Texte de la 229e conférence de l'Université de tous les savoirs donnée le 16 août 2000.

Utilisation des rayons x (rayonnement synchrotron) pour l'analyse de la matière

par Yves Petroff

AVANT PROPOS

Les rayons X ont été découverts à la fin du XIXe siècle par Wilhelm Conrad Röntgen, qui obtint pour la première fois la radiographie d'une main. En quelques semaines, l'expérience fut reproduite dans des centaines de laboratoires à travers le monde. Les tubes à rayons X étaient faciles à construire et peu coûteux : on en installa des centaines, y compris dans les foires et chez les marchands de chaussures. Il fallut attendre plusieurs années avant que l'on ne se rende compte de certains effets néfastes. Pendant quelque temps, les applications des rayons X furent essentiellement médicales, qu'il s'agisse d'imagerie ou de thérapie. Quant à leur origine, durant toute cette période, elle demeura fort controversée.

En 1912, Max von Laue prédit que les rayons X devraient être diffractés par des cristaux. Grâce à ce procédé, il devenait en effet possible d'obtenir la position des atomes dans les solides, donc d'en décrire la structure. La première structure résolue fut celle du chlorure de sodium par Sir William Henry Bragg et son fils.

La fin des années 40 fut marquée par trois événements importants :

- On observa pour la première fois le rayonnement émis par des électrons relativistes (dont la vitesse est proche de celle de la lumière), accélérés au moyen de champs magnétiques dans des machines (synchrotrons) construites pour l'étude de la physique des particules élémentaires. Ce rayonnement fut appelé rayonnement synchrotron.

- À peu près à la même époque, on commença à observer les rayons X provenant de l'espace, grâce à des expériences faites à bord de fusées au-dessus de l'atmosphère terrestre. L'information arrivant du cosmos provient des ondes électromagnétiques émises, réfléchies ou diffusées par les corps célestes. Malheureusement, l'atmosphère qui règne autour de la Terre arrête la plus grande partie de ces rayonnements sauf la partie visible du spectre (0,7-0,4 µm), l'infrarouge ainsi que les ondes radio (de quelques millimètres à 15m). L'astrophysique X est donc une science récente, qui a dû attendre l'avènement des fusées et des satellites pour se développer ; en effet, la détection des rayons X ne peut se faire qu'à 100 km au-dessus de la surface de la Terre. La première mesure fut faite en 1949, par le groupe de H. Friedman, du *Naval Research Laboratory* de Washington, à bord d'une fusée V2 récupérée à la fin de la Seconde Guerre mondiale. L'émission détectée par Friedman se révéla très faible et cela découragea de nombreux scientifiques. R. Giaconni décida de persévérer dans cette voie et, après deux tentatives malheureuses, obtint des résultats remarquables qui ouvrirent l'ère moderne de l'astrophysique X. Dans les années qui suivirent, de nombreuses sources X intenses furent découvertes : Taurus X-1 dans la nébuleuse du Crabe, Cygnus X-1 ainsi que les premières sources extragalactiques (M87, Centaurus A, 3C273 …). Depuis le premier satellite d'étude des rayons X (*Uhuru*, lancé en 1970), une nouvelle mission a lieu tous les trois ou quatre ans. La moisson au cours de ces années a été extraordinairement riche puisque le satellite *Rosat* a répertorié plus de cent vingt mille sources de rayonnement X ! Tous ces résultats donnèrent lieu à un foisonnement de travaux théoriques. Les sources de rayons X dans le cosmos peuvent avoir des origines variées. Il peut s'agir de sources thermiques (gaz ou matière portés à des températures élevées). On sait que tout objet chauffé émet des ondes électromagnétiques. Le Soleil, qui a une température de 5000 à 6000 K à la surface, émet dans le visible ; mais la couronne solaire (10^6K à 10^7K) est également une source intense de rayons X. Cela peut être aussi du rayonnement synchrotron, du *bremsstrahlung* ou des transitions atomiques des éléments.

- Enfin, on commença à déterminer, grâce aux rayonnements X, les premières structures de protéines, systèmes biologiques complexes formés de plusieurs dizaines de milliers d'atomes.

RAYONNEMENT SYNCHROTRON

On appelle rayonnement synchrotron l'émission d'ondes électromagnétiques (donc de rayons X) par des particules chargées accélérées à des vitesses voisines de celle de la lumière. Les propriétés de ce rayonnement ont été calculées pour la première fois en 1944 en Union soviétique et indépendamment aux Etats-Unis en 1945. Il a été observé pour la première fois dans le visible sur une petite machine de 70 MeV au laboratoire de la General Electric en 1947.

Lorsqu'une particule chargée (un électron, un positron ou un proton) est accélérée ou décélérée, elle émet des ondes électromagnétiques. Ce mécanisme existe dans le cosmos (nébuleuse du Crabe, ceintures de Jupiter) ou bien sur terre dans des accélérateurs circulaires (appelés souvent anneaux de stockage) construits pour l'étude de la physique des particules.

Les premiers machines avaient des circonférences de quelques mètres et des énergies de quelques millions d'électronvolts (MeV). Le collisionneur actuel du Conseil Européen pour la Recherche Nucléaire (CERN), le LEP, a 27 km de circonférence et l'énergie des électrons et des positrons y est de 50 milliards d'électronvolts (GeV).

Dans de telles machines, le rayonnement synchrotron est produit lorsque les électrons sont accélérés par des aimants dipolaires, qui permettent aux électrons d'avoir une trajectoire circulaire. L'énergie des électrons dépend du domaine spectral que l'on veut obtenir : pour travailler dans l'ultraviolet et les rayons X mous (100 eV-300 eV) une énergie d'électrons entre 800 MeV et 1,5 GeV est suffisante. Si on a besoin de rayons X durs (10-150 keV), l'énergie des électrons doit atteindre 6 GeV. Il est évident que la taille de l'anneau dépend fortement de l'énergie des électrons : une machine de 1 à 2 GeV aura 100 à 250m de circonférence, une machine de 6 à 8 GeV, 850 à 1400 m.

