Les sources de rayons X pour la bio-cristallographie

R. Fourme

LURE(CNRS, CEA, MENJS), Bât 209D, Université Paris -Sud, 91405 Orsay Cedex, France

Summary: Characteristics of X ray sources for the collection of diffraction data from crystals of biological macromolecules are discussed. It is shown that, in this field, high energy electron or positron storage rings and their insertion devices are currently the best available sources for both monochromatic and polychromatic data collection. The gap between the potential of such sources and area detectors which are currently available is emphasized.

1- Généralités sur la diffraction des rayons X par un monocristal.

Quand on éclaire un échantillon avec du rayonnement électromagnétique de longueur d'onde λ , un des principaux processus observés est la réémission de lumière de même fréquence dans tout l'espace: il s'agit de diffusion élastique. On peut montrer que la structure de la lumière diffusée à grande distance (par structure, on entend l'amplitude et la phase de l'onde diffusée par l'échantillon dans chaque direction de l'espace) est reliée à la structure (i. e. la densité électronique) de l'échantillon par une transformation de Fourier. Le système optique d'un microscope conventionnel recombine une partie de ces ondes diffusées pour former une image, effectuant en temps réel par voie analogique l'opération mathématique inverse de la précédente, la transformation de Fourier inverse.

En raison des effets de diffraction, pour séparer des détails de l'objet distants de d , il faut utiliser une longueur d'onde proche de d . En conséquence, pour obtenir des détails à l'échelle atomique, le cristallographe utilise du rayonnement dont la longueur d'onde est de l'ordre de 1Å. Mais plusieurs difficultés fondamentales surgissent pour faire de la microscopie à 1Å sur une seule macromolécule: d'une part, il n'existe pas encore de dispositif fonctionnant comme une lentille dans ce domaine de longueurs d'onde. D'autre part, la probabilité de la diffusion est faible, c'est à dire qu'il faut beaucoup de photons incidents pour un photon diffusé; il faudrait éclairer très longtemps et avec une source X très puissante la molécule étudiée pour que le nombre de photons réémis permette d'obtenir une image utilisable ; et la macromolécule aurait, de toute manière, été détruite bien avant par l'irradiation.

La solution à ces problèmes réside dans l'utilisation d'un *cristal*, qui est un objet macroscopique contenant de l'ordre de 10^{14} copies de la macromolécule disposées selon un ordre tridimensionnel. L'intensité diffusée par l'ensemble des électrons augmente proportionnellement au nombre de copies; de plus, la tri-périodicité la concentre dans des directions discrètes (on parle alors de *diffraction* plutôt que de diffusion, ce terme signifiant que la figure de diffusion est dominée par les effets d'interférences entre les rayonnements émis par les diffuseurs disposés périodiquement). L'information intervenant dans le calcul de la transformée de Fourier inverse se trouve, elle aussi, contenue en totalité dans la structure - amplitude et phase - de ces faisceaux. Enfin, les effets de l'irradiation se trouvent partagés entre les diverses macromolécules. Une difficulté majeure subsiste: il faut passer par l'étape intermédiaire de l'enregistrement de l'intensité du diagramme de diffraction. Ceci est effectué avec un détecteur de photons X à localisation bidimensionnelle. Ce détecteur mesure l'intensité des faisceaux diffractés. Après diverses corrections de l'intensité expérimentale, on en déduit l'amplitude, à un facteur d'échelle près, en prenant la racine carrée de l'intensité ; par contre, la *phase* du faisceau n'est pas directement mesurable. Il manque donc une partie - essentielle en fait - de l'information pour calculer la transformée de Fourier inverse, c'est à dire la densité électronique. Les

