



Microtomographie à rayonnement X synchrotron

La technologie d'un coup d'œil

La microtomographie étend les capacités de l'imagerie par rayons X pour produire des images à très haute résolution avec un très bon contraste. En utilisant les mêmes principes que l'imagerie médicale, couplés au rayonnement synchrotron et à l'imagerie par contraste de phase, les scientifiques peuvent produire des images 2D et 3D de leurs échantillons à des résolutions sub-microniques. Bien souvent cette technique permet d'étudier des échantillons qui ne peuvent pas être imagés par les techniques conventionnelles.

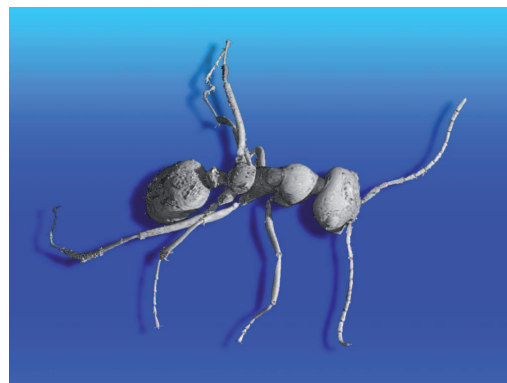
Les plus de l'ESRF

Les lignes de lumière permettant d'utiliser la microtomographie à rayonnement X synchrotron à l'ESRF sont parmi les plus performantes au monde. Elles utilisent une source générant une lumière d'une brillance extrême et peuvent atteindre une résolution spatiale inférieure à 1 micron. Ceci permet de suivre à haute résolution des phénomènes à mesure qu'ils se développent, permettant la production d'images 3D dynamiques. La microtomographie est une des techniques majeures d'imagerie à l'ESRF, et elle est utilisée pour les applications industrielles depuis plus d'une décennie. L'ESRF dispose donc d'un savoir-faire unique dans l'utilisation des différents aspects de la microtomographie, permettant de répondre rapidement et efficacement aux différentes demandes industrielles pour obtenir des résultats optimaux.

De plus, l'ESRF fournit un choix unique d'environnement d'échantillon, avec des systèmes de contrôle de la température pouvant aller de -60°C à 1600°C , et des appareils permettant d'appliquer aux échantillons des contraintes en tension, pression ou en fatigue. Le personnel de l'ESRF en charge de

“ La microtomographie à rayonnement X synchrotron a l'immense pouvoir de trouver la proverbiale aiguille dans une botte de foin de la taille d'un immeuble. ”

- Elodie Boller, ingénieur en charge des expériences industrielles sur ID19



la microtomographie est dédié à la production d'image de la plus haute qualité possible afin de répondre aux besoins des utilisateurs.

Champs d'application

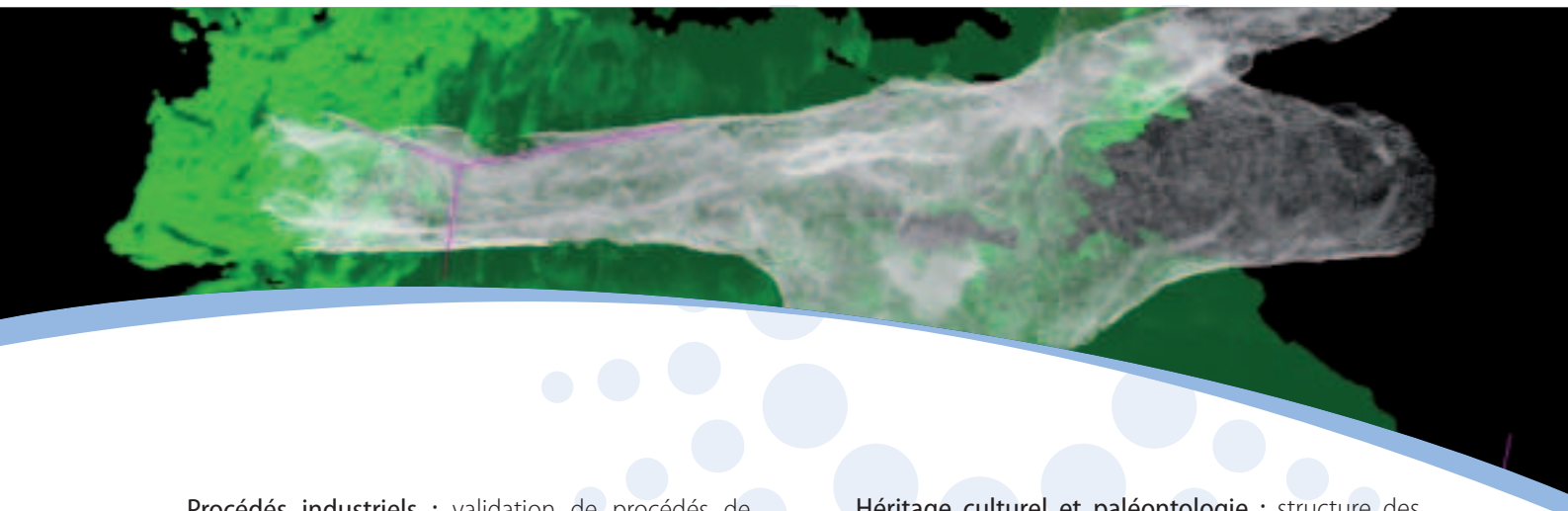
La microtomographie à rayonnement X synchrotron offre de nombreuses possibilités et quelques applications inattendues:

Polymères : structures de fibres, polyuréthane, mousses polystyrènes (cellules ouvertes et fermées).

Production minière, pétrole : perméabilité et détermination de la microstructure des roches, solidification du ciment.

Cosmétiques : rouges à lèvres, structure du cheveu, mousse à raser.

Agroalimentaire : conditions de cuisson du pain, structure de la mousse au chocolat, graines, sucre, sel, fruits, crème glacée ...



Procédés industriels : validation de procédés de fabrication et de structure, contrôle de qualité.

Environnement : structure de la neige, étude des sols.

Héritage culturel et paléontologie : structure des pierres de sites archéologiques, études de chef-d'œuvres artistiques (Rembrandt, Monet, Van Gogh) et fossiles.

“La qualité des expériences à l’ESRF est bien au delà de mes attentes ! J’ai vraiment apprécié non seulement les résultats scientifiques, mais aussi le contact avec l’équipe de personnel de l’ESRF et leur très haut niveau d’expertise. Je recommande vivement l’ESRF en tant qu’installation à la pointe de la technologie.”

- Rhodia (France)

“Ce que j’apprécie le plus lorsque je travaille à l’ESRF c’est la relation de travail que nous avons avec leur personnel. Tout se passe toujours de manière très détendue. Nous obtenons des résultats sérieux dans un environnement agréable et amical. Même si nous sommes une petite compagnie, nous bénéficions d’un traitement de première classe à l’ESRF.”

- ERM SARL (France - 14 employees)

Nos clients industriels comprennent le CEA, AREVA, Lafarge, L’Oréal, Rhodia, Schneider Electric, Unilever

ETUDE DE CAS

Unilever a utilisé l’imagerie tomographique haute résolution pour caractériser la microstructure de la crème glacée.

Le défi : Comprendre comment la microstructure de la crème glacée change après décongélation partielle et recongélation.

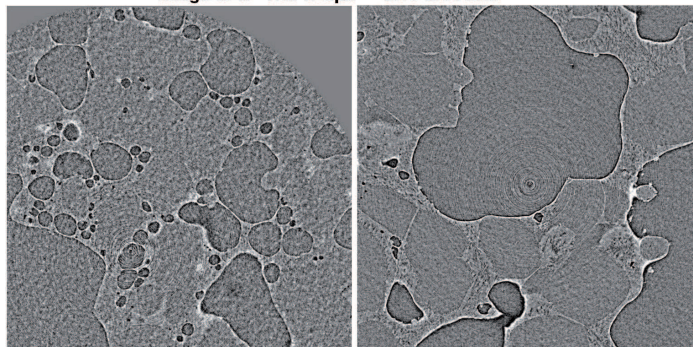
Le contexte : La microstructure des cristaux de crème glacée et des bulles d’air est essentielle pour la qualité de la glace et ses propriétés sensorielles. La crème glacée est de manière inhérente instable, et l’augmentation de la température, que ce soit pendant le transport, le stockage ou même à la sortie du congélateur du consommateur, peut jouer dans la perte de la structure des microcristaux de glace et ainsi donner lieu à une recristallisation et à une structure plus grossière.

