

Comparaison de la cristallographie aux rayons X, de la RMN et de la microscopie électronique

- [Cristallographie aux rayons X](#)
- [Résonance magnétique nucléaire \(RMN\)](#)
- [Microscopie électronique](#)

La biologie structurale intègre des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de biophysique pour élucider les structures moléculaires et la dynamique des molécules biologiquement importantes. Les progrès instrumentaux ont considérablement enrichi ce domaine, permettant l'analyse de molécules biologiques complexes avec une remarquable facilité et une grande précision. La compréhension des structures tridimensionnelles des protéines et des complexes protéiques offre des perspectives profondes sur les mécanismes de la vie et des maladies, facilitant la conception rationnelle de nouveaux agents diagnostiques et thérapeutiques. Les principales techniques de biologie structurale sont [la cristallographie aux rayons X](#), [la résonance magnétique nucléaire \(RMN\)](#) et [la cryo-microscopie électronique \(cryo-ME\)](#). Chaque méthode présente des avantages et des limitations spécifiques, rendant essentiel le choix de la technique appropriée en fonction des objectifs de recherche.

D'après les données de la Protein Data Bank (PDB) du RCSB sur le nombre de structures publiées chaque année, bien que sa proportion ait diminué, la cristallographie aux rayons X demeure la technique dominante en biologie structurale, représentant la majorité des structures publiées annuellement. La RMN contribue beaucoup moins au nombre total de structures, généralement à moins de 10 % par an. Cette méthode est particulièrement précieuse pour l'étude des petites protéines et des complexes en solution. L'utilisation de la microscopie électronique (ME), notamment de la cryo-ME, a considérablement augmenté ces dernières années. Quasi négligeable au début des années 2000, sa contribution a fortement progressé, surtout après 2015, pour représenter jusqu'à 40 % des nouveaux dépôts de structures entre 2023 et 2024.

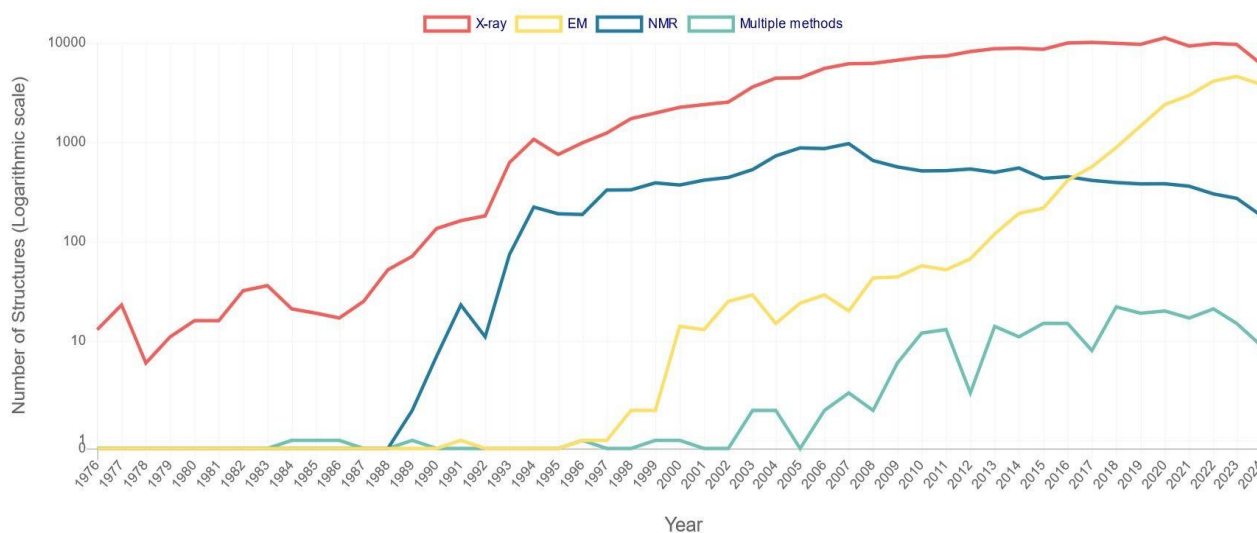


Figure 1. Nombre de structures PDB publiées par an. Les méthodes de diffraction des rayons X incluent la

diffraction des rayons X, la diffraction sur fibres et la diffraction sur poudres ; la RMN désigne la RMN en solution ou la RMN à l'état solide ; la ME inclut la microscopie électronique, la cristallographie électronique et la tomographie électronique ; « méthodes multiples » désigne plusieurs méthodes expérimentales. Par exemple, si une structure est résolue par diffraction des rayons X et par diffraction de neutrons, elle est comptabilisée uniquement dans cette catégorie (Données mises à jour le 3 septembre 2024).

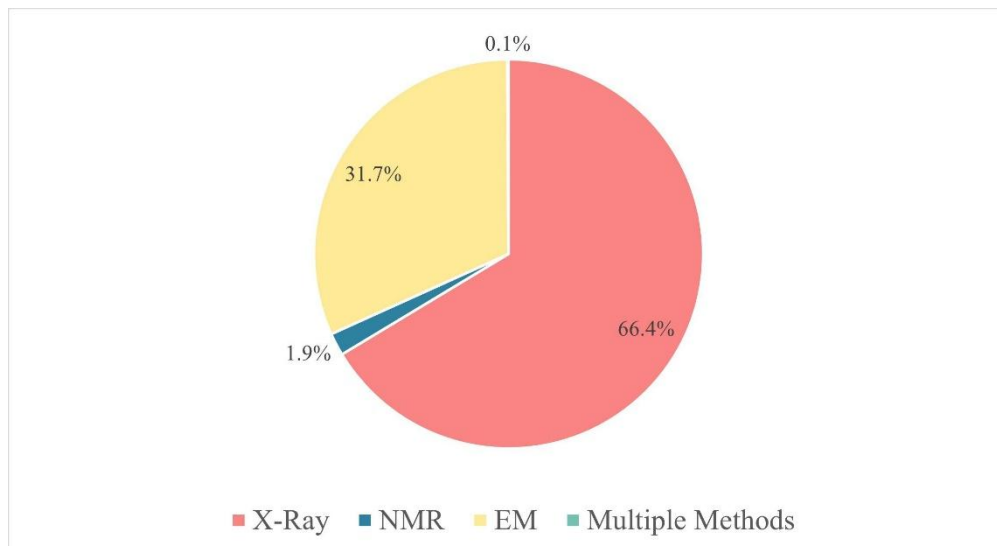


Figure 2. Trois techniques de

recherche majeure en biologie structurale. Selon les statistiques de la PDB, en 2023, plus de 9 601 structures protéiques ont été résolues par diffraction des rayons X, soit plus de 66 % du total. On compte également 4 579 structures protéiques obtenues par microscopie électronique (31,7 %) et 272 par résonance magnétique nucléaire (1,9 %).

Cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X est une technique puissante et largement utilisée en biologie structurale pour déterminer les **structures tridimensionnelles des macromolécules biologiques** telles que [les protéines](#) , [les acides nucléiques](#) et les assemblages complexes. Grâce à sa résolution atomique, elle a joué un rôle déterminant dans l'avancement de notre compréhension des mécanismes moléculaires, des fonctions et des interactions au sein des cellules. Cette technique repose sur la diffraction des rayons X par la densité électronique des molécules cristallisées, permettant ainsi aux chercheurs de construire des modèles détaillés de ces structures. Cette méthode a été essentielle à de nombreuses découvertes scientifiques, notamment la détermination de la structure de [l'ADN](#) et le développement de médicaments ciblant des protéines spécifiques.

