

Photoperception cellulaire et protéines photoactives

Monique Martin (*coordinatrice*), Stefan Haacke, Majed Chergui, Pascal Plaza, Pascale Changenet-Barret, Klaus Brettel, Martin Byrdin, Jean-Yves Bigot, Luca Guidoni et Pascal Didier

Résumé Les étapes décisives de la photoperception cellulaire sont caractérisées et suivies en temps réel par spectroscopie laser jusqu'à l'échelle de quelques dizaines de femtosecondes. Les protéines photoactives étudiées dans cet article sont impliquées dans des phénomènes naturels majeurs comme la vision (protéines de rétinale modélisées par la bactériorhodopsine), la photomotilité de microorganismes (protéine jaune photoactive et oxyblépharismine) et le phototropisme des plantes (cryptochrome). On montre également que la protéine verte fluorescente (GFP) peut être utilisée, en amont de la thérapie génique, comme sonde temporelle de la solubilité cytoplasmique de fragments d'anticorps auxquels elle est fusionnée.

Mots-clés Bactériorhodopsine, protéine jaune photoactive, oxyblépharismine, cryptochrome, protéine verte fluorescente (GFP), vision, photomouvement, phototropisme, solubilité cytoplasmique de fragments d'anticorps, spectroscopie laser femtoseconde.

Abstract Cellular photoperception and photoactive proteins

The crucial steps of cellular photoperception are characterized and followed in real time by laser spectroscopy down to a few tens of femtoseconds. The photoactive proteins studied here are involved in major natural processes such as vision (bacteriorhodopsin used as a model of retinal chromoproteins), microorganism photomotility (photoactive yellow protein and oxyblepharismine binding protein) and plant phototropism (cryptochrome). It is also shown that the green fluorescent protein (GFP) can be used, upstream from genic therapy, as a temporal probe of cytoplasmic solubility of antibody fragments with which it is fused.

Keywords Bacteriorhodopsin, photoactive yellow protein, oxyblepharismine, cryptochrome, green fluorescent protein (GFP), vision, photomovement, phototropism, cytoplasmic antibody solubility, femtosecond laser spectroscopy.

Nous savons bien que la vie n'existerait pas sans lumière. Nous n'aurions pas de repère spatial sans voir, de repère temporel sans alternance de jour et de nuit, de nature abondante et florissante sans eau certes, mais aussi sans lumière. Elle sert à beaucoup d'êtres vivants de vecteur d'information *via* une grande variété de mécanismes de photoperception. Ces phénomènes photobiologiques reposent sur le fonctionnement de protéines photoactives (chromoprotéines) qui collectent les photons et convertissent l'énergie lumineuse en un signal chimique intracellulaire. Une conversion efficace implique des phénomènes moléculaires ultrarapides dont la compréhension nécessite la mise en œuvre de méthodes spectroscopiques poussées à leurs limites temporelles. Comprendre cette photochimie primaire présente un grand intérêt pour l'optoélectronique et le stockage de l'énergie solaire, mais aussi pour la conception de molécules pour le diagnostic par l'imagerie de fluorescence et la photothérapie dynamique. Nous présentons ici des exemples d'études de protéines photoactives mises en jeu dans des phénomènes comme la vision, l'activité photosynthétique, la photomotilité de microorganismes ou le phototropisme des plantes, ainsi que l'étude détaillée d'une protéine fluorescente utilisée comme marqueur en milieu vivant.

