

infrarouge multidimensionnelle permettront de caractériser les mécanismes de propagation de perturbations à travers la chaîne peptidique à l'échelle de temps femto-picoseconde.

Remerciements

L'auteur remercie le grand nombre de chercheurs non permanents et permanents du Laboratoire d'optique et biosciences (LOB) et les collaborateurs extérieurs qui ont contribué aux travaux résumés dans cet article.

Références

- [1] Lumry R., Keyes M.H., Falley M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, p. 2035.
- [2] Vos M.H., *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1777, p. 15.
- [3] Ye X., Demidov A., Champion P.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, p. 5914.
- [4] Ventalon C., Fraser J.M., Vos M.H., Alexandrou A., Martin J.-L., Joffre M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, p. 13216.
- [5] Garry D.J., Ordway G.A., Lorenz J.N., Radford N.B., Chin E.R., Grange R.W., Bassel-Duby R., Williams R.S., *Nature*, **1998**, 395, p. 905.
- [6] Vos M.H., Lambry J., Robles S.J., Youvan D.C., Breton J., Martin J.-L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, p. 8885.
- [7] Dexheimer S.L., Wang Q., Peteanu L.A., Pollard W.T., Mathies R.A., Shank C.V., *Chem. Phys. Letters*, **1992**, 188, p. 61.
- [8] Treuffet J., Kubarych K.J., Lambry J.-C., Pilet E., Masson J.-B., Martin J.-L., Vos M.H., Joffre M., Alexandrou A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, p. 15705.
- [9] Liebl U., Lipowski G., Négrerie M., Lambry J.-C., Martin J.-L., Vos M.H., *Nature*, **1999**, 401, p. 181.
- [10] Groot M.-L., Vos M.H., Schlichting I., van Mourik F., Joffre M., Lambry J.-C., Martin J.-L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, p. 1323.
- [11] Polack T., Ogilvie J.P., Franzen S., Vos M.H., Joffre M., Martin J.-L., Alexandrou A., *Phys. Rev. Lett.*, **2004**, 93, p. 018102.
- [12] Franzen S., Lambry J.-C., Bohn K., Poyart C., Martin J.-L., *Nature Struct. Biol.*, **1994**, 1, p. 230.
- [13] Cianetti S., Négrerie M., Vos M.H., Martin J.-L., Kruglik S.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, p. 13932.
- [14] Olson J.S., Phillips G.N. Jr, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, p. 17593.
- [15] Silkstone G., Jasaitis A., Wilson M.T., Vos M.H., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, p. 1638.
- [16] Liebl U., Bouzhir-Sima L., Négrerie M., Martin J.-L., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, p. 12771.
- [17] Jasaitis A., Hala K., Bouzhir-Sima L., Lambry J.-C., Balland V., Vos M.H., Liebl U., *Biochemistry*, **2006**, 45, p. 6018.
- [18] Yamashita T., Bouzhir-Sima L., Lambry J.-C., Liebl U., Vos M.H., *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, p. 344.
- [19] Pilet E., Jasaitis A., Liebl U., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, p. 16198.
- [20] Jasaitis A., Rappaport F., Pilet E., Liebl U., Vos M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, p. 10882.



Marten Vos

est directeur de recherche CNRS au Laboratoire d'optique et biosciences (LOB), École polytechnique*.

* Laboratoire d'optique et biosciences (LOB), Inserm U696, CNRS UMR 7645, École polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex.
Courriel : marten.vos@polytechnique.edu

Étude de la dynamique structurale de la myoglobine par cristallographie sub-nanoseconde