Histoire et actualité de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X a vu le jour au début du XXe siècle, suite à la découverte des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen en 1895 et à la démonstration de la diffraction des rayons X par les cristaux par Max von Laue en 1912. S'appuyant sur ces travaux, Sir William Henry Bragg et Sir William Lawrence Bragg ont développé la cristallographie aux rayons X comme méthode de détermination de la structure cristalline et ont formulé la loi de Bragg reliant les angles de diffraction des rayons X à l'espacement entre les plans

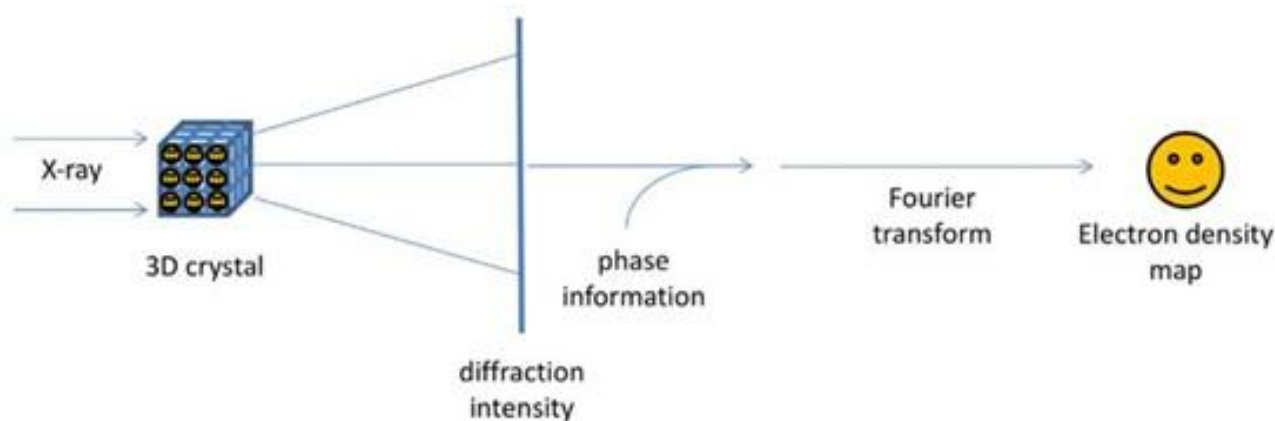
cristallins. Leurs recherches ont abouti aux premiers modèles atomiques de cristaux simples, tels que le NaCl, et leur ont valu le prix Nobel de physique en 1915.

Cette technique a ensuite été étendue à la biologie, notamment à la détermination de la structure de la double hélice d'ADN par James Watson et Francis Crick en 1953, grâce aux données de diffraction des rayons X de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins. Depuis, la cristallographie aux rayons X est devenue un outil indispensable en biologie structurale, permettant d'élucider les mécanismes enzymatiques, les structures des protéines membranaires et les grands complexes macromoléculaires. Aujourd'hui, plus de 224 000 structures protéiques sont déposées dans la Protein Data Bank, dont plus de 86 % ont été résolues par cristallographie aux rayons X, ce qui souligne son importance prépondérante dans l'étude des structures macromoléculaires biologiques.

Théorie de base de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X repose sur la **diffraction des rayons X** par les nuages électroniques des atomes au sein d'une structure cristalline. Lorsqu'un cristal est exposé à un faisceau collimaté de rayons X, ces rayons interagissent avec les électrons du cristal, provoquant des **interférences constructives et destructives**. Cette interaction produit une figure de diffraction qui peut être enregistrée par un détecteur. La position et l'intensité des taches de diffraction sont directement liées à la densité électronique du cristal.

La loi de Bragg, $n\lambda = 2d \sin \vartheta$, où λ est la longueur d'onde des rayons X incidents, d la distance entre les plans cristallins, ϑ l'angle d'incidence et n un entier, décrit la condition d'interférence constructive et est fondamentale pour l'analyse des données de diffraction des rayons X. En mesurant les angles et les intensités des faisceaux diffractés, les scientifiques peuvent générer une carte tridimensionnelle de la densité électronique au sein du cristal, qui peut ensuite être interprétée pour déterminer la position des atomes.



Figure

3. Les principes physiques et mathématiques de la cristallographie aux rayons X pour résoudre une structure.

Procédé de cristallographie aux rayons X

Le processus de cristallographie aux rayons X comprend plusieurs étapes clés :

Cristallisation : La molécule cible, souvent une protéine ou un acide nucléique, doit être cristallisée ([cristallisation des protéines](#)). Cette étape est souvent complexe, car l'obtention de cristaux de haute qualité adaptés à la diffraction peut nécessiter un criblage extensif et une optimisation des conditions.

Acquisition des données : Le cristal est exposé à un faisceau de rayons X, et le diagramme de diffraction résultant est enregistré. Les installations modernes utilisent souvent des sources de rayonnement synchrotron, qui produisent des rayons X intenses et hautement collimatés, permettant ainsi l'acquisition de données à haute résolution.

Traitement des données : Les données de diffraction sont traitées afin de produire un ensemble de facteurs de structure qui décrivent l'amplitude et la phase de chaque faisceau diffracté. La détermination de la phase est une étape cruciale de ce processus, car l'information de phase n'est pas directement mesurable et doit être déduite à l'aide de méthodes telles que le remplacement moléculaire ou de techniques expérimentales de détermination [de phase](#) comme la dispersion anormale multi-longueurs d'onde (MAD) ou la dispersion anormale mono-longueur d'onde (SAD).

Modélisation et perfectionnement : Un modèle initial de la molécule est construit à partir de la carte de densité électronique générée par le traitement des données. Ce modèle est ensuite perfectionné itérativement en ajustant les positions atomiques et en validant son adéquation aux données expérimentales, aboutissant ainsi à une structure tridimensionnelle détaillée.

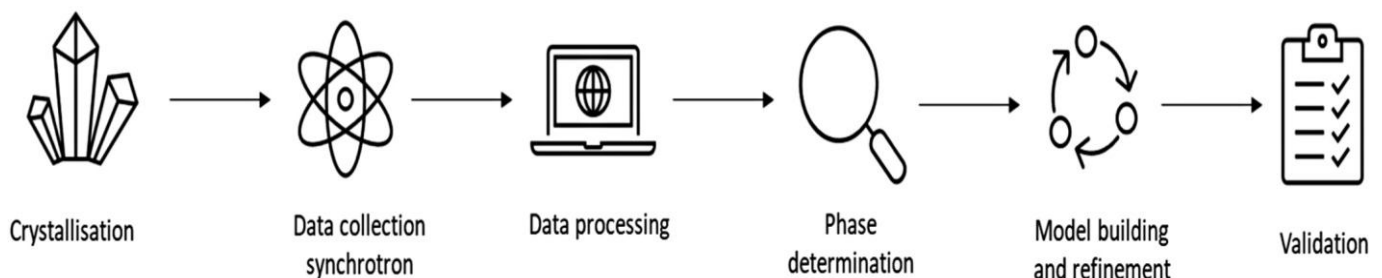


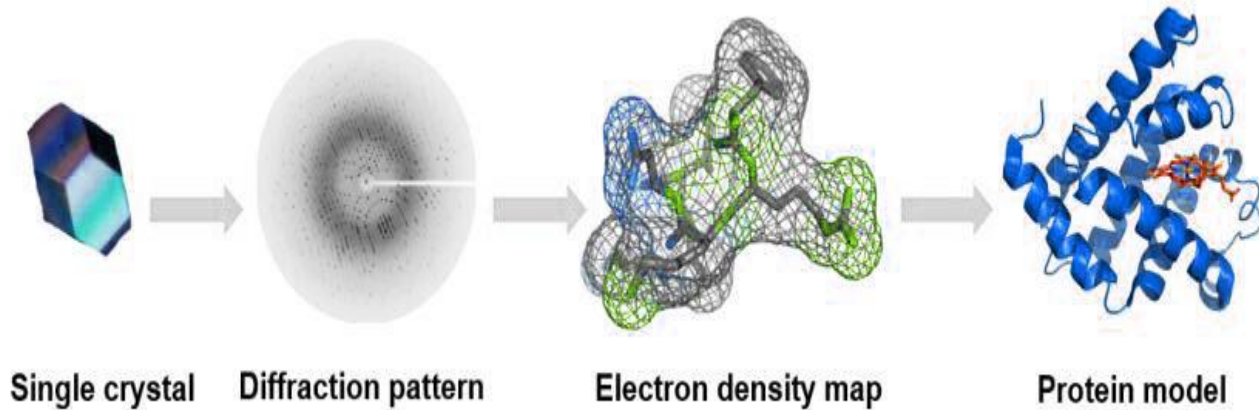
Figure 4. Le processus de cristallographie aux rayons X (Bingham *et al.* , 2023).