La vision, un cas d'école : les étapes photochimiques cruciales

La rhodopsine, le pigment photosensible de la vision, constitue un cas d'école, représentatif de la photoactivité de toutes les chromoprotéines utilisant le rétinale comme chromophore. Celles-ci sont mises en jeu dans des fonctions très diverses, chez les organismes supérieurs (vision), mais aussi chez les bactéries (photosynthèse primaire, phototaxie, etc.). La spectroscopie UV-visible résolue en temps à l'échelle de la milliseconde a permis de caractériser les intermédiaires réactionnels du photocycle de la rhodopsine, associés à l'isomérisation et à la déprotonation du rétinale et aux changements structuraux de la protéine [1-2]. La spectroscopie femtoseconde nous renseigne sur les détails des processus élémentaires ayant lieu au cours des premières picosecondes. Ces processus déterminent le chemin réactionnel et déclenchent les processus plus lents. La photoisomérisation ultrarapide du rétinale a été étudiée dès que des sources laser picosecondes ont été disponibles [3]. Grâce à sa photostabilité extraordinaire, la bactériorhodopsine (bR) (*figure 1*) constitue un système modèle pour l'étude des chromoprotéines utilisant le rétinale.

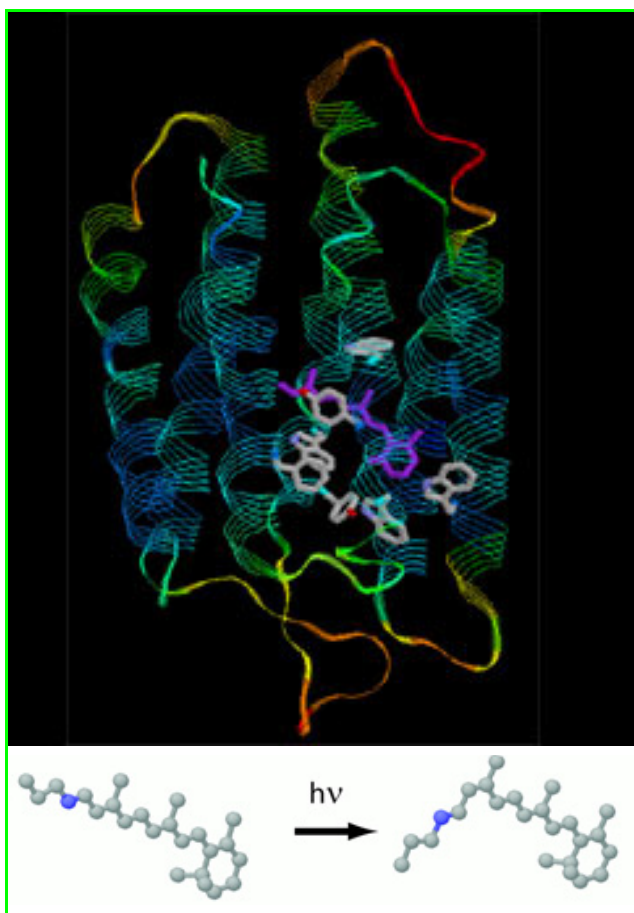


Figure 1 - Structure de la bactériorhodopsine (bR) avec ses six hélices alpha. Le rétinol (mauve), un dérivé de la vitamine A, absorbe la lumière visible et s'isomérisé en moins de 500 fs (trans → cis, schéma inférieur). Les acides aminés aromatiques entourant le rétinol (Trp, Tyr, Phe) sont représentés.

Les formes *cis* et *trans* du rétinol ont des spectres d'absorption légèrement différents. La photoisomérisation produit un déplacement du spectre d'absorption de 10-20 nm vers le « rouge » [3]. La spectroscopie électronique pompe-sonde permet de sonder ce décalage spectral en fonction du retard temporel de la sonde par rapport à la pompe (qui démarre la réaction). Les premiers travaux, réalisés dans la deuxième moitié des années 1980, ont révélé que le temps d'isomérisation est aussi court que 180-500 fs pour la bR et la rhodopsine.

Si l'excitation par la pompe est de très courte durée (< 10 fs), le rétinol est mis en vibration de façon impulsionnelle (formation d'un paquet d'onde) et une modulation périodique assez spectaculaire de la transmission de l'échantillon est observée [4]. Les modulations périodiques ont différentes périodes dont les plus courtes sont de 22 fs, c'est-à-dire la période d'élongation de la double liaison C=C. L'absorption transitoire traduit donc de façon indirecte le mouvement cohérent des molécules de rétinol photoexcitées.