Dominique Bourgeois

Résumé

Le comportement « dynamique » des macromolécules biologiques est une propriété fondamentale du monde vivant. Pour étudier le mouvement des protéines, les chercheurs utilisent la myoglobine depuis près de trente ans. Cette petite protéine est formée d'environ 150 acides aminés repliés sous forme d'hélices pour enserrer un hème au cœur duquel est fixé un atome de fer. L'oxygène se fixe au fer par une liaison de coordination dont l'intensité dépend des contraintes structurales imposées par la protéine. Les ligands diatomiques (O₂, CO, NO) peuvent être dissociés au moyen d'une impulsion laser ultracourte, générant un état photoexcité au sein d'une grande population de protéines de manière parfaitement synchronisée. Le retour à l'équilibre de cet état excité peut alors être étudié par une panoplie de méthodes spectroscopiques et structurales. Grâce à la cristallographie aux rayons X résolue en temps, développée ces dernières années, les modifications structurales induites par la photodissociation du monoxyde de carbone peuvent être visualisées de manière directe et à l'échelle atomique avec une résolution temporelle approchant la picoseconde.

Mots-clés

Cristallographie résolue en temps, dynamique des protéines, myoglobine, photolyse laser.

Abstract

The structural dynamics of myoglobin investigated by sub-nanosecond crystallography

The dynamical behaviour of biological macromolecules is one of the fundamental properties of living systems. Over 30 years, myoglobin has been used as a model for the study of the movement of proteins. This small protein is formed of 150 aminoacids folded in helices and surrounding the heme at the centre of which sits an iron atom. Oxygen binds iron by coordination and the strength of the bond depends upon the structural constraints of the protein. Experimentally myoglobin offers a great advantage: diatomic ligands (O₂, CO, NO) can be readily dissociated by an ultrashort laser pulse, thereby producing synchronously a large population of excited states within the specified proteins. The return of this state to equilibrium can be studied by several structural and spectroscopic methods. Using time resolved X-ray crystallography developed recently and described here, structural modifications in myoglobin induced by the photoejection of CO can be revealed directly at the atomic scale with a time resolution approaching the picosecond time scale.

Keywords

Time-resolved crystallography, protein dynamics, myoglobin, laser photolysis.

La dynamique des protéines

Les protéines, expression du génome, sont des chaînes polypeptidiques constituées d'une longue séquence d'acides aminés. Elles sont impliquées dans tous les mécanismes essentiels de la cellule comme le métabolisme énergétique, le transport intracellulaire ou les échanges avec le milieu extérieur. Chaque protéine se replie dans l'espace pour adopter une structure tridimensionnelle optimisée pour sa fonction biologique. Cette structure 3D présente un caractère hautement dynamique, fluctuant sans cesse entre un grand nombre de conformations légèrement différentes. Les transitions entre états conformationnels jouent un rôle clé dans l'exécution de la fonction et s'effectuent sur une très vaste échelle de temps (de la picoseconde à la seconde, soit douze ordres de grandeur). La « dynamique des protéines » constitue donc un aspect fondamental de l'étude du vivant.

La myoglobine : un « modèle de complexité »

Depuis près de trente ans, la myoglobine, petite protéine globulaire apportant l'oxygène nécessaire à la contraction des muscles squelettiques et cardiaques, est utilisée comme modèle pour étudier le comportement des protéines. On parle ainsi de la myoglobine comme de « l'atome d'hydrogène de la biologie ». Elle est aussi qualifiée de « paradigme de la complexité », tant cette protéine pourtant simple (*figure 1*) ne cesse de dévoiler le caractère extrêmement complexe du comportement dynamique des macromolécules biologiques [1].

Les premières études spectroscopiques sur la myoglobine, s'intéressant au processus de recombinaison d'un ligand de monoxyde de carbone photodissocié,

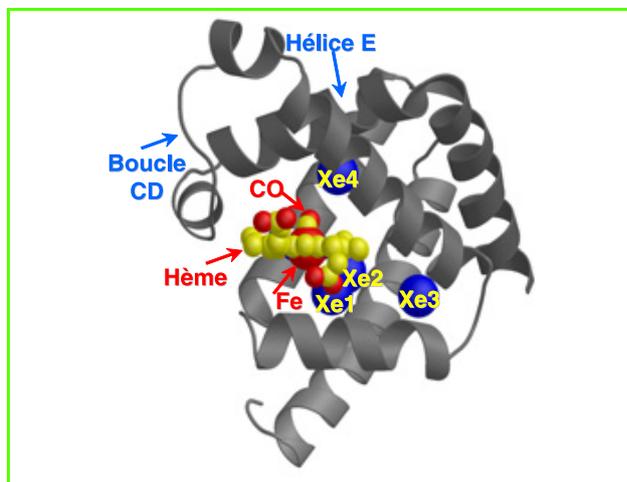


Figure 1 - Structure tridimensionnelle de la myoglobine.