cristallographes ont mis au point diverses méthodes pour estimer ces phases; mais cette estimation est peu précise, contrairement aux mesures d'intensités. Le tracé du modèle initial puis l'affinement de la structure font intervenir un processus complexe d'interprétation et de compréhension de l'architecture de la macromolécule, durant laquelle est incorporée une grande quantité d'information complémentaire de celle apportée par la diffraction X: connaissances du cristallographe, banques de données de fragments, information physique connue a priori (par exemple structure du solvant, contraintes stéréochimiques, fonctions de potentiel...). Durant ces opérations, les phases s'améliorent progressivement, mais demeurent jusqu'au bout assez imprécises: les déterminer d'emblée de manière plus précises à partir de mesures de diffraction reste un problème central de la cristallographie. D'ailleurs, l'indicateur courant de la qualité d'une structure, le résiduel R, exprime uniquement l'accord relatif moyen entre les amplitudes expérimentales des facteurs de structure et celles calculées avec les paramètres du modèle. L'image finale obtenue est donc une représentation relativement grossière de la densité électronique réelle. Ceci tient essentiellement au nombre limité de termes introduits dans le calcul de la série de Fourier inverse (effets de résolution), à l'imprécision sur les phases et aussi au fait que l'image obtenue est la moyenne spatio-temporelle des images d'une myriade de molécules présentant du désordre statique et dynamique. Il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus ainsi sont d'une richesse considérable, et la méthode de diffraction des rayons X par des monocristaux reste à l'heure actuelle la principale méthode permettant de déterminer l'architecture tridimensionnelle des macromolécules biologiques. Elle a permis l'étude détaillée de plusieurs centaines de macromolécules ou de systèmes macromoléculaires, fournissant une base de données d'une importance inappréciable pour la biologie moléculaire, car la fonction biologique est liée étroitement à la structure spatiale.

2- L'importance des sources de rayons X.

De ce qui précède, il ressort que tout le travail initial du cristallographe repose sur un ensemble de mesures des intensités des faisceaux diffractés dont la quantité (résolution) et la qualité (précision) vont conditionner pour l'essentiel le résultat de l'analyse structurale. Interviennent à cette étape le couple source de rayons X/détecteur, dont les deux partenaires ont évolué d'une manière véritablement révolutionnaires durant les deux dernières décennies. Nous nous limiterons ici à une brève discussion sur les sources de rayons X.

En cristallographie - après les sources de laboratoire à anticathode tournante qui ont joué un rôle essentiel pour la résolution des premières structures de macromolécules et qui équipent aujourd'hui tous les laboratoires de bio-cristallographie - l'essentiel des progrès en matière de sources X provient de l'utilisation des anneaux de stockage à électrons ou positons. Une particule chargée et accélérée émet du rayonnement électromagnétique. Quand ce rayonnement est émis par des particules de très haute énergie, les effets relativistes donnent naissance à des propriétés qualitativement nouvelles et on parle de *rayonnement synchrotron*. Les anneaux de stockage e^-/e^+ sont des accélérateurs circulaires où l'on peut stabiliser pendant des dizaines d'heures des "paquets" de particules qui émettent du rayonnement synchrotron au passage des aimants de courbure. Ce rayonnement est émis par une source dont les dimensions apparentes sont faibles; il est très intense; et il est confiné dans un cône de faible ouverture centré autour du vecteur-vitesse du paquet: de ces trois raisons, il résulte que la *brillance optique* de la source est très élevée. Par ailleurs, la distribution spectrale est *continue*. Lorsque l'énergie des particules est supérieure à 1,5 GeV, l'essentiel de l'énergie est rayonné dans le domaine X. Le bio-cristallographe dispose alors d'une source X spatialement stable, brillante et polychromatique: des propriétés qui sont, comme on le verra plus loin, essentielles pour l'enregistrement des données de diffraction. La révolution des sources synchrotron n'est pas achevée: à l'utilisation des aimants de courbure des anneaux de stockage succède celle des dispositifs magnétiques d'insertion qui permettent de moduler localement à volonté les propriétés du rayonnement émis: wigglers multipôles émettant un rayonnement plus intense et au spectre décalé vers les courtes longueurs d'onde, et bientôt onduleurs dont la brillance est très élevée dans une bande spectrale fondamentale et ses harmoniques.