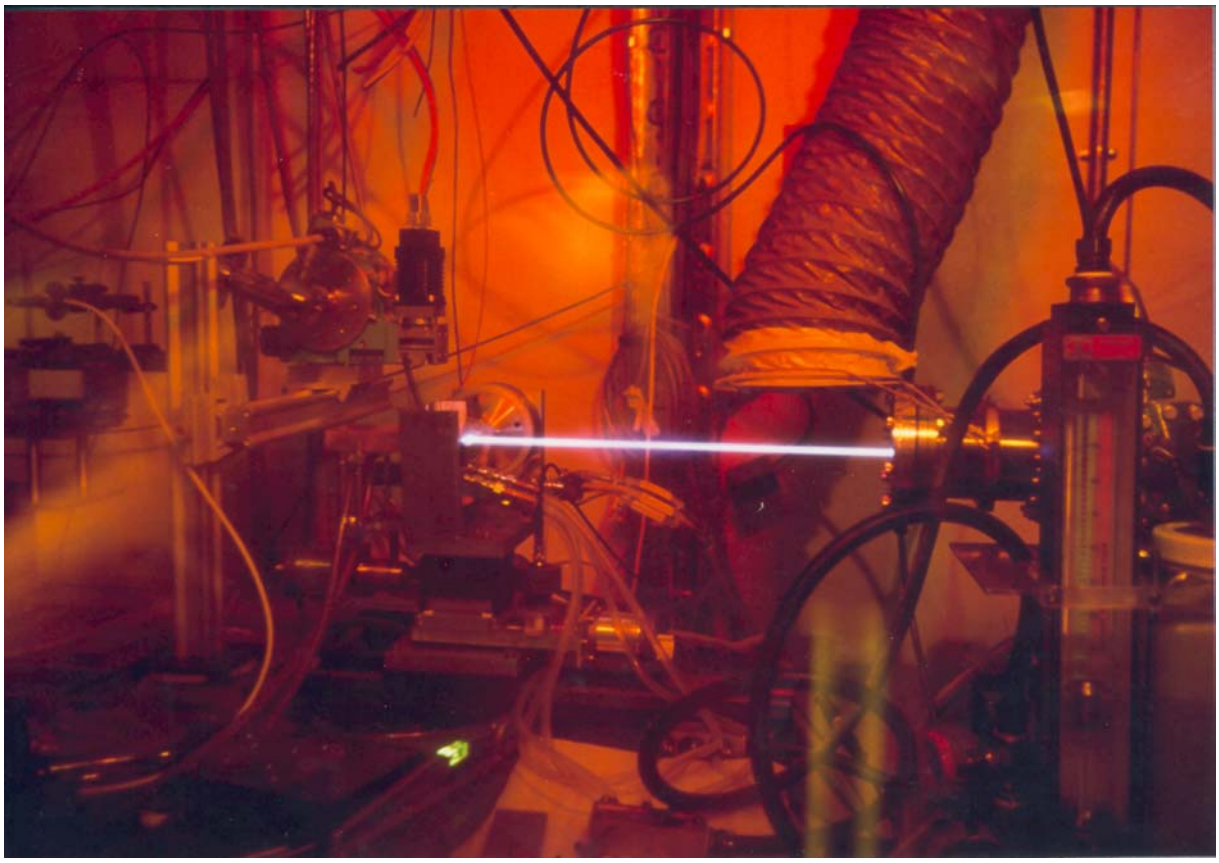
Découvert en 1947, le rayonnement synchrotron mit plus de vingt ans avant d'être réellement exploité en tant que source de rayons X en URSS, au Japon, aux Etats-Unis, en Italie, en France, en Allemagne et en Grande-Bretagne. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la communauté scientifique est très conservatrice !

Les machines de la première génération avaient été élaborées pour l'étude de la physique des particules et on y avait installé en parasite quelques expériences servant à extraire les rayons X et l'ultraviolet.

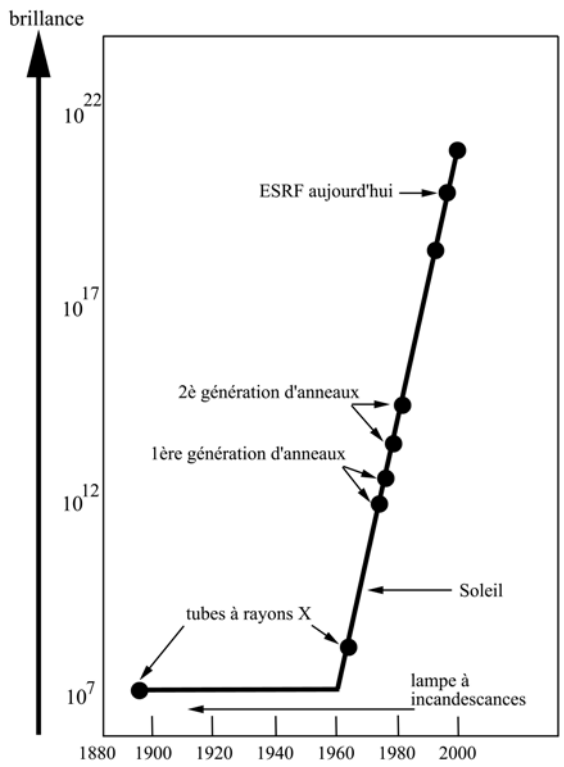
Par la suite, c'est-à-dire dans les années 80, des machines de la deuxième génération furent construites uniquement pour l'exploitation du rayonnement synchrotron. On s'aperçut alors que l'on pouvait gagner des facteurs mille ou dix mille en intensité de rayons X en installant des structures magnétiques appelées éléments d'insertion (on onduleurs), en général de 3 ou 4 m de long, et le plus souvent constitués d'aimants permanents.

La troisième génération de sources de rayonnement synchrotron est fondée essentiellement sur ces éléments d'insertion.

Le rayonnement émis dans ces machines est polychromatique et va des ondes millimétriques aux rayons X durs. Avec des éléments d'insertion, il est émis dans un cône extrêmement étroit, assez voisin de celui d'un laser. Dans une machine de 6 GeV, la divergence des rayons X est très faible (de l'ordre de 0,1 milliradian), aussi faible que celle d'un rayon laser [voir figure 1]. Le rayonnement est pulsé, puisque les électrons sont groupés en paquets de quelques centimètres, ce qui donne des « bouffées » régulières de 50 à 200 picosecondes (ps) suivant la machine.



La brillance est le facteur essentiel qui caractérise la qualité optique de la source. Elle peut être dix milliards de fois supérieure à celle d'un tube à rayons X. Depuis le début du siècle, la brillance des sources de rayons X a beaucoup évolué (cf. figure 2). Pendant une cinquantaine d'années, elle est restée constante. Le rayonnement synchrotron lui a fait gagner un facteur 10^{10} (10 milliards) en trente ans. C'est une phénomène assez rare ; le seul exemple équivalent est celui du laser dans le domaine visible.