La myoglobine est formée de 153 acides aminés qui se replient sous forme d'hélices pour enserrer un hème au cœur duquel est fixé un atome de fer. L'ensemble forme un globule soluble d'environ 3 nm de diamètre. C'est la première protéine dont la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie aux rayons X [17-18]. L'oxygène se fixe au fer par une liaison de coordination, plus ou moins fortement selon les contraintes structurales imposées par la protéine. La myoglobine présente un grand avantage expérimental. Les ligands diatomiques (O_2 , CO, NO) peuvent être dissociés de manière réversible au moyen d'une impulsion laser, générant un état photoexcité synchrone au sein d'une grande population de protéines. La relaxation conformationnelle de cet état excité, associée à la recombinaison du ligand, peut alors être étudiée par cristallographie résolue en temps. Les cavités qui interviennent comme sites de stockage transitoires lors de la migration du ligand sont représentées en bleu. Elles sont notées « Xe1 » à « Xe4 » car elles ont été découvertes en faisant diffuser du xénon dans la protéine [4].

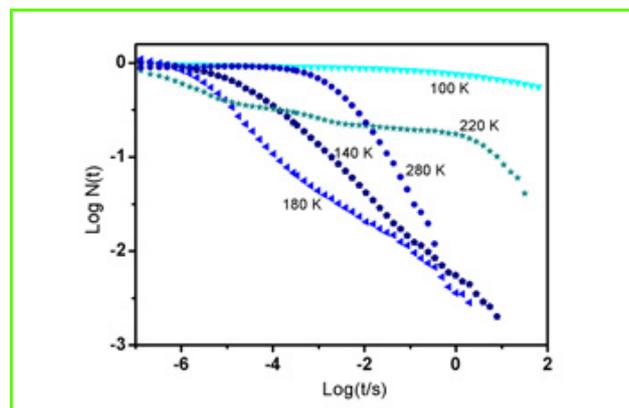


Figure 2 - Cinétique de recombinaison du monoxyde de carbone à la myoglobine.

Lorsque l'on photodissocie le monoxyde de carbone lié à la myoglobine, il est possible de suivre sa cinétique de recombinaison par spectroscopie d'absorption infrarouge. Dans cette figure, $N(t)$ représente la fraction de CO restant libre et la cinétique de recombinaison est montrée pour différentes températures. Ces cinétiques évoluent de manière complexe, témoignant des différentes phases de recombinaison (« gémignée rapide », « gémignée lente », « bimoléculaire »). Leur dépendance en température est parfois contre-intuitive : par exemple, la recombinaison à 220 K est nettement plus lente qu'à 180 K. L'explication tient au fait qu'au-dessus de 200 K, de larges mouvements protéiques deviennent possibles, qui autorisent une recombinaison « bimoléculaire », nettement plus lente que les recombinaisons de type « gémignées » (figure préparée à partir de [19]).

révélèrent tout d'abord des cinétiques fort bizarres, très éloignées d'une simple loi exponentielle (*figure 2*). Au cours des années, la complexité des résultats commença à être comprise.

Trois possibilités existent pour le ligand photodissocié : une recombinaison « gémignée rapide », où le ligand reste à proximité immédiate de l'hème pendant un temps très court avant de rétablir sa liaison de coordination avec le fer (< 1 ns) ; une recombinaison « gémignée lente », où il se recombine après une période plus longue, après avoir diffusé au sein de la matrice protéique (~ 100 ns) ; et une recombinaison « bimoléculaire », où le ligand, après avoir migré hors de la protéine, se lie à nouveau avec une autre molécule de myoglobine (~ 1 ms) [2].