En fait, le rayonnement synchrotron dans notre domaine scientifique est désormais d'utilisation banale et indispensable (1). Il est le complément des sources de laboratoire, à la brillance modeste et dont l'émission est essentiellement monochromatique. En France, le seul accélérateur émettant du rayonnement synchrotron dans la gamme des rayons X conventionnels est l'anneau à positons DCI de LURE. Il s'agit d'une machine de 1,85 GeV, de longueur d'onde critique assez courte (3,4 Å) et à

fort courant (320 mA), qui est une source à haut flux et brillance moyenne. DCI est équipé d'un wiggler à 5 aimants supraconducteurs. La stabilité du faisceau est bonne et sa durée de vie est exceptionnelle (de l'ordre de 75 heures au courant maximum, et 100 heures à 240 mA). Ces caractéristiques sont exploitées dans 4 montages pour la bio-cristallographie, aux finalités complémentaires.

- montage DW32, sur ligne wiggler (2) (100% du temps de faisceau, soit 2500 heures /an). Rayonnement monochromatique (en général vers 0,9Å). Optique à double focalisation. Détecteur à plaque photo-sensible unique avec lecteur laser intégré, construit par J. Hendrix et A. Lentfer à l'EMBL, Hambourg.

- montage D41, sur ligne issue d'un aimant de courbure (dédié à 100%). Rayonnement monochromatique. Optique à simple focalisation. Détecteur : chambre proportionnelle multifils sans parallaxe à haute résolution spatiale construite dans le cadre d'une collaboration entre LURE et le groupe de G. Charpak au CERN (3).

- montage D23B, sur ligne issue d'un aimant de courbure (dédié à 50%). Rayonnement monochromatique. Optique à longueur d'onde rapidement variable et simple focalisation. Détecteur : chambre proportionnelle multifils sans parallaxe à haut taux de comptage, également issue de la collaboration LURE/CERN (4).

- montage DW11, sur ligne wiggler, (en construction, sera dédié à 50%). Rayonnement polychromatique. Détecteur à plaque photo-sensible de grandes dimensions, avec scanner séparé de la firme Molecular Dynamics.

Un laboratoire européen de rayonnement synchrotron est en construction à Grenoble, autour d'un anneau de 6 GeV. Les montages de bio-cristallographie y tiendront aussi une place conséquente. Plusieurs montages expérimentaux sont en construction. D'autres sont en préparation pour des lignes "CRG", notamment celui supervisé par M. Roth, de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

3- Les domaines d'application du rayonnement synchrotron en bio-cristallographie.

3-1 Des données de diffraction plus précises et de plus haute résolution.

La majorité des équipes qui font l'effort de venir dans les laboratoires de rayonnement synchrotron avec leurs précieux cristaux veulent tout simplement obtenir de "meilleures" données, puisque toute la suite de leur travail en dépend. Le cristallographe mesure l'intensité de faisceaux diffractés très nombreux, spatialement très rapprochés et en présence d'un bruit important ; son travail est compliqué par la dégradation assez rapide des cristaux sous l'irradiation X, qui détruit graduellement l'arrangement tridimensionnel. Cette destruction affecte principalement les intensités des taches de diffraction à haute résolution, qui sont précisément celles qui véhiculent l'information la plus précieuse et qui sont les plus difficiles à mesurer avec les sources conventionnelles!

L'amélioration apportée par le rayonnement synchrotron est à la fois qualitative et quantitative: on obtient *très rapidement* des données à *plus haute résolution et plus précises* qui donneront en fin de compte des densités électroniques plus détaillées, plus "piquées". Donnons quelques explications à cet égard.