Le résultat : En utilisant le système de microtomographie installé sur ID19 couplé à un environnement d’échantillon pour les basses températures, la microstructure de la crème glacée est apparue très clairement, montrant les différences de structure entre les échantillons préparés préalablement.

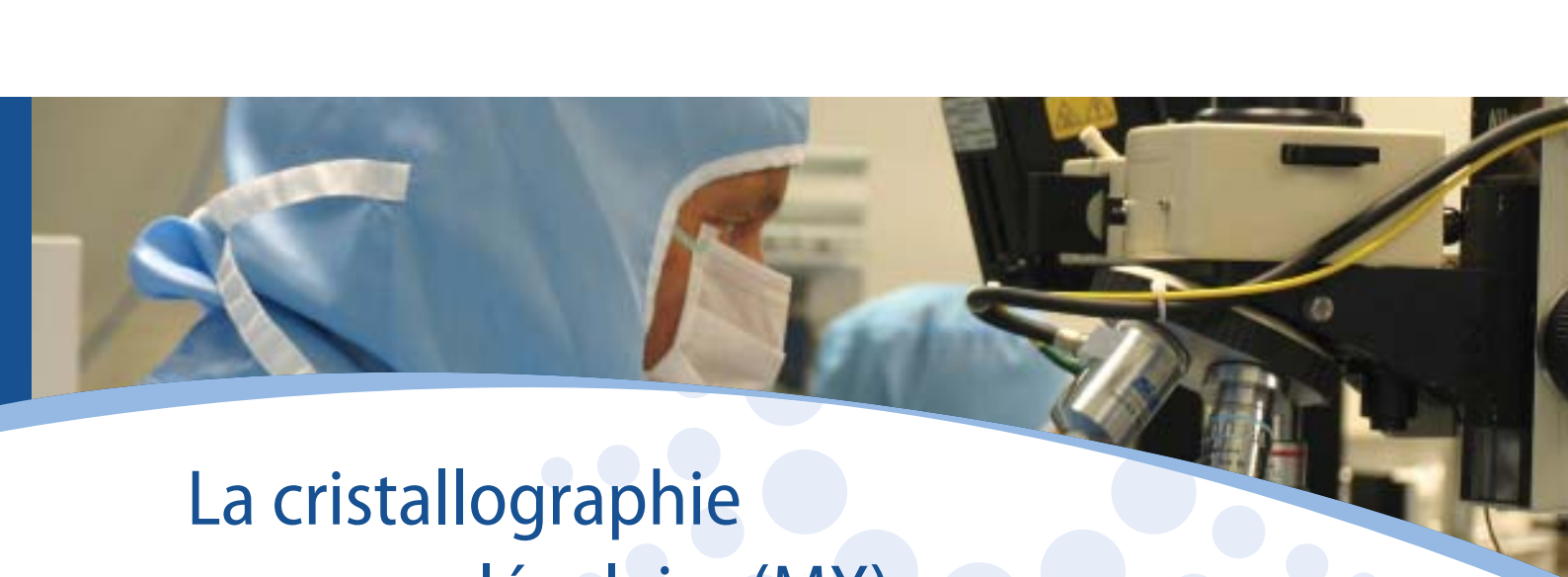
L’apport du synchrotron : La recherche d’Unilever a été un véritable défi pour l’équipe d’ID19, nécessitant

un environnement d’échantillon *in situ* spécifique et des temps d’acquisition très réduits. L’intensité du faisceau d’ID19, ses détecteurs et l’environnement d’échantillon pour les basses températures compatible avec des hautes résolutions (rotation de l’échantillon sur 180°) a permis de réaliser des images 3D de haute qualité avec des voxels de seulement 0.56 micron.

Image size =725*725px² = 0.41*0.41 mm²



Comparaison entre de la crème glacée fraîche (gauche) et de la crème glacée après recongélation (droite), montrant clairement les larges cristaux et les grosses bulles d’air après le cycle de température.



La cristallographie macromoléculaire (MX)

La technologie d'un coup d'œil

Les lignes de lumière MX permettent aux scientifiques d'étudier la structure des macromolécules biologiques qui sont à la base de tous les mécanismes fondamentaux du vivant. Chacune de ces molécules est constituée d'une ou plusieurs protéines qui sont impliquées dans des fonctions aussi diverses que le stockage d'énergie, la signalisation intra- et inter-cellulaire, la division cellulaire, la contraction musculaire pour ne citer que les plus étudiées. La technologie MX permet également aux scientifiques de comprendre comment les molécules chimiques interagissent avec ces protéines et donc de concevoir des médicaments de manière plus rationnelle en utilisant leur structure tridimensionnelle.

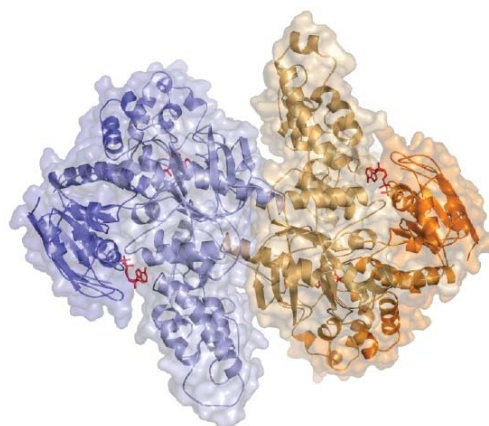
Les plus de l'ESRF

L'ESRF est reconnu comme le leader mondial dans le domaine MX. Ses six lignes de lumière dédiées à la technologie MX, toutes équipées de changeurs d'échantillons automatisés, peuvent traiter et analyser un très grand nombre d'échantillons rapidement et efficacement. Parmi ces lignes, l'ESRF met à la disposition de ses utilisateurs une ligne de lumière micro-focus leur permettant ainsi d'utiliser un micro faisceau de haute intensité, avec des caractéristiques de performance constantes. Ceci est d'autant plus utile que la cristallisation des macromolécules biologiques est une étape souvent difficile. L'obtention d'un échantillon correct demande parfois un test extensif de plusieurs centaines de cristaux et il est toujours préférable que la taille du faisceau de rayons X coïncide avec la taille de l'échantillon.

Le développement de la biologie structurale dans le domaine des biotechnologies, poussé par des avancées techniques de la cristallisation des biomolécules, a généré une demande croissante de temps de faisceau de la part de l'industrie.

“ Vous travaillez dans le noir sans la structure de votre molécule. La voir vous permettra d'illuminer votre recherche. ”

- Matthew Bowler, scientifique responsable de ligne ESRF MX ID14-2



Afin de répondre à ce besoin, l'ESRF a mis en place un service de collecte de données, le service MXpress, qui permet aux utilisateurs d'envoyer leurs échantillons congelés à l'ESRF pour une analyse par ses scientifiques expérimentés. L'expérience s'effectue en général quelques jours après réception des échantillons et les données collectées sont accessibles en temps réel par leurs propriétaires. Les utilisateurs peuvent aussi collecter leurs données en mode « Accès à distance » (Remote Access), en pilotant les lignes de lumière de l'ESRF dans le confort de leur laboratoire.

Champs d'application

Des sociétés pharmaceutiques, telles que Sanofi-Aventis (France et Allemagne), AstraZeneca (Royaume-Uni et Suède) et GlaxoSmithKline (UK), utilisent régulièrement les lignes de lumière MX de l'ESRF afin de déterminer les structures de leurs protéines cibles

en complexe avec de petites molécules, candidates potentielles comme médicaments. Cette collaboration, établie depuis les débuts de l'activité industrielle à l'ESRF (milieu des années 90), est toujours en cours après 15 années d'existence.

“Nous sommes vraiment très satisfaits de la relation privilégiée que nous avons avec l'ESRF. Nos scientifiques préfèrent analyser leurs propres échantillons et ils peuvent le faire à l'ESRF. L'ESRF est facile à utiliser, nous sommes maintenant familiers avec les procédures et bien sûr nous apprécions la qualité de ses lignes de lumière.”

- AstraZeneca (UK)

Nous travaillons en collaboration avec l'ESRF depuis de longues années maintenant. Nous connaissons ces lignes de lumières et cela est un avantage énorme. Le personnel ESRF est très efficace et coopératif. Il est aisé de collaborer dans ces conditions et la qualité des données est excellente.

