

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 ➤

➤ processus au niveau atomique et qui élucideraient la photosynthèse.

Les séquences d'images produites grâce à la SFX pourraient non seulement déboucher sur des avancées scientifiques, mais aussi, de façon plus immédiate, sur des médicaments plus efficaces. Nous avons perçu ce potentiel en étudiant les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA-II ou sartans). Ces médicaments empêchent l'angiotensine II, hormone qui joue un rôle essentiel dans la vasoconstriction (réduction du diamètre des vaisseaux sanguins), de se lier à son récepteur à la surface des cellules. On utilise les ARA-II pour traiter l'hypertension, principale cause d'accidents vasculaires cérébraux et de crises cardiaques aux États-Unis et ailleurs. La première génération de ces médicaments s'est révélée utile, mais ils ne se lient que faiblement à leur cible et il faut donc les employer à haute dose, ce qui accentue leurs effets secondaires – des maux de tête aux vertiges, avec parfois des problèmes plus graves tels que des gonflements du visage et de la gorge.

Nos recherches ont mis en évidence la raison de cette mauvaise liaison : les molécules ne s'insèrent pas très bien dans le récepteur, et beaucoup se détachent. En déterminant plus précisément les structures des récepteurs, on pourrait développer une nouvelle génération d'ARA-II plus efficaces pour contrôler la pression artérielle.

On pourrait améliorer de nombreux autres médicaments par la même approche. Les récepteurs de l'angiotensine II appartiennent à un groupe plus vaste et très important de récepteurs cellulaires nommés récepteurs couplés aux protéines G. Ces molécules de la membrane des cellules permettent à celles-ci d'interagir avec leur environnement. Les scientifiques qui ont été pionniers dans la découverte de la structure et des fonctions des récepteurs de cette classe ont été récompensés du prix Nobel de chimie en 2012. Le rôle joué par ces derniers dans la survie et la croissance des cellules, et leurs dysfonctionnements, impliqués dans de nombreuses maladies, en fait des cibles cruciales pour de nouveaux médicaments. Voir comment leur structure se modifie durant leur activité biologique aidera les pharmacochimistes à concevoir des médicaments qui correspondent précisément aux récepteurs visés, et ce dans leur état actif, ce qui limitera les risques d'effets secondaires.

« Nous avons montré que dans tous les modèles moléculaires précédents, les meilleures estimations de l'adéquation des récepteurs et des médicaments étaient erronées sur de nombreux détails importants », dit Vadim Cherezov, de l'université de Californie du Sud, qui a mené l'expérience sur l'angiotensine II. Par exemple, la SFX a révélé des différences de structure des récepteurs couplés aux

protéines G à température ambiante par rapport aux très basses températures employées en cristallographie classique. Cela signifie que les médicaments conçus pour des récepteurs que l'on a étudiés à basse température ne correspondront pas bien quand on les utilisera dans le corps humain, plus chaud.

Et parfois, les médicaments visent une cible trop large. C'est le cas avec la maladie du sommeil. Nos séquences d'images moléculaires ont montré que les médicaments utilisés pour traiter cette maladie parasitaire interagissent de manière similaire avec les protéines du parasite et avec des protéines des cellules humaines. Ces images plus précises pourraient aider les chimistes à concevoir des médicaments qui n'agissent que sur les protéines du parasite.

DÉCRYPTER COMMENT NOS YEUX VOIENT

Nous avons également été ravis de voir comment d'autres chercheurs utilisent nos techniques SFX pour répondre à différentes questions. Par exemple, Marius Schmidt, de l'université du Wisconsin, et ses collègues ont récemment obtenu des films moléculaires qui contribuent à expliquer comment nos yeux voient. Bien que les bactéries ne soient pas dotées d'une véritable vision, elles ont des protéines sensibles à la lumière qui préfigurent, sur le plan de l'évolution, celles de notre propre système visuel. En enregistrant des clichés avec une rapidité inédite, l'équipe a réalisé une vidéo montrant au ralenti des événements extrêmement rapides, qui révèle comment une protéine bactérienne capte la lumière et y réagit.

Le groupe de Marius Schmidt a utilisé la SFX pour obtenir, de la protéine cristallisée qui réagissait à la lumière, des images se succédant de moins de 1 billionième de seconde (10^{-12} seconde). Spécifiquement, l'équipe a cartographié les déplacements des atomes de la protéine pendant qu'une molécule pigmentaire enfouie dans la protéine jaunissait en réaction à la lumière. Pour la première fois, la structure du pigment était enregistrée immédiatement après l'absorption de la lumière et avant qu'il n'ait eu le temps de réagir ; cet état est fondamental pour la perception de la lumière chez tous les organismes vivants, y compris les bactéries et les plantes, et c'est la première étape de la vision humaine.

Nous sommes convaincus que l'avenir de la cristallographie des protéines – et notre connaissance de la nature – se trouve du côté de la méthode SFX. Qui sait, peut-être que d'ici à une dizaine d'années, la moitié de toutes les structures protéiques connues ne seront plus des images statiques sur la page d'un traité, mais des films de scènes moléculaires en relief. ■

BIBLIOGRAPHIE

P. Fromme, **XFELs open a new era in structural chemical biology**, *Nature Chemical Biology*, vol. 11(12), pp. 895-899, 2015.

T. R. Barends et al., **Direct observation of ultrafast collective motions in CO myoglobin upon ligand dissociation**, *Science*, vol. 350, pp. 445-450, 2015.

M. M. Waldrop, **X-ray science : The big guns**, *Nature*, vol. 505, pp. 604-606, 2014.

J. C. H. Spence et al., **X-ray lasers for structural and dynamic biology**, *Reports on Progress in Physics*, vol. 75(10), article 102601, 2012.

H. N. Chapman et al., **Femtosecond X-ray protein nanocrystallography**, *Nature*, vol. 470, pp. 73-77, 2011.