La vitesse d'enregistrement est considérable par rapport aux sources de laboratoire. Avec l'instrument DW32, le spectre de diffraction à résolution moyenne (3Å) d'une protéine de masse moléculaire voisine de 10 kD (une parvalbumine de brochet) a été récemment enregistré avec une exposition totale de 9 minutes à la longueur d'onde de 0,9 Å (ce temps aurait été raccourci à 90 secondes à la longueur d'onde de 1,40 Å). En fait, c'est le détecteur à plaque photo-sensible et non la source qui a été ici l'élément limitant : dans ce cas particulier, en effet, chaque image correspondait à la diffraction durant une rotation de 1 degré du cristal et le temps effectif de la mesure fut de l'ordre de 3,25 heures en raison du temps de traitement incompressible de chaque image (134 secondes). Le cycle utile du détecteur est évidemment bien meilleur pour les enregistrements plus exigeants (petits cristaux, grosses molécules...) qui nécessitent des expositions de 10 à 50 fois plus longues: par exemple, pour

citer des exemples récents, cristaux de complexes tRNA/tRNA synthétase et de lipase/colipase, de nitrogénase, de catalase, du photosystème I...

L'amélioration de la qualité et de la quantité des données tient à plusieurs causes. Les rayonnements de longueurs d'onde plus courtes utilisables avec les sources synchrotron (0,9 Å au lieu de 1,54 Å) sont moins absorbés par les cristaux et provoquent moins de dégâts par irradiation ; l'accroissement considérable du débit de dose est aussi (paradoxalement) bénéfique, car les radicaux libres produits par l'irradiation diffusent dans le cristal relativement lentement. La brillance de la source permet d'utiliser un faisceau X incident quasi-parallèle, produisant des taches de diffraction très fines donc caractérisées par un haut signal sur bruit sur le détecteur. Enfin, le parallélisme et la courte longueur d'onde du faisceau X permettent l'emploi de distances cristal-détecteur d plus grandes: le rayonnement de diffusion parasite décroît en $1/d^2$ alors que l'intensité du signal de diffraction reste pratiquement inchangée. Cette amélioration est observée pour la quasi-totalité des cristaux. Elle permet de tirer la quintessence des cristaux existants et rend praticables certaines études extrêmes: si la structure détaillée d'un ribosome est connue un jour, ce sera certainement grâce au rayonnement synchrotron.

3-2 Une extension des méthodes utilisant la diffusion anormale pour l'estimation des phases.

On entre ici dans un domaine plus spécialisé (5, 6). Après la fabrication des cristaux, le problème des phases est en effet le principal obstacle sur la voie de la banalisation des méthodes cristallographiques. Comme indiqué plus haut, la densité électronique est une série de Fourier à termes complexes ; or l'expérience (c'est à dire le détecteur bidimensionnel) ne fournit que les amplitudes de ces nombres complexes, et non les phases. La manière usuelle pour estimer les phases des faisceaux diffractés est la méthode des substitutions isomorphes multiples (MIR). On fabrique des cristaux dans lesquels les molécules de protéines sont marquées par quelques atomes lourds (mercure, platine...) fixés en des sites bien définis. La présence de ces atomes lourds modifie les intensités des taches de diffraction. En mesurant l'intensité de la même tache de diffraction relative au cristal "natif" et à deux cristaux "marqués" en des sites différents, on peut déterminer la phase. Cette méthode est puissante, mais elle a des défauts: la recherche de plusieurs "bons" dérivés lourds est une opération fastidieuse et aléatoire, car il faut non seulement qu'il y ait fixation du métal mais aussi que cette réaction chimique ne modifie pas sensiblement ni la forme de la molécule ni l'empilement cristallin (problème du défaut d'isomorphisme).