Le paysage conformationnel des protéines

La cinétique de ces trois phases de recombinaison et leur dépendance parfois contre-intuitive à la température (*figure 2*) furent bientôt corrélées à l'existence de mouvements protéiques répartis en plusieurs familles [3]. Des mouvements de faible amplitude (présents à toute température) favorisent ainsi la phase gémignée rapide, tandis que des mouvements de moyenne et grande amplitude (présents seulement au-dessus de ~ 200 K) favorisent respectivement la phase gémignée lente et la recombinaison bimoléculaire.

Cependant, le mécanisme de recombinaison du CO à la myoglobine ne pouvait être bien compris sans l'apport d'informations structurales plus précises.

Migration du ligand et cavités intraprotéiques

En 1984, une étude cristallographique révéla de manière inopinée l'existence de « cavités » au sein de la myoglobine (*figure 1*) [4]. La nature « ayant horreur du vide », ces cavités

constituent des défauts d'empilement de la protéine et sont coûteuses d'un point de vue thermodynamique. Pour justifier leur présence, il était donc logique de leur associer un rôle fonctionnel. Il fut proposé qu'elles servent de « sites de stockage » du ligand et interviennent ainsi de manière essentielle dans le processus de recombinaison [5].

Ainsi, la recombinaison du CO après photolyse devait impliquer un ou plusieurs chemins de migration conduisant le ligand d'une cavité à l'autre, jusqu'à revenir à l'hème ou sortir de la protéine, et ce en fonction des fluctuations conformationnelles empêchant ou favorisant l'accès aux cavités.

Cristallographie aux rayons X « résolue en temps »

Bien que les processus de migration du ligand photodissocié puissent être étudiés par spectroscopie d'absorption (infrarouge, UV-visible), par simulation numérique, ou même par cristallographie à l'état photostationnaire [6-7], leur visualisation directe nécessitait l'utilisation de la cristallographie « résolue en temps ». Cette technique repose sur le constat fondamental que les mouvements des protéines cristallisées sont globalement les mêmes qu'en solution⁽¹⁾. Une méthodologie du type « pompe-sonde » est employée où la pompe est une impulsion laser et la sonde un flash de rayons X produit par rayonnement synchrotron (*figure 3, encadré*). Grâce au travail de pionnier mené en collaboration avec l'équipe américaine de Keith Moffat, les premiers résultats furent publiés en 1996 [8] et 2001 [9]. Avec les progrès méthodologiques considérables réalisés ces dernières années, les mouvements structuraux induits par la photodissociation du monoxyde de carbone, et la corrélation entre ces mouvements et les chemins de migration du ligand à travers la matrice protéique peuvent aujourd'hui être analysés à l'échelle quasi atomique avec une résolution temporelle sub-nanoseconde [10-12].

Visualisation d'un « séisme protéique »

Les résultats des expériences se présentent, pour chaque délai pompe-sonde, sous la forme de cartes de densité

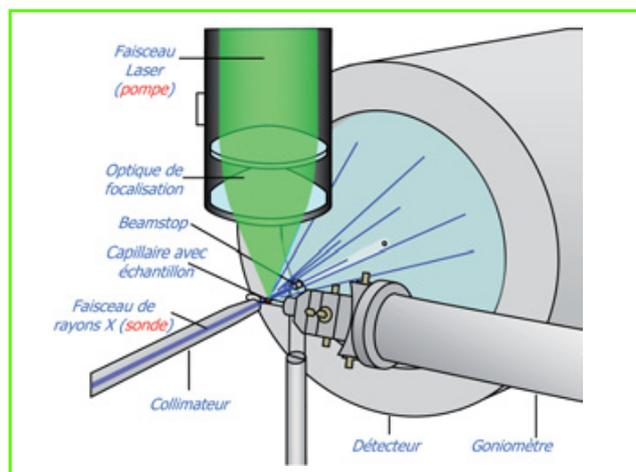


Figure 3 - Dispositif expérimental.

Schéma du dispositif expérimental conçu sur la ligne de lumière ID09B de l'ESRF à Grenoble. Le cristal de myoglobine, saturé de CO, est monté dans un capillaire étanche, sur un diffractomètre permettant l'alignement et l'orientation du cristal dans le volume focal commun aux faisceaux laser et X (figure préparée à partir de [20]).

