



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.

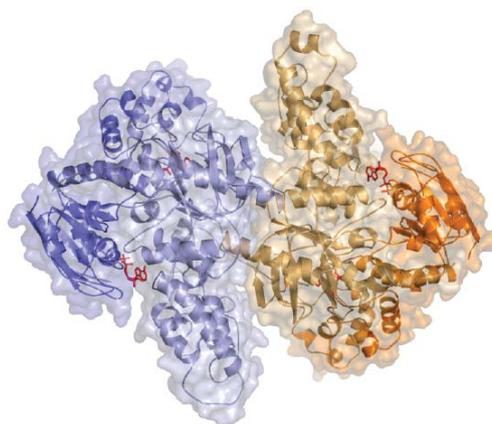
Les plus de l'ESRF

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)

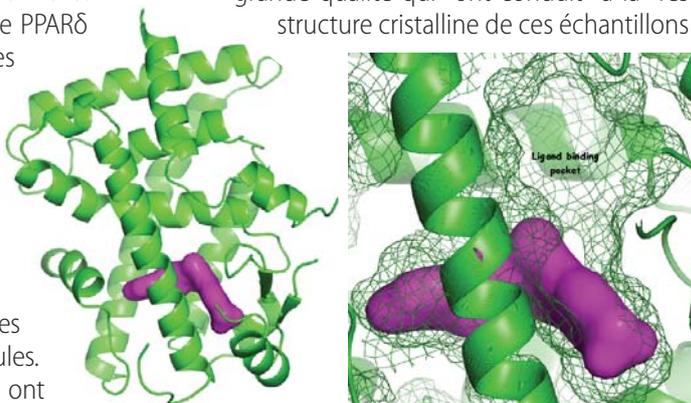
Sanofi-Aventis a utilisé le service MXpress pour la collecte de données sur des cristaux de protéine PPAR δ impliquée dans le diabète.

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.

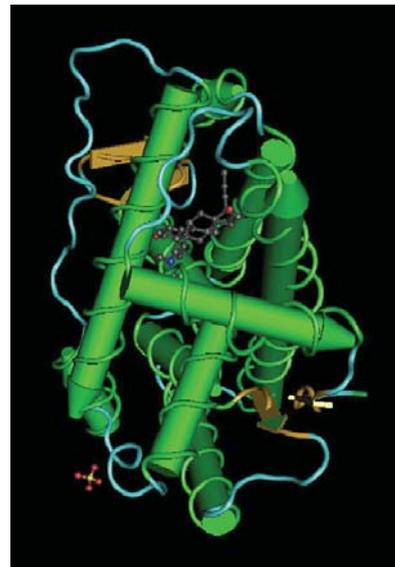
Le défi : Obtenir un modèle du récepteur de la progestérone en complexe avec la mifépristone dans le but de mieux comprendre le fonctionnement et la spécificité de son site actif.

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.

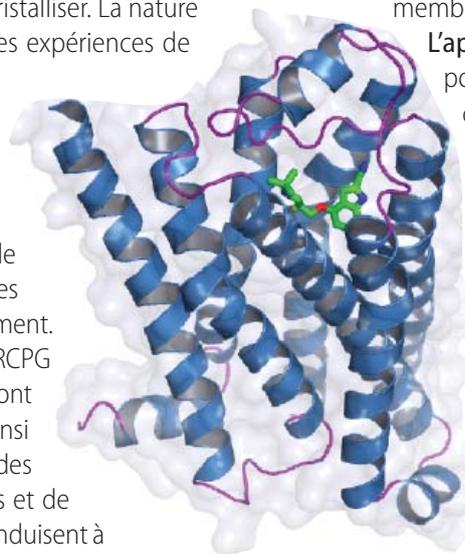
Le défi : Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont des protéines typiquement instables et de fait très difficiles à purifier et à cristalliser. La nature fragile des cristaux obtenus rend les expériences de diffraction très difficiles.

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.