- AstraZeneca (Swe)

“Nous avons particulièrement apprécié l'installation des robots changeurs d'échantillons qui ont drastiquement modifié nos procédures de travail. Avant, il fallait entrer dans la cabine expérimentale toutes les deux ou trois minutes pour changer un échantillon, maintenant nous appuyons sur un bouton et automatiquement voyons venir à nous des centaines de résultats.”

- Sanofi-Aventis (France)

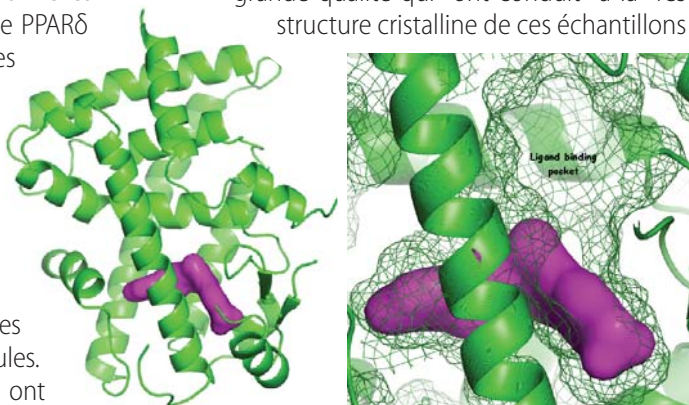
Sanofi-Aventis a utilisé le service MXpress pour la collecte de données sur des cristaux de protéine PPAR δ impliquée dans le diabète.

Le défi : Trouver un agoniste qui puisse stimuler la réaction à l'insuline chez les patients atteints de diabète.

Le contexte : L'augmentation de l'activité de PPAR δ , qui régule la réponse des cellules à l'insuline, est considérée comme un effet positif pour le diabète dit de type 2. Les structures tridimensionnelles des domaines de réception des ligands de PPAR δ complexés avec certaines molécules agonistes ont été déterminées. Le but ultime était de découvrir un agoniste qui puisse être utilisé pour stimuler la réaction du patient à l'insuline.

Le résultat : Les structures tridimensionnelles ont montré que la cavité dans laquelle vient se lier l'agoniste était très plastique – une découverte clé pour les chimistes synthétisant ces petites molécules. Les analyses de la structure cristalline ont permis l'optimisation des propriétés des ligands en vue d'obtenir des agonistes spécifiques activant PPAR δ . Grâce à ces études, Sanofi-Aventis est maintenant en possession d'un médicament en phase d'essais cliniques.

L'apport du synchrotron : Les cristaux de PPAR δ poussent lentement, diffractent faiblement et sont particulièrement sensibles aux dommages causés par le rayonnement X. L'expertise de l'équipe MXpress a permis de collecter des données de diffraction par rayons X de grande qualité qui ont conduit à la résolution de la structure cristalline de ces échantillons délicats.



A gauche : représentation de la structure du domaine de liaison du PPAR δ en complexe avec le ligand. L'agoniste est représenté en violet.
A droite : gros plan de la cavité d'interaction (grille) montrant que le ligand n'occupe qu'une partie de la cavité, mais les deux surfaces d'interaction s'imbriquent intimement.

Cristallographie macromoléculaire (MX)

SPECIFICATIONS TECHNIQUES

	ID14-1	ID14-2	ID14-4	ID23-1	ID23-2	ID29	ID13 +
Ligne de lumière	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Site internet	http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/MX						
En opération	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Calendrier	http://www.esrf.eu/Accelerators/Operation/Schedules						
Intensité du faisceau d'électrons (mA)	90-200mA	90-200mA	90-200mA	90-200mA	90-200mA	90-200mA	90-200mA
Taille du faisceau au niveau de l'échantillon (μm^2)	de 30x30 à 200x200	de 30x30 à 200x200	de 30x30 à 200x80	50 x 30	5 x 7	de 10x10 à 30x50	1x1
Flux @ 200mA (ph/s)	5.8×10^{10}	1.3×10^{11}	1.8×10^{12}	1.5×10^{12}	4.0×10^{11}	1.0×10^{13}	5×10^{10}
Densité de flux @ 200mA (ph/s/mm ²)	5.8×10^{12}	1.3×10^{13}	2.2×10^{14}	1.0×10^{15}	1.1×10^{16}	6.7×10^{15}	5×10^{16}
Expériences avec micro-faisceaux				✓	✓	✓*	✓
Longueur d'onde min (Å)	0.934	0.934	0.9	0.6	0.873	0.6	0.85
Longueur d'onde max (Å)	0.934	0.934	1.3	2.1	0.873	2.1	1.1
Résolution maximale (Å)	1.0	1.0	0.9	0.6	0.9	0.6	0.9
Détecteur	ADSC-Q4r	ADSC-Q210	ADSC-Q315r	ADSC-Q315r	Mar 225	Pilatus 6M	Frelon M4
Changeur d'échantillons	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Collecte de données de type MAD			✓	✓	✓	✓	
Détecteur de fluorescence	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓**
Collecte de données en mode hélicoïdal			✓	✓	✓	✓	✓
Echantillonnage en grille	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Recuit automatique des échantillons	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Analyse de la fluorescence des rayons X (XRF)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓**
Centrage automatique des boucles	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Accès à distance (« Remote Access »)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Caractérisation cristalline automatique	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Service MXpress	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
† Déshydratation des cristaux		✓					
† Micro spectrophotomètre en ligne	✓	✓					
Mesures à température ambiante	✓	✓					✓
Equipements de laboratoire	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

* Non dédié 100 % à MX. ** Utilisable seulement à température ambiante et sur requête préalable.

* Micro-faisceau non focalisé.

† Sur demande deux semaines à l'avance.

Schering-Plough a utilisé le service MXpress pour caractériser le site actif du récepteur de la progestérone.

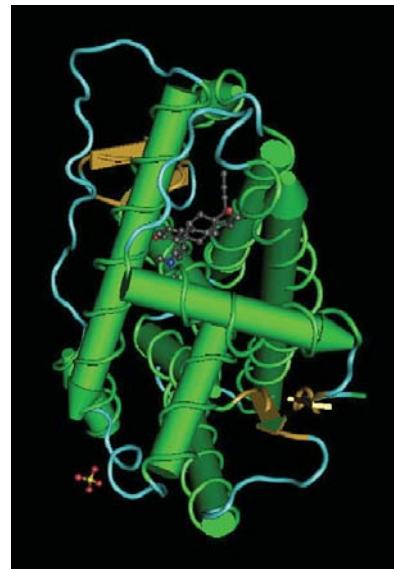
Le défi : Obtenir un modèle du récepteur de la progestérone en complexe avec la mifépristone dans le but de mieux comprendre le fonctionnement et la spécificité de son site actif.

Le contexte : La mifépristone est une anti-progestérogène utilisée en milieu médical. S'il est connu qu'elle exerce son effet en se liant au site actif de la progestérone, aucune information structurale concernant cette interaction n'était disponible. La mifépristone se liant également à deux autres récepteurs, elle pouvait engendrer des effets indésirables.

Le résultat : La structure cristalline à haute résolution a montré que la mifépristone était capable de se lier à son récepteur dans la conformation attendue pour un agoniste alors que des études antérieures donnaient à penser qu'une entrave stérique l'en empêcherait. Ces études ont étendu les connaissances sur la forme structurale du domaine de liaison du récepteur de la progestérone, permettant ainsi la conception de médicaments de type anti-progestérogènes plus spécifiques.

L'apport du synchrotron : La structure cristalline a été résolue à 1.95Å de résolution, à partir de mesures réalisées par le service MXpress de l'ESRF.

Référence : Raaijmakers et al. J. Biol. Chem. 284 (2009), 19572-19579.



La mifépristone (en bâton) liée au récepteur de la progestérone.

MRC Cambridge a utilisé les lignes micro-focus de l'ESRF pour déterminer les structures tridimensionnelles de deux récepteurs β -adrénergiques.

Lignes de lumière : ID23-2, ID13.