Il existe une variante élégante de cette méthode, qui permet de réaliser l'opération avec *un seul* cristal constitué de molécules de protéine native contenant une espèce chimique minoritaire (sélénium, lanthanide, mercure, brome...). On éclaire le cristal par des photons X dont l'énergie est voisine de l'énergie de liaison des électrons des couches K ou L de l'espèce minoritaire ; il se produit des effets de résonance qui modifient l'amplitude et la phase du rayonnement diffusé par ces atomes. Il s'agit du phénomène de *diffusion anormale*, et un simple changement de longueur d'onde permet d'obtenir un pseudo-dérivé lourd qui est évidemment de structure invariante, ce qui élimine tout défaut d'isomorphisme. Le développement de la méthode MAD (Multiple wavelength Anomalous Diffraction) a été rendu possible depuis quelques années grâce à l'intensité et au spectre continu du rayonnement synchrotron. La première densité électronique obtenue par cette méthode, celle de la parvalbumine du muscle rapide de la vessie natatoire du poisson Opsanus Tau, est due à l'équipe de LURE (7). Un travail récent (8), résultant de la collaboration entre une équipe de l'Université de Columbia et l'équipe de LURE, a permis la résolution de la structure tridimensionnelle d'un fragment de la MBP (mannose binding protein) de rat et d'obtenir ainsi la topologie générale du domaine de fixation des hydrates de carbone caractéristique des lectines C (figure 1). Nous avons utilisé dans ce cas la diffusion anormale intense de deux ions Ho^{3+} substitués aux ions Ca^{2+} du monomère natif, ce qui a permis d'obtenir une carte de densité électronique rapidement interprétable. Les mesures ont été effectuées à l'aide du montage D23b, trois jeux de données très précis étant enregistrés au voisinage du seuil d'absorption Ho L_{III} .

Même dans les cas où les données sont enregistrées à une seule longueur d'onde, la diffusion anormale peut apporter une contribution cruciale au phasage si l'on choisit de manière appropriée la longueur d'onde du rayonnement X incident. Un exemple démonstratif à cet égard est la résolution récente de la structure d'une protéine, la nucléoside diphosphate kinase (NDPK) (collaboration Laboratoire de Biologie Structurale, Orsay/ Institut Pasteur/ LURE) (9). Une mutation substituant une cystéine à une histidine au centre actif de l'enzyme a permis d'obtenir un bon site de liaison covalente pour un atome de mercure. Nous avons enregistré avec le montage DW32 un jeu de

Fig. 1 Diagramme en ruban de la structure tridimensionnelle du dimère du fragment de la MBP (mannose binding protein) de rat résolue par méthode MAD (d'après la réf. 8).

données de diffraction du cristal de mutant natif, puis un second jeu pour un cristal de mutant marqué au mercure. La longueur d'onde était ajustée au voisinage de 1 Å, longueur d'onde pour laquelle la diffusion anormale du mercure est maximale. Ces deux jeux de données ont suffi pour tracer d'emblée une carte de densité électronique très claire (figure 2) et résoudre la structure (figure 3). Il est intéressant de noter que l'enregistrement des données a été mené à bien en 13 heures. Cet exemple montre aussi comment la cristallographie moderne fait appel à l'ingénierie des protéines, les biochimistes modifiant la protéine étudiée en fonction des besoins des cristallographes en vue de fixer un marqueur spécifique: on peut par exemple incorporer des résidus cystéine pour une liaison covalente avec le mercure, ou remplacer les résidus méthionine par des résidus sélénio-méthionine pour utiliser le sélénium en méthode MAD.

On peut se demander si un (hypothétique!) laser X à 1 Å permettrait de solutionner le problème des phases en effectuant une expérience d'holographie. La réponse est vraisemblablement non car nos cristaux sont de structure mosaïque, c'est à dire constitués de domaines monocristallins légèrement désorientés les uns par rapport aux autres. On notera que cette structure mosaïque n'a pas d'effet dans la méthode MIR ou MAD, dans lesquelles l'onde de référence (émise par les atomes lourds) est produite au sein même du cristal.

3-3 Des mesures rapides et répétées du spectre de diffraction: étude de phénomènes dépendant du temps dans un monocristal.

Les mesures de diffraction en *rayonnement monochromatique* sont effectuées en enregistrant avec un détecteur bidimensionnel les taches de diffraction activées lors d'une petite rotation du cristal (en général 0,05° avec les détecteurs électroniques, 1° avec les plaques photo-sensibles). Cette méthode est celle qui permet d'obtenir les mesures de la plus haute qualité aussi bien en quantité (dans le domaine de résolution permis par un cristal donné, toutes les réflexions sont accessibles) qu'en qualité (le rapport du signal de diffraction au bruit - c'est à dire les diffusions parasites - est maximal).