Rayonnement synchrotron et cristallographie de Laue

Les expériences de cristallographie résolue en temps utilisent le rayonnement X extrêmement intense, stable et pulsé produit par les sources synchrotrons. Ces grands instruments, comparables à des « supermicroscopes », permettent de sonder la matière à l'échelle de l'atome, dans les domaines les plus divers de la science. Les expériences décrites ici utilisent les sources synchrotrons les plus modernes et puissantes, dites de « troisième génération », comme l'Installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF) à Grenoble.

La méthode de diffraction choisie est la méthode de Laue, qui consiste à utiliser un faisceau de rayons X polychromatique, stimulant en même temps un grand nombre de réflexions cristallographiques. Cette technique permet d'obtenir des clichés de diffraction environ 10 000 fois plus vite que si l'on utilise un rayonnement monochromatique. Si les expériences de diffraction de Laue sont assez simples à réaliser (les premières datent de 1912, lorsque Max von Laue découvrit le phénomène de diffraction X avec un échantillon de sulfure de zinc), ce sont aussi les plus complexes à analyser du fait de la densité d'information présente sur les images.

C'est grâce à la structure impulsionnelle du rayonnement synchrotron qu'il est possible d'obtenir des clichés Laue sub-nanoseconde. À l'ESRF, un mode de fonctionnement particulier est utilisé (appelé « single-bunch ») produisant des impulsions X très intenses de durée ~ 150 ps.

Pour photoactiver l'échantillon, des impulsions laser de ~ 100 ps de couleur verte (533 nm, proche de la bande Q d'absorption de l'hème) sont délivrées à l'échantillon au moyen d'une fibre optique. L'obtention d'un jeu de données cristallographiques complet et de bon rapport signal sur bruit nécessite de répéter la séquence pompe-sonde un grand nombre de fois. Ainsi, la méthode n'est applicable qu'à des systèmes biologiques photoactivables, robustes et réversibles. En pratique, 5 heures et près de 20 000 excitations laser et X sont nécessaires pour collecter une dizaine de délais pompe-sonde.

électronique « différence » entre la forme excitée (laser « on ») et la forme relaxée (laser « off ») de l'échantillon. La *figure 4* a été obtenue avec un triple mutant de la myoglobine nommé YQR-Mb (où la leucine 29 est remplacée par une tyrosine, l'histidine distale 64 par une glutamine et la thréonine 67 par une arginine) [11]. Trois nanosecondes après photolyse laser, les événements suivants sont observés : le CO est dissocié (signal 1 sur la *figure 4a*), et a migré vers la cavité Xe4 (signal 2). La transition bas spin/haut spin du fer induit un déplacement vertical de cet atome, poussant l'histidine proximale His93 vers le bas (signal 3).

L'hème se courbe vers la partie distale de la poche hémique (signal 4), et les deux résidus mutés Tyr29 et Gln64 basculent vers le site laissé vacant par le ligand et établissent entre eux une liaison hydrogène (signaux 5 et 6). Peu de changements structuraux sont observés en dehors de la poche hémique (*figure 4b*, ellipse). Au contraire, ~ 300 ns après photolyse, un « séisme protéique » s'est propagé à distance de « l'épicentre », et plusieurs structures secondaires subissent des mouvements importants, dont la boucle CD et l'hélice E (*figure 4d*, ellipse). Le ligand est maintenant observé dans la cavité Xe1, de l'autre côté de l'hème (*figure 4c*, signal 7). D'autres jeux de données collectés à d'autres délais (100 ps, 316 ps, 562 ps, 1 ns, 32 ns, 3 μ s) permettent d'évaluer avec précision l'enchaînement des événements structuraux induits par la photodissociation du ligand [13].