Cristallographie aux rayons X vs. Diffraction des rayons X sur monocristal (SC-XRD)

La diffraction des rayons X sur monocristal (DRX-MC) et la cristallographie aux rayons X sont étroitement liées, mais ne sont pas exactement synonymes. Dans de nombreux cas, on utilise le terme DRX-MC pour désigner la cristallographie aux rayons X. Plus précisément, la cristallographie aux rayons X est la technique générale, tandis que la DRX-MC en est une application spécifique. La DRX-MC est une branche de la cristallographie aux rayons X qui se concentre sur les monocristaux, tandis que la cristallographie aux rayons X est la méthode générale qui englobe diverses techniques d'étude des structures cristallines.

La cristallographie aux rayons X est un terme général désignant la technique permettant de déterminer la structure atomique d'un cristal en mesurant la diffraction des rayons X lorsqu'ils le traversent. Le diagramme de diffraction obtenu renseigne sur l'agencement des atomes au sein du cristal, permettant ainsi aux scientifiques de reconstituer une structure tridimensionnelle détaillée.

La diffraction des rayons X sur monocristal (SC-XRD) est une technique spécifique de cristallographie aux rayons X qui s'intéresse aux **monocristaux**, c'est-à-dire aux cristaux constitués d'une seule pièce continue présentant une structure cristalline régulière et répétitive. La SC-XRD est la méthode de cristallographie aux rayons X la plus couramment utilisée pour déterminer la structure détaillée des petites molécules, des composés inorganiques et des macromolécules telles que les protéines.



Figure

5 : Le processus de la technique de diffraction des rayons X sur monocristal.

Différents types de cristallographie autres que la cristallographie aux rayons X

La cristallographie ne se limite pas toujours à la cristallographie aux rayons X. Bien que cette dernière soit la forme la plus courante et la plus connue de cristallographie, le terme « cristallographie » désigne plus largement l'étude des structures cristallines et peut inclure diverses techniques autres que les méthodes aux rayons X. Il existe plusieurs types de cristallographie.

La cristallographie aux rayons X est la technique la plus couramment utilisée pour déterminer la structure atomique et moléculaire des cristaux, notamment en biologie structurale, en chimie et en science des matériaux. **La cristallographie neutronique**, qui utilise des neutrons au lieu des rayons X, excelle dans la localisation des atomes légers comme l'hydrogène, ce qui la rend utile pour l'étude des liaisons hydrogène et des structures magnétiques. **La cristallographie électronique**, qui emploie des faisceaux d'électrons, est idéale pour l'étude des très petits cristaux, des couches minces ou des matériaux bidimensionnels, souvent en science des matériaux et en biologie structurale. **La cristallographie des poudres**, une variante de la cristallographie aux rayons X, analyse les poudres polycristallines lorsque les monocristaux ne sont pas disponibles, facilitant ainsi l'identification des phases. **La cristallographie résolue en temps** permet de suivre les changements structuraux en temps réel, ce qui est utile pour l'étude des processus dynamiques tels que les réactions enzymatiques ou les transitions de phase.

Techniques de subdivision de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X dispose de plusieurs techniques de subdivision adaptées à des types d'échantillons ou à des conditions expérimentales spécifiques. Ces techniques permettent d'étendre

l'applicabilité de la cristallographie aux rayons X à divers types de cristaux et de structures moléculaires. Parmi les principales techniques de subdivision, on peut citer :

Diffraction des rayons X sur poudre (PXRD)

La diffraction des rayons X sur poudre est utilisée lorsque les monocristaux ne sont pas disponibles et que l'échantillon est constitué de petits cristallites orientés aléatoirement. Au lieu d'un monocristal, un échantillon de poudre est exposé aux rayons X, et le diagramme de diffraction est enregistré. La diffraction des rayons X sur poudre est largement utilisée en science des matériaux, en minéralogie et pour l'analyse des formes polymorphes de produits pharmaceutiques. Elle fournit des informations sur la structure cristalline, l'identification des phases et la cristallinité.

Cristallographie aux rayons X des petites molécules

Cette technique permet de déterminer la structure de petites molécules organiques et inorganiques. Elle nécessite généralement des monocristaux de haute qualité, et les diagrammes de diffraction obtenus fournissent des informations très détaillées sur la géométrie moléculaire. La cristallographie des petites molécules est utilisée pour la détermination précise de la structure en chimie organique, [en découverte de médicaments](#) et [en science des matériaux](#) .

Cristallographie aux rayons X macromoléculaire (MX)

Il s'agit de la méthode standard pour déterminer la structure des grandes molécules biologiques telles que [les protéines](#) , [l'ADN](#) et [l'ARN](#) . La cristallisation des macromolécules est plus complexe, mais elle permet d'obtenir des informations à l'échelle atomique sur les structures biomoléculaires. La cristallisation par diffraction de rayons X (MX) est couramment utilisée en biologie structurale pour comprendre les mécanismes enzymatiques, les interactions protéine-ligand et les cibles thérapeutiques.

Cristallographie sérielle femtoseconde (SFX)

La technique SFX utilise des impulsions de rayons X extrêmement courtes, produites par des lasers à électrons libres (XFEL), pour collecter des données de diffraction sur des cristaux trop petits ou trop fragiles pour la cristallographie aux rayons X conventionnelle. Elle permet ainsi d'obtenir des données sur des nanocristaux ou des échantillons faiblement diffractants sans les endommager par les radiations. Elle est utilisée pour étudier des processus dynamiques, réaliser des études résolues en temps et déterminer la structure de macromolécules complexes, difficiles à cristalliser à grande échelle.

Diffraction électronique de microcristaux (MicroED)

Bien qu'il s'agisse techniquement d'une technique de microscopie électronique, la micro-diffraction électronique (MicroED) permet de recueillir des données de diffraction similaires à celles obtenues par rayons X à partir de microcristaux grâce à un faisceau d'électrons. Elle est particulièrement utile pour les petits cristaux macromoléculaires trop petits pour les méthodes de diffraction des rayons X classiques. La MicroED

est utilisée en biologie structurale pour déterminer la structure de microcristaux de protéines, de peptides et d'autres petites molécules ([MicroED pour l'analyse structurale](#)).

Méthodes de dispersion anormale (SAD/MAD)

Les techniques de dispersion anormale à une seule longueur d'onde (SAD) et à plusieurs longueurs d'onde (MAD) exploitent les différentes propriétés de diffusion des atomes, notamment des métaux comme le sélénium, pour résoudre les problèmes de phase en cristallographie aux rayons X. En ajustant la longueur d'onde des rayons X au seuil d'absorption d'atomes spécifiques, ces techniques facilitent la détermination de la structure. La SAD et la MAD sont largement utilisées en biologie structurale pour résoudre les problèmes de phase en cristallographie des macromolécules, en particulier pour les protéines et les acides nucléiques.