Le rayonnement X monochromatique le plus intense disponible en 1992 en France, dans le domaine de longueur d'onde compris entre 0,8 et 1,8 Å, est probablement celui que délivre l'optique de l'expérience DW32 à LURE. Pour discuter de l'intervalle de temps minimum nécessaire à la mesure d'un jeu de données assez complet avec DW32, prenons le cas moyen suivant: cristal de bonne qualité et de dimensions de l'ordre de 300 microns, maille orthorhombique de paramètres cristallins de l'ordre de 50 Å, longueur d'onde 1,40 Å (pour laquelle la brillance du montage est maximale), rotation par image 2,5°, rotation totale durant l'enregistrement 90° (pour un cristal de plus haute symétrie, la rotation pourrait être réduite d'un facteur 2 à 4)

- cas des films radiographiques, avec 6 cassettes porte-film sur un carrousel. L'intervalle de temps requis pour l'enregistrement d'une image est de 5 secondes (rotation du carrousel et positionnement de la cassette suivante) auquel il faut ajouter le temps d'exposition de l'ordre de 20 secondes par degré. Changements de films inclus, le temps minimal requis est de 25 minutes pour un balayage total de 90°. Noter qu'il reste ensuite à développer les films, à lire les images avec un densitomètre et à faire l'analyse des données digitalisées pour en extraire l'information cristallographique pertinente. C'est par cette procédure qu'une réaction catalytique très lente a pu être suivie dans des cristaux de phosphorylase b de haute symétrie, chaque jeu de données à moyenne résolution étant dans ce cas enregistré en 20 minutes avec de gros cristaux (10).

- cas du détecteur à plaque photo-sensible. Ce détecteur est beaucoup plus efficace qu'un film radiographique, mais présente, comme indiqué plus haut, l'inconvénient que chaque image doit être lue avant d'enregistrer l'image suivante. L'intervalle de temps minimal entre deux images est 134 secondes (lecture-effacement), et l'exposition de l'ordre de 5 secondes est effectuée en parallèle. La durée d'enregistrement d'un jeu de données est alors de 87 minutes pour une rotation totale de 90°. Dans ce cas, les images sont digitalisées et prêtes à être analysées.

En conséquence, pour ce qui concerne les mesures rapides de diffraction en rayonnement monochromatique, le principal goulot d'étranglement actuel vient des détecteurs. Il faudra réaliser un détecteur et un système d'acquisition de données combinant le taux de comptage et la résolution spatiale des plaques photo-sensibles avec le temps mort entre deux images de l'ordre de la seconde que permettent des détecteurs électroniques tels que ceux des montages D41 et D23b à LURE. Il

Fig. 2 Densité électronique de la NDPK obtenue directement par méthode SIRAS (un seul dérivé lourd et appoint de la diffusion anormale) (tracée par C. Dumas, LBS Orsay) (ref.9).

Fig.3 Diagramme en ruban de la structure tridimensionnelle du monomère de la NDPK (ref. 9).

existe quelques possibilités pour réaliser un tel appareil dans un délai de quelques années. Avec ce détecteur et une source synchrotron de 3^{ème} génération (ESRF à Grenoble, APS à Cornell, Spring 8 au Japon), la durée d'un enregistrement pourrait alors descendre à 3 minutes pour une rotation totale de 90°.

Pour des expositions plus courtes, il faut recourir à la *méthode de Laue* qui utilise du rayonnement de large bande passante et de ce fait raccourcit les temps d'exposition de plusieurs ordres de grandeur (11). Des expériences effectuées avec un onduleur sur l'anneau de stockage CHESS à l'Université Cornell indiquent qu'il est envisageable, avec un onduleur X sur une source synchrotron de 3^{ème} génération et une bonne optique de focalisation, d'enregistrer un diagramme de Laue dans l'intervalle de temps correspondant au passage d'un seul "paquet" de particules, c'est à dire en moins d'une nanoseconde. La méthode de Laue a divers inconvénients que ne présente pas la méthode monochromatique. Elle nécessite des cristaux de très haute qualité (faible mosaïcité); les données qu'elle permet d'enregistrer sont incomplètes à basse et haute résolution et une fraction des données enregistrées est inexploitable pour cause de chevauchement des taches de diffraction sur le détecteur et de superposition du fondamental et d'harmoniques dans la même tache de diffraction. Cependant, la difficulté la plus sérieuse pour étudier des phénomènes dépendant du temps dans un cristal - ceci est évidemment valable en rayonnement monochromatique - est liée au fait, déjà souligné auparavant, que l'image obtenue par cristallographie est une moyenne spatio-temporelle sur une vaste collectivité de molécules arrangées de manière tri périodique. Ainsi, assurer la simultanéité du déclenchement d'une réaction dans tout le volume du cristal et obtenir une espèce moléculaire largement majoritaire et organisée à 3 dimensions durant chaque brève exposition sont des problèmes ardu, qui impliquent un choix soigneux et une étude préalable approfondie du système étudié. Conclusion: la méthodologie est au point pour l'essentiel, la balle est désormais dans le camp des chimistes et des biochimistes.

Existe t-il des sources X pulsées à spectre continu qui permettraient des expositions de diagramme de Laue encore plus brèves? Cette question a été discutée durant la réunion de Carry le Rouet. Le facteur important n'est pas l'intensité, mais la brillance. De ce point de vue, il semble clair que les onduleurs sur les sources synchrotron de 3^{ème} génération dominent le débat.

4- Conclusion.

En bio-cristallographie, les sources X synchrotron présentent toutes les caractéristiques souhaitables et les développements ultérieurs vont faire appel à des dispositifs d'insertion sur des anneaux de stockage de haute énergie et certainement pas à des sources d'un type radicalement différent. Le goulot d'étranglement pour les diverses méthodes d'enregistrement des données de diffraction est constitué par les détecteurs bidimensionnels. Les détecteurs actuels, en dépit de leurs énormes progrès, sont dans la plupart des cas concrets incapables d'utiliser efficacement le potentiel des sources synchrotron actuelles, ni à fortiori celui des sources de dernière génération. Il serait opportun de faire les efforts appropriés pour améliorer une situation qui n'est d'ailleurs pas propre à la cristallographie. Dans le cas qui nous occupe ici, le problème technique est extrêmement complexe, dans la mesure où l'on demande au détecteur idéal de posséder simultanément des qualités largement contradictoires : grand nombre de pixels, très haut taux de comptage, grande dynamique, réponse uniforme, très haut débit d'informations etc..

Une dernière remarque: la situation qui vient d'être décrite et le fait que les cristallographes ont besoin en permanence du rayonnement synchrotron tant pour les travaux de pointe que pour les travaux courants plaident pour que soit maintenu dans le futur un laboratoire national de rayonnement synchrotron, travaillant en concertation et en coordination avec le laboratoire européen. C'est d'ailleurs la situation et la tendance qui prévalent à l'heure actuelle dans les divers laboratoires nationaux anglais (Daresbury), allemand (Hambourg), français (Orsay) et italien (Trieste), qui sont tous en développement ou en consolidation tout en étant associés à la construction de l'ESRF.

Références

- 1- Helliwell, J., Macromolecular crystallography with synchrotron radiation, Cambridge University Press (1992).
- 2- Fourme, R. et al., Rev. Sci. Instrum. **63(1)** (1992), 982.
- 3- Bahri, A. et al., Rev. Sci. Instrum. **63(1)** (1992), 655.
- 4- Kahn, R. et al., Nucl. Instrum. Methods **A246** (1986), 596.
- 5- Hendrickson, W. A., Science **254** (1991), 51.
- 6- Fourme, R. et Hendrickson, W. A., Synchrotron Radiation and Biophysics (1990), 156, Ellis Horwood (Chichester) .
- 7- Kahn, R. et al., Febs Letters **179** (1985), 133.
- 8- Weis, W. I. et al. (1991) Science, **254**, 51.
- 9 - Dumas, C. et al., The EMBO J. (sous presse).
- 10- Hadju , J. et al. Biochem. Soc. Trans. **14** (1986), 538.
- 11- Hadju, J. et al., Embo J. **6** (1987) , 539.