Une conclusion essentielle est que la migration du CO de la cavité Xe4 vers la cavité Xe1 (associée à la recombinaison géminée lente) est synchrone avec les mouvements

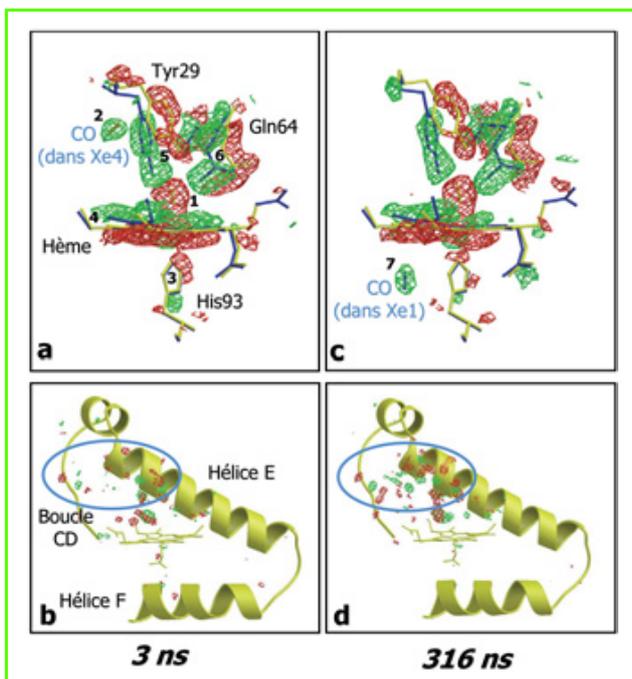


Figure 4 - Cartes de densité électronique révélant le séisme protéique

Cartes de densité électronique « différence » entre la forme excitée et la forme au repos (CO lié) de la myoglobine (triple mutant « YQR-Mb »). Ces cartes sont superposées aux modèles de la myoglobine au repos (jaune) et à l'état excité (bleu). Les parties rouges des cartes de densité indiquent un départ d'électrons suite à la photolyse, les parties vertes indiquant au contraire une augmentation du nombre d'électrons. La protéine se déplace donc du rouge vers le vert. Les figures 4a et 4c montrent l'environnement immédiat de l'hème, tandis que les figures 4b et 4d montrent des parties de la protéine plus éloignées. Les mouvements de la boucle CD et de l'hélice E atteignent leur maximum après ~ 300 ns (ellipses bleues) et sont corrélés avec la migration du ligand vers la cavité Xe1.

structuraux (d'amplitude moyenne) de la boucle CD et de l'hélice E. Le comportement dynamique de la myoglobine « en action » a pu être visualisé de manière directe.

Conclusion et perspectives

La technique de cristallographie résolue en temps révèle de manière remarquable la complexité du comportement dynamique des macromolécules biologiques. Dix ans d'efforts acharnés ont permis d'obtenir des résultats fascinants sur la myoglobine (et quelques autres protéines [14-15]), montrant la subtilité de la nature à mettre au point des macromolécules capables d'exécuter leur fonction de manière exactement adaptée aux besoins physiologiques. D'énormes progrès restent cependant à réaliser pour prendre en compte le fait que chaque protéine fluctue sans cesse entre plusieurs états conformationnels d'énergies voisines. Comme technique « d'ensemble », la cristallographie reste impuissante à suivre le comportement de molécules individuelles. Pour pallier cette difficulté majeure, cristallographie et simulation par dynamique moléculaire peuvent être combinées : les trajectoires individuelles prédites par simulation sont moyennées, puis comparées au comportement global de l'échantillon cristallin mesuré expérimentalement, afin d'être validées [16]. L'apport des techniques de spectroscopie sur molécule unique, en combinaison avec la cristallographie, sera aussi amené à croître. Enfin, les sources « laser X à électron libre » en construction aujourd'hui

permettront d'améliorer encore la résolution temporelle à un niveau sub-picoseconde, ouvrant de nouvelles portes pour l'investigation des phénomènes dynamiques ultrarapides dans les protéines [17].

Remerciements

L'auteur remercie G.U. Nienhaus et F. Schotte pour l'avoir aidé à préparer les figures 2 et 3, ainsi que K. Moffat, M. Brunori et leurs collègues pour leur soutien constant.