Avantages de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X offre plusieurs avantages :

Haute résolution : Elle offre une résolution à l'échelle atomique, permettant de visualiser la disposition précise des atomes au sein d'une molécule.

Polyvalence : Elle peut être appliquée à une large gamme de molécules biologiques. Elle convient aux protéines hydrosolubles, [aux protéines membranaires](#) ainsi qu'aux complexes macromoléculaires.

Informations structurelles détaillées : Elles révèlent des informations détaillées sur les interactions moléculaires, les changements conformationnels et les sites de liaison, ce qui est crucial pour comprendre les fonctions biologiques et concevoir des thérapies ciblées.

Inconvénients de la cristallographie aux rayons X

Malgré ses atouts, la cristallographie aux rayons X présente également des limites :

Exigence de cristallisation : Le besoin de cristaux de haute qualité peut constituer un goulot d'étranglement important, en particulier pour les molécules volumineuses, flexibles ou associées à une membrane.

Image statique : Cette technique fournit généralement une image statique de la molécule à l'état cristallin, ce qui peut ne pas représenter pleinement son comportement dans un environnement dynamique en solution.

Problème de phase : La mesure indirecte des informations de phase nécessite des méthodes expérimentales ou de calcul supplémentaires, ce qui peut compliquer le processus de détermination de la structure.

Applications de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X a un large éventail d'applications en biologie structurale et au-delà :

Conception de médicaments : C'est un outil essentiel dans la conception de médicaments basée sur la structure, permettant la conception rationnelle de petites molécules capables de se lier à des cibles protéiques spécifiques.

Études des mécanismes enzymatiques : En révélant l'architecture détaillée des sites actifs, la cristallographie aux rayons X apporte des éclairages sur les mécanismes catalytiques des enzymes.

Structures des protéines membranaires : Bien que complexes, la cristallisation et la détermination structurale des protéines membranaires par cristallographie aux rayons X ont permis des avancées significatives dans notre compréhension de processus tels que la transduction du signal et le transport d'ions.

Interactions protéine-protéine : Cette technique a joué un rôle déterminant dans la caractérisation de grands complexes macromoléculaires, tels que le ribosome, en expliquant comment les protéines interagissent entre elles et avec les acides nucléiques.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique analytique puissante utilisée en biologie structurale pour déterminer les **structures tridimensionnelles des biomolécules en solution**. La RMN fournit des informations détaillées sur l'environnement physico-chimique des atomes au sein d'une molécule, ce qui la rend indispensable à l'étude de la structure, de la dynamique et des interactions des protéines, des acides nucléiques et d'autres biomolécules complexes. Contrairement à la cristallographie aux rayons X, qui nécessite une cristallisation, la RMN permet d'étudier les biomolécules dans des conditions mimant fidèlement l'environnement physiologique, offrant ainsi un aperçu du comportement moléculaire à l'**état natif**.

Histoire et actualité de la RMN

Depuis la première observation de signaux RMN à l'état condensé en 1946, la technologie RMN a connu un développement rapide pendant plus de 70 ans, et ses applications se sont étendues de la physique, notamment pour la détermination du moment magnétique nucléaire, à la chimie, la médecine, la science des matériaux, les sciences de la vie et bien d'autres domaines. En particulier, dans les années 1980, la technologie RMN a été appliquée de manière novatrice à l'analyse structurale des protéines, favorisant ainsi son utilisation en biologie. Bien que la quantité de données structurales tridimensionnelles des protéines obtenues par RMN ne soit pas comparable à celle obtenue par diffraction des rayons X sur monocristal, les avantages uniques de la RMN sont largement reconnus : elle fournit des informations cinétiques, permettant ainsi de résoudre les mouvements internes des protéines sur différentes échelles de temps et leur mécanisme de liaison aux ligands.

Théorie de base de la RMN

La spectroscopie RMN repose sur le principe que **certains noyaux atomiques possèdent un moment magnétique dû à leur spin**. Placés dans un champ magnétique externe intense, ces noyaux absorbent et réémettent un rayonnement électromagnétique à des fréquences spécifiques, appelées **fréquences de résonance**. La fréquence de résonance est influencée par l'environnement magnétique du noyau, lui-même affecté par la structure chimique et l'arrangement spatial des atomes environnants. En mesurant ces fréquences

de résonance, la RMN fournit des informations sur l'environnement local d'atomes spécifiques au sein d'une molécule, permettant ainsi la détermination de sa structure.

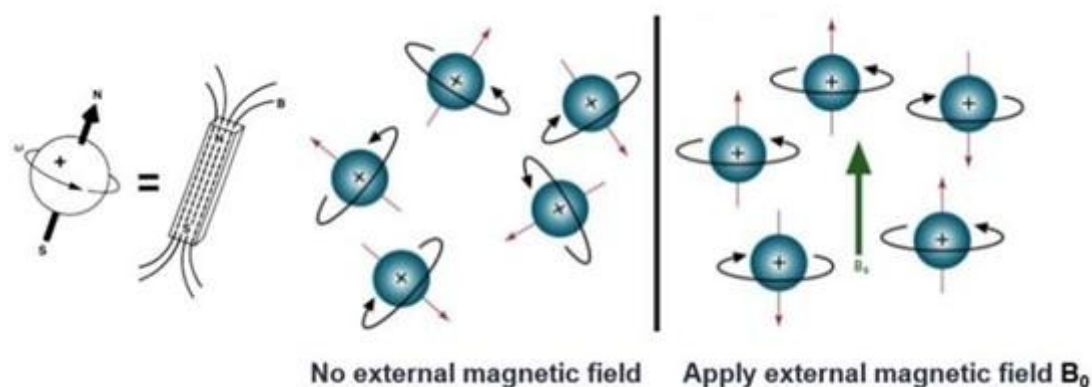


Figure 6. Spin

nucléaire sans et avec un champ magnétique externe.

Processus de RMN

Le processus de détermination d'une structure moléculaire par RMN comprend plusieurs étapes clés :

Préparation de l'échantillon : La biomolécule d'intérêt est généralement marquée isotopiquement avec des noyaux actifs en RMN tels que ^{13}C , ^{15}N ou ^2H pour améliorer la sensibilité et la résolution du signal ([services de spectroscopie RMN](#)).

Acquisition des données : L'échantillon est placé dans un champ magnétique intense, et une série d'impulsions radiofréquences est appliquée pour exciter les noyaux. Les signaux émis sont enregistrés sous forme de décroissances d'induction libre (FID).

Traitement spectral : Les signaux FID sont transformés en spectres RMN par transformation de Fourier. Ces spectres fournissent des informations sur l'environnement chimique des noyaux. Les signaux RMN sont attribués à des atomes spécifiques de la molécule en fonction de leurs déplacements chimiques et de leurs couplages connus.

Analyse de la structure : En utilisant les résonances attribuées et les contraintes de distance dérivées des expériences NOE (effet Overhauser nucléaire), la structure tridimensionnelle de la molécule est calculée par des algorithmes informatiques.

