



energie atomique • énergies alternatives



Sous embargo jusqu'au 3 mai 2010

Le 30 avril 2010

## Communiqué de presse

### Structure des biomacromolécules : voir plus grand et plus précisément grâce à un nouveau procédé de marquage

**Des chercheurs grenoblois<sup>1</sup> du CEA<sup>2</sup>, du CNRS et de l'Université Joseph Fourier viennent de développer une nouvelle technique de marquage permettant de repousser les limites de la résonance magnétique nucléaire (RMN)<sup>3</sup>. Ce procédé a permis de détecter, pour la première fois, des interactions très faibles, jusqu'alors prédites mais encore jamais caractérisées dans les macromolécules biologiques. Il a également rendu possible l'étude d'une protéine de grande taille, avec une résolution au niveau atomique. Ce nouveau procédé de marquage permettra notamment une meilleure compréhension du fonctionnement des machineries biologiques. Ces résultats sont publiés dans les revues *Angewandte Chemie International Edition* et *Nature Chemistry*.**

L'un des défis actuels de la biologie est de déterminer, au niveau atomique, la structure et le fonctionnement des assemblages de protéines de grande taille. La Résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode de choix pour les étudier en solution. Cependant, cette technique se caractérise par une faible sensibilité et reste limitée à des molécules de taille modeste. Pour repousser ces limites, il est nécessaire d'avoir recours au marquage isotopique spécifique<sup>4</sup> des protéines consistant à remplacer la plupart des atomes d'hydrogène par du deutérium (isotope<sup>5</sup> de l'hydrogène, invisible en RMN). Ainsi, seuls certains atomes d'hydrogène, situés dans des positions particulières de la protéine, sont conservés et visibles. Cette technique simplifie en partie l'analyse de la structure en observant uniquement les atomes d'hydrogène d'intérêt.

Pour simplifier davantage l'analyse d'édifices moléculaires complexes et ne marquer que certains atomes d'hydrogène avec une localisation encore plus précise, les chercheurs ont développé un nouveau protocole de marquage isotopique. « *Nous pouvons désormais incorporer des groupes méthyles <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> de façon stéréosélective<sup>6</sup> dans les acides aminés leucine et valine des protéines, et ceci directement lors de leur biosynthèse. Pour développer ce procédé, nous avons dû mettre en place et optimiser des modes de*

<sup>1</sup> Institut de biologie structurale Jean-Pierre Ebel (CEA / CNRS / Université Joseph Fourier) et Laboratoire de chimie et biologie des métaux (unité mixte CEA / CNRS / Université Joseph Fourier)

<sup>2</sup> Institut de biologie structurale Jean-Pierre Ebel et Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant de la Direction des sciences du vivant du CEA

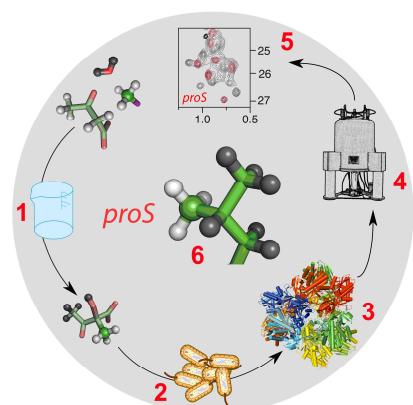
<sup>3</sup> Résonance magnétique nucléaire : phénomène par lequel un noyau de l'atome considéré absorbe les rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique en présence d'un fort champ magnétique. Ses applications concernent la physique, la chimie, l'imagerie médicale et la biologie structurale.

<sup>4</sup> Marquage isotopique spécifique : substitution de 100 % de l'atome naturel d'hydrogène par du deutérium et réinsertion spécifique en quelques sites déterminés de l'atome naturel d'hydrogène, atome observable par Résonance magnétique nucléaire.

<sup>5</sup> Deux atomes sont dits isotopes s'ils ont le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent.

<sup>6</sup> Dans les protéines, les acides aminés leucine et valine possèdent en bout de chaînes deux méthyles (CH<sub>3</sub>). Le remplacement des protons sera stéréosélectif s'il permet d'introduire spécifiquement des protons dans un seul de ces méthyles.

synthèse organique permettant de produire différents précurseurs<sup>7</sup> spécifiquement enrichis en isotopes stables - deutérium et carbone-13 », explique Olivier Hamelin, responsable de la synthèse des précurseurs marqués isotopiquement. « Ces précurseurs vont maintenant pouvoir être utilisés pour déterminer la structure de nombreuses biomolécules complexes. »



**D'une molécule simple à l'obtention du spectre RMN d'une molécule marquée de 500kDa.** La première étape permet par voie chimique (symbolisée par un vase becher) d'obtenir le précurseur enrichi isotopiquement (1). La deuxième étape consiste à marquer les protéines dans la position correcte lors de la culture (2). Une fois la protéine purifiée (3), elle est analysée par spectroscopie RMN (4). Le marquage permet de simplifier le spectre RMN (5) des protéines (en noir : spectre obtenu avec un marquage standard et en rouge avec un marquage stéréosélectif des leucines). Au centre (6), la structure chimique des leucines stéréosélectivement marquées dans la protéine (en noir : les deutérons ; en blanc, les protons ; en bâton vert : les carbones-12 ; en sphère verte : le carbone-13).

Ce marquage stéréosélectif augmente considérablement la qualité des données RMN et ouvre la porte à de nombreuses applications. « Nous avons ainsi pu observer une protéine de 500 kDalton<sup>8</sup>, soit dix fois plus grosse que celles observées classiquement », précise Jérôme Boisbouvier, spécialiste des développements technologiques en RMN. « Cette protéine, impliquée dans le système de contrôle qualité des protéines cellulaires<sup>9</sup>, n'est qu'un exemple des nombreuses molécules que les biologistes vont désormais pouvoir observer en solution grâce à ce nouveau procédé ».

Par ailleurs, grâce à l'amélioration de sensibilité apportée par cette technique, les chercheurs ont pu caractériser<sup>10</sup>, pour la première fois, un type particulier de liaisons hydrogènes, présent dans les protéines. Ces interactions, jusqu'alors uniquement prédites d'un point de vue théorique, n'avaient jamais pu être détectées expérimentalement à l'intérieur des protéines du fait de leurs très faibles intensités.

Cette nouvelle stratégie de marquage est compatible avec les techniques de RMN rapide développées récemment par ces chercheurs. Celles-ci permettent de réduire le temps expérimental pour l'observation par RMN d'assemblages moléculaires pouvant atteindre un mégaDalton. Ces développements technologiques sont des pas importants vers l'observation en temps réel et à la résolution atomique de machineries biologiques complexes en pleine action.

#### Référence des articles :

*Direct detection of CH/π interactions in proteins.* Michael Plevin, David Bryce & Jérôme Boisbouvier. **Nature Chemistry (2010), online.**

*Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR spectroscopic studies of high-molecular-weight proteins.* Pierre Gans, Olivier Hamelin, Remy Sounier, Isabel Ayala, Asunción Durá, Carlos Amero, Marjolaine Noirclerc-Savoie, Bruno Franzetti, Michael Plevin, & Jérôme Boisbouvier.

**Angewandte Chemie International Edition, (2010); 49, pp. 1958-1962.**

#### Contact presse :

CEA : Céline Lipari – 01 64 50 14 88 – [celine.lipari@cea.fr](mailto:celine.lipari@cea.fr)

#### Contacts chercheurs :

Jérôme Boisbouvier - [jerome.boisbouvier@ibs.fr](mailto:jerome.boisbouvier@ibs.fr) / Olivier Hamelin – [olivier.hamelin@cea.fr](mailto:olivier.hamelin@cea.fr)

<sup>7</sup> Précurseurs : petites molécules chimiques qui vont être utilisées pour la synthèse d'une molécule. Dans le cas présent, ces précurseurs vont permettre d'introduire les isotopes dans les molécules qui doivent être marquées.

<sup>8</sup> Un Dalton est la masse d'un atome d'hydrogène. Un acide aminé de protéine représente environ 110 Da, un assemblage d'un méga Dalton contient environ 9 000 acides aminés.

<sup>9</sup> Dans la cellule, un ensemble de grosses machines biologiques sont chargées de contrôler la qualité des protéines cellulaires et de les dégrader si nécessaire.

<sup>10</sup> Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Pr. D. Bryce de l'université d'Ottawa : <http://www.science.uottawa.ca/~dbryc159>