Du fait de ces propriétés exceptionnelles, et de la possibilité de réaliser une cinquantaine d'expériences autour d'un anneau de stockage, le rayonnement synchrotron, d'abord considéré comme une nuisance, aujourd'hui la source la plus intense de rayons X, est devenu très vite un outil indispensable pour la chimie, la biologie, la physique du solide, la physique des surfaces, la physique atomique et moléculaire.

Il existe aujourd'hui une cinquantaine de centres dans le monde produisant du rayonnement synchrotron.

QUELQUES EXEMPLES DE NOUVELLES POSSIBILITES OFFERTES PAR LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

Imagerie X

Lorsque l'on examine une radiographie du corps humain, on s'aperçoit immédiatement que l'on distingue parfaitement les os mais pas les tissus mous. La raison en est que, les os mis à part, l'eau représente 65 % du corps. L'eau, constituée d'éléments légers, l'hydrogène et l'oxygène absorbe peu les rayons X. Les os en revanche, constitués essentiellement de calcium, les absorbent fortement.

Les images en rayons X sont donc obtenues par contraste d'absorption. C'est ainsi que, si on veut visualiser les tissus mous, on doit y injecter un élément plus lourd ; par exemple, si on veut regarder les artères coronaires, on injecte dans le sang de l'iode. Existe-t-il des possibilités de voir les tissus mous, c'est-à-dire en général les objets absorbant peu les rayons X ? La réponse est oui, mais avec d'autres techniques réalisées dans le visible avec le laser, et assez voisines de l'holographie. Le problème pour élargir ces techniques aux rayons X vient du fait qu'elles nécessitent un rayonnement cohérent comme celui émis par un laser : en effet, la lumière émise par un laser possède de la cohérence spatiale, c'est-à-dire qu'elle diverge très peu, et de la cohérence temporelle, c'est-à-dire qu'elle est monochromatique. Or, il n'existe pas aujourd'hui de laser dans le domaine des rayons X.

Nous avons vu que la lumière émise par un élément d'insertion avait une divergence (cohérence spatiale) de l'ordre de 10^{-4} radian, assez voisine de celle d'un petit laser. La monochromatisation est facile à obtenir en mettant sur le trajet du faisceau un monochromateur. On obtient ainsi artificiellement de la lumière cohérente dans le domaine des rayons X. On pourrait, certes, faire de même avec un tube à rayons X et un monochromateur, mais le nombre de photons qui en jaillirait serait très faible et peu exploitable.

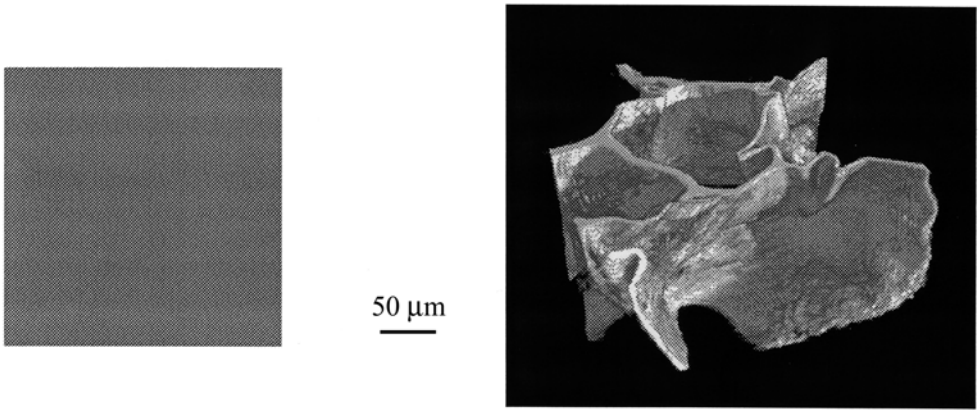
Ces nouvelles possibilités ouvrent la voie vers de nombreuses applications en métallurgie et en médecine.

L'exemple que nous allons décrire a été obtenu récemment à l'ESRF (Grenoble) par P. Cloetens et al [1].

Jusqu'à très récemment, les images en rayons X étaient obtenues par contraste d'absorption. En fait, si on a la chance d'avoir des rayons X cohérents on peut produire des images par contraste de phase. Ceci est particulièrement intéressant lorsqu'il s'agit de matériaux composés d'éléments légers (hydrogène, oxygène, carbone) qui absorbent très peu les rayons X. Nous avons représenté dans la figure 3 deux images d'une mousse de polystyrène obtenues dans des conditions différentes :

a) une image obtenue à 18 KeV, en plaçant le détecteur à 10 cm de l'objet. On n'exploite pas la cohérence et on a image normale en absorption et donc on ne voit rien puisque l'absorption est très faible

b) on va obtenir des images en déplaçant le détecteur à des distances variables entre 10 cm et 100 cm de l'objet. Les interférences entres les faisceaux directes et les faisceaux réfractés par l'objet permettent de reconstruire une image à trois dimensions avec une résolution de l'ordre de 1 μm. Cette holotomographie a été obtenue à partir de 700 images et ceci peut être fait en une heure. L'exploitation de la cohérence et une véritable révolution dans le domaine de l'imagerie X.



Expériences de rayons X sous haute pression

Les rayons X permettent également de tester les modèles de l'intérieur de la terre. Grâce à leur aide, la structure des matériaux à très haute pression peut être révélée. Par très hautes pressions, nous entendons des pressions supérieures à 100 gigapascals [GPa] (approximativement un million d'atmosphères). Ces pressions sont celles qui règnent à l'intérieur de la Terre, mais aussi dans les planètes telle que Jupiter. Reproduire ces pressions en laboratoire est donc important pour la géophysique, l'astrophysique, la science des matériaux.

En effet, l'augmentation de la pression change considérablement l'interaction entre atomes, donc les propriétés chimiques et physiques. Elle permet aussi de vérifier la validité des modèles théoriques de la matière condensée.