Note et références

- (1) Le plus souvent, les protéines cristallisées conservent la flexibilité conformationnelle leur conférant leurs propriétés dynamiques en solution. Ceci résulte du fait que les molécules individuelles au sein d'un cristal de protéine baignent dans une grande quantité de solvant, seuls quelques résidus de surface étant impliqués dans les contacts cristallins. Ainsi, les cristaux de myoglobine tolèrent facilement les mouvements structuraux résultant de la photolyse du ligand.
- [1] Frauenfelder H., McMahon B.H., Fenimore P.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, p. 8615.
- [2] Austin R.H., Beeson K.W., Eisenstein L., Frauenfelder H., Gunsalus I.C., *Biochemistry*, **1975**, *14*, p. 5355.
- [3] Frauenfelder H., Sligar S.G., Wolynes P.G., *Science*, **1991**, *254*, p. 1598.
- [4] Tilton R.F. Jr., Kuntz I.D. Jr., Petsko G.A., *Biochemistry*, **1984**, *23*, p. 2849.
- [5] Brunori M., Gibson Q.H., *EMBO Rep*, **2001**, *2*, p. 674.
- [6] Schlichting I., Chu K., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, p. 744.
- [7] Ostermann A., Waschpky R., Parak F.G., Nienhaus G.U., *Nature*, **2000**, *404*, p. 205.
- [8] Srajer V., Teng T., Ursby T., Pradervand C., Ren Z., Adachi S., Schildkamp W., Bourgeois D., Wulff M., Moffat K., *Science*, **1996**, *274*, p. 1726.
- [9] Srajer V., Ren Z., Teng T.Y., Schmidt M., Ursby T., Bourgeois D., Pradervand C., Schildkamp W., Wulff M., Moffat K., *Biochemistry*, **2001**, *40*, p. 13802.
- [10] Schotte F., Lim M., Jackson T.A., Smirnov A.V., Soman J., Olson J.S., Phillips G.N. Jr., Wulff M., Anfinrud P.A., *Science*, **2003**, *300*, p. 1944.
- [11] Bourgeois D., Vallone B., Schotte F., Arcovito A., Miele A.E., Sciarra G., Wulff M., Anfinrud P., Brunori M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, p. 8704.
- [12] Schmidt M., Nienhaus K., Pahl R., Krasselt A., Anderson S., Parak F., Nienhaus G.U., Srajer V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, p. 11704.
- [13] Bourgeois D., Vallone B., Arcovito A., Sciarra G., Schotte F., Anfinrud P.A., Brunori M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, p. 4924.
- [14] Bourgeois D., Royant A., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2005**, *15*, p. 538
- [15] Ihee H., Rajagopal S., Srajer V., Pahl R., Anderson S., Schmidt M., Nienhaus G.U., Anfinrud P.A., Wulff M., Moffat K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, p. 7145.
- [16] Hummer G., Schotte F., Anfinrud P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 15330.
- [17] Neutze R., Huld T., Hajdu J., van der Spoel D., *Rad. Phys. Chem.*, **2004**, *71*, p. 905.
- [18] Kendrew J.C., Dickerson R.E., Strandberg B.E., Hart R.G., Davis D.D., Phillips D.C., Shore V.C., *Nature*, **1960**, *185*, p. 422.
- [19] Lamb D.C., Arcovito A., Nienhaus K., Minkow O., Draghi F., Brunori M., Nienhaus G.U., *Biophys. Chem.*, **2004**, *109*, p. 41.
- [20] Schotte F., Soman J., Olson J.S., Wulff M., Anfinrud P.A., *J. Struct. Biol.*, **2004**, *147*, p. 235.



Dominique Bourgeois

est directeur de recherche au CNRS à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble* responsable de l'équipe Cristallographie Cinétique des Protéines, et collaborateur scientifique au synchrotron européen (ESRF), groupe « Macromolecular Crystallography »**.

* Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, CEA/CNRS/UJF, 41 avenue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1.
Courriel : dominique.bourgeois@ibs.fr

** ESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex.