



HAL
open science

I. FIP : une ligne de lumière française pour la cristallographie des protéines II. Une approche structurale du métabolisme secondaire des plantes

Jean-Luc Ferrer

► To cite this version:

Jean-Luc Ferrer. I. FIP : une ligne de lumière française pour la cristallographie des protéines II. Une approche structurale du métabolisme secondaire des plantes. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier (Grenoble I), 2003. tel-01449055

HAL Id: tel-01449055

<https://hal.science/tel-01449055>

Submitted on 30 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES
DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER DE GRENOBLE**

Comité d'Habilitation de Physique

**I. FIP : une ligne de lumière française pour la
cristallographie des protéines**

**II. Une approche structurale du métabolisme
secondaire des plantes**

Jean-Luc FERRER

HDR soutenue le 10 février 2003
devant la Commission d'Examen composée de :

| | |
|---------------------|--------------------|
| Prof. R. Fourme | Rapporteur Externe |
| Dr. J.-P. Samama | Rapporteur Externe |
| Prof. R. Douce | Rapporteur Interne |
| Dr. J.-J. Leguay | Examineur |
| Dr. J.C. Fontecilla | Examineur |
| Prof. J. Vicat | Examineur |

*Institut de Biologie Structurale
Jean-Pierre Ebel*

Laboratoire de Cristallographie et
Cristallogénèse des Protéines



Direction
des
Sciences du Vivant



Département des
Sciences Chimiques
UPR 9015

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| 1. Les lignes de lumière françaises à l'ESRF pour la cristallographie des protéines | 2 |
| 1.1 Historique | 3 |
| 1.2 Les caractéristiques principales de la ligne D2AM | 5 |
| 1.3 L'évolution de D2AM à FIP | 10 |
| 1.4 Amélioration de l'expérience | 15 |
| 1.5 Résultats et perspectives | 22 |
| 2. Une approche structurale du métabolisme secondaire des plantes | 25 |
| 2.1 Intérêt du métabolisme secondaire | 26 |
| 2.2 Une enzyme clef : la chalcone synthétase | 29 |
| 2.3 La voie de synthèse de la lignine | 39 |
| 2.4 Vers la construction de nouveaux produits | 51 |
| Conclusion | 58 |
| Bibliographie | 59 |

Introduction

Le présent document reprend plus en détails les deux projets qui ont constitué l'essentiel de mon activité ces dernières années.

Le premier de ces projets, développé dans le chapitre 1 de ce rapport, est la construction des lignes de lumières françaises à l'ESRF dédiées à la cristallographie des protéines. La seconde et dernière de ces lignes étant achevée, cette phase de construction va laisser place à une phase d'exploitation et d'amélioration continue. Mes responsabilités, techniques jusque là, se sont élargies à la gestion d'un instrument désormais opérationnel.

Le second projet, décrit dans le chapitre 2, est le développement d'une thématique centrée sur les enzymes du métabolisme secondaire des plantes, et leurs équivalents chez certains micro-organismes. Bien que démarrée récemment, cette activité me paraît également importante dans la mesure où elle m'a permis de mettre un pied du côté des utilisateurs de la ligne de lumière, et ainsi de mieux appréhender leurs besoins. Mais bien au delà, c'est également un sujet d'un fort intérêt biologique avec d'importantes implications, en particulier médicales et industrielles. Parmi les structures résolues dans le cadre de ce projet, je m'attarderai davantage sur celles pour lesquelles je me suis le plus impliqué personnellement. Enfin, je détaillerai dans ce chapitre comment ces deux activités s'articulent ensemble, au sein d'un projet international du type "génomique structurale".

**1. Les lignes de lumière françaises à l'ESRF pour la
cristallographie des protéines**

1.1 Historique

L'ESRF ("European Synchrotron Radiation Facility") a été créé dans le but de fournir à la communauté internationale une source de rayonnement de troisième génération dans le domaine des rayons X. Conçu au départ pour l'utilisation d'une trentaine d'éléments d'insertion, le plan général a été réaménagé par la suite afin de tirer également parti des aimants de courbure. Il a alors été décidé d'attribuer une partie des trente sources supplémentaires à des groupes "nationaux", appelés "Cooperative Research Groups" (CRG).

La construction d'une ligne française dédiée aux expériences de diffraction et diffusion anormale multi-longueur d'onde (ligne CRG-D2AM) a démarré en 1991 sur l'emplacement BM2 (aimant de courbure n°2, voir Fig. 1). Cette ligne, achevée en 1994, était ouverte à l'ensemble de la communauté française de biologie structurale à hauteur d'un tiers du temps de faisceau disponible, un autre tiers étant réservé aux expériences de la communauté "Science des Matériaux", le tiers restant étant attribué par l'ESRF.

Afin de faire face à la demande croissante de faisceau, la décision a été prise de construire une nouvelle ligne française totalement dédiée à la cristallographie de rayons X des macromolécules biologiques. La construction de cette ligne, du nom de CRG-FIP (ligne Française pour l'Investigation des Protéines) a débuté en septembre 1995 sur l'emplacement BM30 (Fig. 1), pour s'achever fin 1998. Elle prend le relais de la ligne D2AM où la station de cristallographie de macromolécules biologiques a été fermée en mars 1998.

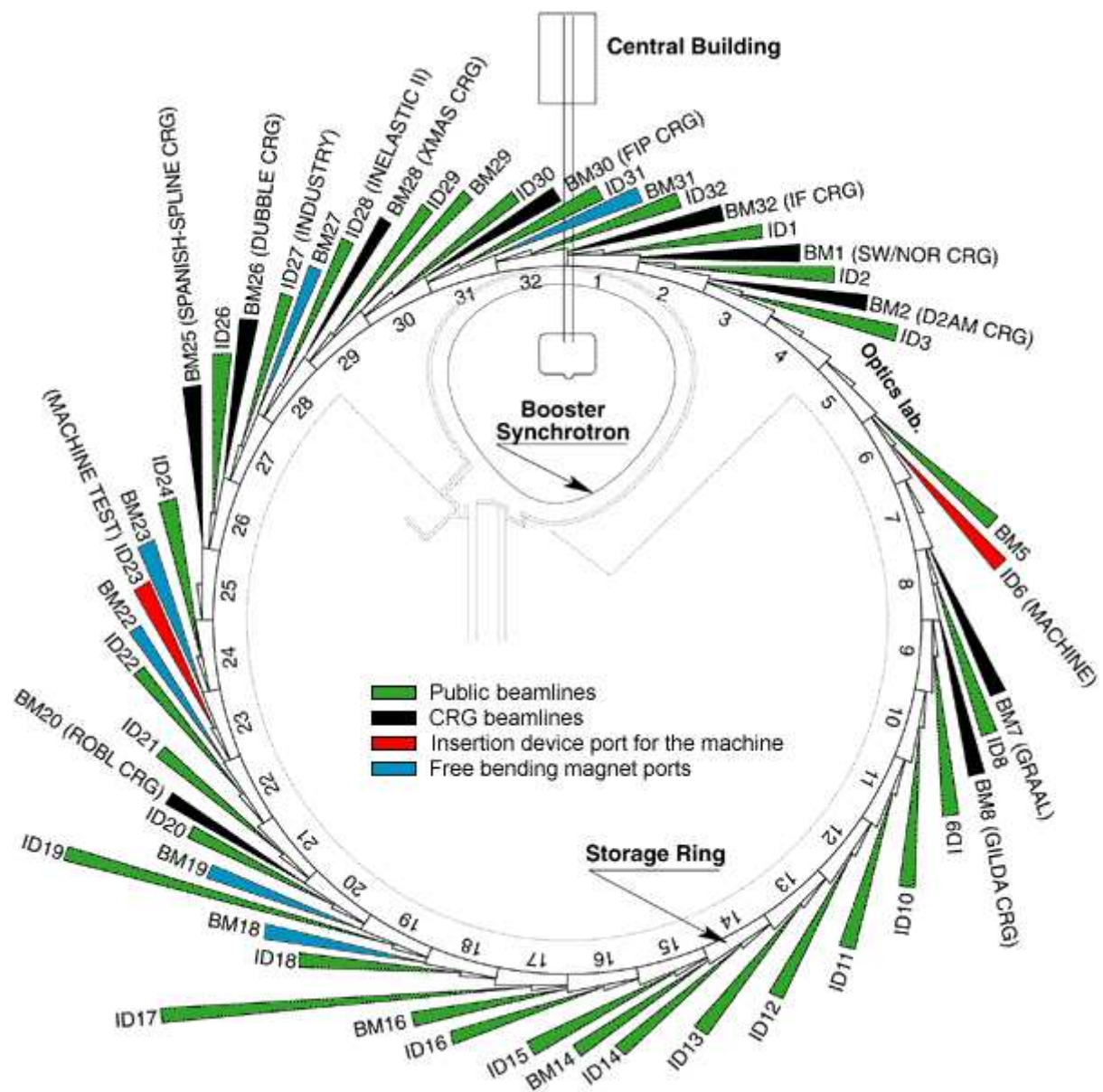


Figure 1 : emplacement des lignes de lumière à l'ESRF. Les lignes IDxx utilisent des éléments d'insertion ("Insertion Device") comme source de rayons X. Les lignes BMxx utilisent des aimants de courbure ("Bending Magnet").

1.2 Les caractéristiques principales de la ligne D2AM

Les aimants de courbure sont des sources de rayonnement synchrotron produisant un faisceau divergeant au spectre étendu. Les expériences de cristallographie classique, à une longueur d'onde, nécessitent un faisceau monochromatique d'une taille comparable à celle de l'échantillon à étudier. Aussi, une ligne de lumière pour la cristallographie des protéines est-elle avant tout constituée d'une optique qui monochromatise et focalise le faisceau sur l'échantillon placé au centre du diffractomètre.

Outre cette exigence de base, les objectifs que l'on s'était fixés lors de l'avant projet de la ligne D2AM étaient de réaliser une ligne flexible, permettant à la fois des expériences classiques à une longueur d'onde, avec le flux le plus intense possible, et des expériences de diffusion anormale multi-longueur d'onde (MAD) nécessitant une très bonne qualité spectrale (résolution en énergie de 10^{-4} en valeur relative et un domaine d'énergie des photons X de 5 à 25 keV, avec un taux de réjection des harmoniques de 10^{-4}). Ces objectifs ont pu être atteints grâce à une optique symétrique constituée de deux miroirs à incidence rasante encadrant un double monochromateur à focalisation sagittale (*ie* focalisation dans le plan horizontal) (Fig. 2) (Ferrer *et al.*, 1998).



Figure 2 : optique de la ligne D2AM. De droite à gauche, on distingue les enceintes du premier miroir, du monochromateur et du second miroir.

1.2.1 Les miroirs

La sélection de la longueur d'onde est classiquement effectuée par diffraction du faisceau blanc par un cristal de silicium (voir plus loin la description du monochromateur). Cependant, outre la longueur d'onde fondamentale désirée, cette diffraction produit également un certain nombre d'harmoniques à plus haute énergie.

Les miroirs constituent un élément essentiel de l'optique de D2AM dans la mesure où ils assurent la réjection de ces harmoniques. De plus, ils réalisent la focalisation dans la direction verticale. Le premier de ces miroirs est placé à 26 m de la source. Il est suivi du monochromateur puis du second miroir placé environ 8 m avant l'échantillon (Fig. 3).

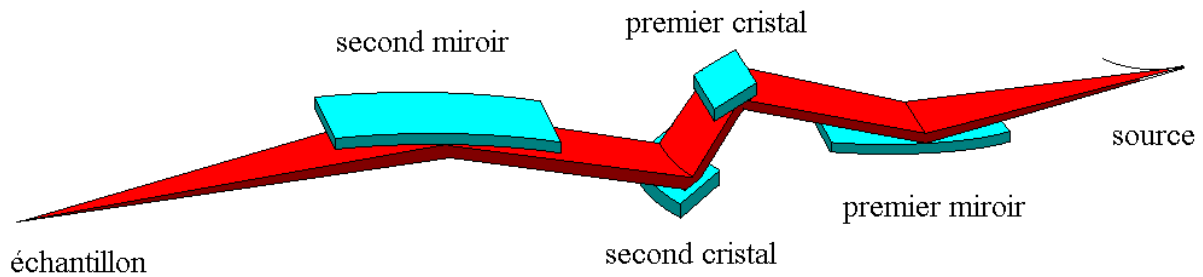


Figure 3 : schéma de l'optique de la ligne D2AM.

La réjection des harmoniques est réalisée en tirant partie de la brusque chute de réflectivité d'une surface métallique au delà d'une énergie dite énergie de coupure. L'incidence des miroirs est choisie de sorte à ce que la longueur d'onde fondamentale sélectionnée par le monochromateur corresponde à une bonne réflectivité, alors que ses harmoniques se retrouvent au delà de l'énergie de coupure. Cependant, malgré le choix d'un dépôt métallique d'atomes lourds, du platine en l'occurrence, l'angle auquel a lieu ce filtrage est particulièrement faible, de l'ordre de 10^{-3} radian, et donc la longueur du miroir importante (1.1 m de long, pour 9 cm de large). De plus, une partie significative du rayonnement est absorbée, de l'ordre de 100 à 200 W, d'où la nécessité d'un refroidissement. Afin d'obtenir un bon découplage mécanique, celui-ci est réalisé grâce à des ailettes taillées dans la masse du miroir et baignant dans un bain d'un eutectique de gallium refroidi par une circulation d'eau.

Un autre rôle essentiel des miroirs est de collimater (premier miroir) et de focaliser (second miroir) le faisceau dans le plan vertical. La collimation a pour but de réduire la divergence verticale du faisceau au niveau du monochromateur, et donc d'atteindre la meilleure résolution en énergie possible. Cette fonction est assurée par les miroirs grâce à une courbure longitudinale obtenue par l'application d'un couple aux extrémités par l'intermédiaire de rouleaux. Dans le

même temps, la déformation parasite due au poids propre des miroirs est annulée par un système de contrepoids.

Ces miroirs ont été réalisés par la société REOSC (91200 Massy, France). Le matériau choisi est le silicium monocristallin. Peu sensible au rayonnement, il présente de plus une bonne conductivité thermique ($149 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et un faible coefficient de dilatation thermique ($2.55 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$), d'où une faible déformation sous l'effet de la charge thermique. De tels monocristaux, d'une longueur supérieure au mètre, ont été développés par l'industrie de la microélectronique. Bien que semblant très attractif, ce matériau n'avait jamais été utilisé auparavant pour la réalisation de miroirs de cette dimension et de la qualité requise, en particulier en raison des incertitudes sur le comportement lors du polissage. Cependant, cette prise de risque s'est révélée payante dans la mesure où il a été possible d'atteindre des qualités de poli de 2–4 Å rms, en terme de rugosité (notre cahier des charges stipulait 4 Å rms) et des erreurs de pente longitudinales inférieures à 5 μrad . Depuis, ce choix s'est imposé pour la plupart des grands miroirs de rayon X à l'ESRF.

1.2.2 Le monochromateur

La ligne D2AM est équipée d'un monochromateur à focalisation sagittale pourvu de deux cristaux de silicium parallèles, orientés [111] ou [311], le premier étant plat et refroidi par une circulation d'eau, le second étant courbé afin d'assurer la focalisation horizontale du faisceau (Fig. 4).

Le principe de fonctionnement de ce monochromateur repose sur la loi de Bragg et ses performances sont liées à la qualité géométrique des plans cristallographiques diffractants, qui doivent être idéalement parallèles et équidistants. En réalité, ces deux cristaux de silicium subissent toujours des déformations et l'efficacité du monochromateur en est par conséquent diminuée. Afin de prévenir la plus importante d'entre elles, la déformation anticlastique

induite par la courbure sagittale, le second cristal a été usiné en forme de peigne. Il en résulte, du fait de la taille des nervures usinées, une taille minimale pour la tache focale qui se situe autour des $300\mu\text{m}$. Les autres défauts de ce cristal, bien que moins importants, nécessitent cependant une correction. Ceci est réalisé grâce au grand nombre de degrés de liberté du courbeur. Cependant, le pilotage de ces mouvements s'avère à l'usage assez délicat et un programme d'aide à la décision a été conçu afin de faciliter ce réglage (Ferrer, 1999).



Figure 4 : monochromateur à deux cristaux de la ligne D2AM.

1.3 L'évolution de D2AM à FIP

Dans l'ensemble, FIP reprend les mêmes principes que D2AM (Roth *et al.*, 2002). Cependant, du fait de l'absence des compromis rendus nécessaires sur D2AM par la cohabitation avec la communauté "matériaux", il a été possible sur FIP de faire le choix d'une démagnification 1:1 (distance source – monochromateur égale à la distance monochromateur – échantillon). Le faisceau, ainsi moins divergeant, autorise des échantillons avec des paramètres de maille plus importants, permettant ainsi l'étude de gros complexes protéiques. Les autres évolutions par rapport à D2AM sont d'ordre purement technologiques, et sont détaillées ci-dessous.

1.3.1 Les miroirs et leur courbeurs

Le premier miroir de FIP (Fig. 5), grâce à l'évolution de la technologie du silicium pour la micro-électronique, a pu être réalisé d'une longueur plus importante que ceux de D2AM (1.3 m contre 1.1 m). Il a également bénéficié d'une simplification du mode de refroidissement : au lieu d'ailettes plongeant dans du métal liquide, on a opté pour de simples rainures taillées au bord de la surface utile et remplies de métal liquide (Fig. 6). Des lames de cuivre, refroidies par une circulation d'eau, viennent tremper dans ce bain afin d'assurer l'évacuation de la chaleur. Ce système, à la fois simple et efficace, a depuis été adopté par plusieurs lignes à l'ESRF, dont la future ligne CRG-FAME, ainsi que par la ligne CHEM-MAT CARS du synchrotron américain APS, des lignes du synchrotron Allemand ANKA et du synchrotron Suisse. Le second miroir, qui ne reçoit pas de charge thermique significative, a pour sa part été usiné en verre (Zerodur). Le système de courbure a lui aussi été modifié : il constitue désormais un système autonome et compact qui s'intègre à l'intérieur de l'enceinte à vide, rendant ainsi cette dernière beaucoup plus simple à réaliser.