Comment obtient-on des pressions aussi élevées ? D'une manière relativement simple : la pression étant une force appliquée sur une surface, pour l'augmenter, soit on accroît la force, soit on diminue la surface. C'est cette seconde possibilité que l'on exploite en général : l'échantillon à étudier est placé dans un trou aménagé dans un joint métallique et comprimé entre les pointes de deux diamants. Il s'agit de petits diamants de 0,1 à 0,4 carat (1 carat = 0,2g). Pour obtenir des pressions de l'ordre de 300 GPa, le diamètre de l'échantillon ne doit pas dépasser 20 µm, ce qui veut dire que le faisceau de rayons X pour sonder l'échantillon ne devra pas dépasser 10 µm. Les cellules sont faites en diamant à cause de la dureté de ce matériau mais aussi parce qu'il est transparent aux rayons X. Si on a besoin de chauffer le matériau, on le fait en focalisant un laser infrarouge au centre de la cellule ou par un chauffage électrique.

À basse pression, l'hydrogène cristallise dans une structure hexagonale compacte donnant lieu à un solide moléculaire isolant, les molécules d'hydrogène étant orientées au hasard. La théorie prévoit depuis longtemps qu'à haute pression, entre 100 et 300 GPa, l'hydrogène devrait présenter une phase métallique atomique dans laquelle les molécules ont cessé d'exister. Cet hydrogène métallique devrait avoir des propriétés inhabituelles : il devrait en particulier être supraconducteur (c'est-à-dire avoir une résistivité nulle) à la température ambiante.

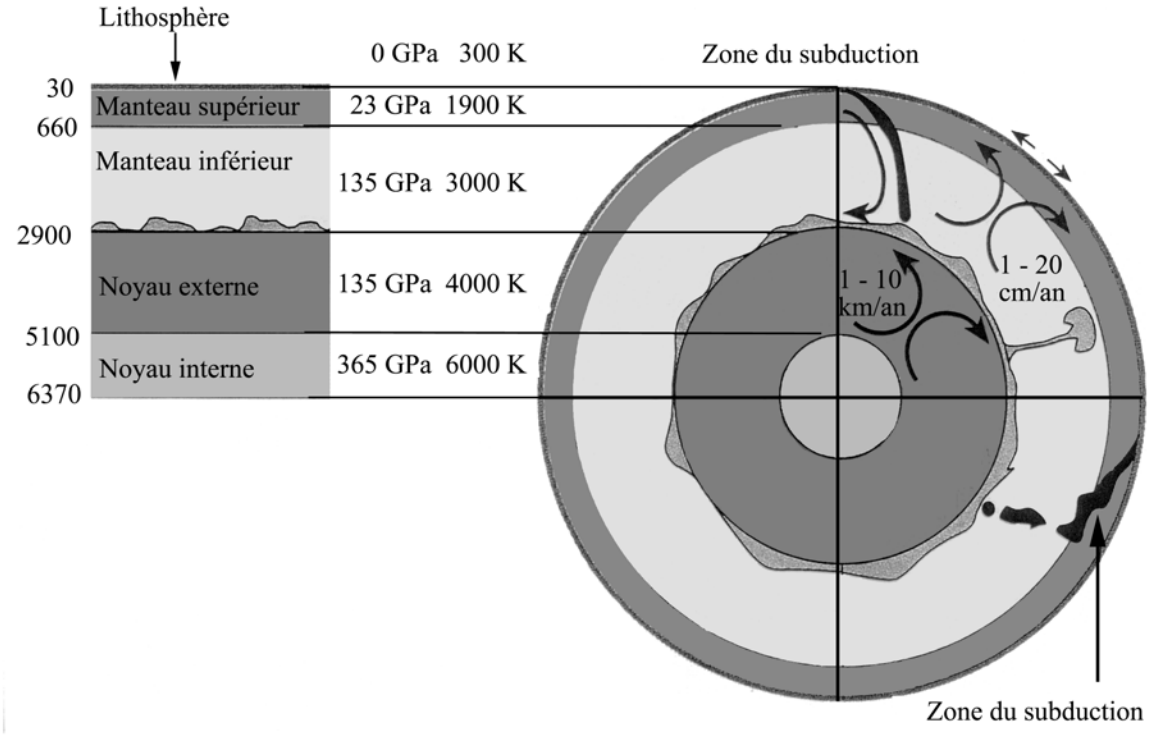
Il est donc important de voir s'il y a des changements de structure cristalline et d'étudier la variation du volume en fonction de la pression. Ces expériences sont très difficiles pour plusieurs raisons : d'une part, l'intensité diffractée dans une expérience de rayons X varie comme le carré du nombre d'électrons ; l'hydrogène n'en a qu'un, donc jusqu'à très récemment il était impossible d'observer les raies de diffraction de l'hydrogène. D'autre part, l'hydrogène diffuse dans la plupart des matériaux. Enfin, au-delà de 35 GPa, les monocristaux d'hydrogène se fragmentent, ce qui diminue l'intensité du signal de plusieurs ordres de grandeur.

Récemment, une équipe franco-américaine [2] a réussi à faire des mesures sur des pressions atteignant 120 GPa grâce à une astuce qui permet d'éviter la fragmentation. Pour cela, on fait pousser un cristal d'hydrogène au centre d'un cristal d'hélium. A haute pression, l'hydrogène et l'hélium ne sont pas miscibles et l'hélium sert de coussin hydrostatique. Cela a permis de mesurer la variation du volume en fonction de la pression : le résultat le plus notable est que l'on observe pas la phase métallique prévue par la théorie.

Actuellement, on pense que 88% de Jupiter est formé d'hydrogène métallique. une première couche de 17 500 km est composée d'hydrogène moléculaire isolant, le reste est de l'hydrogène métallique, excepté le petit noyau central. Malheureusement, le champ magnétique de Jupiter calculé à partir de ce modèle est beaucoup plus faible que celui mesuré par une sonde envoyée il y a quelques années. Le champ magnétique de Jupiter est le plus fort de toutes les planètes et il repousse le vent de particules chargées provenant du Soleil jusqu'à cent fois son rayon (contre dix pour la Terre).

La Terre, elle, s'est formée il y a environ 4,5 milliards d'années, lorsque les objets orbitant autour du Soleil en formation entrèrent en collision et s'agrégèrent. Au fur et à mesure, la gravitation força les éléments les plus lourds à migrer vers le centre de la Terre. Depuis sa surface jusqu'au cœur, elle est formée de couches concentriques de compositions et des propriétés chimiques très différentes. La lithosphère, la couche externe de la croûte terrestre, est constituée de plaques qui se déplacent les unes par rapport aux autres à raison de plusieurs centimètres par an. Les plaques océaniques sont recouvertes d'une croûte de 7 km d'épaisseur. Froides et plus denses que la couche inférieure (le manteau), elles ont tendance à

s'enfoncer dans celui-ci à des endroits appelés zones de subduction. Les plaques continentales, plus épaisses, ne sont pas sujettes à ce phénomène. Aux frontières des plaques, il existe des zones volcaniques et des tremblements de terre. Le manteau supérieur est situé entre la lithosphère et le manteau inférieur. Son épaisseur est de l'ordre de 600 km. A 660 km à l'intérieur de la Terre, la température est de l'ordre de 1 900 K et la pression de 23 GPa. Le manteau inférieur s'étend entre 660 et 2 900 km. Il est essentiellement formé d'oxydes de fer et de magnésium ainsi que de silicates. A 2 900 km la température atteint 3 000 K et la pression est de 135 Gpa (voir figure 4). Entre 2 900 et 5 100 km se trouve le cœur extérieur, composé d'un alliage liquide fer-nickel avec 10 % d'impuretés (hydrogène, soufre, carbone, oxygène, silicium …). Cet alliage liquide est un fluide qui se déplace de 1 km/an et est sujet à des courants électriques: par un effet dynamo, il est responsable du champ magnétique terrestre. En étudiant des roches magnétiques dont on peut mesurer avec précision l'âge, on s'est aperçu que la direction du champ magnétique terrestre avait changé de nombreuses fois depuis la création de la Terre (avec une période de quelques millions d'années). L'interface cœur liquide-manteau inférieur solide joue un rôle particulièrement important à cause des discontinuités des propriétés chimiques et physiques à cet endroit. Entre 5 100 et 6 400 km se trouve le cœur constitué de fer solide. Au centre de la Terre –6 400 km) la pression atteint 360 GPa et la température avoisine 6 000 K [3].



D'où proviennent les information sur cette composition et ces paramètres ? Essentiellement d'une seule technique : l'étude des ondes sismiques. Les ondes élastiques créées par des tremblements de terre traversent la planète avec des vitesses qui varient selon la densité, la pression et le module élastique des matériaux. Les tremblements de terre produisent des ondes longitudinales (compression) et des ondes transverses (cisaillement). Ces derniers ne se propagent pas dans les solides. Des détecteurs installés tout autour de la Terre permettent de mesurer les ondes réfléchies ou diffusées et d'obtenir le modèle actuel.

A quoi peuvent servir les rayons X ? A tester ce modèle : pour cela, on reconstitue en laboratoire les conditions de pression et de température qui règnent dans les différentes

couches de la Terre sur les mêmes matériaux. Avec des rayons X, on peut étudier la structure des matériaux et les changements de phase.

Toutefois, on ne peut pas aujourd'hui reproduire en laboratoire les conditions qui règnent au centre de la Terre (6 400 K et 360 GPa). Par contre, on a pu atteindre pour la première fois récemment 304 GPa ([5] et 1 300 K sur un échantillon de fer et étudier la structure hexagonale observée dans ces conditions. Ceci correspond à des conditions assez voisines de l'interface fer liquide-fer solide et permet de tester avec précision des modèles de l'intérieur de la Terre [5].

Détermination de Structures Biologiques

Le but de la biologie moléculaire est de comprendre les processus biologiques à partir des propriétés chimiques et physiques des macromolécules. Nous allons voir que cela nécessite la connaissance de la structure atomique à trois dimensions de ces macromolécules, ce qui n'est pas surprenant puisqu'on sait qu'en changeant la structure d'un semi-conducteur ou d'un métal (en faisant varier par exemple la température ou la pression), on change aussi ses propriétés chimiques et physiques.

Pourtant, il existe une différence fondamentale entre l'inerte et le vivant : la cellule élémentaire du silicium comporte quelques atomes, celle d'un virus plusieurs millions ! Seule la diffraction des rayons X permet de déterminer des structures aussi compliquées, et encore, à condition d'employer du rayonnement synchrotron.

Comme chaque cellule contient des millions de protéines, qui interagissent d'une manière complexe, la compréhension du fonctionnement de la cellule vivante est devenue l'un des défis majeurs de la science moderne.

La détermination de la structure des macromolécules biologiques (protéines, ribosomes, virus…) est facilitée par le fait qu'elles sont formées de séquences de sous-ensembles de petite dimension (quelques atomes) que sont les acides aminés pour les protéines et les nucléotides pour l'ADN.

Les premiers clichés de diffraction X de protéines furent obtenus à Cambridge en 1934 par le physicien anglais J.D. Bernal. Il a fallu attendre plus de vingt ans avant de pouvoir les interpréter et remonter à la structure même de ces protéines. La découverte de la structure de l'ADN en 1953 par Francis Crick et James Watson par ce procédé – et toujours à Cambridge ! – est considérée comme le point de départ de la biologie moléculaire.

<u>Les acides aminés et les protéines</u>

Les acides aminés sont les constituants fondamentaux des protéines : seuls vingt acides aminés sont utilisés par le vivant. Ils ont tous en commun un atome central de carbone $C\alpha$ auquel est attaché un atome d'hydrogène H, un groupe aminé NH_2 (N = azote), un groupe COOH, appelé groupe carboxyle, et enfin une chaîne latérale considérée comme un radical, et appelée R, différente pour chaque acide aminé et spécifiée par le code génétique.

Les acides aminés forment des chaînes grâce à des liaisons peptidiques, dont la formation requiert l'élimination de molécules d'eau : un peptide comporte quelques acides aminés, un polypeptide peut atteindre cent cinquante acides aminés.

Les chaînes sont appelées « structures primaires de protéines ». Au-delà de la structure primaire, les chaînes forment, grâce aux liaisons hydrogène entre certains acides aminés, soit des hélices α soit des feuillets β. La structure d'hélice α fut décrite en 1951 par Linus Pauling qui montra qu'elle devait être un élément de base des protéines. Cela fut vérifié quelques années plus tard par Max Ferdinand Perutz, qui découvrit la structure de l'hémoglobine, et

John Cowdery Kendrew en 1958 celle de la myoglobine, ce qui leur valut en 1962 le prix Nobel.