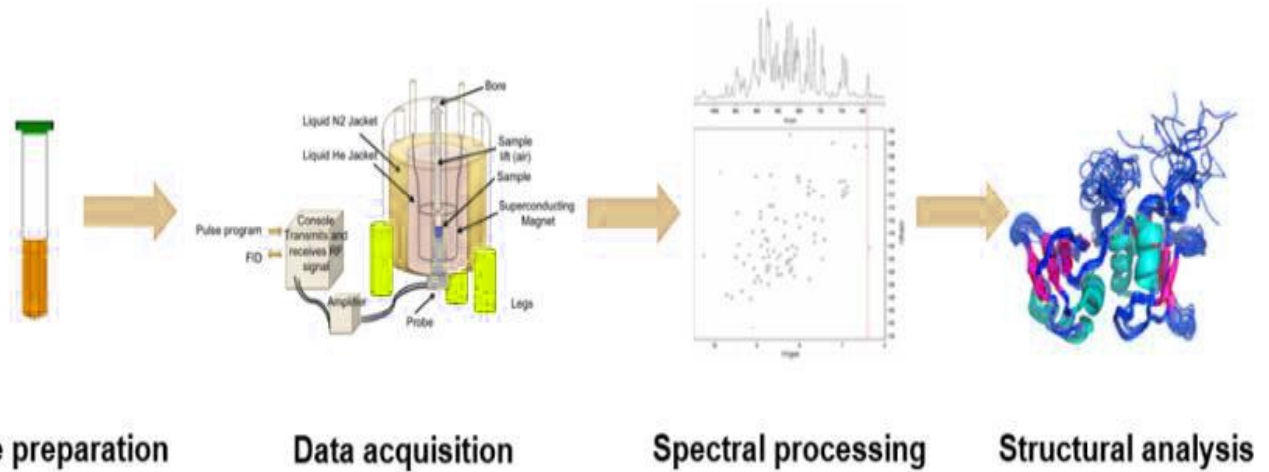


Figure 7. Le processus de la technologie de résonance magnétique nucléaire.

Techniques de subdivision de la RMN

La spectroscopie RMN comprend plusieurs techniques de subdivision, telles que :

RMN multidimensionnelle : Les techniques de RMN multidimensionnelle, telles que la RMN 2D, 3D et [4D](#), répartissent l'information spectrale sur plusieurs dimensions, permettant une meilleure résolution des spectres complexes. Cette approche contribue à surmonter les problèmes de chevauchement des signaux, fréquents dans les grandes molécules comme les protéines et les acides nucléiques. En corrélant les données issues de différentes dimensions, ces expériences améliorent la capacité à attribuer les signaux à des atomes individuels, offrant ainsi une image plus précise de la structure moléculaire. La RMN multidimensionnelle est essentielle à l'étude des biomolécules, pour lesquelles la RMN monodimensionnelle ne possède pas la résolution requise pour une interprétation structurale précise.

RMN de relaxation : La RMN de relaxation se concentre sur l'analyse des temps de relaxation, T1 (relaxation spin-réseau) et T2 (relaxation spin-spin), afin d'obtenir des informations sur le mouvement et la dynamique moléculaires. Ces temps de relaxation reflètent la rapidité avec laquelle les spins nucléaires retournent à l'équilibre après excitation, fournissant ainsi des renseignements sur la flexibilité moléculaire, les mouvements internes et les interactions avec l'environnement. La RMN de relaxation est particulièrement précieuse pour l'étude des grandes biomolécules, car elle renseigne sur leur comportement dynamique et son impact sur leur activité biologique.

Spectroscopie NOE : La spectroscopie par effet Overhauser nucléaire (NOE) exploite les interactions dipolaires entre noyaux atomiques voisins pour mesurer les distances interatomiques. En observant les variations d'intensité du signal dues à ces interactions, la NOE fournit des contraintes de distance essentielles à la construction de structures moléculaires tridimensionnelles. Cette technique est particulièrement importante en biologie structurale, où elle contribue à définir l'agencement spatial des atomes dans les biomolécules telles que les protéines et l'ADN, permettant ainsi une meilleure compréhension de leur fonction et de leurs interactions.

Avantages de la RMN

Analyse en solution : La RMN permet l'étude des biomolécules en solution, imitant fidèlement les conditions physiologiques.

Informations dynamiques : La RMN fournit des informations sur [la dynamique moléculaire](#), la flexibilité conformationnelle et les interactions qui ne sont pas accessibles par des techniques statiques comme la cristallographie aux rayons X.

Aucune cristallisation requise : La RMN ne nécessite pas de cristallisation, ce qui la rend adaptée à l'étude de molécules difficiles à cristalliser.

Inconvénients de la RMN

Limitation de taille : La RMN est limitée par la taille moléculaire, avec des limites supérieures pratiques pour la détermination de la structure autour de 50 kDa, bien que les progrès repoussent ces limites.

Sensibilité : La RMN est moins sensible que d'autres techniques, nécessitant souvent des concentrations d'échantillon élevées et un marquage isotopique.

Complexité : L'interprétation des données RMN et la détermination de la structure peuvent être complexes et chronophages, nécessitant des connaissances et des logiciels spécialisés.

Applications de la RMN

La spectroscopie RMN est largement utilisée en biologie structurale pour :

Détermination de la structure des protéines : La RMN a été utilisée pour déterminer la structure de nombreuses protéines, y compris celles qui sont liées à la membrane ou impliquées dans les voies de signalisation.

Découverte de médicaments : La RMN est utilisée dans la découverte de médicaments basée sur des fragments, où elle aide à identifier et à optimiser les petites molécules qui se lient aux protéines cibles.

Interactions biomoléculaires : La RMN est utilisée pour étudier les interactions [protéine-ligand](#), [protéine-protéine](#) et [protéine-acide nucléique](#), fournissant des informations sur les affinités et les mécanismes de liaison.

Dynamique conformationnelle : La RMN fournit des informations sur le comportement dynamique des biomolécules, révélant comment les changements conformationnels sont liés à la fonction biologique.

Microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) est une technique d'imagerie puissante utilisée en biologie structurale pour **visualiser des échantillons biologiques à haute résolution**, souvent jusqu'à l'échelle atomique. Contrairement à la microscopie optique, limitée par la longueur d'onde de la lumière visible, la ME utilise les électrons comme source d'imagerie, permettant ainsi d'obtenir des détails beaucoup plus fins. La ME est devenue indispensable à l'étude des structures des cellules, des virus, des protéines et autres complexes

biomoléculaires. En particulier, [la cryo-microscopie électronique \(cryo-ME\)](#), une technique qui consiste à congeler les échantillons dans un état proche de leur état natif, a révolutionné le domaine en permettant la visualisation des biomolécules sous leurs formes fonctionnelles et hydratées.

Histoire et actualité de l'EM

Le rôle de la microscopie électronique (ME) en biologie structurale a considérablement évolué au cours des dernières décennies. Initialement utilisée pour étudier [les structures cellulaires](#) et [les grands virus](#), son application était toutefois limitée par les dommages causés par les faisceaux d'électrons et la nécessité de recourir à des techniques de préparation d'échantillons agressives. L'introduction de la cryo-ME dans les années 1970 a permis de pallier ces problèmes, rendant possible l'imagerie d'échantillons dans un état quasi natif, sans fixation chimique ni coloration.

Ces dernières années, la cryo-microscopie électronique (cryo-ME) a connu une véritable révolution en termes de résolution grâce aux progrès technologiques, tels que les détecteurs d'électrons directs et l'amélioration des méthodes de calcul. Ces avancées ont permis la détermination, avec une précision sans précédent, de structures à haute résolution de complexes macromoléculaires comme [les ribosomes](#), [les canaux ioniques](#) et [les particules pseudo-virales](#). La cryo-ME est devenue une technique incontournable en biologie structurale, souvent utilisée conjointement avec la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN.