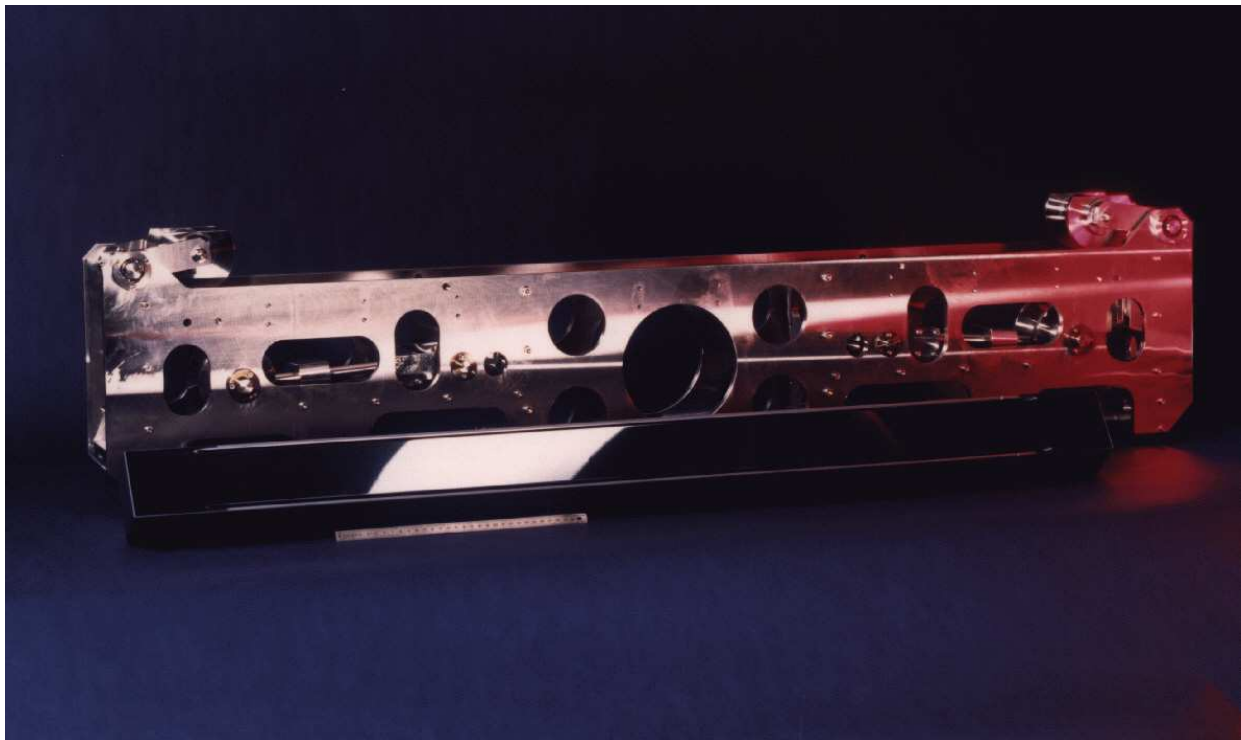


Figure 5 : miroir refroidi en silicium et son courbeur.

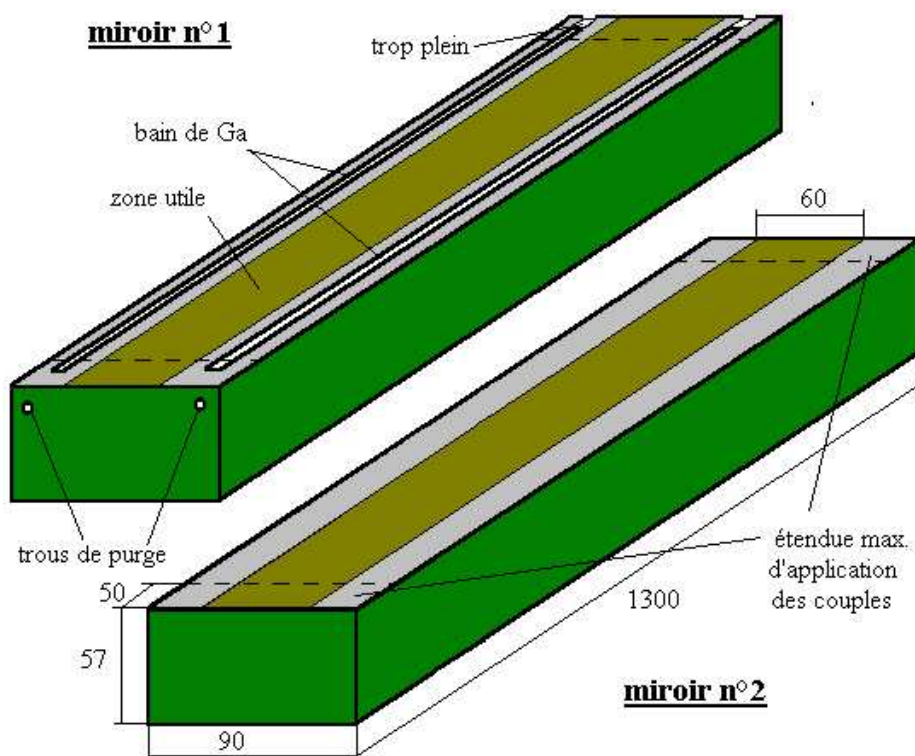


Figure 6 : miroirs de FIP. Le premier est refroidi par un bain de gallium liquide.

1.3.2 Premier cristal du monochromateur refroidi à l'azote liquide

Le premier cristal du monochromateur absorbe une puissance comparable à celle du premier miroir, à savoir de 100 à 200 W, mais sur une surface beaucoup plus faible. De ce fait un refroidissement efficace, au plus près de la surface, est nécessaire. Classiquement, une circulation d'eau dans des canaux ou à l'intérieur d'une boîte peuvent convenir pour cette gamme de puissance. Cependant, l'effet de gradient thermique entraîne l'apparition d'une courbure de la surface irradiée, et donc un élargissement spectral. Ce problème disparaît lorsque le cristal est refroidi à la température de l'azote liquide. En effet, à cette température, le coefficient de dilatation du silicium est quasiment nul. Aussi avons nous décidé de développer sur FIP un système de refroidissement à l'azote liquide (Carpentier *et al.*, 1999), et ceci pour un coût bien inférieur à celui des systèmes développés à l'ESRF pour les lignes utilisant un élément d'insertion comme source. Cela a été rendu possible par la relative faible puissance de notre source, permettant ainsi l'utilisation de l'azote liquide en flux perdu. Ainsi dans notre système, l'azote liquide est pompé (A)(Fig. 7) dans un réservoir (F) et injecté dans un circuit (C) en contact thermique avec le cristal, à une pression légèrement supérieure à la pression atmosphérique. Ceci lui permet d'absorber la charge thermique sans se vaporiser. Il est ensuite détendu dans un serpentin (D) placé dans le réservoir (F), conduisant à l'évaporation d'un peu d'azote liquide compensée par un apport automatique (G).

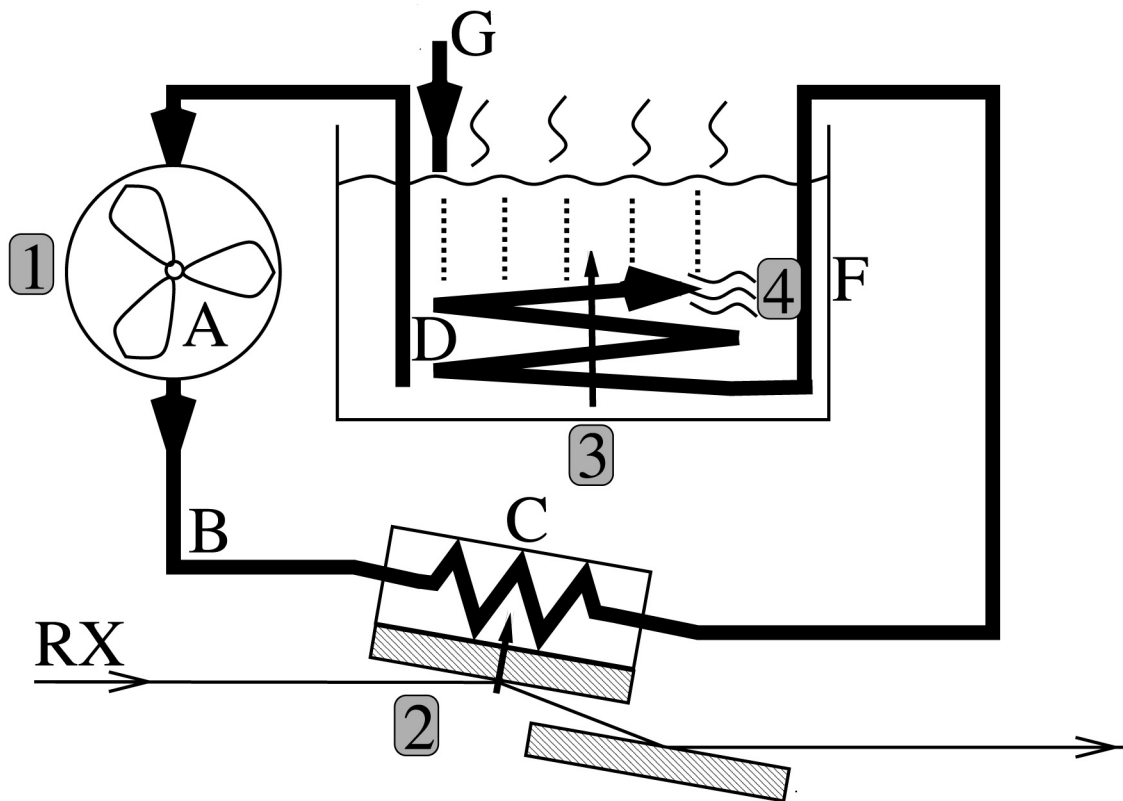


Figure 7 : refroidissement cryogénique du premier cristal du monochromateur.

1.3.3 Le courbeur piézo-électrique du second cristal du monochromateur

Le concept du courbeur est aussi novateur. Il est constitué de cinq actionneurs piézo-électriques complètement indépendants, qui appuient sur le cristal pour lui conférer sa forme cylindrique (Fig. 8). Le bon fonctionnement du courbeur et notamment son aptitude à corriger les défauts de courbure grâce à ces actionneurs, ont été vérifiés par des essais mécaniques avec mesures micrométriques et modélisation mathématique de la forme du cristal. Nous avons pu ainsi montrer qu'en modulant les valeurs des cinq actionneurs, on peut limiter les défauts de courbure du cristal et s'approcher au mieux de la forme cylindrique souhaitée.

Un développement est en projet pour proposer une solution innovante au problème des déformations axiales (anticlastiques) apparaissant sur le second cristal lors du cintrage en cylindre. Il s'agit d'un cristal en forme de U permettant

d'obtenir une courbure cylindrique continue avec déformation anticlastique acceptable, ce qui n'est pas le cas des cristaux à ailettes utilisés couramment. Cette forme géométrique minimise aussi l'effet de déformation conique à condition d'effectuer un usinage du cristal de grande précision. Des calculs par éléments finis ont permis de déterminer les paramètres géométriques d'un tel cristal. Cependant, ils aboutissent à une épaisseur de la surface utile du cristal de $600\ \mu\text{m}$, ce qui est difficile à réaliser dans une pièce ouvragée. Aussi faudra-t-il peut-être considérer la possibilité de rapporter une lame fine sur des renforts, plutôt que d'effectuer un usinage dans la masse.

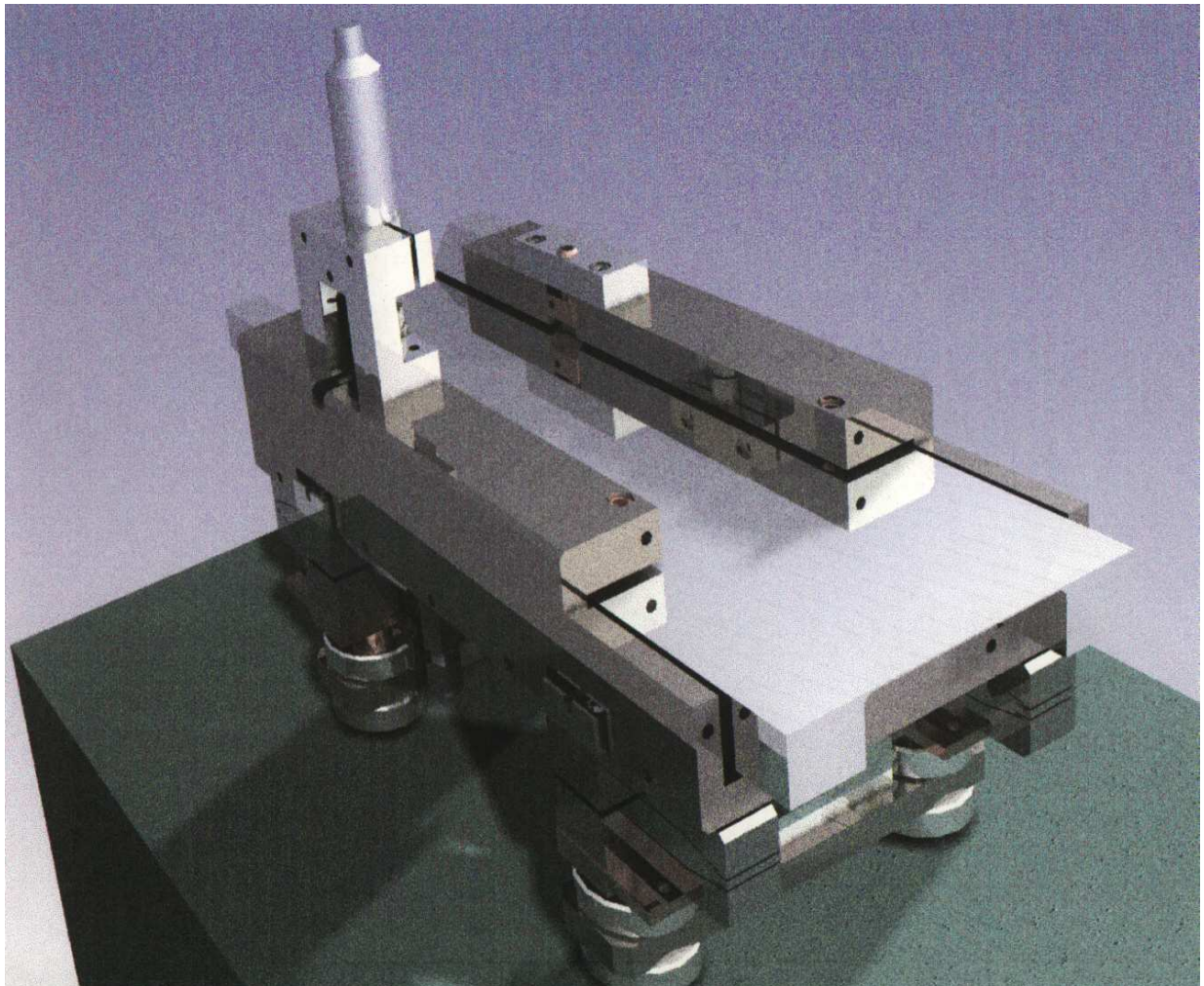


Figure 8 : image calculée du second cristal et de son courbeur.

1.4 Amélioration de l'expérience

On constate actuellement un sensible accroissement de la demande ainsi qu'une généralisation de l'approche structurale par la cristallographie, faisant de cette méthode la solution la plus généralement utilisée pour l'étude des macromolécules biologiques. Pour répondre à ce besoin, et dans l'attente de l'arrivée de nouveaux grands équipements, il est important désormais de progresser dans la voie de l'automatisation. Une percée récente a été réalisée sur FIP par la mise en oeuvre d'un programme de réglage complètement automatisé de la longueur d'onde, ainsi qu'un programme d'optimisation de l'intensité de la ligne. Ceci permet, outre un gain de temps appréciable, le réglage de la ligne à n'importe quelle longueur d'onde par tout utilisateur, même non expert. Il s'agit là de l'aboutissement d'efforts continus depuis la construction de la ligne D2AM. L'étape suivante, toujours dans le but de rendre la ligne plus sûre et plus facile à utiliser, et également afin d'en accroître le rendement, est d'automatiser l'expérience elle-même. Pour cela, des développements sont en cours sur les trois étapes importantes : *(i)* le montage et le centrage des échantillons, *(ii)* la collecte des données et *(iii)* le traitement de ces données.

1.4.1 Montage et centrage de l'échantillon

L'objectif est d'atteindre un taux de rentabilité du temps de faisceau le plus élevé possible, en minimisant les temps de montage et de centrage, et une meilleure sécurité dans la manipulation des échantillons. Ceci peut être réalisé par une automatisation de la procédure de montage et de centrage des échantillons cryogéniques. Pour cela, nous avons entrepris le développement d'un système de montage automatique de l'échantillon, composé d'un bras manipulateur (un robot

6 axes Stäubli RX-60-L, Fig. 9) et d'un Dewar pouvant accueillir des supports dédiés, chacun accueillant une dizaine d'échantillons montés sur des boucles Hampton (Fig. 10). Ce système permet le stockage de 40 échantillons et leur transfert, un à un, sur la tête goniométrique en un temps de quelques secondes, au lieu de 10 à 15 mn pour un expérimentateur. L'ensemble est en cours de test sur la ligne et devrait être mis à disposition des utilisateurs à partir de la fin 2002.

Le problème du centrage automatique de l'échantillon est un point délicat sur lequel nous travaillons en ce moment. Un premier programme, développé par M. Roth, permet le centrage de la boucle avec une fiabilité raisonnable. Cependant la technique et la qualité d'éclairage de l'échantillon actuelle sur le diffractomètre ne permet pas d'aller au delà. Ce sera donc le point à travailler dans l'avenir. En particulier, le recours à un éclairage UV est peut-être à considérer (Fig. 11).

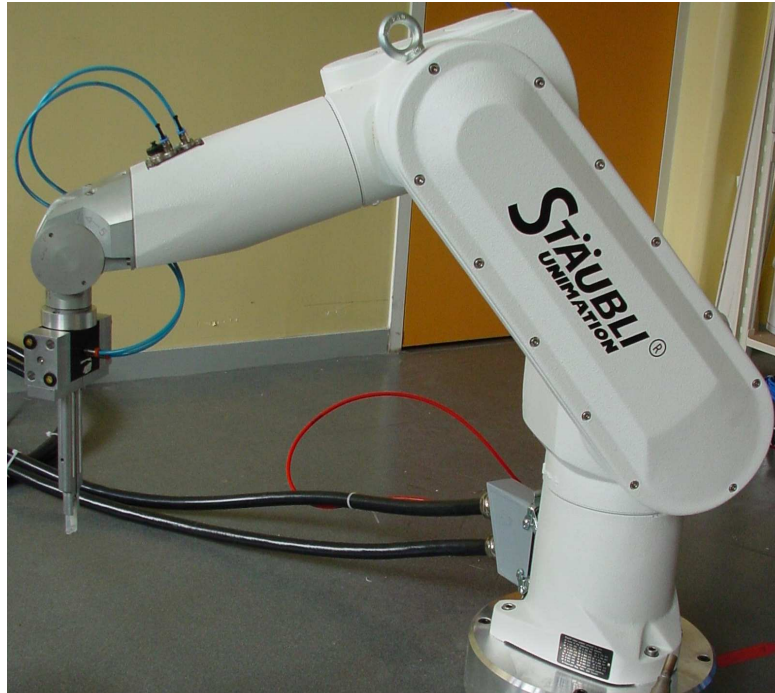


Figure 9 : robot manipulateur d'échantillons.



Figure 10 : Dewar et racks de stockage des échantillons.

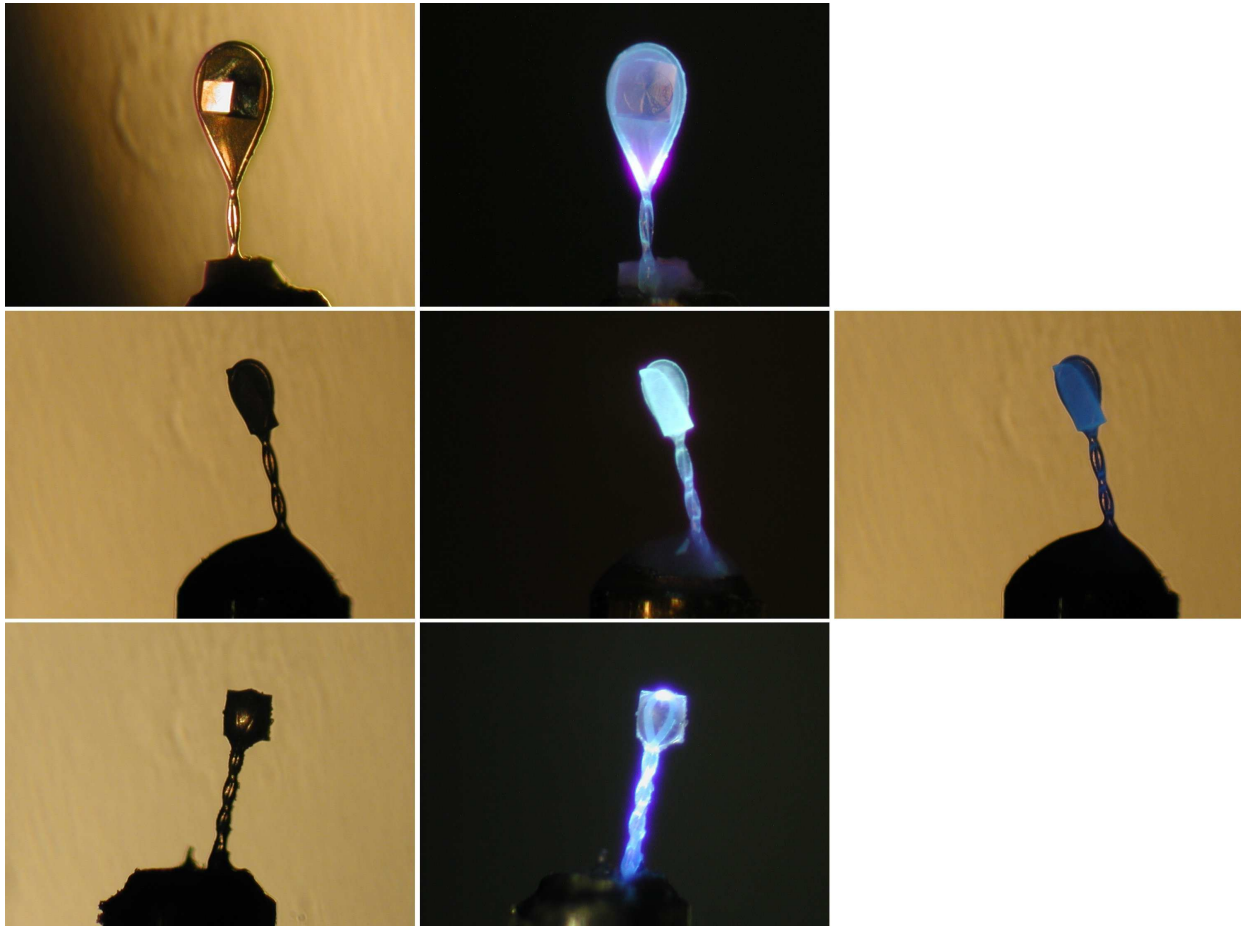


Figure 11 : différents échantillons (1^{ère} ligne : lysozyme ; 2^{ème} ligne : échantillon inconnu ; 3^{ème} ligne : CCOMT), éclairés avec de la lumière visible (colonne de gauche), une source UV (colonne du milieu) et une combinaison des deux (colonne de droite). Ces images ont été réalisées à l'ESRF sur le Cryobench de D. Bourgeois.

1.4.2 Collecte de données

Le dialogue avec l'interpréteur de commande Nemo se fait à travers une interface graphique, Xnemo, dérivée de ProDC, l'interface standard d'ESRF (Spruce, non publié). Avec cette interface, l'utilisateur peut sans risque

- manoeuvrer le diffractomètre (centrage et orientation de l'échantillon, déplacement du détecteur...),
- exécuter et traiter un balayage en énergie,
- préparer et lancer la collecte de données.

Pour cette dernière opération, l'utilisateur peut définir le mode de collecte (image, monochromatique simple, SAD, MAD, MAD en mode inverse) et de gestion du faisceau (optimisation automatisée en cas de diminution d'intensité et, optionnellement, au changement de longueur d'onde) aussi bien que les paramètres habituels. La collecte de données peut alors se dérouler complètement sans surveillance, car le programme prend soin de l'optimisation du faisceau et change la longueur d'onde automatiquement. A titre d'information, un tracé de l'intensité moyenne ainsi que de la fluorescence de l'échantillon est réalisé en continu pendant la collecte. Tout événement important se produisant pendant la collecte de données (changement de la longueur d'onde, optimisation de l'intensité, panne, fin de la collecte de données, etc...) est décrit dans un fichier log et commenté par un haut-parleur. Par ailleurs, il est maintenant possible de préparer une série de collectes en utilisant Xnemo comme éditeur et de les exécuter séquentiellement sans intervention de l'utilisateur. Par exemple, un utilisateur peut préparer et exécuter à la suite et automatiquement une série de collectes de données telle que

- une collecte de données à haute résolution à une seule longueur d'onde (grand 2θ),
- une collecte de données MAD de mode inverse de moyenne résolution,
- une collecte de données MAD courte à une autre orientation du cristal (pour obtenir la région aveugle),
- une collecte de données à basse résolution rapide.

Cette possibilité d'une série de collectes de données deviendra essentielle quand le robot sera disponible pour la manipulation des échantillons.

1.4.3 Traitement des données

Nous avons développé un ensemble de programmes qui, dans une première version, créaient de façon automatique les scripts et les fichiers de paramètres nécessaires au traitement des données.

Dans une version plus récente un script, dénommé ADP, permet la réduction de données de façon totalement automatisée (J.-L. Ferrer, 2001). Ce script exécute successivement :

- une recherche de pics avec MARPEAKS de MAR-Research (Klein, non publié),
- l'indexation avec DENZO (suite HKL, Otwinowski and Minor, 1997),
- l'analyse des scores d'indexation afin de déterminer le groupe d'espace,
- l'évaluation de la meilleure stratégie de collecte,
- la recherche des possibilités de pré-orientation de l'échantillon compatibles avec le diffractomètre,
- l'intégration des images au fur et à mesure de leur arrivée,
- plusieurs cycles de mise à l'échelle avec SCALEPACK (suite HKL) jusqu'à la convergence des paramètres d'affinement,
- l'analyse des extinctions systématiques,
- le calcul des facteurs de structure avec TRUNCATE (suite CCP4; Projet informatique de collaboration, numéro 4, 1994),
- s'il y a lieu, l'évaluation du signal anomal et
- le calcul de la carte de Patterson anormale,
- la recherche des sites d'atomes lourds et le phasage avec SOLVE (Terwilliger *et al.*, 1999),
- l'aplatissement de solvant et la construction du modèle avec RESOLVE (Terwilliger, 2001).

Tous les paramètres utiles, tels que la mosaïcité, la taille des boîtes d'intégration, l'intensité, les seuils de résolution ainsi que le nombre de résidus et le nombre d'atomes lourds sont automatiquement évalués.

Ce développement est rendu nécessaire par la rapidité des collectes de données (en général 1 h pour la collecte d'un jeu de données de 120 degrés, avec une exposition de 15 s par degré). De plus, l'intégration pouvant s'effectuer pendant la collecte de données, les utilisateurs disposent ainsi des statistiques sur les données mesurées et une première carte anormale juste quelques minutes après la fin de la collecte, et ont donc accès aux informations nécessaires pour décider s'il est nécessaire de collecter davantage de données. Ceci permet de réduire au minimum le temps mort entre les collectes de données. La qualité de ce traitement automatisé est suffisante pour une évaluation rapide des données et est au moins comparable à celle d'un traitement effectuée par un utilisateur standard. Peut-être le motif le plus important pour l'usage de ADP est le nombre croissant de projets prévus dans le contexte de la Génomique Structurale. L'automatisation de chaque étape d'un processus de résolution de structure, y compris la réduction de données, permettra une augmentation du nombre de projets par cristallographe. Actuellement, plusieurs jeux de données MAD collectées sur FIP et traités avec ADP ont été phasés avec succès.

1.5 Résultats et perspectives

Les objectifs techniques de FIP sont à ce jour parfaitement atteints. Ceci a permis d'ores et déjà de résoudre de nombreuses structures par la méthode MAD, dont certaines dans le groupe d'espace P1 ayant nécessité un temps de collecte suffisamment long pour faire la preuve de la stabilité de la longueur d'onde à l'échelle de plus de 24 heures (Verdecia *et al.*, 1999). Dans l'ensemble, les temps d'exposition utilisés, allant de 10 s à 2 mn pour 1 deg d'oscillation, sont la preuve la plus évidente du niveau élevé de l'intensité. En terme de résolution en énergie, les résultats sont également très encourageants : la mesure absolue de la "rocking curve" (par un balayage de l'angle du second cristal par rapport au premier) donne une valeur proche de la limite théorique (Fig. 12). Ceci est confirmé par la hauteur du signal anomal lors de la collecte d'un jeu de données sur un seuil présentant une ligne blanche.

Les limites techniques de la ligne, continuellement repoussées par les nouvelles améliorations, sont illustrées par quelques exemples récents d'expériences difficiles :

- (i) structure résolue par remplacement moléculaire, dans le cas de cristaux présentant un paramètre de maille de 460 Å (Budayova–Spano *et al.*, 2002),
- (ii) résolution d'une structure par la méthode MAD avec des cristaux composés de 83% de solvant (Richard *et al.*, 2002),
- (iii) collecte d'un jeu de données à 1.05 Å de résolution sur un cristal d'une protéine dimérique de 84 kDa (Borel *et al.*, non publié),
- (iv) résolution de structure par la méthode MAD avec 57 atomes de sélénium par unité asymétrique.

Sur le plan de la facilité d'utilisation, les qualités de l'environnement expérimental de la ligne FIP sont déjà unanimement reconnues. Cette facilité est

particulièrement appréciée des utilisateurs qui peuvent ainsi intégrer en temps réel l'ensemble de leurs données, leur permettant parfois de repartir avec des données phasées, voir un début de construction de modèle.

Ces progrès s'accompagnent d'une évolution de l'aide apportée aux utilisateurs, et donc d'une évolution du profil des "contacts locaux" qui assurent cette aide. Jusqu'à récemment, la réalisation d'une expérience représentait une charge de travail importante pour le contact local. De ce fait, cette charge devait être répartie sur un nombre important de chercheurs, chacun assurant l'encadrement d'un nombre réduit d'expériences. Outre la difficulté de motiver des chercheurs déjà en place pour ce genre de tâche, il est également difficile à ces personnes de rester informées des modifications permanentes que subit la ligne. Cependant, dans la mesure où cette charge de travail s'est nettement amoindrie, au point d'être équivalente à celle que l'on aurait sur une ligne à longueur d'onde fixe, il devient alors envisageable pour les cristallographes à demeure sur la ligne de dégager suffisamment de temps pour mener en parallèle leur propre recherche. L'automatisation profite donc autant aux utilisateurs qu'au personnel en charge du fonctionnement de la ligne.

Cependant, bien qu'opérationnelle et satisfaisante au niveau technique, la ligne doit continuer de s'adapter à la demande des utilisateurs. Ainsi, sur le plan technique, un besoin se fait de plus en plus sentir dans le domaine des petits cristaux (moins de 100 μm). Aussi conviendrait-il d'installer un jeu de petits miroirs focalisants placés près de l'échantillon. Par ailleurs, le souhait de certains utilisateurs d'exploiter un signal anomal très faible, tel que celui du soufre, nous oblige également à améliorer la fin de ligne (atténuateur, collimateur, fentes) afin de réduire le bruit de fond. Enfin, la mise en oeuvre du robot de montage révèle une faiblesse du diffractomètre, à savoir sa lenteur. Son remplacement est donc à prévoir. Je me propose de mener ces développements dans les années à venir, autant que possible sans perturbation du fonctionnement normal de la ligne.

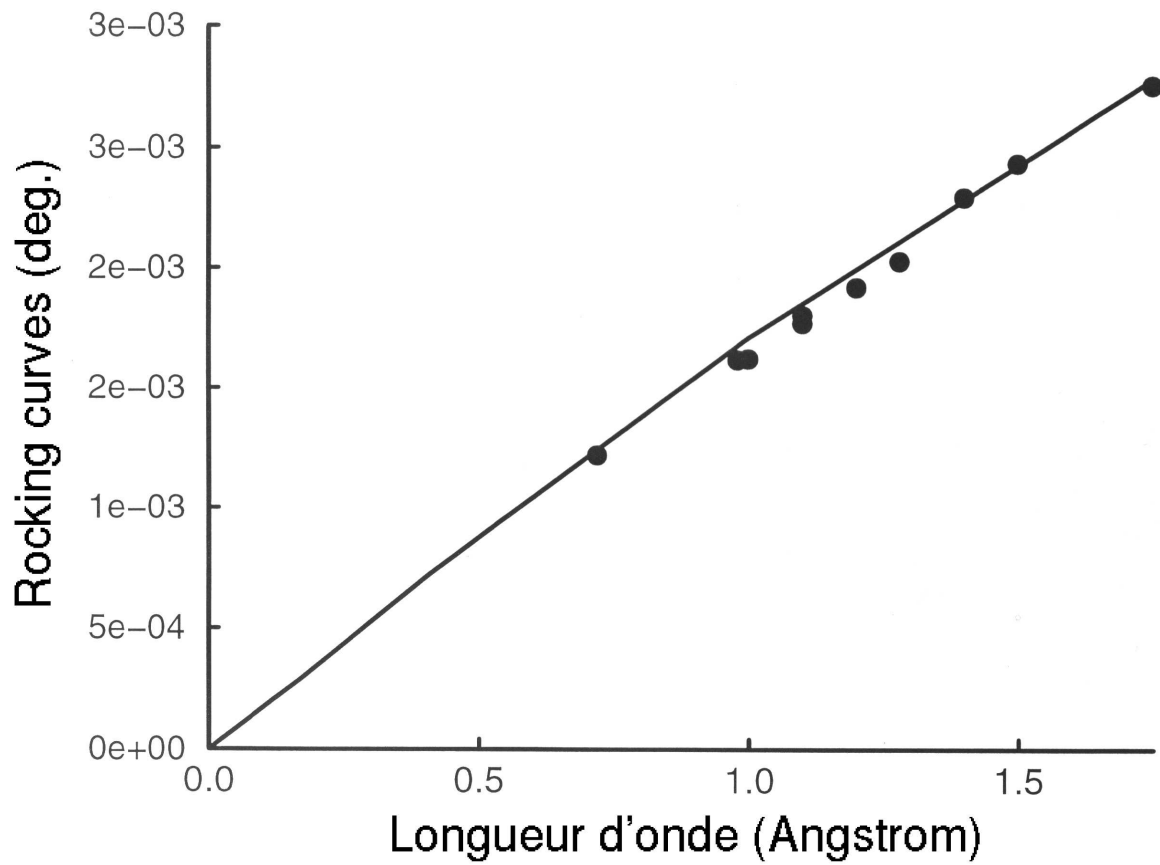


Figure 12 : largeur de la "rocking curve" à différentes énergies. La valeur théorique dans le cas d'un cristal parfait est donnée par la courbe continue.

2. Une approche structurale du métabolisme secondaire des plantes

2.1 Intérêt du métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire des plantes regroupe un grand nombre de réactions non essentielles, par opposition à celles liées à la respiration et à la fabrication des molécules constitutives de la cellule. Bien que qualifié de secondaire, ce métabolisme n'en participe pas moins à des mécanismes importants tels que la défense de la cellule ou la communication avec les micro-organismes vivant en symbiose avec la plante. Ce métabolisme, résultat de l'adaptation des différentes plantes à leur environnement, est une composante essentielle de la biodiversité du monde végétal.

La production par les plantes de molécules dérivées de la phénylalanine (Fig. 13) constitue une partie importante de ce métabolisme secondaire. Ces dérivés sont obtenus par déamination de la phénylalanine en coumaroyl puis altération du cycle, conduisant par exemple à la production de la lignine. Une autre voie débute avec l'ajout d'un nombre plus ou moins grand de kétydes et diverses modifications du produit. On compte parmi les molécules ainsi obtenues les anthocyanines, responsables de la pigmentation et impliquées également dans la défense des plantes contre les dommages dûs aux UV, ainsi que les flavonoïdes, impliquées par exemple au niveau de la nodulation chez les légumineuses (Bailey *et al.*, 1982 ; Dixon *et al.*, 1995 ; Long *et al.*, 1989 ; Schröder *et al.*, 1997).

Le rôle des produits du métabolisme secondaire peut donc se classer en trois catégories : (i) ces composés protègent la plante contre les prédateurs (les phytoalexines assurent une protection contre les bactéries, la lignine constitue une barrière physique contre les microorganismes, certains composés éloignent les herbivores), (ii) ils apportent une protection contre les agressions de l'environnement (rigidité et résistance contre les agressions mécaniques, protection contre les UV, les stress de différentes natures) et (iii) ils participent également à la communication inter-espèces (messagers chimiques à destination

du rizobium chez les légumineuses, pigments attirant les insectes pollinisateurs). Ces molécules sont également très importantes dans la consommation humaine du fait de leurs propriétés médicales. Elles ont en particulier une action chemopréventive (Jang *et al.*, 1997), fongicide (Edwards *et al.*, 1990), anti-malariale (Li *et al.*, 1995) et anti-HIV (Wang *et al.*, 1998), et sont également des compétiteurs des oestrogènes (Gehm *et al.*, 1997). C'est à ces molécules, et en particulier au 3,4',5-trihydroxystilbene (resveratrol) que l'on associe les effets bénéfiques de la consommation du vin, désignés sous le nom de "paradoxe français" (Frankel *et al.*, 1993a ; Frankel *et al.*, 1993b).

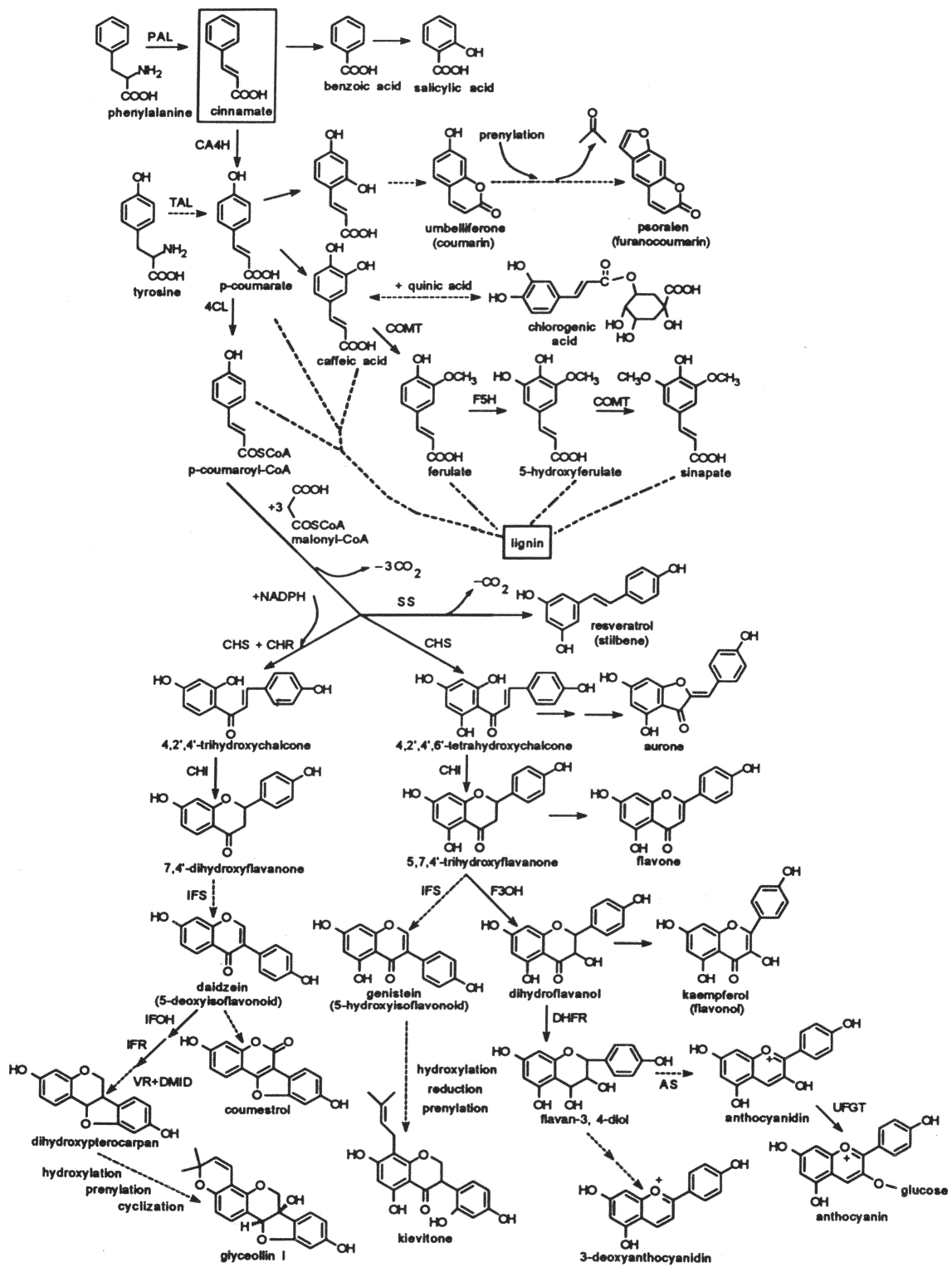


Figure 13 : métabolisme de transformation de la phénylalanine.

2.2 Une enzyme clef : la chalcone synthétase

2.2.1 Situation de la chalcone synthétase dans le métabolisme secondaire

La chalcone synthétase (CHS) est une enzyme clef du métabolisme de transformation de la phénylalanine (Fig. 13). En effet, CHS produit la chalcone (plus précisément la 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone, voir Fig. 21), par la condensation successive de trois molécules de malonyl et d'une molécule de coumaroyl dérivée de la phénylalanine. La chalcone constitue ensuite l'ossature d'une grande partie des molécules précédemment décrites. Ainsi, les légumineuses possédant la chalcone isomérase (CHI) peuvent générer la 6-déoxychalcone, précurseur d'isoflavines, pterocarpans et coumestans.

De nombreuses plantes et certains micro-organismes possèdent également des enzymes très proches de la CHS, avec une identité de séquence souvent supérieure à 80%. On compte notamment parmi ces enzymes la stilbène synthétase (STS) (Schröder *et al.*, 1988), l'acridone synthétase (ACS) (Junghanns *et al.*, 1995) et la bibenzyle synthétase (BBS) (Preisig-Mueller *et al.*, 1995).

Au sein de la famille des polykétide synthétases (PKS), CHS est également d'un grand intérêt. En effet, elle réalise la même réaction de polymérisation de kétides, véhiculés par la Coenzyme A (CoA), que les autres PKS. Il s'agit également du même mécanisme réactionnel que celui conduisant à la synthèse des acides gras. Cependant, dans la majorité des cas, ces enzymes sont constituées de plusieurs domaines, chacun ayant son site actif et réalisant une étape de la réaction. CHS, elle, n'est constituée que d'un domaine, et l'ensemble des réactions ont lieu dans le même site actif. De ce fait, cette enzyme est un excellent modèle simplifié des PKS. Les PKS de cette famille sont désignées PKS de type III. Le nombre d'éléments de cette famille s'enrichit rapidement depuis quelques

années mais la classification sur la base de la nature de leurs produits reste un problème difficile. Du fait de leur fortes homologues, la seule comparaison des séquences d'acides aminés est de peu d'utilité. L'étude structurale des PKS de type III, que nous avons entreprise depuis 1998, est destinée à améliorer cette connaissance.

2.2.2 Structure de la chalcone synthétase

Le gène de la chalcone synthétase de *Medicago sativa*, fourni par le laboratoire du Dr. R. A. Dixon (Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation, P. O. Box 2180, Ardmore, O 73402, USA), a été cloné dans *E coli* début 1998. La protéine produite (42 kDa, 389 résidus) a été purifiée sur colonne d'affinité (Ni-NTA, Qiagen). Une digestion par la thrombine puis un second passage sur la colonne ont permis de supprimer le poly-His en N-terminal. Enfin, la thrombine a été éliminée par un passage sur une colonne de benzamidine-Sepharose (Pharmacia). Après concentration à 25 mg/ml, la protéine a été cristallisée par la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue dans les conditions suivantes :

réservoir : 2.2–2.4 M sulfate d'ammonium, 100 mM PIPES pH 6.5,

goutte : 2 µl de réservoir + 2 µl de solution protéique,

température : 4°C.

Les cristaux ont ensuite été stabilisés dans une solution cryoprotectrice (40% (v/v) PEG400, 100 mM PIPES pH 6.5, 50–75 mM sulfate d'ammonium) avant congélation à 105°K. La même solution a été utilisée, après ajout de sels d'atomes lourds, pour l'obtention des dérivés. Les complexes décrits plus loin ont été obtenus de la même façon.

Les cristaux de protéine native obtenus, d'une taille de 0.3 mm, ont diffracté au laboratoire jusqu'à 1.56 Å de résolution. Six dérivés d'atomes lourds ont été également obtenus, diffractant chacun jusqu'à 2.25–2.3 Å. Le groupe d'espace est

P3₂21, avec une molécule par unité asymétrique. Les deux membres de l'homodimère physiologique sont reliés par l'axe 2 cristallographique.

Les phases ont été estimées par la technique MIRAS de remplacement isomorphe (information provenant de la variation d'intensité des réflexions entre les cristaux de protéine native et les dérivés d'atomes lourds) en tirant partie également du signal anomal (variation de l'intensité entre les réflexions symétriques d'un même dérivé d'atomes lourds). La position des atomes lourds a été déterminée avec les programmes XtalView et MLPHARE. L'affinement des paramètres de ces atomes lourds a été réalisé avec SHARP (La Fortelle *et al.*, 1997). Enfin, le programme SOLOMON (Abrahams *et al.*, 1996) a été utilisé pour l'aplatissement de solvant et l'extension des phases MIRAS. La carte de densité électronique expérimentale obtenue, de très bonne qualité, a permis de construire rapidement un modèle avec le programme O (Jones *et al.*, 1994), incluant sans ambiguïté les résidus Ser3 à Ile389. Ce modèle a finalement été affiné avec REFMAC/ARP (Murshudov *et al.*, 1997), puis SHELX-97 (Seldrick, 1990), jusqu'à un R_{libre} de 19.3%.

La structure obtenue (Fig. 14) présente une pseudo-symétrie interne du type $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ rappelant celle de la 3-ketoacyl-CoA thiolase (Mathieu *et al.*, 1994). Cependant la cavité du site actif localisée sous ce domaine et constituée par les boucles reliant les structures secondaires de la partie supérieure est sensiblement différente de celle de la thiolase. Dans le cas de CHS, ce site actif est profondément enfoui. Un accès, plus proche, est obstrué par une boucle provenant de l'autre membre du dimère (Fig. 15).

2.2.3 De la structure au mécanisme réactionnel

Une deuxième étape de ce travail a consisté à déterminer la structure de CHS complexé avec différents substrats et analogues de produits (Fig. 16). A partir de ces complexes, et d'un certain nombre d'évidences chimiques, il a été possible de

reconstituer le mécanisme réactionnel (Fig. 17). En particulier, on a ainsi pu montrer que la réaction était initiée par la fixation de la molécule de coumaroyl puis condensation des trois molécules de malonyl, et non l'inverse comme il était couramment admis avant la résolution de cette structure.

A partir de ces informations, il a été possible de reconstruire la totalité du film de la réaction, sur des bases structurales solides (volume des cavités, structure des complexes, etc...). Cet enchaînement (Fig. 18) montre comment la chaîne du polyketide, de plus en plus repliée dans le site actif au fur et à mesure de son élongation, prend finalement la bonne conformation pour que la réaction conduisant à la formation du cycle ait lieu.

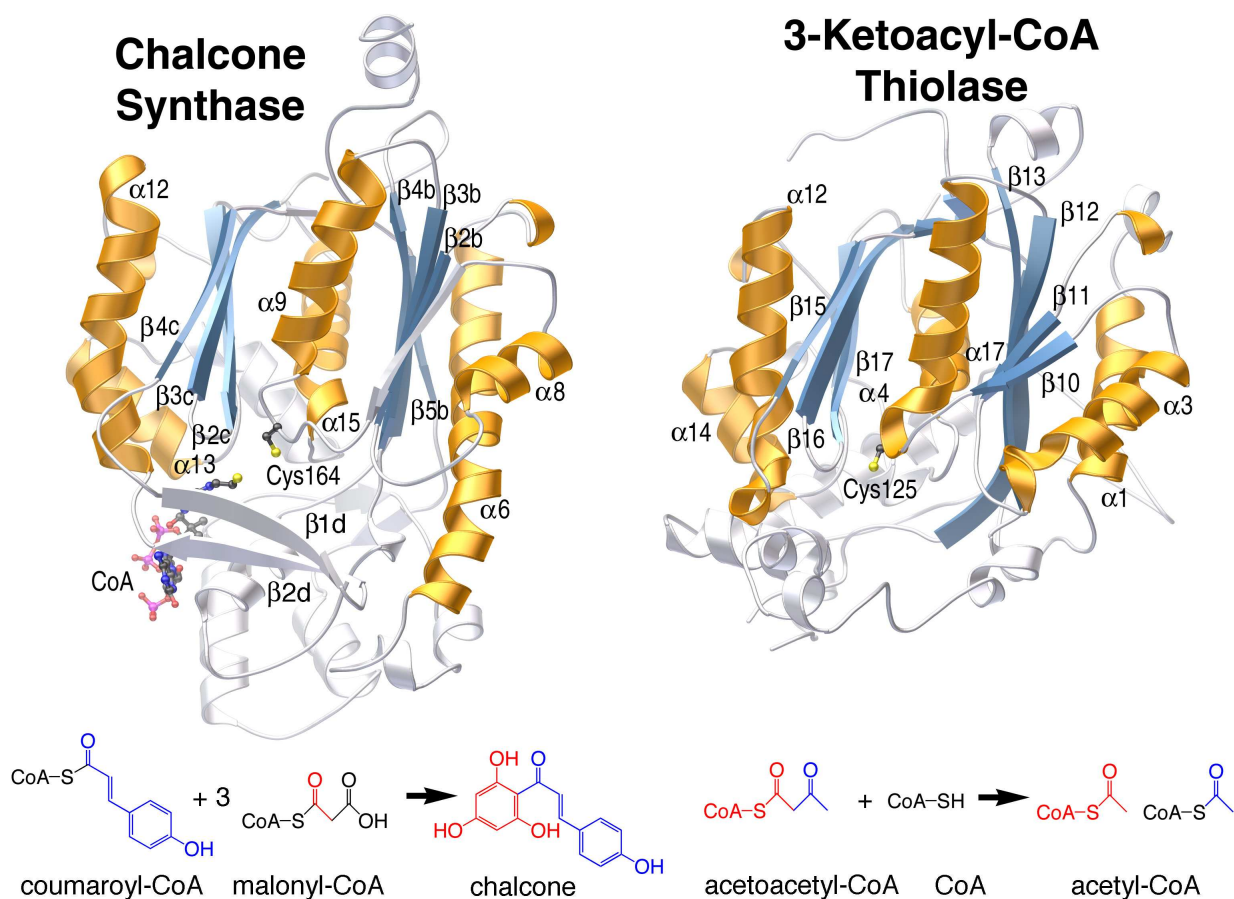


Figure 14 : structure de la chalcone synthétase, comparée à celle de la 3-ketoacyl-CoA thiolase. Le site actif est matérialisé respectivement par Cys164 et Cys125. Les réactions catalysées par chacune de ces enzymes sont représentées en dessous.

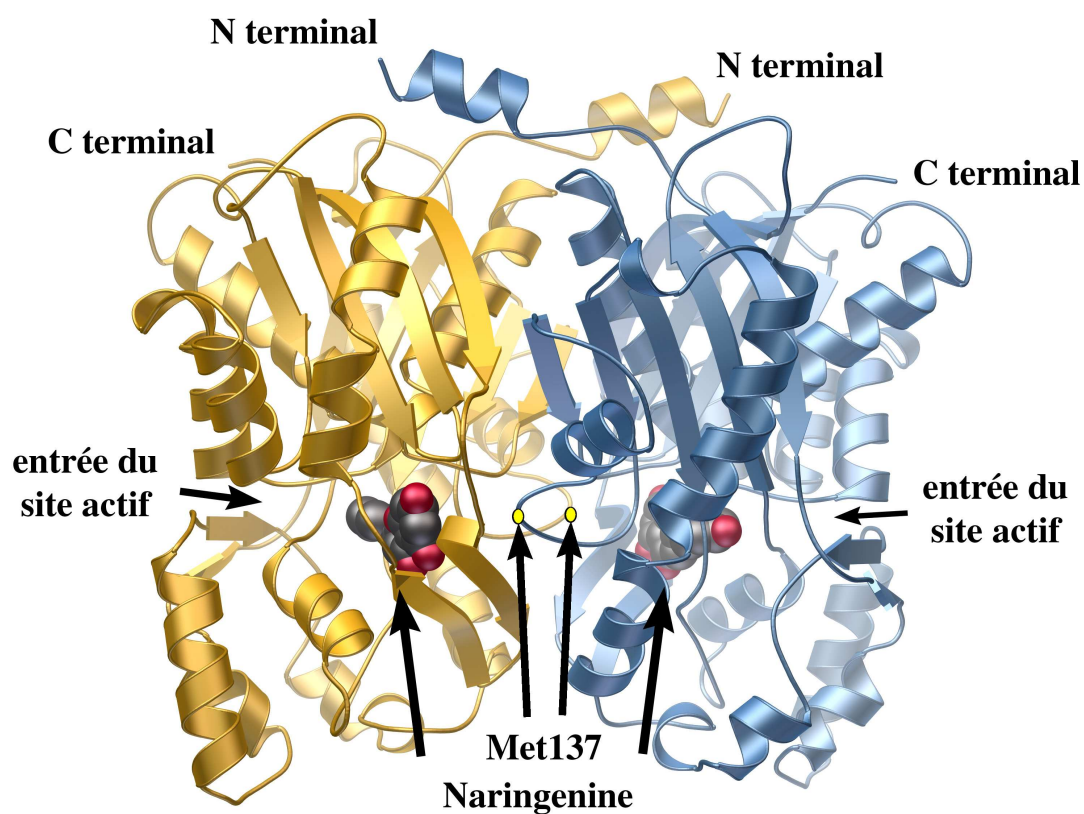


Figure 15 : homodimère de CHS complexé avec la naringénine. Le site actif, profondément enfoui, ne peut être atteint qu'à travers un tunnel de 12 Å de long. Un second accès depuis la surface de dimérisation, plus court, est en fait obstrué par la méthionine 137 de la molécule symétrique.

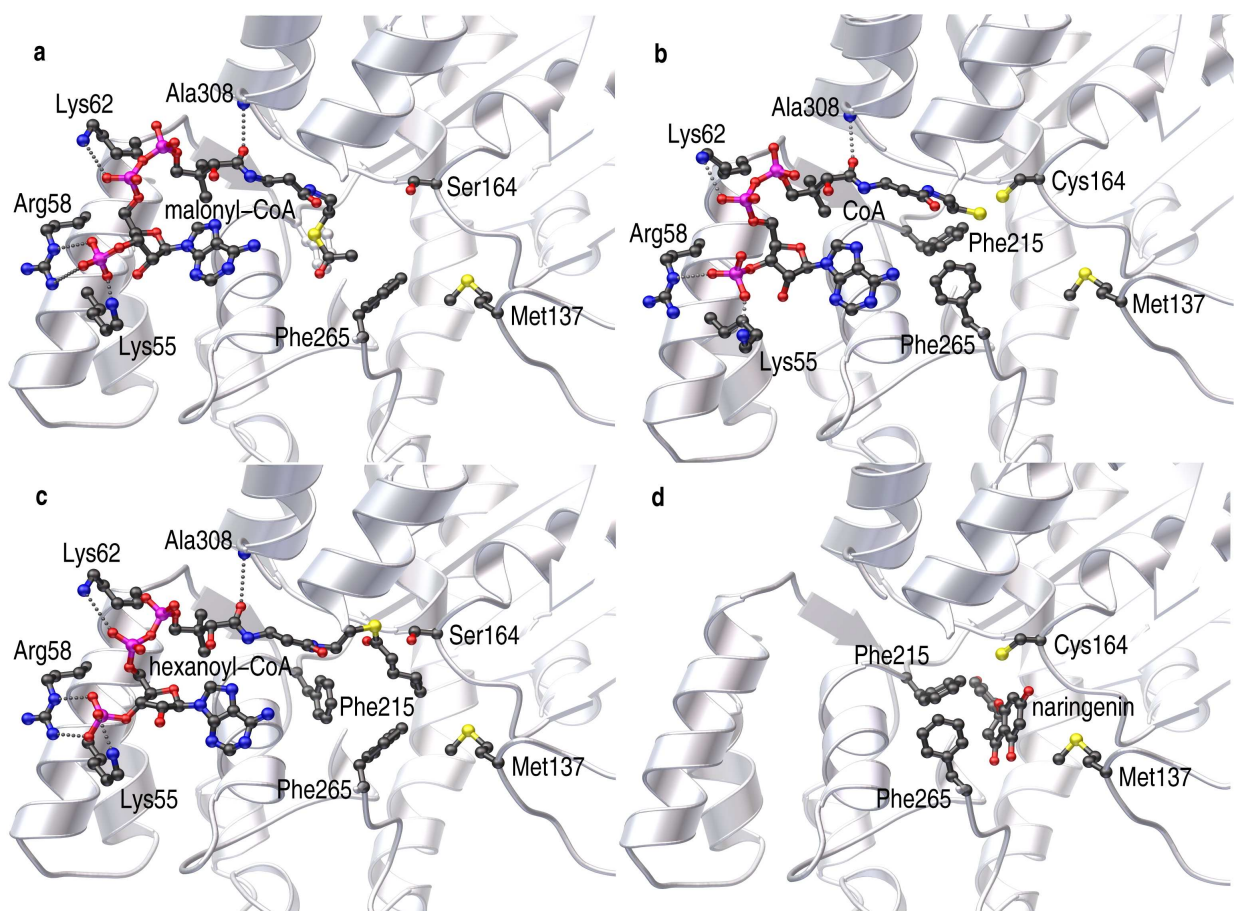


Figure 16 : principaux complexes de CHS avec différents substrats et analogues de produits. En (a), complexe d'un mutant C164S inactif de CHS avec la malonyl-CoA. En (b), complexe de CHS avec la CoA avant qu'elle ne soit relâchée dans le milieu. En (c), complexe du mutant C164S de CHS avec l'hexanoyl-CoA, imitant ainsi le cheminement de la chaîne du polyketide pendant son élongation. En (d), complexe de CHS avec la naringenin, proche de la chalcone normalement produite, mettant ainsi en évidence le positionnement du cycle formé à partir de la chaîne polyketidique.

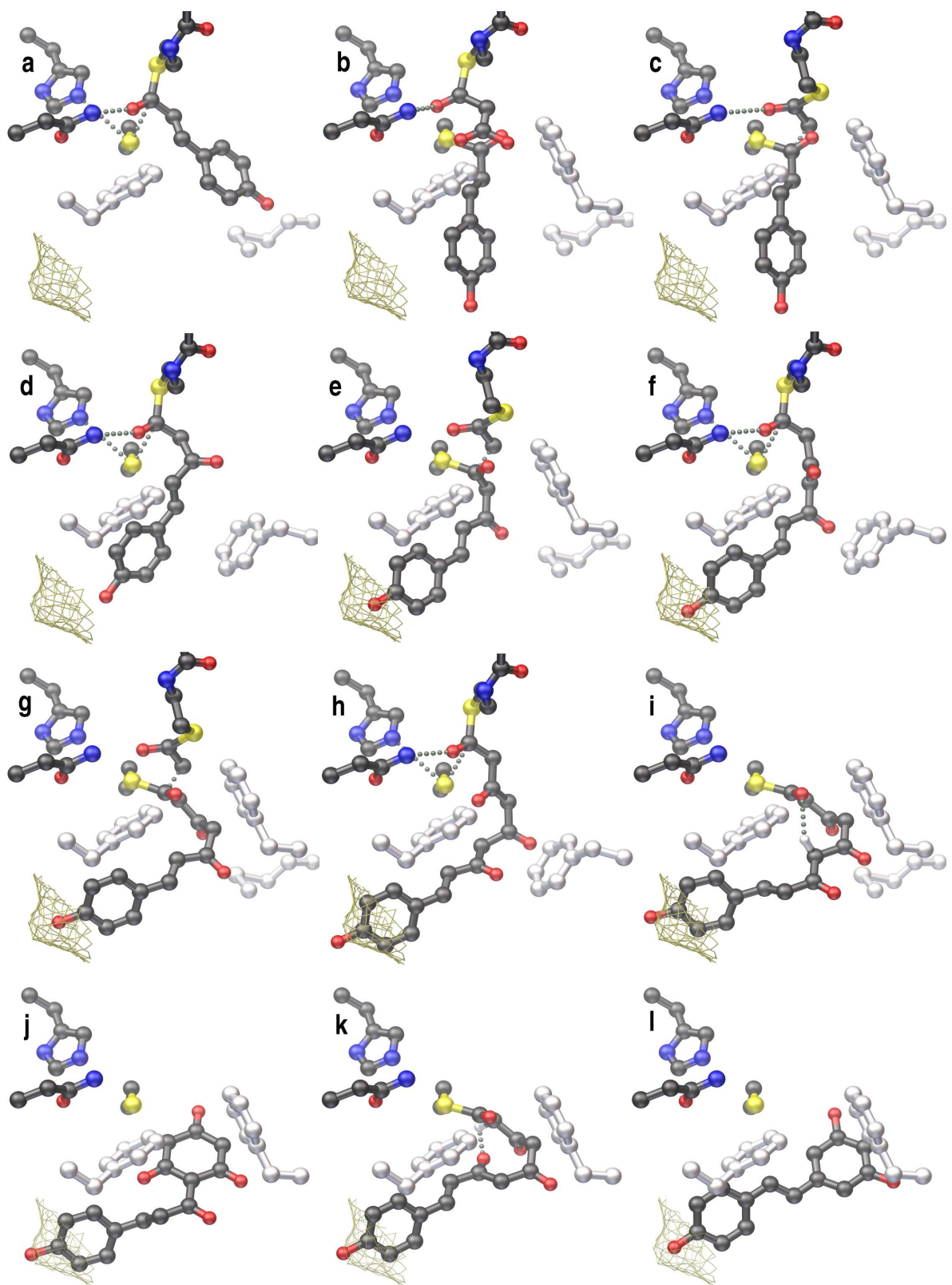


Figure 18 : modélisation structurale de l'enchaînement des étapes réactionnelles de CHS (a-j). Variante de la dernière étape dans le cas de STS (k,l)

2.2.4 Prédiction et classification

Outre la compréhension de ce mécanisme réactionnel, un autre apport de cette structure a été une meilleure compréhension de la spécificité des enzymes de la famille des CHS et STS. Il a ainsi été possible de reprendre la classification de ces enzymes, non plus sur la base des identités de séquence, peu fiables tant ces enzymes sont proches, mais plutôt en s'appuyant sur la conservation des résidus importants pour la sélectivité vis à vis du substrat et les modifications finales apportées au produit.

Ainsi, la modélisation structurale à partir de CHS, d'enzymes dont seule la séquence est connue a permis d'évaluer la taille des différents compartiments du site actif. De cette façon, il a été possible de prédire que l'enzyme dénommée GCHS2 de *Gerbera hybrida* ne pouvait être une chalcone synthétase, mais produisait plus vraisemblablement une molécule plus petite obtenue après condensation de deux, et non trois, molécules de malonyl (Fig. 19). Ceci a pu être établi sur la base d'une modélisation effectuée avec le programme Modeler (Sali *et al.*, 1993), et d'un calcul du volume de la cavité du site actif. Depuis, nous avons déterminé la structure de GCHS2 et confirmé ce résultat. Dans un même temps, l'équipe du Prof. J. Schröder a caractérisé chimiquement la molécule produite, qui se trouve être une pyrone (Eckermann *et al.*, 1998). Cette enzyme sera donc désignée dans la suite sous le nom de pyrone synthétase (PS).

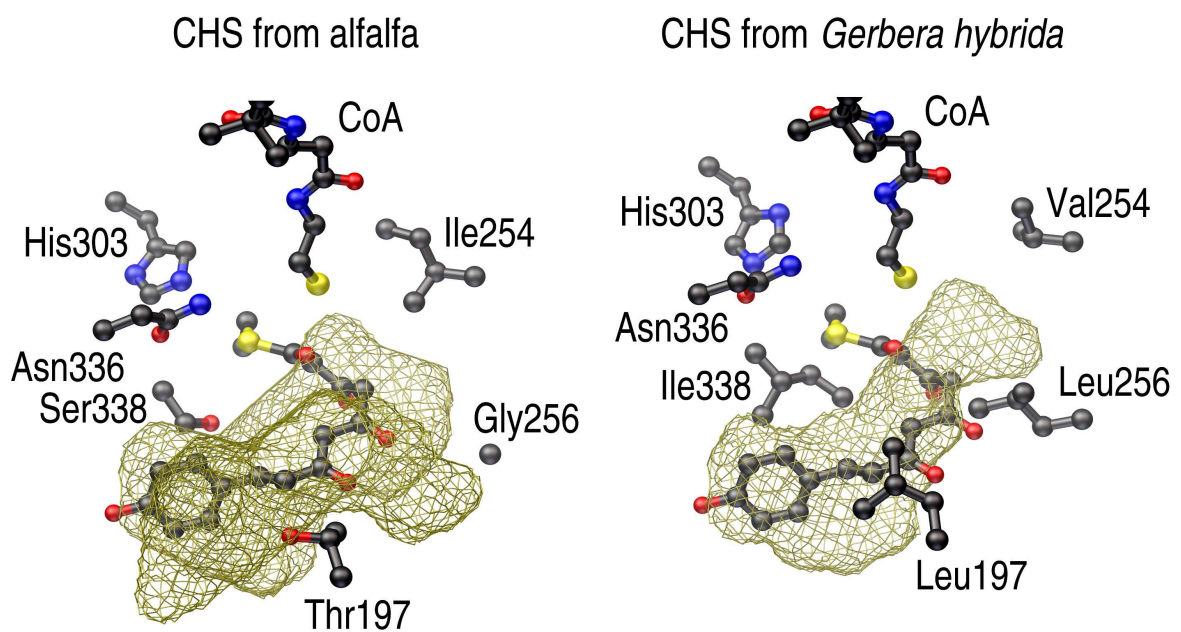


Figure 19 : cavité prédite de GCHS2 de *Gerbera hybrida* (à droite) comparée à celle de CHS (à gauche). On note que la chaîne obtenue après trois condensations ne peut se loger dans le volume disponible au niveau du site actif.

2.3 La voie de synthèse de la lignine

2.3.1 Généralités

Les lignans, de petits composés polyphénoliques, et la lignine, un polymère phénolique hautement réticulé, sont, chez les plantes terrestres, des produits importants du métabolisme secondaire. L'évolution de leur voie biosynthétique s'est faite parallèlement à celle des plantes vasculaires primitives. Les lignans, utilisés par les plantes comme substances défensives, sont obtenus par dimérisation des monolignols. Ces derniers sont également les précurseurs de la lignine qui fournit le support structural et constitue une partie des tissus de transport et des éléments tracheïques critiques pour le développement des plantes supérieures et de leurs ancêtres aquatiques. La lignine sert également de barrière physique induite lors des infections par des organismes pathogènes (Vance *et al.*, 1980) et est, après la cellulose, la deuxième substance naturelle la plus abondante.

La production des lignans et de la lignine constitue une branche de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes. Elle implique l'hydroxylation et la méthylation successives du cycle phénolique de l'acide cinnamique. Ces modifications se produisent sur l'acide libre ou sur sa forme thio-ester avec la coenzyme A (CoA). On obtient ainsi, après réduction, les trois composants de base : les monolignols (alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique). Ces composés sont à la fois instables et toxiques pour la cellule végétale. De ce fait ils sont stockés, et probablement transportés, sous une forme glycosilée (Whetten *et al.*, 1995). Une partie de ces monolignols est assemblée dans la cellule pour former les lignans. La plus grande partie est exportée vers la paroi cellulaire où elle forme la lignine par polymérisation sous la forme d'un réseau racémique. La polymérisation des lignans et de la lignine implique la formation de radicaux, avec la participation de laccases et de peroxydases respectivement.

La méthylation des groupes d'hydroxyle du cycle phénolique est un point important car, en réduisant la réactivité de ces groupes, elle commande les proportions des trois monolignols dans les produits finaux, et donc leurs propriétés chimiques et mécaniques. Parmi ces monomères – l'alcool *p*-coumarylique (unité H), l'alcool coniférylique (unité G) et l'alcool sinapylique (unité S) – seules les unités G et S sont présentes dans des proportions élevées dans la lignine des dicotylédons. Les unités G conduisent généralement à un degré plus élevé de liaisons diphényle et carbone-carbone tandis que des unités S sont plus souvent liées par des liaisons éther plus labiles. Plus le rapport S/G est bas, plus l'extractibilité de la lignine est faible et plus la densité de carbone est haute. Par conséquent, un bois présentant un rapport S/G accru et un contenu réduit en lignine devrait présenter une valeur économique accrue pour l'industrie du papier (Pilate *et al.*, 2002). Une valeur S/G élevée a également un impact positif sur la digestibilité des plantes lorsqu'elles sont utilisées comme plantes fourragères (Dixon *et al.*, 1996). A l'opposé, une réduction du rapport S/G améliore sa valeur calorifique en augmentant sa densité en carbone (White, 1987; Baucher *et al.*, 1998).

Deux O-méthyltransférases (OMTs) S-adenosyl-L-méthionine (SAM)-dépendantes sont impliquées au cours des étapes de méthylation : l'acide cafféique O-méthyltransférase (COMT) (Zubieta *et al.*, 2002) et la cafféoyl-CoA O-méthyltransférases (CCoAOMT). CCoAOMT a été isolée et caractérisée dans différentes plantes telles que la luzerne, la carotte, le persil, le tremble, le pin et le tabac. Bien que l'identification du substrat de COMT ait été rendue difficile du fait de son activité peu spécifique, il a cependant pu être établi que la synthèse des monolignols suit une grille métabolique, avec un certain nombre de voies parallèles et redondantes (Humphreys *et al.*, 1999; voir Fig. 20). Les étapes de méthylation lors de la synthèse de la lignine semblent suivre deux branches principales utilisant COMT et CCoAOMT respectivement (Fig. 20). *In vitro*, COMT méthyle les acides libres cafféoyl et 5-hydroxyféruloyl, ainsi que les aldéhydes et les alcools, avec une préférence pour les composés 5-hydroxylaté,

tandis que CCoAOMT méthyle les thio-esters cafféoyl-CoA et 5-hydroxyfêruloyl-CoA avec une préférence cinétique *in vitro* pour le cafféoyl-CoA (Parvathi *et al.*, 2001). On a également observé l'activité de COMT sur le thio-ester 5-hydroxyfêruloyl-CoA (Lapierre *et al.*, 1999), faisant de COMT autant que de CCoAOMT les responsables de la production des unités S. Le thio-ester est finalement clivé et réduit dans des étapes successives pour former l'aldéhyde et l'alcool substitué.

La réduction de l'activité de COMT par des méthodes transgéniques conduit à une forte diminution de la teneur en syringyl de la lignine, sans diminution de la teneur globale en lignine des plantes (Atanassova *et al.*, 1995; Doorselaere *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 2001). Ces résultats montrent que COMT est la principale 5-hydroxyl méthyltransférase chez la plante. En raison de la teneur inchangée en lignine et de la proportion plus élevée en unités guaiacyl, on peut supposer que CCoAOMT constitue une voie de biosynthèse de la lignine parallèle principalement responsable de la synthèse des unités de guaiacyl (Zhong *et al.*, 1998). Cependant, *in vitro*, une affinité réduite de CCoAOMT pour 5-hydroxyfêruloyl-CoA, comparée à celle pour cafféoyl-CoA, n'explique pas l'importante réduction en monomère de syringyl précédemment décrite. Elle suggère plutôt une activité réduite de l'hydroxycinnamate:CoA ligase envers l'acide sinapique, un manque d'accès au substrat de 5-hydroxyfêruloyl-CoA (Zhong *et al.*, 1998) ou un profil cinétique nettement différent pour CCoAOMT *in vivo*. Ainsi, CCoAOMT peut méthyler 5-hydroxyfêruloyl-CoA et cafféoyl-CoA, tandis que la production d'acide fêrulique par la COMT, et ensuite la conversion en thio-ester 5-hydroxyfêruloyl, est un goulot d'étranglement qui empêche CCoAOMT de produire seule les unités de syringyl. À l'opposé, la répression de l'expression de CCoAOMT par ARN antisens conduit à des plantes présentant une réduction de la fraction de guaiacyl et de syringyl et une altération du développement (Zhong *et al.*, 1998; Pincon *et al.*, 2001).

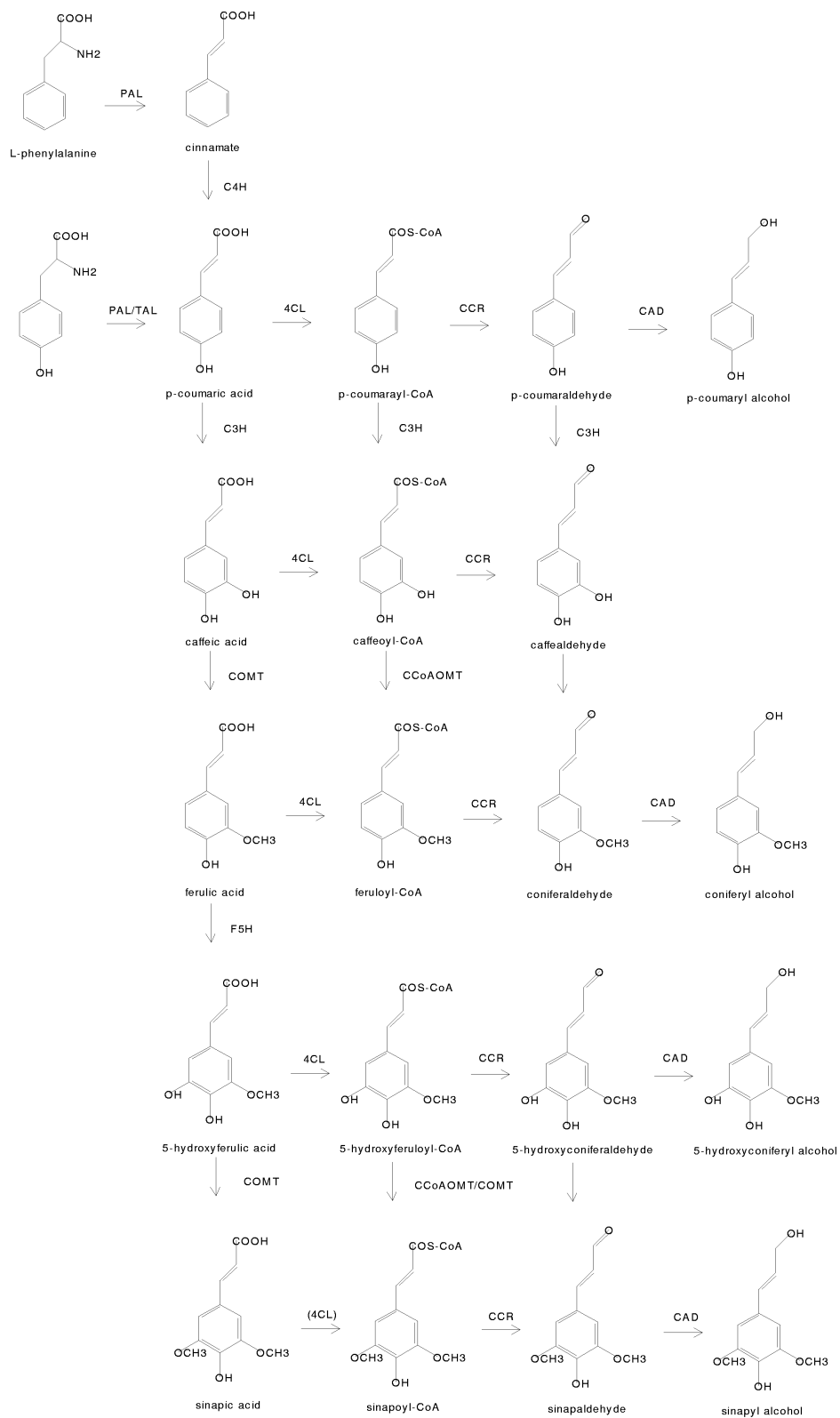


Figure 20 : grille métabolique de la synthèse de la lignine

L'analyse et la comparaison de la séquence primaire avec celle des autres OMTs de plantes démontre que COMT et CCoAOMT appartiennent à deux familles distinctes. La première famille comprend également deux autres OMTs de plante récemment caractérisées structurellement : l'isoflavone OMT de luzerne (IOMT, identité de séquence de l'ordre de 13% avec CCoAOMT de luzerne) et la chalcone OMT de luzerne (ChOMT, identité de l'ordre de 11% avec CCoAOMT de luzerne) (Zubieta *et al.*, 2001). La deuxième famille ne comprend que les OMTs de plantes qui montrent un degré élevé de spécificité pour les esters de CoA, avec une identité de séquence de l'ordre de 50% à 90%. Le groupe le plus proche de cette famille, sur la base de l'identité de séquence, est le groupe des catéchol OMTs (CatOMTs) d'animaux (Fig. 21). La CatOMT (celle de rat présente une identité de séquence de 19% avec CCoAOMT de luzerne) a déjà été structurellement caractérisée (Vidgren *et al.*, 1994) et employée pour modéliser la structure de CCoAOMT (Hoffmann *et al.*, 2001). Un autre groupe de transférases étroitement liées aux CCoAOMT de plante inclut des enzymes responsables de la méthylation des macrolides, telles que la macrolide 4-O-méthyltransférase (MaOMT, identité de séquence de 37% avec CCoAOMT de luzerne) chez *Streptomyces mycarofaciens* (Hara et Hutchinson, 1992) et la macrolide 8-O-méthyltransférase (Ma8OMT, identité d'ordre de 10% avec CCoAOMT de luzerne) chez *Streptomyces glaucescens* (Summers *et al.*, 1992). Les macrolides sont des polyketides produits dans les bactéries par des polyketide synthétases modulaires (Xue *et al.*, 1998) et modifiées par des enzymes post-polyketide telles que MaOMT et Ma8OMT, produisant ainsi une vaste famille de produits naturels ayant des propriétés antibiotiques. Les gènes codant pour MaOMT (réf. Q00719) et Ma8OMT (réf. P39896) sont des membres de groupes de gènes impliqués dans la production et la modification du midecamycin et du tétracenomycin C, deux importants macrolides.

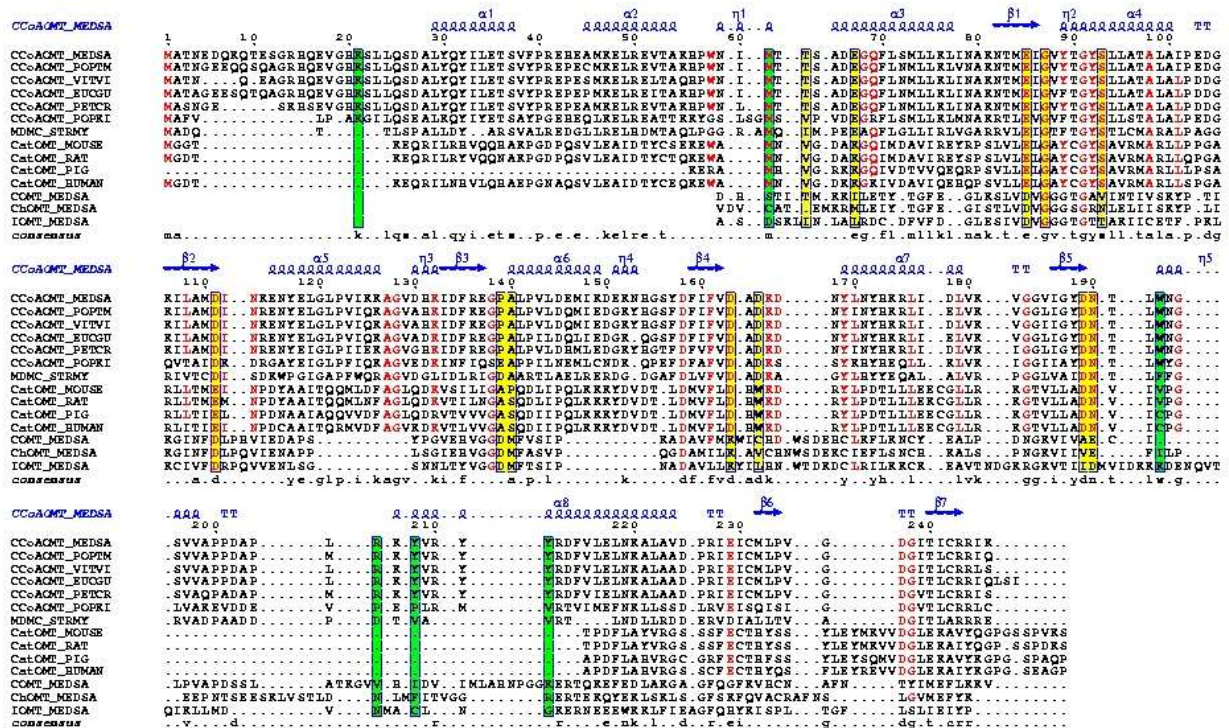


Figure 21 : alignement de séquence de CCoAOMT avec les OMTs proches, incluant cinq OMTs de plante ayant une préférence pour les esters de CoA, une 3-O-acyltransférase de *Streptomyces mycarofaciens*, la partie soluble de quatre CatOMTs d’animaux, dont la CatOMT de rat déjà caractérisée structurellement (référence Protein Data Bank : 1VID), et trois OMTs de plante également déjà caractérisées structurellement (COMT de luzerne, ChOMT et IOMT, avec pour référence PDB respectives : 1KYZ, 1FPQ et 1FPX) dont les séquences sont tronquées à la partie s’alignant avec celle de CCoAOMT. Les structures secondaires de CCoAOMT sont représentées au dessus et la séquence consensus pour la famille CCoAOMT sous l’alignement. Les résidus fortement conservés entre CCoAOMT et la famille des CatOMT sont représentés en rouge. Les résidus impliqués dans la fixation de l’atome métallique et du cofacteur sont représentés sur un fond jaune. Les résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat sont représentés sur un fond vert. Cette figure a été préparée avec ESPript (Gouet *et al.*, 1999) et corrigée afin d’inclure les informations structurales disponibles.

2.3.2 Structure de CCoAOMT

CCoAOMT de luzerne est une protéine de 28 kDa avec 247 acides aminés (réf. EC 2.1.1.104; Inoue *et al.*, 1998) formant un dimère en solution. La structure cristallographique obtenue à 2.45 Å de résolution (2.65 Å avec le substrat) par la méthode MAD (tableau 1) montre le dimère observé en solution (Fig. 22). En raison de l'absence dans CCoAOMT du domaine de dimérisation en N-terminal précédemment caractérisé dans les autres OMTs de plante, l'interaction entre les monomères s'effectue d'une manière complètement différente, impliquant les résidus 26–40, 66–78 et 212–226 dans des interactions essentiellement hydrophobes. Les 20 premiers résidus ne sont pas visibles dans la carte de densité : ils étaient déjà supposés subir des changements de conformation lors de la fixation du substrat (Hoffman *et al.*, 2001)..

| data set | | | | |
|-----------------------|--------|-------------|-------------|-----------------------|
| données | | | | |
| échantillon | Native | données MAD | cafféoy–CoA | 5–hydroxyféruloyl–CoA |
| résolution (Å) | 2.45 | 3.04 | 2.65 | 2.70 |
| complétude (%) | 94.6 | 93.5 | 85.7 | 94.2 |
| R _{sym} (%)* | 6.0 | 6.7 | 6.3 | 7.6 |
| redondance | 3.1 | 1.4 | 2.3 | 2.0 |
| affinement | | | | |
| R fact. (%) | 26 | | 24 | 24 |
| R free (%) | 30 | | 29 | 29 |

*R_{sym} = $\sum |I_h - \langle I_h \rangle| / \sum I_h$, où $\langle I_h \rangle$ est l'intensité moyenne des réflexions symétriques.

Tableau 1 : statistiques du traitement des données cristallographiques. Les données natives ont été collectées à SSRL sur la ligne 9.2. Les données MAD et celles des dérivés cafféoyl–CoA (resp. féruloyl–CoA) ont été collectées à l'ESRF sur la ligne FIP–BM30A. Les données ont été réduites avec la suite HKL (Otwinowski *et al.*, 1997) en combinaison avec le programme PROW (Bourgeois, 1999). L'affinement a été réalisé avec le programme CNS.

Chaque monomère est composé d'un domaine catalytique unique. Ce domaine présente une structure de type "noyau α/β de Rossmann", constituant le site de fixation de SAM/SAH (SAH: S-adénosine-L-homocystéine) (Rossmann *et al.*, 1974). Cette caractéristique est universellement partagée par toutes les OMTs SAM-dépendantes structurellement caractérisées : la partie adénine de SAM/SAH établit des liaisons hydrogène avec Asp165 et la chaîne principale entre Pro139 et Ala140, les hydroxyles du ribose avec Asp111, le groupe amine terminal de la méthionine avec Gly87 et Ser93, et le carboxylate terminal forme un réseau de liaisons hydrogène avec Ser93 et une molécule d'eau. Enfin, l'extrémité aminée forme un pont salin avec Glu85.

On observe une faible densité dans le site actif pour des cristaux trempés en présence du cafféoyl-CoA et 5-hydroxyfêruloyl-CoA respectivement. La densité est cependant suffisante pour la modélisation du substrat phénolique pour une des quatre molécules par unité asymétrique. Peu d'information est présente pour la modélisation correcte de l'extrémité de CoA, qui semble fortement désordonnée, se prolongeant hors du site actif selon plusieurs cheminements. La densité la plus nette, utilisée pour sa modélisation, suggère que les résidus de surface Arg206 et Lys21 interagissent avec le groupe 3'-phosphate négativement chargé de la partie adénosine 3'-5'-diphosphate. Les résidus impliqués dans la fixation du substrat phénolique se situent, pour la plupart, dans la partie C-terminal. Il s'agit principalement de Met61, Asp163, Asn190 plus un ensemble de résidus aromatiques comprenant Tyr208, Tyr212 et Trp193. Chaque substrat n'interagit qu'avec un seul partenaire du dimère de CCoAOMT, à la différence des autres OMTs de plante dont les deux partenaires contribuent à chaque site actif (Zubieta *et al.*, 2001; Zubieta *et al.*, 2002). L'absence du domaine responsable de l'interaction du substrat avec le monomère opposé (Schröder *et al.*, 2001) suggère un mode de sélection du substrat radicalement différent des autres OMTs de plantes.

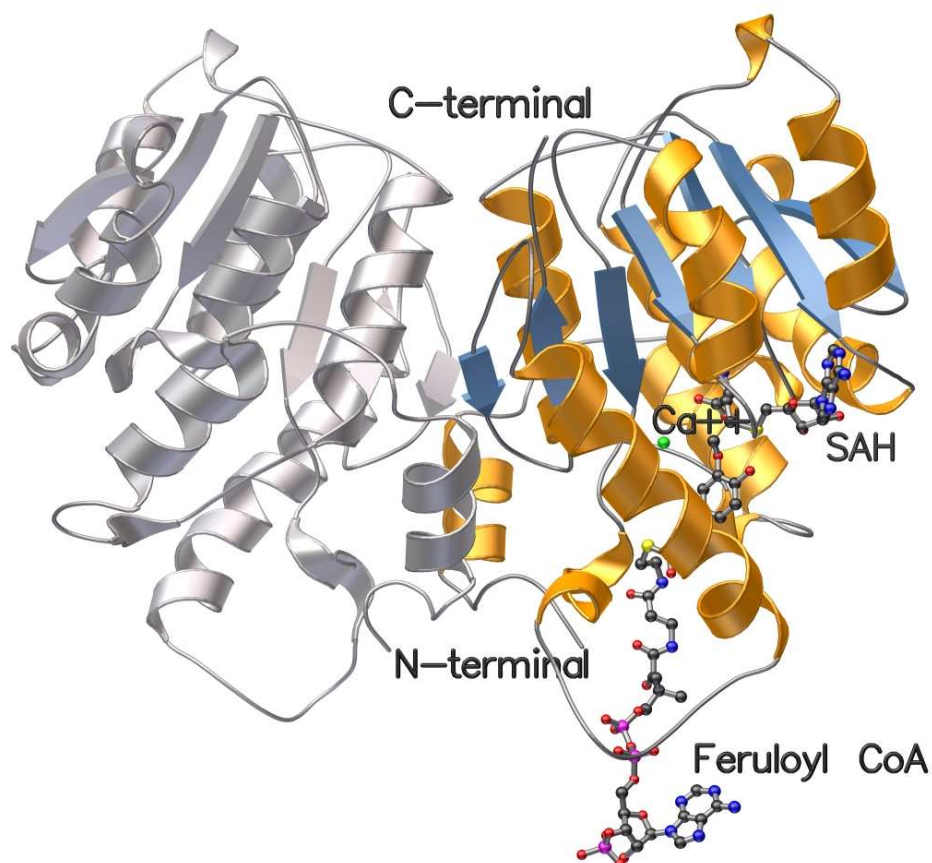


Figure 22 : structure tridimensionnelle de CCoAOMT. Cette figure a été réalisée avec MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) et POV-RAY (<http://www.povray.org>).

La densité électronique a révélé la présence d'un atome de calcium dans le site actif, entouré par une coordination octaédrique. Les atomes d'oxygène des chaînes latérales de Thr63, Glu67, Asp163, Asp189, et Asn190 sont impliqués dans la chélation de cet atome de calcium, complétée par le groupe 3-hydroxyl de cafféoyl-CoA (résp. 5-hydroxyferuloyl-CoA) et par une molécule d'eau. Cet atome de calcium substitue l'atome de Mg^{++} prévu à cette position et est également présent dans la structure du CatOMT avec la même coordination. Cet atome est impliqué dans un mécanisme catalytique semblable à celui du CatOMT (Vidgren *et al.*, 1994; Ibrahim *et al.*, 1998) : dans CCoAOMT, il intervient dans la déprotonation du groupement 3-hydroxyl du cafféoyl et maintient ce groupe à proximité du groupe méthylique réactif de SAM (~ 3 Å) lors de la transméthylation.

2.3.3 Comparaison des structures de CCoAOMT et CatOMT

La superposition tridimensionnelle des structures de CCoAOMT et de CatOMT (Fig. 23) montre un niveau élevé de similitude dans le coeur de l'enzyme, en dépit de la faible homologie de séquence. Basé sur l'alignement de structure exécuté avec le serveur DALI, la distance moyenne entre les 183 carbones alpha est de 2.4 Å rms. La partie la mieux conservée est le site catalytique, et en particulier l'environnement de l'ion métallique et le site de fixation de SAM/SAH. L'aspect global, la fixation du substrat et le rôle d'un atome de métal dans le mécanisme catalytique font de CCoAOMT une enzyme structurellement très semblable à la CatOMT. Cependant, les deux enzymes adoptent différents états d'oligomérisation. Tandis que CCoAOMT est un dimère, la forme soluble de la CatOMT de mammifère est monomérique. Le dimère de CCoAOMT n'est probablement pas directement nécessaire pour la transméthylation, à la différence des autres OMTs de plante. D'autres différences entre CCoAOMT et CatOMT sont visibles au niveau du site de fixation de CoA, des résidus en N-terminal et de la boucle Val197 à Lys207, riche en proline, de CCoAOMT. Ces différences sont probablement liées à la spécificité de CCoAOMT pour le substrat thio-ester.

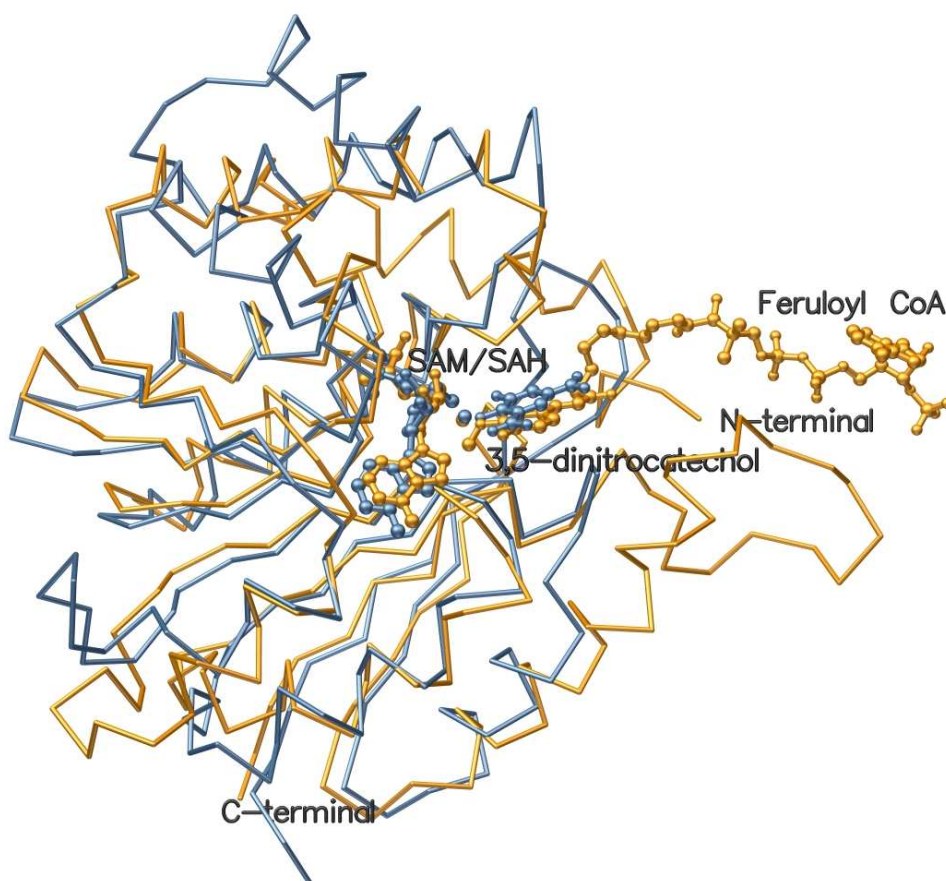


Figure 23 : superposition des structures de CCoAOMT (en bleu) et CatOMT (en jaune). Cette figure a été réalisée avec MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) et POV-RAY (<http://www.povray.org>).

Au vu de la structure de CCoAOMT et de la comparaison avec CatOMT, nous pouvons suggérer un mécanisme catalytique basé sur le déprotonation métal-dépendante du groupe 3-hydroxyl du cafféoyl suivi de la transméthylation. L'environnement autour de la partie 3-hydroxyl du cafféoyl est électropositif du fait de l'atome de soufre positivement chargé du SAM et de l'ion Ca^{++} . Très probablement, le groupe 3-hydroxyl du cafféoyl est déprotoné afin d'aider à équilibrer la charge de l'environnement du site actif. La chélation de l'ion métallique permet ensuite de positionner le groupe 3-hydroxyl à proximité du groupe méthyle réactif de SAM ($\sim 3 \text{ \AA}$). Ce mécanisme catalytique métal-dépendant est également celui supposé pour la CatOMT de mammifère et les méthyltransférases apparentées (Vidgren *et al.*, 1994; Ibrahim *et al.*, 1998). Les analyses comparant l'activité spécifique de CCoAOMT en présence des cations

bivalents Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} et Zn^{++} confirment l'importance du rôle catalytique de l'ion métallique (tableau 2). Tous les ions métalliques donnent une activité méthyltransférase, avec Ca^{++} , Mg^{++} , et Zn^{++} donnant 100% de l'activité de l'enzyme sauvage. Cependant, lorsque l'atome de métal est substitué par Mn^{++} , on ne retrouve plus que ~35% de cette activité. L'activité réduite en présence de Mn^{++} peut être expliquée par l'énergie de liaison plus élevée de Mn^{++} par rapport à Ca^{++} et à Mg^{++} . Ainsi, le manganèse pourrait lier la partie 3-hydroxyl du substrat plus fortement, empêchant ensuite la réaction de transméthylation.

Le rôle des résidus précédemment signalés comme important pour l'activité enzymatique peut être maintenant analysé sur la base de la structure de CCoAOMT. Les conclusions actuelles sont loin de celles obtenues à partir de l'alignement de séquence avec la CatOMT de rat (Hoffman *et al.*, 2001) : la réduction d'activité lors de la mutation de Asp66 et Gln69 est essentiellement due à la proximité de ces résidus avec Thr63, ce dernier étant impliqué dans la fixation de l'atome de métal, et avec Met61 impliqués dans la fixation de substrat. La perte totale d'activité observée lors de la mutation de Arg228, situé loin du site actif et des substrats, montre seulement le rôle structural de ce résidu.

| | Activity (% of wild type) |
|---------------------------------|---------------------------|
| CCoAOMT | 100 |
| CCoAOMT + 5 mM EDTA | 15 |
| CCoAOMT + 1 mM Ca^{++} | 100 |
| CCoAOMT + 1 mM Mg^{++} | 100 |
| CCoAOMT + 1 mM Zn^{++} | 100 |
| CCoAOMT + 1 mM Mn^{++} | 35 |

Tableau 2 : première ligne : CCoAOMT sans traitement à l'EDTA; seconde ligne : CCoAOMT après dialyse en présence de 5 mM d'EDTA; lignes 3–6 : après traitement EDTA et ajout de 1 mM de l'ion métallique concerné. Ces essais ont été réalisés avec 0.1 mM de cafféoyl-CoA et 200 mM de SAM marqué au C^{14} .

2.4 Vers la construction de nouveaux produits

Le présent chapitre décrit le projet de résolution systématique de structures (Génomique Structurale) initié par le Prof. J. P. Noel (The Salk Institute / Structural Biology Laboratory, San Diego, USA). L'objet de ce projet est la compréhension et la maîtrise du métabolisme de transformation de la phénylalanine chez les plantes. En effet, les molécules produites par ce métabolisme présentent de nombreuses applications médicales et agro-alimentaires. On peut citer par exemple les transporteurs ABC non spécifiques, responsables de l'expulsion par les cellules des petites molécules hydrophobes, et en particulier des composés administrés lors d'une chimiothérapie, rendant ce traitement inefficace. Certains flavonoïdes ont la propriété de se positionner sur le site de fixation du substrat tout en bloquant l'activité ATPase du transporteur. Ils constituent d'excellents inhibiteurs. Établir des bibliothèques de produits proches, pouvant présenter une meilleure affinité, est donc d'un grand intérêt.

Afin de pouvoir disposer en quantité de molécules de ce type, il conviendrait de connaître et de maîtriser *in vitro* la cascade réactionnelle conduisant aux principaux groupes de ces composés. Aussi avons nous entrepris l'étude structurale de l'ensemble des enzymes clés du métabolisme des phénylpropanoïdes. Cette connaissance devrait ouvrir la voie à des modifications, par mutagenèse, afin d'obtenir les produits désirés.

2.4.1 Les connaissances déjà acquises

Actuellement nous travaillons, au niveau de l'activation du substrat, sur l'obtention de cristaux de phénylalanine ammonium liase (PAL) et de l'acide coumarique:CoA ligase (4CL).

Dans la branche du métabolisme conduisant à la synthèse de la lignine, nous avons mené l'étude structurale de l'acide cafféique 3-O-méthyltransférase (COMT) et de cafféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT), qui jouent un rôle clef dans la synthèse de la lignine.

Par ailleurs nous disposons déjà, au niveau de la synthèse du polikétide, de la structure de CHS, de PS et de STS, ainsi que de cristaux d'acide *p*-coumaroyltriacétique synthétase (CTAS) (Akiyama *et al.* 1999) dont nous essayons d'améliorer la qualité.

Enfin, au niveau de la transformation du produit final, nous avons pu élucider les structures de CHI et CHR. Nous essayons également d'obtenir des complexes de CHI avec différents inhibiteurs. Par ailleurs, nous disposons de la structure de l'isoliquiritigénine 2'-O-méthyltransférase (ChOMT; Zubieta *et al.*, 2001) qui méthyle le groupe hydroxyle en 2' de la 4,2',4'-trihydroxychalcone (déoxychalcone). Cette réaction se produit exclusivement dans les racines des légumineuses où le produit méthylé joue le rôle d'inducteur du gène *nod* lors de la fixation de l'azote par la bactérie *rhizobia* (Maxwell *et al.*, 1993). Nous disposons également de la structure de la daidzène 4'-O-méthyltransférase (IOMT; Zubieta *et al.*, 2001), enzyme qui méthyle le groupe hydroxyle en 4' de la 7,4'-dihydroxyisoflavone (daidzéine). Cette méthylation sert de régulation à la production d'agents anti-microbiens (phytoalexines) tels que la medicarpine.

L'état d'avancement actuel est résumé par la figure 24.

2.4.2 Les objectifs

Une fois la maîtrise des réactions clefs acquise, on pourrait envisager de les modifier à volonté. Dans cette approche, les PKS de type III jouent un rôle central. Une étape importante, si l'on veut étendre la diversité des produits de ces enzymes, serait la fabrication de l'ossature du polykétide à la longueur souhaitée en modulant la forme du site actif de ces PKS. Cette stratégie est apparue lors de

l'étude structurale de PS, à l'occasion de laquelle il a été mis en évidence que la taille réduite de son site actif était la principale cause de la synthèse d'un produit final plus petit, en raison du nombre plus restreint de ketides que PS peut polymériser. On peut donc envisager des mutations de résidus ciblés du site actif afin d'obtenir un produit particulier, en conjonction avec l'utilisation de substrats spécifiques. Cette approche a toutefois été mise à mal par l'étude des différences entre CHS et STS. En effet, nous avons pu changer l'activité CHS en STS par la modification de résidus éloignés du site actif, avec des conséquences subtiles pour la stéréochimie mais notables sur les interactions entre résidus de ce site actif.

En s'appuyant sur les connaissances acquises lors de ces deux études structurales, on peut dégager une troisième approche. Ce travail a en effet permis d'établir une liste de résidus importants pour la sélectivité envers le substrat et le type de produit final. Cette liste, que la seule analyse des séquences de ces enzymes n'aurait pas permis d'établir, peut être utilisée lors d'une étude systématique, du type mutagenèse combinatoire. La réduction de la combinatoire obtenue en se restreignant à la liste précédemment établie, par rapport à une mutagenèse totalement en aveugle, couplée à l'utilisation de robots de clonage et de purification, rend cette approche réaliste. L'étude structurale des mutants d'intérêt, et de leurs complexes avec des analogues de substrats et de produit final, par une approche de type "génomique structurale" est également envisageable afin de continuer à acquérir des connaissances sur ces PKS. On espère ainsi, au fur et à mesure de l'avancement de cette étude, pouvoir prédire de plus en plus précisément l'effet des mutations ultérieures. Au départ systématique, cette approche devrait ainsi progressivement se rationaliser.

La seconde étape consisterait à utiliser les enzymes en amont et en aval, sous leur forme native ou après mutation, afin de modifier le produit final au gré des besoins. La aussi, et en particulier pour 4CL, la modification du site actif sur des bases structurales devrait permettre l'activation de nouveaux substrats utilisables ensuite par une PKS modifiée.

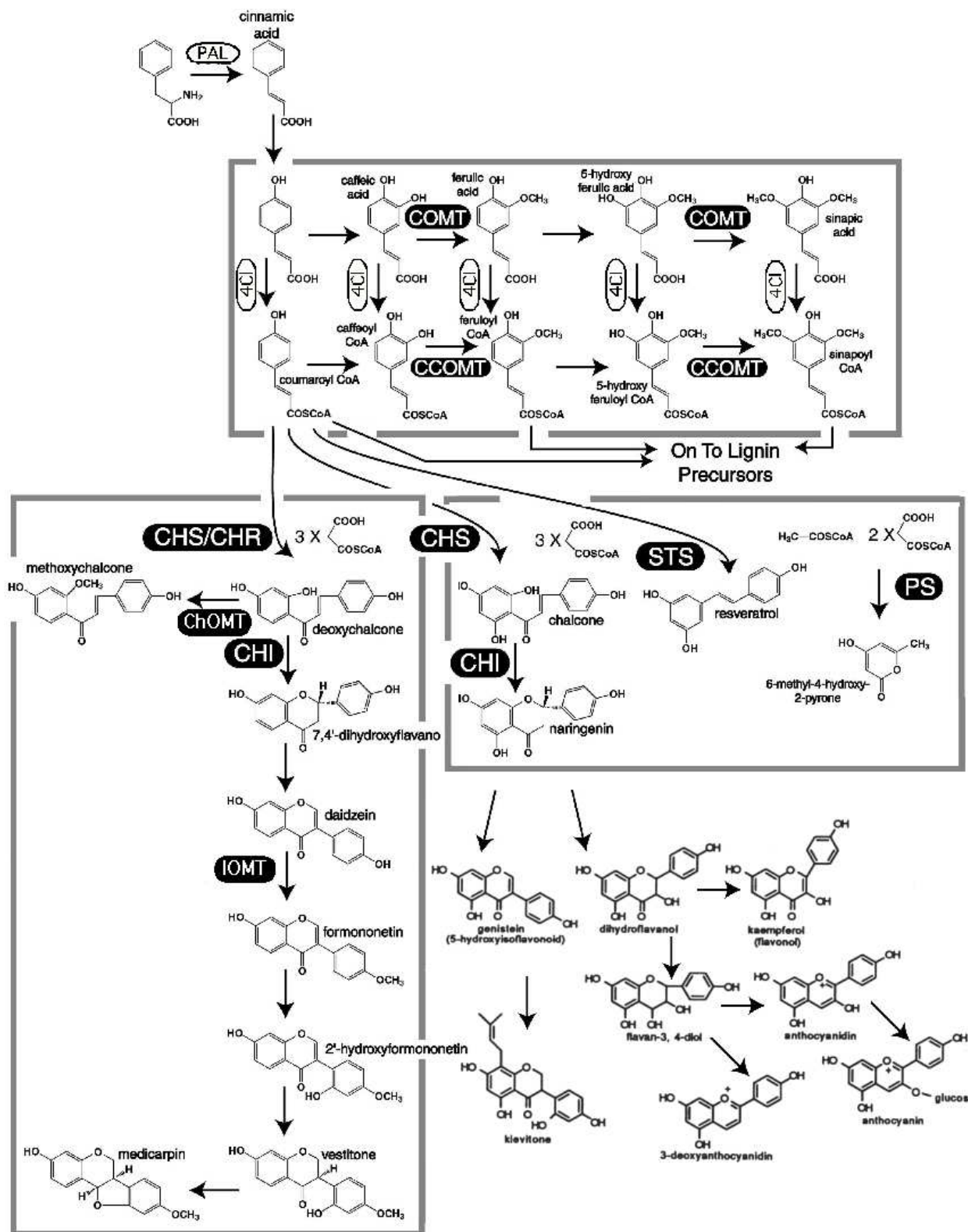


Figure 24 : enzymes du métabolisme de la phénylalanine à étudier (blanc sur fond noir : structures déjà résolues; noir sur fond blanc : projet en cours).

2.4.3 Les moyens

Compte tenu du nombre de structures à considérer, il ne s'agit pas seulement de la juxtaposition d'un grand nombre d'études reliées par une même thématique, mais bien d'une étude systématique et rationnelle nécessitant d'établir des protocoles standardisés.

Dans ce but, de vastes collaborations ont été mises en place afin d'assurer le partage le plus efficace possible des différentes tâches. Ainsi, les gènes des protéines à étudier sont fournis par le laboratoire de Dr. R. A. Dixon (Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation, P. O. Box 2180, Ardmore, O 73402, USA) et, pour certains d'entre eux, par le groupe du Prof. J. Schröder (Institut für Biologie II, Biochemie der Pflanzen, Schänzlestr.1, D-79104 Freiburg, Germany). Le laboratoire du Prof. J. P. Noel (The Salk Institute, Structural Biology Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, CA 92037, USA) se charge d'insérer le gène dans un plasmide "maison" (pHIS8, dérivé de pET-28a(+)) de Novagen). Les protéines sont produites dans *E. coli*, purifiées par colonne d'affinité suivie éventuellement par une gel-filtration. Enfin, la cristallisation est réalisée à partir d'une bibliothèque de 2400 conditions (Tableau 3), déjà constituée et testée avec succès dans le cas de CHS, PS et STS.