Mais ce n'est pas tout ! La protéine va encore changer de forme. Sous l'effet de paramètres divers dont certains demeurent encore inconnus, les feuillets β et les hélices α peuvent se replier pour former des amas globulaires : c'est la structure ternaire. L'eau joue un rôle très important dans ce repliement : en effet, les chaînes latérales hydrophobes sont tournées vers l'intérieur, créant un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. C'est une des caractéristiques des protéines mises en évidence par Kendrew au cours de la détermination de la structure de la myoglobine. Finalement, l'association de plusieurs chaînes polypeptiques par des liaisons faibles about it à la structure quaternaire : celle-ci se compose donc d'un assemblage de structures ternaires [6].

Certaines protéines ne contiennent que des hélices α : c'est le cas par exemple des globines. D'autres sont constituées uniquement de feuillets : les enzymes (qui sont des protéines servant comme catalyseurs), les anticorps ou bien les protéines qui entourent les virus. Toutefois, de nombreuses protéines comprennent aussi bien des hélices que des feuillets.

La myoglobine et l'hémoglobine ont une importance capitale pour l'organisme : elles permettent respectivement le stockage et le transport de l'oxygène dans les muscles et le sang. Les structures des globines furent les premières structures de protéines découvertes grâce aux rayons X.

Les nucléotides et les acides nucléiques

Deux acides nucléiques jouent un rôle fondamental : l'ADN et l'ARN. L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le constituant principal des chromosomes et le support de l'hérédité, l'acide ribonucléique (ARN) possède de nombreuses variantes et se définit comme le messager entre les gènes et les sites de synthèse des protéines.

Les acides nucléiques sont formés à partir de quelques nucléotides. Ces derniers sont constitués d'un sucre, d'une base et d'un groupe phosphate. Le sucre est soit un ribose (dans le cas de l'ARN), soit un désoxyribose (pour l'ADN).

Comme nous l'avons vu dans le cas des protéines, il existe aussi des structures primaires, secondaires et ternaires pour les nucléotides.

La structure primaire est une chaîne de nucléotides (polynucléotide). La structure secondaire est la fameuse double hélice de Watson et Crick : elle est formée de deux chaînes polynucléotiques qui s'enroulent autour d'un axe commun. Elles sont unies par des liaisons hydrogène qui existent entre les paires de bases. L'adénine (A) ne se couple qu'avec la thymine (T) par deux liaisons hydrogène ; la guanine (G) se liant avec la cytosine (C) par trois liaisons hydrogène.

C'est la séquence précise des bases dans l'ADN qui détermine l'information génétique : les différents tronçons de cette double hélice forment les gènes.

L'ADN se comporte comme un programme d'informatique qui indique à la cellule ce qu'elle doit faire.

Détermination de la structure des macromolécules

Pourquoi a-t-on besoin de connaître la structure des macromolécules ? Tout simplement parce que l'on sait aujourd'hui qu'il existe une relation entre la fonction biologique d'une macromolécule et la forme qu'elle prend dans un espace à trois dimensions : la connaissance de la structure d'un virus permet la mise au point de médicaments antiviraux : celle de la structure du ribosome est utile à la création de nouveaux antibiotiques, qui

servirons à attaquer l'appareil génétique de la bactérie ; enfin, la connaissance de la structure du nucléosome permettra un meilleur contrôle des gènes et une plus grande efficacité du génie génétique.

Pour que cette observation soit possible, deux méthodes sont disponibles. La première est la résonance magnétique nucléaire (RMN) dans le détail de laquelle nous ne pouvons entrer ici. L'avantage de la RMN vient du fait qu'elle donne des résultats en phase liquide *(in vivo)* : elle ne nécessite pas l'obtention de cristaux. Mais elle ne peut résoudre que des structures ayant un poids moléculaire peu élevé (30 000 daltons[1]).

La diffraction des rayons X est la seconde méthode, et de loin la plus utilisée. les résolutioins obtenues varient entre 1,5 et 3 Å. Elle présente l'inconvénient de nécessiter des monocristaux. La première question que l'on peut se poser et qui a fait l'objet de nombreuses controverses au début de la cristallographie des protéines est de savoir si les macromolécules conservent leurs fonctions biologiques dans la phase cristalline. La réponse est clairement positive et cela a été démonté en particulier pour les enzymes.

Une des difficultés provient du fait qu'il est très difficile de faire « pousser » des monocristaux de grandes dimensions: de plus, durant les mesures, ils doivent rester en contact avec la solution qui a servi à les faire pousser.

Au début de la cristallographie de molécules biologiques, il fallait plusieurs années pour découvrir la structure d'une protéine. Aujourd'hui, quelques heures ou quelques jours suffisent pour les cas les plus simples.

De nombreuses structures de protéines sont d'abord étudiées avec des tubes à rayons X pour « dégrossir ». Mais pour obtenir des structures à très haute résolution, pour déterminer la structure des ensembles de grandes dimensions tels que le ribosome et les virus, on doit impérativement utiliser le rayonnement synchrotron. En 1996, 70% des structures découvertes l'ont été par rayonnement synchrotron.

La cristallographie des molécules biologiques

Nous avons vu comment se forment les protéines et les virus. Nous allons aborder maintenant plusieurs exemples d'expériences qui ne pouvaient être réalisées il y a quelques années : la première consiste à étudier les modifications de la structure d'une protéine à l'échelle de quelques milliardièmes de seconde pendant une réaction biologique, la seconde est la découverte de la structure d'un virus dont la cellule unitaire contient plusieurs millions d'atomes et les deux dernières concernent des ensembles de grandes dimensions, le nucléosome et le ribosome.

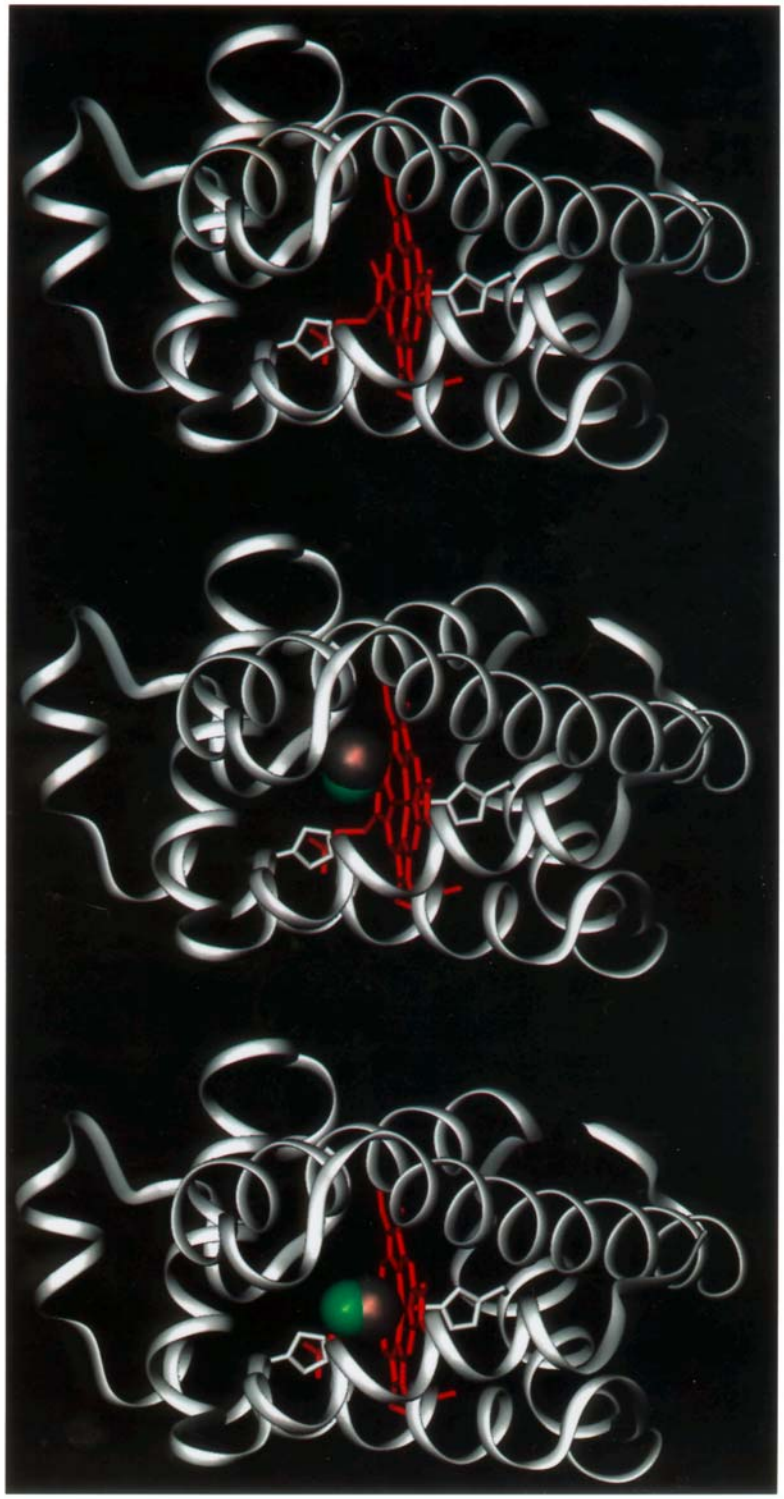
Pourquoi est-il important de réaliser des expériences résolues en un milliardième de seconde ? Parce que les molécules biologiques subissent des changements structuraux extrêmement rapides pendant qu'elles assument leur fonction biologique.

On sait que la myoglobine, une protéine que l'on trouve dans les muscles, emmagasine l'oxygène pour le convertir en énergie. Comme nous l'avons vu plus haut, l'oxygène se fixe sur le fer. Lorsque Kendrew résolut la structure de la myoglobine en 1960, il se posa immédiatement la question de savoir comment la molécule d'oxygène pouvait entrer ou sortir de la myoglobine, étant donné la compacité de sa structure. sa conclusion fut que ladite structure ne pouvait être statique ; dynamique, elle « respire » grâce à des canaux qui s'ouvrent et se ferment pour permettre l'accès à l'hème. Quels sont ces canaux ? Quelle est la vitesse à laquelle la protéine répond à la dissociation de l'oxygène du fer ? On a aujourd'hui un début de réponse.

---

[1] dalton : unité de masse égale au seizième de la masse de l'atome d'oxygène

L'expérience a été faite avec un cristal de myoglobine [7] avec du monoxyde de carbone (CO) qui se fixe plus facilement que l'oxygène. A l'instant t=0, on envoie sur le cristal une impulsion très courte d'un laser visible dont la longueur d'onde a été choisie pour casser la liaison entre le monoxyde de carbone et le fer. A un instant t=0, la molécule de CO est liée à l'atome de fer : quatre milliardièmes de seconde plus tard, la molécule de CO s'est éloignée de 4 Å et s'est retournée de 90 degrés [voir figure 5]. Elle reste dans cette configuration pendant 350 ns. Après une microseconde, la molécule de CO a quitté l'hème. On peut observer simultanément le changement de position des hélices et de certains acides aminés.



T = 1 000 ns

T = 4 ns

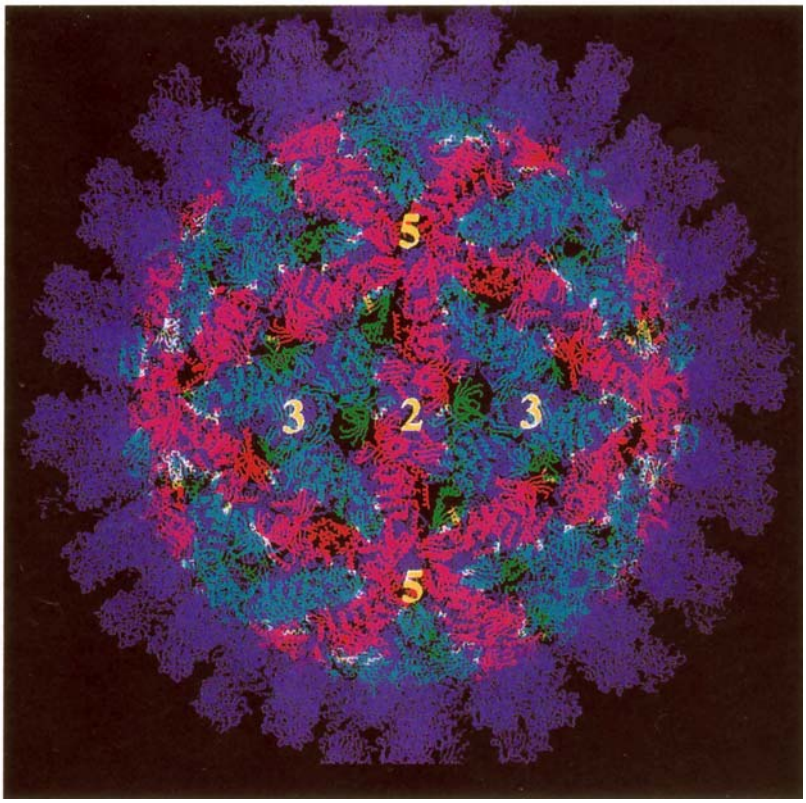
T = 0

On a donc pu réaliser pour la première fois un film des changements de structure d'une protéine pendant sa fonction biologique. toutefois, pour arriver à observer les mécanismes fondamentaux, il faudrait gagner encore plusieurs ordres de grandeur en résolution temporelle, ce qui n'est pas impossible.