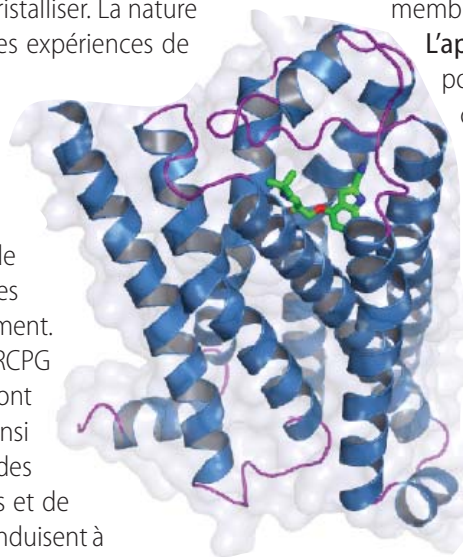
Le défi : Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont des protéines typiquement instables et de fait très difficiles à purifier et à cristalliser. La nature fragile des cristaux obtenus rend les expériences de diffraction très difficiles..

Le contexte : Les RCPGs sont la principale voie pour la transduction du signal transmembranaire en réponse aux hormones et neurotransmetteurs. Plusieurs centaines de médicaments ciblant ces protéines sont actuellement en développement. Les structures cristallines des RCPG en complexes avec des ligands sont cruciales car elles permettent ainsi d'analyser le mode de liaison des médicaments potentiels aux RCPGs et de comprendre les mécanismes qui conduisent à la transduction du signal provenant des hormones (l'adrénaline dans ce cas).

Le résultat : Les données de diffraction de rayons X sur des monocristaux recueillies à l'ESRF ont conduit à la publication des premières structures cristallines de membres de cette famille de RCPGs.

L'apport du synchrotron : Le faible pouvoir diffractant de la plupart des cristaux produits couplé à leur petite taille nécessitait une ligne de lumière très automatisée, au faisceau micro-focalisé de haute intensité afin d'obtenir des données exploitables. Plus d'un millier de cristaux ont été testés pour obtenir les données de diffraction. Le jeu de données finalement utilisé a été obtenu en fusionnant des données recueillies en différents points d'un même cristal.

Référence : Rasmussen et al. Nature 450 (2007), 383-387; Warne et al. Nature 454 (2008), 486-492 .



Structure cristalline du récepteur beta-adrénergique avec un ligand.



Déshydratation de cristaux

Un nouvel appareil qui maîtrise l'humidité des cristaux macromoléculaires est disponible sur les lignes de lumière ESRF

Les propriétés des cristaux de protéines peuvent souvent être améliorées par déshydratation contrôlée de ceux-ci. Un nouvel appareil développé par l'EMBL et l'ESRF est maintenant utilisable couramment à l'ESRF pour maîtriser l'hydratation des cristaux non congelés quand ils sont montés sur une ligne de lumière de cristallographie macromoléculaire. Ceci permet un réglage fin de la déshydratation et ainsi de caractériser pleinement un système donné afin d'augmenter les chances de trouver un protocole de déshydratation adapté au cristal. De plus, sa facilité d'utilisation rend ces expériences faisables dans un délai raisonnable.

La déshydratation peut avoir plusieurs effets observables sur les propriétés des cristaux parmi lesquels un changement de groupe d'espace, la réduction de la maille cristalline, des changements de mosaïcité, une amélioration des profils des taches de diffraction, une amélioration de la résolution ou du pouvoir de diffraction de l'échantillon.

L'appareil fournit un courant d'air d'une humidité relative précise qui peut être utilisée pour faire varier la quantité d'eau présente dans des cristaux macromoléculaires.



L'expérience est simple : l'appareil peut être installé rapidement sur la ligne, les échantillons sont montés dans des boucles utilisées habituellement en cryogénie et l'impact de la déshydratation peut être contrôlé visuellement au moyen de l'acquisition d'images de diffraction in situ. Une fois le niveau optimal d'hydratation obtenu, la congélation de l'échantillon en vue d'une mesure complète de données est facile à réaliser : soit à la main, soit en utilisant nos changeurs d'échantillons.

Détails pratiques

Que me faut il ?

- Plusieurs cristaux non congelés issus approximativement de la même condition de cristallisation – qui peuvent être sacrifiés si nécessaire.
- Des boucles de type Mesh, montées sur des bases de standard SPINE.
- Des paniers remplis de tubes vides, tous issus des standards SPINE.

Combien de temps une expérience de ce type prend elle ?

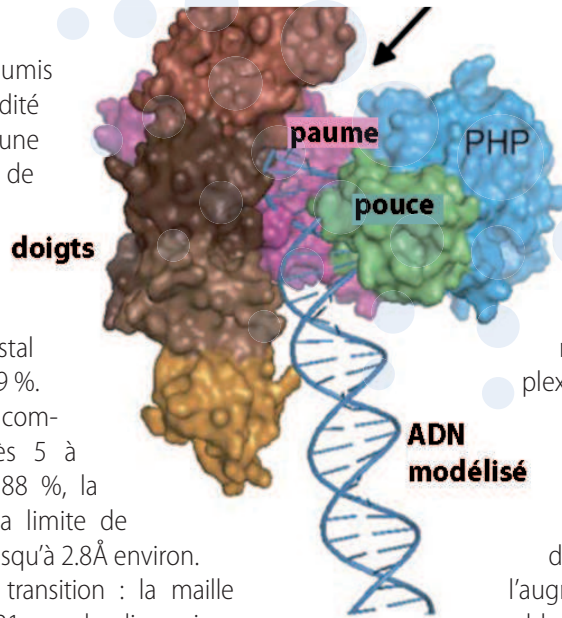
- Un test rapide de quelques heures peut être effectué afin de voir si votre système cristallin est sensible aux changements de déshydratation..
- Des protocoles de déshydratation peuvent être très différents selon le système du cristal. Pour cette raison, affiner un protocole de déshydratation peut prendre du temps et nécessiter le sacrifice de plusieurs cristaux. Il faut en général 24 heures pour explorer et raffiner un protocole de déshydratation.
- Une fois affiné, un protocole permet de conditionner rapidement et de stocker des échantillons pour des expériences ultérieures.

Quel est le taux de succès de ce type d'expériences ?

- La déshydratation améliore l'ordre d'un système cristallin dans 10 à 20 % des cas. Elle résulte alors en une augmentation de la limite de diffraction observée.
- Si votre cristal contient beaucoup de solvant et/ou est de basse symétrie, la déshydratation peut l'améliorer.
- Si vous avez observé une variabilité dans les dimensions de maille de vos cristaux après congélation, ceci peut indiquer que votre système est sensible à la déshydratation.

L'ADN Pol III de Escherichia coli

Lorsque ces cristaux sont soumis à un gradient d'une humidité relative (HR) décroissante, une diminution dans la qualité de la diffraction est observée à environ 96 % HR, à tel point qu'il n'est plus possible d'indexer les clichés de diffraction du cristal avant que la HR n'atteigne 89 %. À ce stade, la diffraction commence à s'améliorer. Après 5 à 10 minutes à une HR de 88 %, la diffraction est rétablie et la limite de résolution augmente d' 1\AA jusqu'à 2.8\AA environ. Les cristaux subissent une transition : la maille élémentaire initiale en P212121 avec des dimensions d'environ $a=83, b=99, c=144\text{\AA}$, est réduite à environ

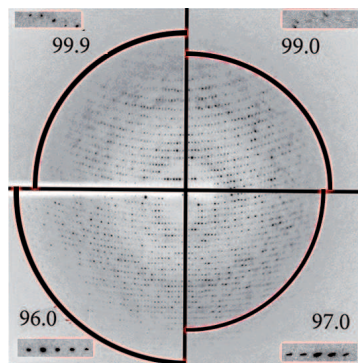


$a=83, b=94, c=131\text{\AA}$. Ceci correspond à une réduction en volume de toute la maille de 14 % et une réduction approximative du contenu du solvant de 57 % (v/v) à 50 %.

Ces cristaux avaient été signalés préalablement comme améliorables grâce à leur déshydratation au moyen d'un autre appareil plus complexe le FMS (Lamers et al, 2006). Bien que les deux appareils fonctionnent de manière très différente, ces cristaux subissent la même transition. Les changements se produisent à des valeurs HR quasiment identiques et l'augmentation de la résolution est comparable. Ceci met en évidence la nature robuste et reproductible de la méthode.

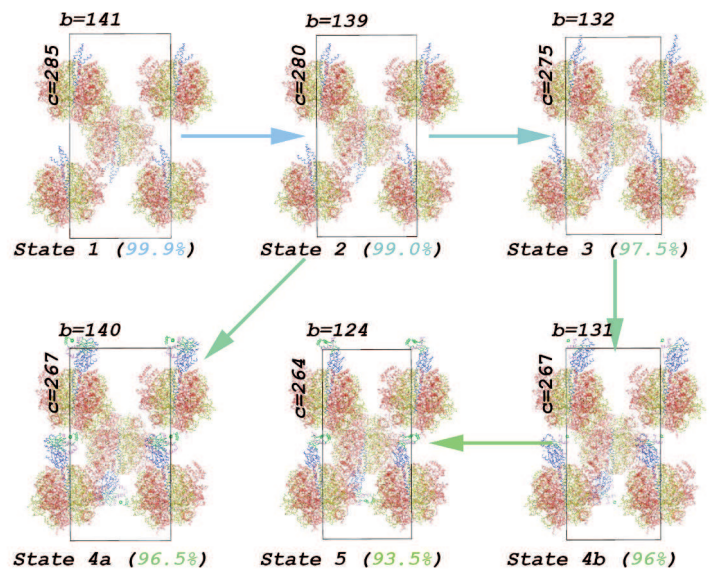
L'ATPase F₁ de bœuf

Les cristaux de l'ATPase F1 bovin ont un comportement plus complexe quand ils sont soumis à une déshydratation contrôlée. Ces cristaux ont été préalablement caractérisés lors de la déshydratation, en utilisant le FMS (Bowler et al, 2006b, Sanchez-Weatherby et al, 2007). Néanmoins, l'extrême facilité de manutention de ce nouvel appareil, couplée avec l'utilisation d'une ligne de lumière synchrotron



Changements de la diffraction aux rayons X des cristaux de l'ATPase F1 observés au cours de leur déshydratation. Les limites de résolution obtenues à chaque état de déshydratation : 3Å, 3.8Å, 4Å et 2.5Å sont exposées dans chaque quadrant de l'image. Un zoom sur la même zone du détecteur (dans les petits encarts), montre l'amélioration des profils des pics de Bragg après déshydratation.

brillante, a permis une étude beaucoup plus détaillée des changements subis par ces cristaux lors de la déshydratation. Ce système a permis d'approfondir notre compréhension du processus de déshydratation des cristaux et de comprendre ses principes généraux sous-jacents.



Les structures des différents états de transition de l'ATPase F1. Empilement cristallin des cristaux de l'ATPase F1 à chaque état de déshydratation. Les mailles élémentaires à chaque état de déshydratation sont ici présentées suivant l'axe a. L'unité asymétrique ainsi que les molécules reliées par symétrie sont représentées suivant leur chaîne carbonée principale et colorées par sous-unité (α en rouge, β en jaune, δ en magenta et ε en vert). Les flèches indiquent les différents chemins que peuvent suivre les cristaux.



Diffusion aux petits angles d'échantillons biologiques (BioSAXS)

La technologie d'un coup d'œil

La diffusion des rayons X aux petits angles (DXPA, ou SAXS en anglais) est un outil fondamental pour déterminer les propriétés structurales (dimensions et enveloppes moléculaires à basse résolution) des macromolécules en solution. Cette technique est relativement efficace pour étudier des macromolécules qui ne peuvent cristalliser et dont les masses varient de 1kDa à 1MDa (protéines, biopolymères, glucides, lipides, ainsi que leurs complexes). De plus, des changements de conformation de protéines suffisamment larges peuvent être repérés sur un large éventail de conditions expérimentales (pH, températures, concentrations, etc).

Quelle information puis-je obtenir ?

Uniquement à partir des données SAXS

- Monodispersité et comportement d'une macromolécule en solution (utile lors de l'optimisation des conditions de cristallisation ou d'essais de stabilisation des protéines)
- Dimensions des particules diffusantes : rayon de giration (R_g) et diamètre maximum (D_{max}), et ainsi une information sur leur état oligomérique (monomères, dimères, tétramères, ...)
- Forme d'une protéine non-cristallisable (obtention de phases à basse résolution)
- Forme d'un complexe macromoléculaire.

Combinaison données SAXS/données cristallographiques

- Confirmation de la structure quaternaire d'une protéine ou un complexe multiprotéine
- Elucidation de la forme d'un nouveau domaine ou d'un domaine invisible dans la structure cristalline
- Suivi des changements conformationnels et des mouvements d'un domaine produits par la fixation d'un ligand ou la formation de complexes.

Les plus de la ligne BioSAXS

Facile à utiliser, entièrement automatisée et nécessitant de petites quantités d'échantillons

ID14-3 est la ligne de lumière de l'ESRF entièrement dédiée à l'étude d'échantillons biologiques en solution. Un robot permet d'automatiser tout le cycle de chargement/déchargement des échantillons et de nettoyage de la cellule de mesure. De très petites quantités d'échantillons (généralement 50µL à 10 mg / mL) sont suffisantes pour réaliser une expérience complète. L'interface graphique de contrôle de l'expérience (BsxCuBE) est facile d'utilisation, permettant des mesures en séquence sans intervention de l'utilisateur et est liée à un programme de traitement automatique des données SAXS (« AutoSub » développé par le groupe BioSAXS de EMBL, Hambourg).

Nos scientifiques offrent toute l'aide nécessaire pour réaliser l'expérience et analyser les données en cas de besoin.

Détails pratiques

De quoi ai-je besoin ?

- Échantillons en solution monodisperse (aucune agrégation)
- 3 dilutions à différentes concentrations (de 1 à 10 mg / ml) bien déterminées (mesures au Nanodrop par exemple)
- Une solution tampon qui correspond exactement au solvant des échantillons.

Combien de temps dure une expérience SAXS ?

L'étude d'un échantillon dure approximativement 1 heure de temps de faisceau, y compris l'analyse préliminaire des données * (le démarrage de la ligne de lumière par nos scientifiques n'est pas inclus).

* Ceci inclut la collecte de données à partir de 3 différentes concentrations de l'échantillon, la vérification de sa monodispersité, la détermination du rayon de giration et le poids moléculaire de la biomacromolécule.



Gros plan du changeur d'échantillon sur ID14-3 avec le compartiment de stockage des échantillons ouvert.

Comment puis-je accéder à cette technique?

Deux modes d'accès sont actuellement disponibles: accès standard au temps de faisceau, avec et sans assistance scientifique, et un service de collecte des données par courrier.

Données techniques de la ligne BioSAXS de l'ESRF ESRF ID14-3

Gamme de Q (nm ⁻¹)	0.05 - 5 nm ⁻¹
Cellule de mesure de l'échantillon	Capillaire en quartz
Volume de l'échantillon exposé	Typiquement 10-30 µl
Temps d'exposition de l'échantillon	Typiquement 100 secondes
Changeur d'échantillons	Tubes PCR, tubes eppendorf et 3 plaques de 96 puits
Température de l'échantillon (°C)	4-60 °C

Le récepteur intracellulaire PYR1 de *A. Thaliana*

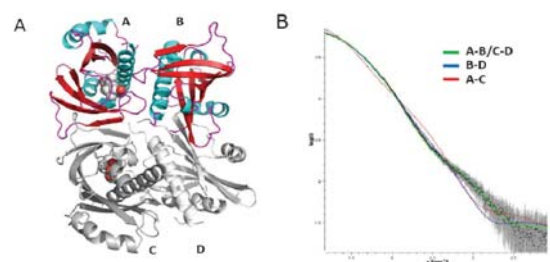
Le défi : Identifier le dimère biologiquement actif du PYR1 et sa relation avec la structure cristalline qui a montré un arrangement tétramérique.

Le contexte : L'acide abscissique (ABA) est une hormone végétale qui a un rôle central dans la réponse adaptative à la contrainte de dessiccation. Dans cette étude, les auteurs [1] ont déterminé la structure cristalline de la protéine PYR1 issu de *A. thaliana* en complexe avec l'ABA. Le modèle cristallographique de PYR1 contient quatre monomères dans l'unité asymétrique (schéma A). Or, la chromatographie d'exclusion stérique combinée avec la diffusion de lumière laser multi-angle (MALLS) démontre que la structure de PYR1 est un dimère en solution.

Le résultat : La solution de la protéine PYR1 a été étudiée sur la ligne de lumière BioSAXS. Les trois modèles cristallographiques de dimères présumés A-B, A-C et B-D ont été comparés aux données SAXS (schéma B) et la comparaison montre un bon ajustement uniquement

pour le dimère A-B, confirmant ce dernier comme le dimère biologiquement actif de la protéine PYR1.

L'apport du synchrotron : Les données de diffusion des rayons X aux petits angles de la protéine PYR1 collectées sur la ligne de lumière BioSAXS ont été essentielles pour identifier la structure du dimère en solution biologiquement pertinent.



[1] Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA. "The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid", Nature 462, 665-668.

Spectroscopie d'absorption de rayons X

La technologie en un coup d'œil

La spectroscopie d'absorption de rayons X donne accès à l'organisation atomique et aux liaisons chimiques autour d'un atome absorbant, et ce quel que soit le milieu dans lequel il se trouve (solide ou liquide). Il y a essentiellement deux types de spectroscopies d'absorption : la spectroscopie sur une gamme étendue d'énergie (EXAFS - "Extended X-ray Absorption Fine Structure") et la spectroscopie au seuil (XANES - "X-ray Absorption Near Edge Structure"). Ces deux techniques permettent de distinguer des éléments dans leur environnement, ce qui rend possible la caractérisation *in situ* des éléments.

Les plus de l'ESRF

L'ESRF offre une série de trois lignes de lumière de spectroscopie d'absorption, chacune optimisée pour différentes applications, permettant ainsi d'étudier une large gamme de matériaux et de détecter de multiples facteurs sous de nombreuses conditions.

- ID24 est idéale pour les processus chimiques rapides et peut être utilisée pour la cartographie rapide d'échantillons hétérogènes *in situ* avec une résolution micrométrique. L'activité principale actuelle d'ID24 est axée sur la catalyse en opération avec un suivi en temps sous la seconde afin de produire des cartographies chimiques à relativement haute définition. Elle est également très bien adaptée pour des études en conditions extrêmes de pression et sous des champs magnétiques en mode pulsé.
- ID26 est une ligne de lumière de spectroscopie rayons X pour les études d'absorption sur des échantillons dilués, tels que les éléments traces extrêmement dilués ou les produits chimiques toxiques. Des informations détaillées sur la structure électronique peuvent être obtenues en utilisant un dispositif haute résolution en énergie. ID26 est équipée pour différents environnements d'échantillons afin de pouvoir réaliser des expériences *in situ*, environnements

“ La spectroscopie d'absorption nous permet de connaître non seulement ce que fait la molécule, mais surtout pourquoi. Nous avons ainsi compris les principes et les évolutions de l'activité moléculaire *in situ*. ”

- Mark Newton and Pieter Glätzel, scientifiques de lignes de lumière.



qui sont adaptés à plusieurs stations expérimentales. Enfin, des logiciels de balayage rapide permettent une collecte de données efficace.

- BM29 est la ligne de lumière de spectroscopie d'absorption de rayons X d'utilisation générale à l'ESRF. Elle offre la spectroscopie d'absorption de rayons X conventionnelle afin de réaliser des expériences qui ne nécessitent pas les spécificités des autres lignes de lumière en absorption. Elle utilise un aimant de courbure à large bande énergétique qui permet d'obtenir des données de haute qualité basées sur des acquisitions rapides de spectres. On obtient ainsi un bon équilibre entre qualité des données et rapidité d'utilisation. Dernièrement, BM29 a entrepris des expériences en

micro-XAS, produisant des résultats surpassant ceux des lignes de lumières équivalentes dans le monde.

Champs d'application

Science de l'environnement : éléments traces, tels que l'identification de concentrations toxiques de métaux lourds, analyse de filtres à pollution, techniques de séparation d'effluents ...

Science de la terre et des planètes : études géologiques, cartographie élémentaire, caractérisation de minéraux.

Médecine et pharmacie : recherche sur les cellules cancéreuses, observation des activités sous-jacentes et moléculaires d'ingrédients actifs et de formules *in situ*.

Automobile et Industrie : étude des composants clés tels que les piles à combustible et les pots catalytiques.

Industrie pétrolière : analyse d'éléments traces dans le pétrole et les produits pétrochimiques.

"Nous venons à l'ESRF car on y trouve des techniques uniques et c'est le seul synchrotron capable de nous préparer des porte-échantillons pour des mesures *in situ*."

- Toyota Motor Europe nv/sa (Belgium)

Nos clients industriels comprennent
Toyota, BASF, Total, Johnson-Matthey,
IFP (Institut Français du Pétrole)

Toyota a étudié des catalyseurs d'échappement automobile en utilisant des techniques de rayons X afin d'examiner la structure de surface du catalyseur et les réactions chimiques qui y ont lieu.

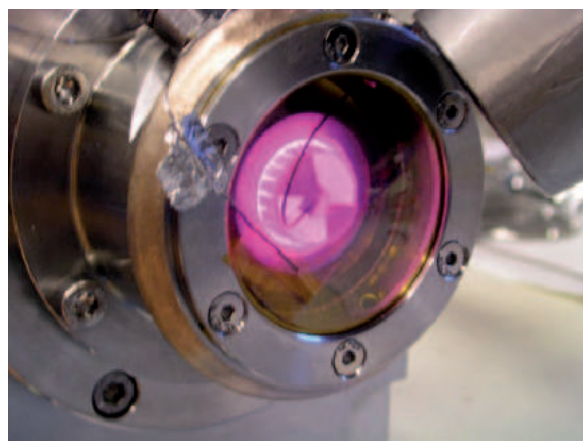
Le défi : Etudier les composants métalliques nobles d'un catalyseur d'échappement d'un véhicule en marche dans des conditions *in situ* et en temps réel.

Le contexte : Un catalyseur à métal supporté est responsable de la majeure partie de l'oxydation du CO et des hydrocarbures non brûlés dans les gaz d'échappement des véhicules. Ces catalyseurs perdent en efficacité avec le temps, en particulier à cause de l'effritement des métaux nobles supportés utilisés par le catalyseur. Toyota voulait étudier les processus d'effritement en détail afin d'améliorer les catalyseurs.

Le résultat : L'analyse des résultats a conduit à la découverte d'un phénomène inattendu : une dispersion oxydative de nanoparticules de Pt sur quelques supports en oxydes de métaux pendant de courts cycles d'oxydation-réduction (~60 secondes). Ce processus de re-dispersion ouvre la voie à un potentiel tangible d'incorporation afin d'étendre

la durée de vie des catalyseurs en réduisant, voire inversant, les effets de l'effritement du métal durant l'opération.

L'apport du synchrotron : En utilisant un porte-échantillon spécialement élaboré pour l'expérience, la spectroscopie d'absorption de rayons X en mode dispersif a permis d'étudier l'environnement local et la structure électronique du site actif du Pt métallique dans des conditions de fonctionnement (hautes températures, cycles d'oxydation-réduction des gaz), en simultané avec des observations TEM *in situ* pour suivre la surface du catalyseur. Des expériences de spectroscopie infrarouge



Chauffage d'un échantillon de catalyseur durant une analyse XAFS *in situ* en temps réel.

et d'EXAFS ont été également réalisées pour étudier les autres composants majeurs du système catalyseur, Rh et Pd. Les spectres ont été enregistrés au millième de seconde.



Microscopie de fluorescence de rayons X

La technologie en un coup d'œil

La microscopie et la micro-spectroscopie de fluorescence de rayons X utilisent des faisceaux de très haute qualité, concentrés sur des zones extrêmement petites de matériaux hétérogènes. Par exemple, l'irradiation d'éléments traces dans des matériaux durs ou organiques permet aux scientifiques de sonder en profondeur la matière et d'en révéler de petites quantités d'une substance donnée dans un grand volume. Cela ouvre la voie à de nouvelles investigations, telles que l'accès à des éléments d'intérêt majeur dans les sciences biologiques et la science des matériaux, l'identification de métaux lourds et la cartographie d'éléments traces, pratiquement sans préparation des échantillons analysés.

Les plus de l'ESRF

L'ESRF possède quatre lignes de lumière (ID13, ID18F, ID21, ID22) dédiées à la microscopie et la micro-spectroscopie. ID22 en particulier est une ligne micro-sonde dans la gamme des rayons X durs axée sur la fluorescence de rayons X, l'absorption et la diffraction à l'échelle micrométrique. Les quatre lignes de lumière offrent des approches différentes qui peuvent être combinées, dont la tomographie en mode de fluorescence, l'imagerie XANES, l'holographie et la microtomographie par contraste de phase, avec une résolution micrométrique. Leur potentiel pour la détection et la cartographie d'éléments traces, l'analyse quantitative de fluorescence, la détermination de l'état chimique précis et l'analyse structurale, est idéal pour une large gamme d'applications industrielles.

“ A quel point nos techniques sont-elles précises pour trouver des éléments traces ? Vous pourriez verser un verre de vin dans une piscine olympique et nous pourrions vous dire s'il s'agissait de Bordeaux ou de Bourgogne. ”

- Jean Susini, Chef de la Division Support et Développement de l'Instrumentation



Champs d'application

Science de l'environnement : des éléments traces, dont l'identification de concentrations toxiques de métaux lourds, l'analyse de filtres à pollution, etc.

Science de la terre et des planètes : analyse de petits échantillons pour étudier la morphologie en masse, les structures internes, la cristallographie et la composition en éléments traces, utilisée par exemple pour étudier les poussières de comète récupérées lors de la mission Stardust de la NASA.

Microélectronique : identification des niveaux de micro contamination dans les microprocesseurs et les circuits intégrés, amélioration des tranches de silicium.

Cosmétiques : connaissance approfondie des interactions entre les substances cosmétiques et les organismes vivants.

Héritage culturel et archéologie : études de chefs-d'œuvre artistiques (Grünewald Triptych, Van Gogh) et d'échantillons de pierres (Pompéi).

Industrie pétrolière : analyse d'éléments traces dans le pétrole et les produits pétrochimiques.

“Notre principale motivation pour venir à l'ESRF est la garantie que nous allons trouver exactement ce que nous recherchons. La ligne de lumière est toujours préparée en fonction de nos besoins et nous avons toujours atteint nos objectifs.”

- Phi-Axis (une petite société de services)

Nos clients industriels comprennent le CEA, Lafarge, L'Oréal, Saint-Gobain

Nanotomographie en mode de fluorescence de rayons X sur des matériaux de la comète 81P/Wild2 récupérée par la mission Stardust de la NASA

Le défi : Déterminer la répartition 3D d'éléments principaux et traces dans une particule de poussière de comète intégrée à une matrice d'aérogel.

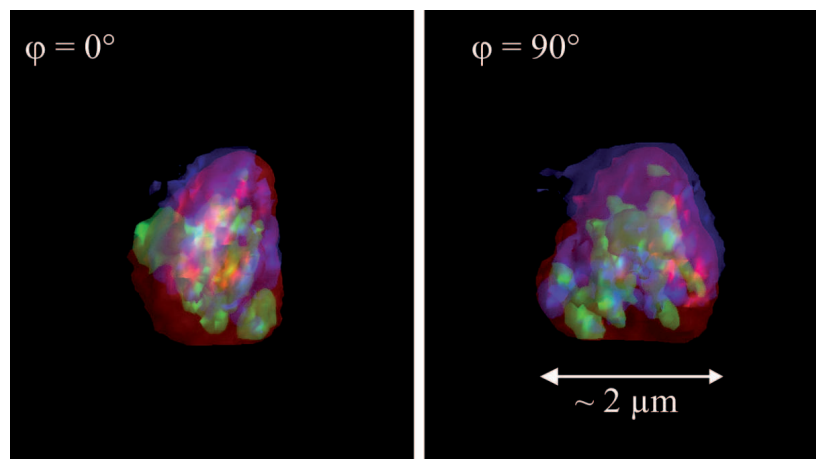
Le contexte : La mission Stardust de la NASA a ramené sur terre des particules de poussière de comètes. Ces particules ont été capturées dans l'espace en utilisant une matrice d'aérogel afin de stopper et piéger les particules de poussière. Les particules capturées ont une taille de 2 micromètres.

Le résultat : Une représentation entièrement en 3D des éléments traces a été réalisée sur une particule, illustrant la répartition des éléments, du calcium au sélénium à une résolution spatiale submicrométrique (200nm).

L'apport du synchrotron : Les techniques d'analyses basées sur l'utilisation des rayons X permettent d'identifier de manière non destructive les éléments chimiques. Les faisceaux de rayons X extrêmement fins disponibles sur la ligne ID13 (le projet phare de l'ESRF pour le développement

de l'utilisation des nano-faisceaux de rayons X) a permis d'enregistrer et de transformer en représentation 3D des images nano-tomographiques de petits échantillons de particules de poussières de comète.

Références : Silversmith et Al. Anal. Chem. (2009). Sous presse.



La reconstruction couleur de la particule de poussière montrant les différents éléments (rouge : fer ; vert : chrome ; bleu : sélénium).

Diffraction de poudre

La technologie d'un coup d'œil

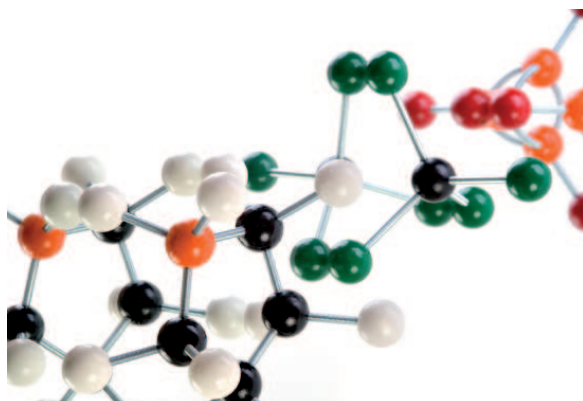
Les solides sont souvent composés de microcristaux qu'il est difficile d'étudier en utilisant les techniques standards de cristal unique. La technique de la diffraction de poudre permet d'analyser des structures de tels matériaux dans une large gamme de conditions, par exemple, pendant la chauffe ou le refroidissement, ou sous diverses conditions atmosphériques. Les positions, les intensités et les formes des pics de diffraction des poudres révèlent des informations concernant la structure microscopique et l'état de contrainte d'un échantillon; elles peuvent être utilisées pour identifier les substances qui sont présentes dans un mélange, même complexe. De telles informations sont cruciales pour comprendre les propriétés et le comportement des matériaux.

Les plus de l'ESRF

A l'ESRF, la ligne de lumière de diffraction de poudre fournit des données très précises même à haute résolution, avec le choix d'une grande variété de longueurs d'onde, ce qui permet d'étudier des matériaux complexes et hautement absorbants. En outre, un changeur d'échantillons automatique permet l'étude d'une série d'échantillons rapidement et efficacement. Enfin, les utilisateurs ont la possibilité de venir à l'ESRF et d'effectuer l'expérience eux-mêmes avec le support du personnel de la ligne ou, pour un petit nombre d'échantillons, peuvent bénéficier de notre service « express ». Il s'agit alors d'envoyer les échantillons à l'ESRF, ce qui élimine donc le besoin de voyager et d'être présent quand les mesures sont réalisées.

“ Nous pouvons voir des choses à l'intérieur de l'échantillon que le client n'imaginait même pas trouver. ”

- Andy Fitch, scientifique responsable d'ID31,
la ligne de lumière de diffraction de poudre à l'ESRF



Champs d'application

Les sociétés pharmaceutiques utilisent régulièrement les techniques de la diffraction de poudre de l'ESRF pour caractériser les composants pharmaceutico-actifs et autres ingrédients faisant partie des formules. Par exemple, pour étudier le polymorphisme et ensuite leur permettre de respecter les exigences réglementaires et protéger leur propriété intellectuelle. **La sidérurgie, l'industrie aérospatiale et automobile, ainsi que d'autres industries métallurgiques** utilisent nos installations afin d'examiner la structure d'alliages, d'effectuer des tests de tension et de fatigue, et de

cette façon d'aider à concevoir des matériaux plus solides et performants. Il y a aussi des applications prometteuses pour étudier des pigments chimiques et les matériaux de haute technologie dans le secteur de l'énergie, par exemple les batteries, le stockage d'hydrogène et les super-conducteurs, ainsi que pour les nano-technologies et autres matériaux liés.

"ID31 me fournit des données d'une qualité que je ne peux obtenir nulle part ailleurs - incomparables !"

- Sanofi-Aventis (Montpellier, France)

"Quand nous venons à l'ESRF, nous sommes toujours satisfaits de l'efficacité de la collecte des données, mais surtout nous apprécions le support technique fantastique que nous recevons ici. Quand nous ne pouvons pas nous déplacer à l'ESRF, nous leur expédions nos échantillons et nous savons qu'ils effectueront des tests d'une manière exhaustive. Dernier point, et pas des moindres, l'ESRF respecte notre propriété intellectuelle. Les sociétés sont vraiment chez elles à l'ESRF et sont libres de développer leurs technologies."

- Formulateur d'un grand groupe pharmaceutique, USA

La diffraction des poudres révèle la structure de cristaux du polymorphe métastable de benzamide.