Les cristaux, montés sur des boucles Hampton, sont envoyés au LCCP/GSY, dans des containers cryogéniques secs. Ce mode de transport a été testé avec succès. La dernière étape, qui échoit au LCCP/GSY, sera la collecte de données sur la ligne FIP à l'ESRF, classique ou MAD selon qu'une structure suffisamment proche a déjà été déterminée ou non, puis le traitement de ces données et la construction du modèle.

Structural Biology Laboratory Crystal Screen I

pH values – 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5, 8.5

100 Boxes
2400 Drops

| | | |
|--|---|--|
| PEG 20,000 – 5, 11, 17, 23 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.25 M ammonium bromide5 % (v/v) 1,3-propanediol0.20 M di-sodium tartrate0.20 M imidazole0.50 M magnesium nitrate0.40 M cesium sulfate | PEG 17,500 – 5, 11, 17, 23 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.30 M ammonium acetate0.20 M guanidine sulfate0.10 M zinc sulfate0.10 M sodium perchlorate monohydrate5 % (v/v) dimethylsulfoxide5 % (v/v) dioxane15 % (v/v) PEG 200 | PEGMME 5000 – 7, 14, 21, 28 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.30 M potassium nitrate0.10 M barium chloride0.20 M manganese chloride tetrahydrate0.10 M benzamidine hydrochloride0.05 M sodium cacodylate0.50 M cesium chloride10 % (v/v) 1,3-butanediol10 % (v/v) PEG400 |
| PEG 8000 – 7, 14, 21, 28 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">no additives2.0 M lithium chloride0.30 M ammonium acetate0.20 M magnesium chloride0.25 M lithium sulfate1.0 M sodium chloride0.20 M calcium acetate0.30 M sodium bromide0.25 M potassium thiocyanate | PEG 10,000 – 7, 14, 21, 28 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">2.5 M lithium nitrate0.20 M cadmium bromide tetrahydrate0.10 M guanidine thiocyanate0.10 M sodium persulfate0.05 M sodium cacodylate0.10 M tetramethylammonium bromide | PEGMME 2000 – 10, 20, 30, 40 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.20 M lithium sulfate0.50 M ammonium bromide0.20 M imidazole5 % (v/v) dimethylsulfoxide5 % (v/v) 1,5-pentanediol |
| PEG 4000 – 7, 14, 21, 28 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.30 M magnesium nitrate5 % (v/v) 2,5-hexanediol0.25 M guanidine hydrochloride0.10 M sodium sulfate0.30 M di-sodium tartrate0.10 M imidazole | PEG 3350 – 7, 14, 21, 28 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.30 M potassium chloride3.0 M cesium chloride0.20 M nickel chloride1.5 M ammonium nitrate0.05 M cobalt chloride hexahydrate0.15 mM aluminum chloride / 37.5 mM sodium fluoride | PEGMME 550 – 10, 20, 30, 40 % (v/v) <ol style="list-style-type: none">0.30 M cadmium bromide tetrahydrate5 % (v/v) dioxane0.20 M tri-sodium citrate dihydrate10 % (v/v) tert-butanol3.0 M lithium chloride |
| MPD (2-methyl-2,4-pentanediol) – 20, 30, 40, 50 % (v/v) <ol style="list-style-type: none">no additives0.50 M ammonium acetate0.10 M sodium chloride0.10 M sodium L-lactate0.30 M guanidine sulfate0.20 M tetramethylammonium formate0.20 M manganese chloride tetrahydrate0.25 M potassium iodide0.30 M lithium sulfate0.10 M zinc sulfate | Salt Precipitants <ol style="list-style-type: none">ammonium sulfate (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M)ammonium sulfate + 1 % (v/v) PEG 400 (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M)magnesium acetate (0.5, 1.1, 1.7, 2.3 M)sodium formate (3.5, 4.5, 5.5, 6.5 M)sodium chloride (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 M)magnesium sulfate (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M)ammonium bromide (0.7, 1.4, 2.1, 2.8 M)nickel chloride (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M)potassium iodide (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 M)lithium nitrate (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 M) | PEG 400 – 10, 20, 30, 40 % (v/v) <ol style="list-style-type: none">no additives1.0 M ammonium formate0.20 M magnesium sulfate0.10 M tetramethylammonium formate0.10 M sodium L-lactate0.10 M guanidine thiocyanate0.40 M potassium nitrate |
| 1,6-hexanediol – 20, 30, 40, 50 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">no additives0.50 M sodium formate0.30 M potassium nitrate0.10 M guanidine hydrochloride0.10 M sodium L-lactate | 1,3-butanediol – 10, 20, 30, 40 % (v/v) <ol style="list-style-type: none">0.20 M guanidine hydrochloride0.25 M barium chloride0.30 M benzamidine hydrochloride0.20 M tetramethylammonium iodide0.05 M cobalt chloride hexahydrate | PEG 1000 – 10, 20, 30, 40 % (w/v) <ol style="list-style-type: none">0.50 M potassium iodide0.40 M cesium sulfate0.25 M magnesium bromide5 % (v/v) tert-butanol0.3 M tri-sodium citrate dihydrate |

Tableau 3 : bibliothèque de conditions de cristallogénèse développée au Salk/SBL.

Le schéma précédent est cependant appliqué avec une certaine souplesse, afin de faire face à d'éventuelles surcharges (Tableau 4). Ainsi, nous serons amenés à

prendre en charge certaines opérations de biologie moléculaire (le LCCP dispose déjà des moyen adéquats), de biochimie ou de cristallogénèse. A l'opposé, si un grand nombre d'enzymes sont cristallisées au même moment, le SBL peut avoir recours à la ligne MAD (ligne 9.2) à SSRL. Les qualités de la source ne sont pas du niveau de celle de l'ESRF en terme de stabilité, mais une jouvence de la machine est en cours. Par ailleurs, elle dispose d'atouts certains, et en particulier d'un remarquable détecteur CCD et de moyens informatiques impressionnants voulus par l'ambitieux projet "Structural Genomics" américain.

A signaler que l'ensemble du temps de faisceau requis pour les expériences sur la ligne FIP fait l'objet de demandes auprès du comité de programme de la ligne.

| Resp. | moyens | gène | production | cristallisation | collecte | construction |
|---------------|---------------|-------------|-------------------|------------------------|-----------------|---------------------|
| Dixon | PBD | | | | | |
| Schröder | IBBP | | | | | |
| Noel | SBL | | | | | |
| | SSRL | | | | | |
| Ferrer | GSY | | | | | |
| | FIP | | | | | |

Tableau 4 : répartition des tâches dans le projet de résolution systématique de structures. Les attributions en rouges constituent le partage par défaut. Les réorganisations lors de surcharge de certaines étapes sont représentées en jaunes. Les noms des organisateurs du projet sont en gras [PBD : Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation (Dr. R. A. Dixon). IBBP : Institut für Biologie II, Biochemie der Pflanzen (Prof. Schröder). SBL : Structural Biology Laboratory (Prof. J. P. Noel, The Salk Institute), SSRL : Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, GSY : Groupe Synchrotron (Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel), FIP : ligne Française pour l'Investigation des Protéines].

Conclusion

Ces dernières années furent donc consacrées par le Groupe Synchrotron (GSY) de l'IBS à la construction des lignes de lumière françaises à l'ESRF, dédiées à la cristallographie des protéines. L'aboutissement de ce travail est la ligne FIP. C'est une ligne polyvalente, optimisée pour les expériences de Diffraction Anomale Multi-longueur d'onde (MAD). Entrée en service en juillet 1999, cette ligne a déjà pu accueillir plus d'une centaine d'expériences, et plusieurs structures ont pu être totalement résolues, dont certaines en quelques semaines grâce à la méthode MAD.

Dans le même temps, nous avons pu démarrer une activité plus orientée vers la biologie, en s'intéressant au métabolisme secondaire des plantes et en déterminant, à l'occasion d'échanges avec le Laboratoire de Biologie Structurale (SBL) de l'Institut Salk de San Diego, la structure de la Chalcone Synthétase (Ferrer *et al.*, 1999b; Jez *et al.*, 2000). Il s'agit là d'une enzyme centrale de ce métabolisme d'un grand intérêt dans les domaines médicaux et de l'agro-alimentaire.

Les développements de l'étude de ce métabolisme sont désormais menés dans le cadre d'une collaboration entre le SBL, différents laboratoires de biologie moléculaire, et moi-même au sein du Groupe Synchrotron de l'IBS. Ils aboutissent sur un vaste projet du type Genomique Structurale (GS), pour lequel la ligne FIP devrait être un élément majeur. Poussés par les besoins de ce projet et également par une demande croissante des utilisateurs dans ce sens, nous nous orientons désormais vers une automatisation plus importante de cette ligne.

Bibliographie

Abrahams J.P., and Leslie A.G.W. (1996). *Acta Cryst.* **D52**, 30–42.

Akiyama, T., Shibuya, M., Liu, H.M., and Ebizuka Y. (1999). p-Coumaroyltriacytic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*, *Eur J. Biochem.* **263**, 834–839.

Araki, M., Nanri, H., Ejima, K., Murasato, Y., Fujiwara, T., Nakashima, Y., and Ikeda, M. (1999). Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system, *J. Biol Chem* **274**, 2271–2278

Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.–T., Monties, B., Fritig, B., and Legrand, M. (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**, 465–477.

Bailey, J.A., Mansfield, J.W. (1982). *Phytoalexins*, John Wiley and Sons, New-York.

Baucher, M., Christensen, J.H., Meyermans, H., Chen, C., Doorselaere, J.V., Leplé, J.–C., Pilate, G., Petit–Conil, M., Jouanin, L., Chabbert, B., Monties, B., Montagu, M.V., and Boerjan, W. (1998). Applications of molecular genetics for biosynthesis of novel lignins. *Polymer degradation and stability* **59**, 47–52.

Bourgeois, D. (1999). New processing tools for weak and/or spatially overlapped macromolecular diffraction patterns. *Acta Cryst.* **D55**, 1733–1741.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.–S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.

Budayova–Spano, M., Lacroix, M., Thielens, N.M., Arlaud, G. Fontecilla, J.C. and Gaboriaud, C. (2002). *EMBO J.* **21**, 1–9.

Carpentier, P., Rossat, M., Charrault, P., Joly, J., Pirocchi, M., Ferrer, J.-L., Kaikati, O., and Roth, M. (2001). Synchrotron monochromator heating problem, cryogenic cooling solution, *Nucl. Instr. And Meth.* **A456**, 163–176.

Conseil, G., Baubichon–Cortay, H., Dayan, G., Jault, J.-M., Barron, D., and Di Pietro, A. (1998). Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP– and steroid–binding sites on mouse P–glycoprotein, *Proceeding of the Nat. Academy of Sciences* **95**, 9831–9836.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995). Stress induced phenylpropanoids, *The Plant Cell* **7**, 1085–1097.

Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. & Paiva, N.L. (1996). Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses –a review. *Gene* **179**, 61–71.

Doorselaere, J.V., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M.T., Petit–Conil, M., Leplé, J.C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., van Montagu, M., Inzé, D., Boerjan, W., and Jouanin, L. (1995). A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/ferulic acid O–methyltransferase activity. *Plant J.* **8**, 855–864

Eckermann, S., Schröder, G., Schmidt, J., Strack, D., Edrada, R.A., Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Kilpeläinen, I., Proksch, P., Teeri, T.H., and Schröder, J. (1998). A new pathway to polyketides in plants, *Nature* **396**, 387–390.

Edwards, M.L., Stemerick, D.M., and Sunkara, P.S. (1990). Chalcones: a new class of antimetabolic agents. *J. Med. Chem.* **33**, 1948–1954.

Ferrer, J.-L., Simon, J.-P., Berar, J.-F., Caillot, B., Fanchon, E., Kaikati, O., Arnaud, S., Guidotti, M., Pirocchi, M., Roth, M. (1998). D2AM, a beamline with a high intensity, point focusing, fixed exit monochromator for multiwavelength anomalous diffraction experiments, *J. of Synchrotron Radiation* **5**, 1346–1356.

Ferrer, J.-L. (1999a). Correction for the twist and the conical defects of a sagittally bent crystal, *Nuclear Instr. and Meth. in Phys. Res.* **A431**, 224–233.

Ferrer, J.-L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P. (1999b). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 775–784.

Ferrer, J.-L. (2001) Automated Data Processing on beamline FIP (BM30A). at ESRF. *Acta Cryst.* **D57**, 1752–1753.

Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. (1993a). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454–457.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E. (1993b). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341**, 1103–1104.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308

Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.-Y., and Jameson, J.L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14138–14143.

Hara, O. and Hutchinson, C.R. (1992). A macrolide 3-O-acyltransferase gene from the midecamycin-producing species *Streptomyces mycarofaciens*. *J. Bacteriol.* **174**, 5141–5144.

Hoffmann, L., Maury, S., Bergdoll, M., Thion, L., Erard, M., and Legrand, M. (2001). Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biol. Chem.* **276**, 36831–36838.

Hopkins, D.W., Webster, E.A. Chudek, J.A., and Halpin, C. (2001). Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis. *Soil Biology & Chemistry* **33**, 1455–1462.

Humphreys, J.M., Hemm, M.R., and Chapple, C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **96**, 10045–50.

Ibrahim, R.K., Bruneau, A., and Bantignies, B. (1998). Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1–10.

Inoue, K., Sewalt, V.J.H., Balance, G.M., Ni, W., Stürzer, C., and Dixon, R.A. (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol.* **117**, 761–770.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A.D., mehta, R.J., Moon, R.C., and Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218–220.

Jez, J.M., Austin, M.B., Ferrer, J.–L., Bowman, M.E., Schröder, J., Noel, J.P. (2000) Structural control of polyketide formation in plant polyketide synthases, *Chem. Biol.* **7**, 919–930.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1993). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. D* **49**, 148–157.

Junghanns, K.T., et al. (1995). molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* cell suspension cultures. *Plant Mol. Biol.* **27**, 681–692.

Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950.

La Fortelle, E. de, and Bricogne, G. (1997). *Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography* **276**, 472–494, edited by R.M. Sweet and C. W. Carter, Jr. New York : Academic Press.

Lapierre, C., Pollet, B., Petit–Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leplé, J.–C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadai, V., and Jouanin, L. (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O–methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* **119**, 153–163.

Li, R. *et al.* (1995). In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem.* **38**, 5031–5037.

Long, S. R. (1989) Rhizobium–legume nodulation, *Cell* **56**, 203–214.

Mathieu, M., Zeelen, J.P., Pauptit, R.A., Erdmann, R., Kunau, W.H., and Wierenga, R.K. (1994). The 2.8 Å crystal structure of peroxisomal 3–ketoacyl–CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: a five–layered alpha beta alpha beta alpha structure constructed from two core domains of identical topology. *Structure* **2**, 797–808.

Maxwell, C.A., Harrison, M.J., and Dixon, R.A. (1993). Molecular characterization and expression of alfalfa isoliquiritigenin 2'–O–

methyltransferase, an enzyme specifically involved in the biosynthesis of an inducer of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant J.* **4**, 971–981.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr.* **D53**, 240–255

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.

Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W., and Dixon, R.A. (2001). Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant J.* **25**, 193–202.

Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leplé, J.-C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D., and Halpin, C. (2002). Field en pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnologie* **20**, 607–612.

Pincon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M. (2001). Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* **57**, 1167–1176.

Preisig-Mueller, R., Gnau, P., and Kindl, H. (1995). The inducible 9,10-dihydrophenanthrene pathway: characterization and expression of bibenzyl synthase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 201–207.

Richard, S.B., Ferrer, J.-L., Bowman, M.E., Lillo, A.M., Tetzlaff, C.N., Cane, D.E., and Noel, J.P. (2002). Structure and Mechanism of 2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 8667–8672.

Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194–199.

Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charrault, P., Pirocchi, M., Kahn, R., Fanchon, E., Jacquamet, L., Borel, F., Bertoni, A., Israel-Gouy, P., and Ferrer, J.-L. (2002). FIP: a Highly Automated Beamline for Multiwavelength Anomalous Diffraction Experiments, *Acta . Cryst.* **D58**, 805–814.

Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815.

Seldrick, G.M. (1990). *Acta Crystallogr.* **A46**, 467–473.

Schröder, G., Brown, J.W.S., and Schroeder, J. (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* **172**, 161–169.

Schröder, J. (1997). A family of plant-specific polyketide synthases, *trends in plant science* **2**, 373–378.

Schröder, G., Wehinger, E., and Schröder, J. (2001) Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferase. *Phytochemistry* **59**, 1–8.

Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E., Motamedi, H., and Hutchinson, C.R. (1992). Nucleotide sequence of the tcmII–tcmIV region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the tcmN gene encodes a multifunctional cyclase–dehydratase–O-methyl transferase. *J. Bacteriol.* **174**, 1810–1820.

Terwilliger, T.C., and Berendzen J. (1999). Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Crystallographica* **D55**, 849–861.

Terwilliger, T.C. (2001). Maximum-likelihood density modification with pattern recognition of structural motifs. *Acta Cryst.* **D57**, 1755–1762

Vance, C.P., Kirk, T.K., and Sherwood, R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 259–288.

Verdecia, M. *et al.* (en préparation). Structure of the HECT domain of an Ubiquitin ligase.

Vidgren, J., Svensson, L.A., and Liljas, A. (1994). Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**, 354–357.

Wang, H.–K. *et al.* (1998). Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents., pp 191–226. In Flavonoids in the Living System, Manthey, J.A. and Buslig, B.S. eds Plenum Press, New York.

Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M., and Hunter, T. (1999, à paraître). *J Cell Sci.*

Whetten, R., and Sereedoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1001–1013.

White, R.H. (1987). Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood. *Wood and Fiber Science* **19**, 446–452.

Xue, Y., Zhao, L., Liu, H.W., and Sherman, D.H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 12111–12116.

Zhong, R., Iii, W.H., Negrel, J., and Ye, Z.H. (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell* **10**, 2033–2046.

Zubieta, C., He , X.–Z., Dixon, R.A., and Noel, J.P. (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O–methyltransferases. *Nature Structural Biology* **8**, 271–279.

Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.–L., Dixon, R.A., and Noel, J.P. (2002). Structural Basis for the Modulation of Lignin Monomer Methylation by Caffeic Acid / 5–Hydroxyferulic Acid 3/5–O–Methyltransferase. *The Plant Cell*, in press.