Théorie de base de l'électromagnétisme

La microscopie électronique repose sur l'interaction d'un faisceau d'électrons avec un échantillon pour produire une image. Les électrons ont des longueurs d'onde beaucoup plus courtes que la lumière visible, ce qui permet à la microscopie électronique d'atteindre une résolution bien supérieure. Il existe plusieurs types de microscopie électronique, notamment la microscopie électronique en transmission (MET), la microscopie électronique à balayage (MEB) et la cryo-microscopie électronique (cryo-ME), chacune présentant ses propres applications et avantages.

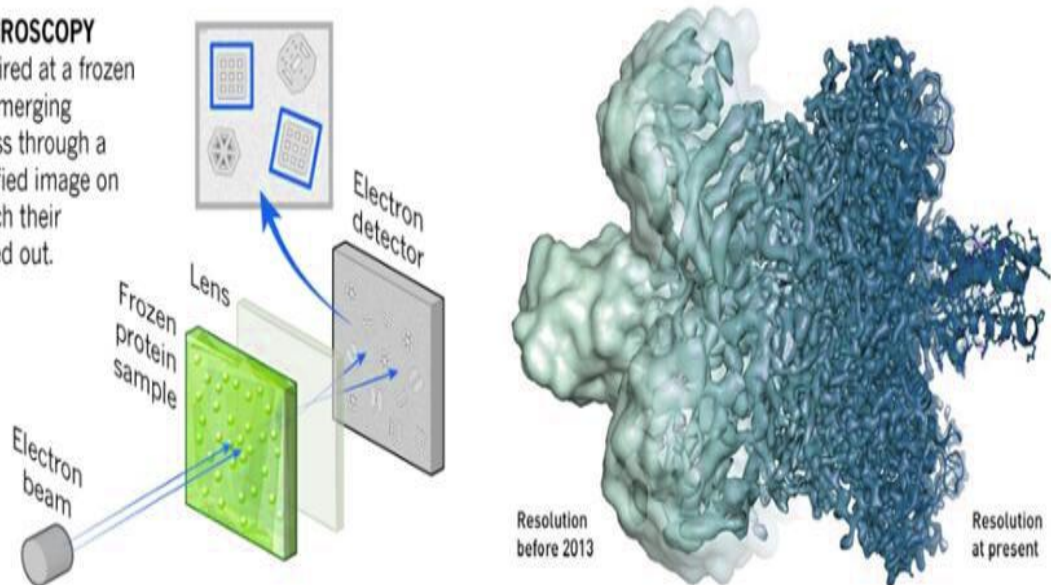
Microscopie électronique en transmission (MET) : En MET, un faisceau d'électrons traverse un échantillon mince. Les électrons qui traversent l'échantillon sont collectés pour former une image, fournissant des informations détaillées sur la structure interne de l'échantillon.

Microscopie électronique à balayage (MEB) : En MEB, un faisceau d'électrons focalisé balaie la surface d'un échantillon. Les électrons diffusés par la surface sont détectés afin de produire une image haute résolution de la topographie de l'échantillon.

Microscopie cryo-électronique (cryo-ME) : La cryo-ME consiste à congeler rapidement l'échantillon dans de la glace vitreuse afin de préserver sa structure native. Des images sont capturées sous différents angles et combinées pour reconstruire un modèle 3D de l'échantillon.

CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

A beam of electron is fired at a frozen protein solution. The emerging scattered electrons pass through a lens to create a magnified image on the detector, from which their structure can be worked out.



Figure

8. Mécanisme de la cryo-microscopie électronique.

Processus général de l'EM

Les procédures impliquées en microscopie électronique varient selon la technique spécifique, mais le processus général comprend les étapes suivantes :

Préparation de l'échantillon : L'échantillon biologique (protéines, virus ou cellules, par exemple) est d'abord mis en suspension dans un film mince de solution. Une petite quantité de cet échantillon est ensuite déposée sur une grille de microscopie électronique spécialisée. L'excédent de liquide est absorbé, ne laissant qu'une fine couche de l'échantillon. La grille est rapidement plongée dans de l'éthane liquide, ce qui solidifie l'échantillon sous forme de glace vitreuse. Ce procédé préserve l'échantillon dans un état hydraté proche de son état natif, sans formation de cristaux de glace susceptibles d'endommager sa structure.

Cryotransfert : La grille congelée est transférée au cryo-microscope électronique dans des conditions cryogéniques, généralement à l'aide d'un porte-échantillon cryogénique. Ce transfert garantit la vitrification et la stabilité de l'échantillon à des températures extrêmement basses (environ $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Acquisition des données : Des images haute résolution de l'échantillon congelé sont acquises à l'aide d'un faisceau d'électrons dans un microscope électronique à transmission. En raison du faible contraste des échantillons biologiques, des détecteurs d'électrons directs ou d'autres caméras de pointe sont utilisés pour acquérir des images à sensibilité et résolution accrues. Des milliers d'images bidimensionnelles de l'échantillon sont prises sous différents angles.

Traitement d'images : Les images collectées sont traitées à l'aide d'un logiciel spécialisé afin de corriger les mouvements et de réduire le bruit. Des algorithmes alignent les images 2D et les classent selon des vues similaires des particules. Parmi celles-ci, des milliers d'images de particules sont sélectionnées et moyennées pour améliorer la qualité du signal.

Reconstruction 3D : Grâce à des techniques de calcul, les images 2D alignées sont assemblées pour former un modèle tridimensionnel de l'échantillon. Ce processus consiste à reconstruire la structure en combinant plusieurs vues de particules afin de créer une carte 3D haute résolution, qui représente la densité électronique de l'échantillon.

Modélisation et raffinement : À partir de la carte 3D, un modèle moléculaire de l'échantillon est construit. La structure atomique est interprétée en ajustant des modèles atomiques connus (ou des modèles ab initio) à la carte de densité. Un raffinement supplémentaire est effectué pour améliorer la précision du modèle structural.

Validation et analyse : La structure est validée à l'aide de différentes méthodes afin d'en garantir l'exactitude. La structure finale obtenue par cryo-microscopie électronique est analysée pour comprendre la fonction biologique, les interactions et les mécanismes de l'échantillon.

Techniques de subdivision de l'EM

La microscopie électronique englobe plusieurs techniques de subdivision, notamment :

Analyse de particules uniques (SPA) : L'analyse de particules uniques (SPA) en cryo-microscopie électronique (cryo-ME) est une méthode utilisée pour reconstruire la structure tridimensionnelle des biomolécules. Elle consiste à capturer des milliers d'images 2D de particules individuelles, telles que des protéines ou des virus, orientées aléatoirement. Ces particules sont ensuite alignées par calcul et moyennées pour produire un modèle 3D haute résolution. La SPA est particulièrement utile pour l'étude de molécules volumineuses et complexes, permettant aux chercheurs de visualiser des détails structuraux sans avoir recours à la cristallisation.

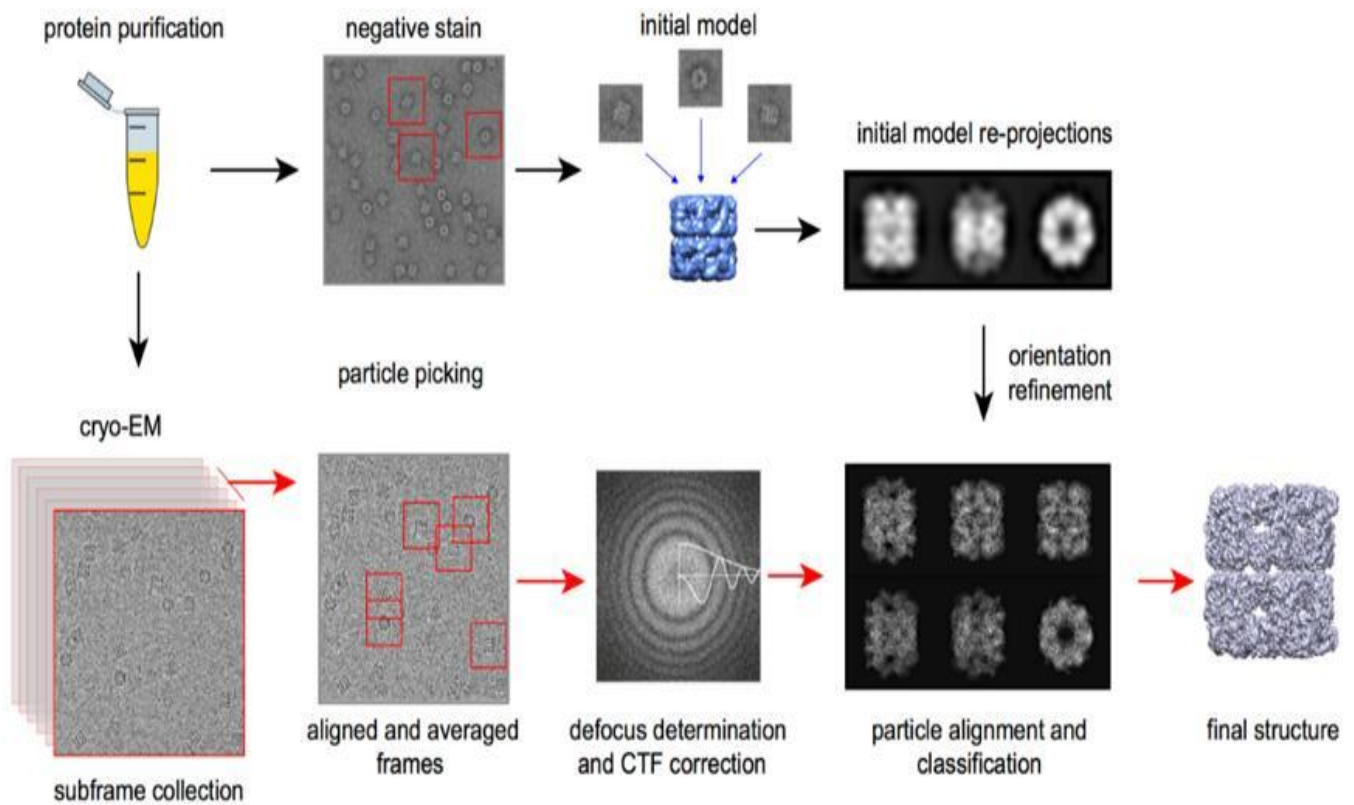


Figure 9. Le processus de la technique d'analyse de particules uniques par cryo-ME.

Tomographie électronique : La tomographie électronique est une technique permettant la reconstruction tridimensionnelle des structures cellulaires. En inclinant l'échantillon selon différents angles et en capturant de multiples images, on obtient un ensemble complet de projections. Ces projections sont ensuite combinées par ordinateur pour créer un modèle 3D de l'échantillon. La tomographie électronique est un outil précieux pour l'étude de l'organisation spatiale des composants cellulaires, offrant une vision détaillée des structures subcellulaires et de leurs relations au sein de la cellule.

Tomographie cryo-électronique (cryo-TE) : La tomographie cryo-électronique (cryo-TE) est une version avancée de la tomographie électronique qui combine la cryo-microscopie électronique (cryo-ME) et la tomographie pour étudier des échantillons biologiques dans leur état natif, congelé-hydraté. En cryo-TE, un échantillon vitrifié est incliné et imagé sous de multiples angles, permettant ainsi la reconstruction 3D des structures cellulaires in situ. Cette technique est particulièrement performante pour visualiser l'ultrastructure des cellules et [des organites](#), offrant des images à haute résolution, proches de l'état natif, de l'architecture cellulaire et des interactions moléculaires.

Avantages de l'EM

Haute résolution : La microscopie électronique, et en particulier la cryo-microscopie électronique, permet d'atteindre une résolution quasi atomique, autorisant une visualisation détaillée des structures macromoléculaires.

Polyvalence : La microscopie électronique peut être utilisée pour étudier une large gamme d'échantillons biologiques, des protéines isolées aux cellules entières.

Imagerie à l'état natif : La cryo-microscopie électronique permet la visualisation des biomolécules dans leur état natif et hydraté, sans nécessiter de coloration ni de cristallisation.

Inconvénients de l'EM

Dommages causés par les radiations : Les spécimens biologiques peuvent être endommagés par le faisceau d'électrons, ce qui limite le temps d'exposition et la résolution pouvant être atteinte.

Préparation complexe des échantillons : La préparation des échantillons pour la microscopie électronique, en particulier la cryo-microscopie électronique, peut s'avérer techniquement complexe et chronophage.

Coût et accessibilité : Les microscopes électroniques haut de gamme et les installations de cryo-microscopie électronique sont coûteux et nécessitent une infrastructure et une expertise spécialisées.

Application des EM

La microscopie électronique a un large éventail d'applications en biologie structurale :

Complexes macromoléculaires : La cryo-microscopie électronique est utilisée pour déterminer les structures de grands complexes protéiques, tels que [les ribosomes](#) , [les polymérases](#) et [les protéines membranaires](#) .

Structure du virus : La microscopie électronique a joué un rôle déterminant dans la révélation des structures des virus, notamment dans la détermination récente de la structure des protéines du SARS-CoV-2.

Architecture cellulaire : La tomographie électronique est utilisée pour visualiser l'architecture des cellules et des organites en trois dimensions, fournissant des informations sur la fonction et l'organisation cellulaires.

Découverte de médicaments : La microscopie électronique contribue à la découverte de médicaments en révélant les sites de liaison et les changements conformationnels des protéines cibles, facilitant ainsi la conception de nouvelles thérapies.

Comparaison de la cristallographie aux rayons X, de la RMN et de la cryo-microscopie électronique

En conclusion, chaque technologie présente des avantages distincts pour des applications spécifiques. Par conséquent, une méthode peut être largement utilisée dans certains cas, mais rarement dans d'autres. Il est donc impératif de comprendre la nature de l'analyse afin de choisir la méthode appropriée. Un choix de méthode inapproprié peut non seulement compromettre les résultats, mais aussi entraîner des retards importants et des pertes financières. Pour plus de détails, veuillez consulter le tableau 1.

Tableau 1. Comparaison de la cristallographie aux rayons X, de la RMN et de la cryo-ME.

Avantages

Inconvénients

Objets

Résolution

Cristallographie aux rayons X

- Bien développé
 - Haute résolution
 - Large gamme de poids moléculaires
 - Facile pour la construction de maquettes
 - Difficile à cristalliser
 - Difficile pour la diffraction
 - structure solide préférée
 - structure à l'état cristallin statique
 - Échantillons cristallisables
 - Protéines solubles, protéines membranaires, ribosomes, complexes ADN/ARN et protéines
- Haut

RMN

- Haute résolution
 - Structure 3D en solution
 - Idéal pour les études dynamiques
 - Nécessité d'une pureté élevée de l'échantillon
 - Préparation des échantillons difficile
 - Difficile pour la simulation numérique
 - masses moléculaires inférieures à 40–50 kDa
 - échantillons hydrosolubles
- Haut

Cryo-ME

- Préparation facile des échantillons
 - Structure à l'état natif
 - Résolution relativement faible
 - Applicable uniquement aux échantillons
 - >150 kDa
 - Virions, protéines membranaires, grosses protéines, ribosomes,
- Relativement faible (<3,5 Å)

- Taille de l'échantillon réduite
- de masse moléculaire élevée
- composés complexes
- Fortement dépendant des techniques EM
- Équipement EM coûteux

Liens entre la cristallographie aux rayons X, la RMN et la cryo-microscopie électronique

Intégration des techniques : Ces techniques sont souvent utilisées conjointement pour une compréhension plus complète des structures moléculaires. Par exemple, la cristallographie aux rayons X permet d'obtenir la structure à haute résolution d'une protéine, tandis que la RMN renseigne sur sa dynamique en solution et la cryo-microscopie électronique révèle sa structure au sein d'un complexe plus large.

