir en laboratoire. Mais cela signifiait de nouvelles difficultés. Non seulement il fallait obtenir un signal suffisamment fort à partir d'un cristal tout petit, mais, de plus, s'ajoutaient des défis physiques élémentaires :

comment détecter des microcristaux trop petits pour être vus au microscope, sans parler de les positionner correctement par rapport aux impulsions laser, et ce à une cadence de 120 microcristaux par seconde?

En premier lieu, il fallait inventer de nouveaux moyens de voir nos microcristaux. Nous avons entre autres appliqué une méthode nommée Sonicc (*Second-Order Non-linear Imaging of Chiral Crystals*, «imagerie non linéaire au second ordre de cristaux chiraux»), dans laquelle les cristaux convertissent deux impulsions infrarouges ultra-brèves en photons de lumière verte, ce qui a pour effet d'allumer les nanocristaux comme des lucioles dans la nuit.



Les séquences d'images produites grâce à la SFX pourraient conduire à des avancées scientifiques, mais aussi, de façon plus immédiate, à des médicaments plus efficaces



Il fallait aussi trouver le moyen de propulser les cristaux pour qu'ils traversent l'impulsion laser à un rythme soutenu et régulier. L'un de nous (John Spence), aidé des physiciens Uwe Weierstall et Bruce Doak, de l'université d'État de l'Arizona, a conçu un dispositif qui fonctionne un peu comme une imprimante à jet d'encre: il produit un jet d'une solution contenant des nanocristaux. Cet injecteur envoie les nanocristaux avec une telle précision qu'ils traversent le faisceau de rayons X en file indienne.

Pour empêcher que l'injecteur ne s'encrasse (ce qui risquerait d'éteindre le jet de nanocristaux), Uwe Weierstall a dû concevoir une buse large qui soit néanmoins capable de produire un jet très fin. Il y est parvenu en entourant

l'extrémité de la buse d'un flux d'hélium gazeux; il en résulte un jet de cristaux beaucoup plus fin qu'un cheveu humain, même si la buse elle-même est 10 fois plus grosse.

Et quand tout le dispositif expérimental a enfin été prêt, restait un problème: comment gérer la masse de données qu'il allait produire? Une seule expérience peut engendrer jusqu'à 100 téraoctets de données, suffisamment pour remplir 25 disques durs d'ordinateurs de bureau de haute gamme. Et pour construire une image tridimensionnelle, nous devons déterminer l'orientation correspondant à chacun des dizaines de milliers de clichés de diffraction, puis combiner ces informations. Pour ce faire, nous avons développé un logiciel spécial en collaboration avec Richard Kirian et Thomas White, qui faisaient alors tous deux partie de l'équipe de Henry Chapman à Desy.

Pas à pas, nous avons amélioré notre technique. Et en 2014, nos travaux nous ont livré le premier aperçu en temps réel du transfert d'électrons entre deux acteurs clés de la photosynthèse: le gros photosystème I, qui capte la lumière, et une protéine nommée ferrédoxine (études faites avec des cristaux où sont présents les deux acteurs). Quand la lumière atteint le photosystème I, elle est convertie en électrons, que la ferrédoxine emporte et utilise pour convertir le dioxyde de carbone (CO_2) en molécules biologiques. Quand la ferrédoxine migre, les cristaux de protéines se dissolvent vite, ce qui rend la réaction difficile à suivre. Seul le processus ultrarapide de la SFX permet de voir ce changement éclair.

COMPRENDRE COMMENT LES PLANTES DISSOCIENT LES MOLÉCULES D'EAU

Le défi suivant dans cette voie de recherche est l'un des principaux axes de l'activité de Petra Fromme en tant que biochimiste: découvrir comment une plante scinde les molécules d'eau en hydrogène et en oxygène en utilisant seulement la lumière solaire et les abondants métaux terrestres. Décomposer l'eau à la manière des plantes pourrait fournir de l'hydrogène bon marché, un carburant propre pour les automobiles ou les groupes électrogènes – un vieux rêve relatif aux énergies renouvelables.

Nous avons obtenu les premiers clichés à basse résolution du processus de dissociation de l'eau, et ce que nous voyons suggère des changements structuraux significatifs du complexe protéique impliqué, le photosystème II. Récemment, l'équipe de Jian-Ren Shen, à l'université d'Okayama au Japon, a appliqué la technique SFX pour visualiser le processus avec encore plus de détails. Nous essayons à présent de réaliser des films à haute résolution qui montreraient les détails de toutes les étapes du >