Le défi : obtenir une structure de cristaux du benzamide métastable, non résolue depuis plus de 170 ans.

Le contexte : La compréhension des influences de facteurs structuraux, thermodynamiques et cinétiques qui contrôlent les processus de cristallisation est importante pour les domaines tels que la pharmacologie, la santé, l'optoélectronique et la chimie fine.

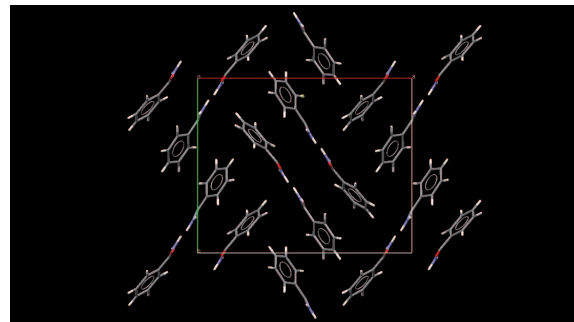
Une Forme II métastable et transitoire de benzamide est connue depuis 1832, mais la structure des cristaux n'avait jamais pu être résolue jusqu'à ce jour.

Le résultat : La structure des cristaux a été résolue à partir des données de diffraction de poudre à haute résolution sur la ligne ID31. De nombreux signaux de diffraction de poudres ont été collectés afin de contrôler la Forme II dans l'échantillon, qui contenait également la Forme I. La structure montre que le polymorphisme provient du désordre d'une des molécules indépendantes de benzamide dans la maille élémentaire, ce qui montre l'équilibre fragile entre la cinétique et la thermodynamique dans l'apparition des polymorphes.

L'apport du synchrotron : Des spectres de diffraction

de poudre à haute résolution collectés rapidement étaient la clé pour résoudre cette structure, avec le contrôle cinétique *in situ* de la température de l'échantillon. La très haute résolution angulaire du diffractomètre d'ID31 a permis d'obtenir des données de haute qualité avec une bonne séparation des pics, ce qui a conduit à la structure finale et détaillée des cristaux.

Références : Blagden et al. *Crystal Growth & Design* 5 (2005), 2218-2224.



La structure de cristaux de la Forme II du benzamide qui montre le dimère moléculaire non centré, a été déterminée à partir des données de diffraction de poudre sur ID31.



Diffusion des rayons X aux petits et grands angles (SAXS et WAXS)

La technologie d'un coup d'œil

La diffusion des rayons X aux petits et grands angles (SAXS et WAXS) utilise la haute brillance d'une source d'ondulateur afin d'étudier des échantillons de matière condensée sous forme liquide ou solide, avec une résolution spatiale submicrométrique et une grande pénétration dans des matériaux tels que les colloïdes, polymères, membranes, surfactants et protéines, même quand ceux-ci sont opaques ou turbides. Les techniques SAXS et WAXS peuvent être combinées avec d'autres techniques, tels que la rhéologie et la diffusion de la lumière, afin de fournir une meilleure compréhension du comportement des échantillons à court terme (sub-milliseconde).

Les plus de l'ESRF

L'ESRF offre une gamme de lignes de lumière et de techniques combinées SAXS et WAXS permettant d'analyser des types variés d'échantillons en obtenant des informations complémentaires. Les lignes de lumière ESRF, et en particulier ID02, offrent les niveaux de brillance les plus élevés, ce qui signifie que même les signaux faibles peuvent être traités efficacement. Pour les applications industrielles, l'ESRF est particulièrement expérimenté dans l'étude du comportement du produit commercial et possède l'expertise pour mettre en place des environnements d'échantillons divers et des processus *in situ* qui simulent les conditions de traitement industriel. L'ESRF fournit à ses utilisateurs industriels non seulement les données brutes, mais offre également un environnement de collaboration, dans le but de produire les résultats directement exploitables.

“ Nos techniques permettent aux chercheurs de visualiser, en conditions réelles, la structure des produits et leurs modes d'interaction. ”

- Narayanan Theyencheri, scientifique responsable d'ID02, la principale ligne de lumière SAXS et WAXS à l'ESRF.



Champs d'application

Des organisations de recherche médicale utilisent les techniques SAXS et WAXS - un exemple est la société Fermiscan (Australie) qui a utilisé la technique de diffraction pour examiner un système expérimental de détection précoce du cancer du sein utilisant des échantillons de cheveux, comme une technique complémentaire à la mammographie. Ils sont entrés dans la Phase III de leurs recherches en Australie, des recherches qui pourraient résulter en une révolution pour la santé des femmes dans le monde.

Des sociétés de cosmétiques ont étudié la diffraction des cheveux afin d'améliorer les après-shampoings.

Des sociétés pharmaceutiques utilisent les techniques SAXS et WAXS pour étudier les principes actifs et les formules, ainsi que leur comportement dans des conditions différentes.

Des fabricants de produits ménagers examinent, par exemple, l'effet des détergents afin de concevoir des produits qui fonctionnent plus efficacement à des températures plus basses tout en utilisant moins d'eau. D'autres sociétés industrielles utilisent l'ESRF, en allant des producteurs de plastiques et de polymères aux fabricants de vestes pare-balles en Kevlar.

"Ce que l'on apprécie le plus à l'ESRF, c'est que c'est un centre de haute technologie, très en vue, où les gens pratiquent la science à son plus haut niveau."
- Procter & Gamble (GB)

"ID02 est la meilleure ligne de lumière que nous ayons utilisée et potentiellement la meilleure disponible pour notre travail. Il est facile de travailler avec le personnel de l'ESRF, ils sont accueillants, communicatifs et soutiennent ce que nous essayons de faire. L'ESRF est vraiment le centre d'excellence en Europe. Notre travail à l'ESRF nous a permis d'établir d'importants contacts qui nous ont aidés, à leur tour, dans notre recherche."
- Fermiscan (Australie)

Les essais cliniques d'un test innovant pour détecter le cancer du sein utilisant une analyse SAXS de cheveux ont été effectués par Fermiscan Pty Ltd (Australie)

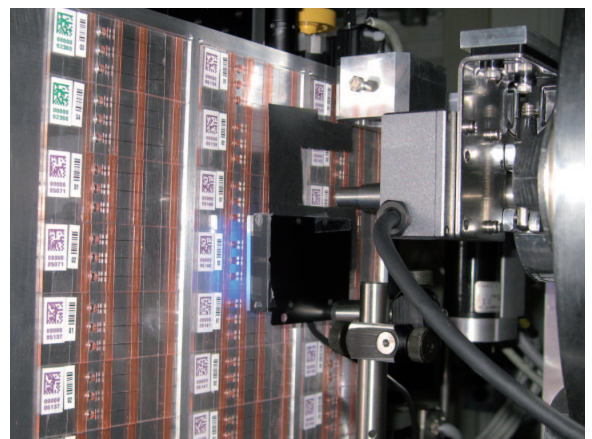
Le défi : Confirmer l'utilisation de SAXS comme outil de détection du cancer du sein.

Le contexte : Une étude de 2008 concernant l'analyse des cheveux utilisant la technique SAXS du synchrotron a confirmé une observation antérieure de l'existence d'une corrélation entre un signal SAXS altéré de cheveux et la présence de la maladie. Des signaux SAXS de cheveux provenant de femmes avec un cancer du sein contiennent un signal qui apparaît sous forme d'anneau à $4,76 \pm 0,07 \text{ nm}$.

Le résultat : Depuis cette étude, Fermiscan a piloté plusieurs essais. En Australie, un essai avec 2000 patientes a démontré une sensibilité (une capacité à détecter un cancer du sein) de 74 % chez les femmes de moins de 70 ans et une valeur de prédiction négative de 99,5 %. Un essai récent avec la Sécurité Sociale d'Italie a démontré une sensibilité de 83 % et une spécificité (une capacité à détecter précisément l'absence de cancer) de 76 %. D'autres essais ont été effectués en France et en Italie.

L'apport du synchrotron : Un système automatisé de

traitement d'échantillons a été développé et installé sur la ligne de lumière ID02 de l'ESRF, ce qui a permis d'analyser 72 échantillons sans intervention. Grâce à la haute brillance d'ID02, l'analyse d'un échantillon ne prenait que quelques secondes. Des développements du système effectués avec le personnel de la ligne ont encore amélioré les capacités du dispositif de mesure des échantillons.



Le porte-échantillon dédié de Fermiscan sur la ligne de lumière ID02 de l'ESRF