Approche multi-résolution : Les biologistes structuraux utilisent souvent une approche multi-résolution, combinant les données de la cryo-microscopie électronique (cryo-ME), de la cristallographie aux rayons X et de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour compléter leurs connaissances. Par exemple, la cryo-ME peut fournir la structure globale d'un grand complexe, tandis que la cristallographie aux rayons X ou la RMN permettent de détailler des régions spécifiques ou des interactions dynamiques.

Validation structurale : L'utilisation de différentes méthodes permet la validation croisée des données structurales. Une structure déterminée par cryo-microscopie électronique peut être comparée à des données de cristallographie aux rayons X ou de RMN afin de confirmer son exactitude et d'interpréter ses aspects fonctionnels.

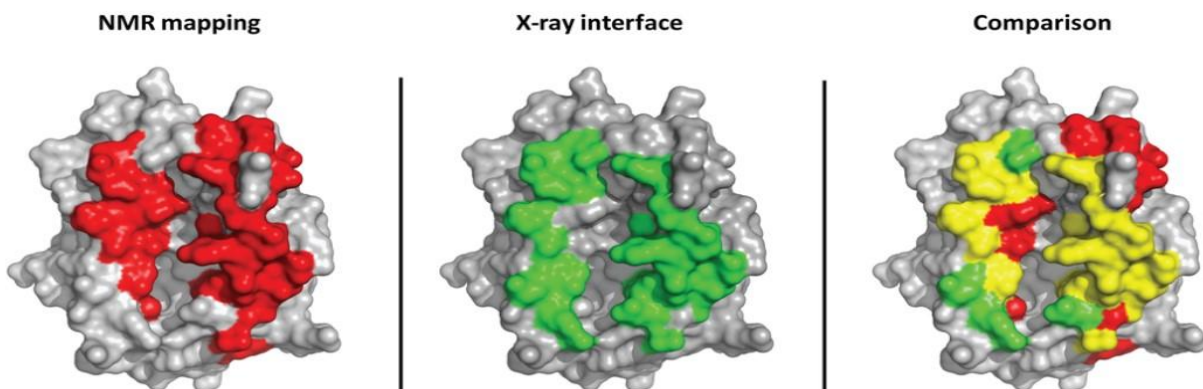


Figure 10. Comparaison entre une interface intermoléculaire déterminée par cartographie RMN et par cristallographie aux rayons X (complexe TCR/pMHC). La structure du CMH est représentée en gris (surface). Les résidus du CMH dont le signal RMN est affecté par la liaison du TCR sont représentés en rouge à gauche ; les résidus du CMH situés à moins de 5 Å du TCR dans la structure cristallographique sont représentés en vert au centre. Les résidus d'interface, identifiés par RMN et par cristallographie aux rayons X, sont représentés en jaune à droite. La structure la plus à droite montre une bonne concordance entre les cartographies RMN et cristallographiques. Des effets allostériques à courte portée sont visibles dans les résidus rouges en haut à droite de l'image comparative (Bardelli *et al.* , 2015).

Chez **Creative Biostructure** , notre équipe d'experts hautement qualifiés se consacre à faire progresser vos recherches grâce à des analyses structurales d'une précision inégalée. Forts d'une vaste expérience et d'un accès aux technologies de pointe – notamment la cristallographie aux rayons X, la RMN et la cryo-microscopie électronique – nous sommes idéalement placés pour sélectionner la technique optimale répondant à vos besoins spécifiques. Notre engagement envers la précision et l'excellence vous garantit des données structurales fiables pour faire avancer vos recherches. Nous vous invitons à nous [contacter](#) pour des solutions personnalisées et innovantes, adaptées à vos objectifs scientifiques.

Références

1. Bardelli, M., Livoti, E., Simonelli, L., Pedotti, M., Moraes, A., Valente, AP et Varani, L. (2015). Cartographie des épitopes par spectroscopie RMN en solution. *Journal de reconnaissance moléculaire* , 28 (6), 393-400.
2. Bingham, M.; *et al.* Criblage et caractérisation biophysiques en chimie médicinale. *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 62, pp. 61–104) 2023.
3. Callaway, E. La révolution ne sera pas cristallisée : une nouvelle méthode déferle sur la biologie structurale. *Nature News* 2015 525(7568) : 172.
4. Carroni M, Saibil R. Cryo-microscopie électronique pour déterminer la structure des complexes macromoléculaires. *Methods* 2016, 95 : 78-85.
5. Rankin, N.; *et al.* L'émergence de la métabolomique par résonance magnétique nucléaire du proton dans le domaine cardiovasculaire, vue d'un point de vue clinique. *Atherosclerosis* 2014, 237(1): 287-300.
6. Wang, HW; Wang, W. Comment la cryo-microscopie électronique et la cristallographie aux rayons X se complètent. *Protein Science* 2017, 26(1): 32-39.

Tableau comparatif : Cristallographie des rayons X vs RMN en solution

- *Comparaison des approches de biologie structurale pour la détermination de la structure 3D des macromolécules.*

Critères de comparaison	Cristallographie (Rayons X)	RMN (en solution)
Principe physique	Diffraction par les nuages électroniques	Résonance des spins nucléaires ()
État de l'échantillon	Monocristal ordonné	Soluté (proche des conditions natives)
Sonde structurale	Densité électronique	Distances inter-nucléaires (effet Overhauser - NOE)
Limite de taille	Pas de limite théorique (jusqu'au MDa)	Limitée par la relaxation (kDa en routine)
Atomes d'hydrogène	Généralement non résolus	Directement observés et localisés
Information dynamique	Faible (structure statique moyenne)	Élevée (mesure des temps de corrélation)
Contrainte majeure	Obtention d'un cristal de haute qualité	Marquage isotopique () souvent requis
Résultat final	Carte de densité électronique unique	Ensemble de structures (conformations)

L'intérêt de la **RMN** et de la **Cristallographie** pour la structure des protéines réside dans leur capacité à transformer une séquence linéaire d'acides aminés en un **modèle 3D fonctionnel**. Sans ces méthodes, nous ne pourrions pas comprendre comment les protéines travaillent à l'échelle atomique.

Voici les trois intérêts majeurs :

1. Comprendre la fonction biologique (Relation Structure-Fonction)

En biologie, "la forme, c'est la fonction".

- **Intérêt** : Ces méthodes permettent de visualiser les **sites actifs** (là où se passent les réactions chimiques).
- *Exemple* : Voir exactement comment une enzyme "attrape" sa cible pour la découper.

2. Conception de médicaments (Drug Design)

C'est l'intérêt industriel et médical le plus important.

- **Intérêt** : En connaissant la structure exacte d'une protéine responsable d'une maladie, on peut dessiner une molécule (médicament) qui s'y emboîte parfaitement pour la bloquer.
- *Application* : C'est ainsi que les traitements contre le VIH ou certains cancers sont développés.

3. Étude des interactions et de la dynamique

Les protéines ne travaillent jamais seules.

- **Intérêt** : La **Cristallographie** montre comment deux protéines s'assemblent comme des pièces de puzzle. La **RMN** montre comment cet assemblage vibre et change de forme lorsqu'il reçoit un signal.
- *Bénéfice* : On comprend comment les messages sont transmis à l'intérieur de nos cellules.