Structure de très gros virus

Chaque virus a sa forme propre, mais tous les virus ont des points communs. Le cœur contient un acide nucléique (ADN ou ARN). Il est entouré et protégé par une enveloppe composée d'une ou plusieurs protéines (capside), généralement identiques. Chez quelques virus, comme celui de la grippe, cet ensemble est lui-même entouré par une enveloppe riche en protéines, lipides et carbohydrates.

En 1998, une équipe d'Oxford [8] a réussi à déterminer à Grenoble la structure du virus de la langue bleue, qui atteint les ovins et n'est pas transmissible à l'homme. Ce virus est composé d'une enveloppe extérieure formée de 260 trimères. Le noyau central a un diamètre de 800 Å (voir figure 6) et un poids moléculaire de 60.10^6 daltons ! Il comprend 780 protéines d'une sorte et 120 d'une autre. L'information génétique se trouve en son intérieur sous la forme de dix molécules d'ARN comprenant 19 200 paires de bases. C'est la plus grosse structure de virus jamais découverte, mais ce record ne devrait pas tenir très longtemps. L'information structurelle obtenue devrait permettre la mise au point d'un médicament.



Les nucléoprotéines

Il s'agit d'ensemble de très grandes dimensions (plusieurs centaines d'angströms) formés de protéines et d'acides nucléiques et jouent un rôle fondamental dans le corps humain.

- *le nucléosome :* la structure élémentaire de la chromatine, consistant en deux cent paires de bases d'ADN et de deux copies de quatre histoires différentes. La structure a été résolue en 1997 par l'équipe de Richmond (Zürich) [9].

- *le ribosome :* c'est le composant essentiel du mécanisme de traduction du code génétique c'est-à-dire de la synthèse des protéines autrement dit la « fabrique » de protéines du corps humain.

Trois équipes américaines [10] ont réussi en 1999 à obtenir une structure avec 5 Å de résolution (à NSLS – Brookhaven et ALS – Berkeley). Des études récentes faites à l'ESRF sont proches de 2,5-3 Å.

CONCLUSION

J'ai choisi d'une manière arbitraire deux ou trois exemples pour illustrer les nouvelles possibilités du rayonnement synchrotron. J'aurais pu aussi bien montrer le développement considérable de l'étude du magnétisme, en grande partie dû à la découverte de la magnétorésistance géante [11], des études de surface en particulier en catalyse ou des structures électroniques des supra conducteurs à haute température.

Le rayonnement synchrotron est devenu aujourd'hui un outil indispensable pour l'étude de matériaux [12]. Toutefois il ne faut pas oublier que l'on résout rarement un problème de physique avec une seule technique. C'est donc un outil qu'il faut compter avec d'autres techniques : lorsqu'on étudie une surface la diffraction de surface en rayons X et la microscopie tunel amènent des informations complémentaires.

Références

P. Cloetens et al. Applied Phys. Lett. 75, 2912 (1999)

P. Loubeyre et al. Nature. 383, 702 (1996)

P. Gillet et F. Guyot. Phys. World 9, 27 (1996)

L.S. Dubrovinsky et al. Phys. Rev. Lett. 84, 1720 (2000)

A.M. Dziewonski et D.L. Anderson. Phys. Earth Planet. Inter. 25, 297 (1981)

C.I. Brändén et J. Toozl. Introduction to Protein Structure. Garland Publ. Inc. New York – London (1991)

V. Srajer et al. Science 274, 1726 (1996)

J.M. Grimes et al. Nature, 395, 470 (1998)

K. Luger et al. Nature 389, 251 (1997)

W.M. Clemons et al. Nature 400, 833 (1999)

N. Ban et al. Nature 400, 841 (1999)

R. Cate et al. Science 285, 2095 (1999)

M.N. Baibich et al. Phys. Rev. Lett. 61, 2472 (1988)

Y. Petroff. Les rayons X (de l'Astrophysique à la Nanophysique). Collection Dominos. Flammarion (1998).

Légendes

Figure 1 : Faisceau de rayons X émis par un élément d'insertion de l'ESRF (Grenoble). Ce faisceau est rendu visible par le fait que la forte intensité (3 Kw) ionise les molécules de l'air. On peut remarquer la faible divergence.

Figure 2 : Brillance des sources de rayons X, comparée à celle d'une lampe et du Soleil (de 1895 à 2000). La brillance est ce qui caractérise la qualité optique de la source.

Depuis le début du siècle elle a considérablement progressé, notamment grâce au rayonnement synchrotron.

Figure 3 : Image d'une mousse de polystyrène obtenue à 18 KeV

a) en absorption classique : la mousse n'est pas visible puisqu'elle n'absorbe pas les rayons X

b) l'image reconstituée en exploitant la cohérence de la lumière. La résolution (1 µm) est limitée par le détecteur.

La différence est saisissante [Ref. 1]

Figure 4 :Coupe de la terre présentant les différentes couches (lithosphère, manteau externe, manteau interne, noyau externe, noyau interne). Les pressions et les températures sont aussi indiquées. Le noyau interne comprend surtout du fer solide alors que le noyau externe est liquide. Les manteaux sont formés essentiellement de silicates [Ref. 3]

Figure 5 : Modification de la structure de la myoglobine pendant une réaction biologique. A l'instant t=0 (à gauche) on casse avec un laser visible la liaison entre le fer et l'oxyde de carbone. L'atome d'oxygène est en vert, celui de carbone en gris, l'hème est rouge.

Quatre nsec (milliardième de seconde) plus tard (au milieu) la molécule de CO s'est déplacée de 4 Å et s'est retournée de 90°. A droite, après un millionième de seconde, la molécule de CO est sortie de l'hème ([Ref. 7]

Figure 6 : Noyau du virus de la langue bleue : le diamètre est de l'ordre de 800 Å [Ref. 8]. C'est encore aujourd'hui la plus grosse structure de virus résolue par rayons X.