Une image plus directe des vibrations et torsions du rétinol après excitation s'obtient par spectroscopie d'absorption dans le moyen infrarouge ou par spectroscopie Raman. Comme l'isomérisation s'accompagne d'un déplacement de la fréquence de vibration des liaisons simples C-C du rétinol, la spectroscopie IR femtoseconde a permis de confirmer que le temps de photoisomérisation de bR est ultracourt, de l'ordre de 450-500 fs [5].

Au cours de ces cinq dernières années, il a été démontré que les mouvements précurseurs de l'isomérisation étaient des mouvements de haute fréquence comme l'élongation C=C et les mouvements des hydrogènes (« HOOP modes »). Des travaux expérimentaux sur des analogues du rétinol où l'isomérisation est bloquée et des calculs *ab initio* ont mis en avant un modèle dit de « deux états/deux modes » pour décrire le scénario des événements au cours des premières centaines de femtosecondes. Selon ce modèle, le rétinol photoexcité s'étire légèrement – les liaisons doubles prennent un caractère de liaison simple – sur une échelle de 50 fs avant que la torsion ne commence.

Un autre processus photoinduit est l'augmentation du moment dipolaire du rétinol, qui donne lieu à une forte émission dans l'infrarouge lointain (THz) [6]. Le changement du moment dipolaire peut être observé en temps réel si l'on utilise des acides aminés de la protéine, en l'occurrence les tryptophanes les plus proches du rétinol, comme sondes moléculaires. En effet, leur spectre d'absorption est très sensible au champ électrique créé par le moment dipolaire du rétinol, ce qui a permis de mettre en évidence un temps caractéristique de 150-200 fs pour les translocations de charges sur le rétinol [7]. S'opérant sur la même échelle de temps, cette augmentation du moment dipolaire semble être couplée au mouvement de torsion pendant l'isomérisation. Puisque l'environnement protéique favorise énergétiquement la forme du rétinol ayant un grand moment dipolaire, il semble plausible que ce processus photoinduit accélère l'isomérisation. En effet, le lien intime entre les deux processus a été démontré car ils sont tous les deux nécessaires pour le fonctionnement de bR comme pompe à protons [8].

En résumé, la spectroscopie femtoseconde a permis de disséquer les étapes de l'isomérisation des protéines de rétinol et en particulier de donner accès aux détails des dynamiques ultrarapides, électronique et structurale. En dehors de la description précise des mécanismes moléculaires photochimiques, ces travaux intéressent « l'électronique moléculaire ». En effet, les différents isomères du rétinol représentant des bits « 0 » et « 1 », on peut s'inspirer de la rapidité et de la grande efficacité de l'isomérisation dans le milieu protéique pour concevoir de nouveaux photocommutateurs moléculaires artificiels par voie chimique. Bien que les études sur ces molécules aient débuté il y a plus de vingt ans, d'autres découvertes fascinantes peuvent encore survenir et nous surprendre.

La photoperception de microorganismes motiles

Certains microorganismes unicellulaires perçoivent les gradients de lumière au sein de leur habitat. Entrant dans une zone éclairée, ils peuvent modifier leur trajectoire ou leur vitesse [9-10]. Cette réponse leur permet d'éviter des dommages, ou plus subtilement, d'optimiser des processus métaboliques (photosynthèse) ou génétiques (photomorphogénèse). La lumière peut donc être un vecteur d'information sur leur environnement, par exemple pour reconnaître les endroits propices à leur nutrition ou à leur reproduction. La fonction correspondante s'apparente à une vision élémentaire. La réponse cellulaire est initiée au sein d'un photorécepteur constitué, comme dans le cas de la vision, d'un ensemble macromoléculaire chromophore-protéine qui est le plus souvent une rhodopsine. L'absorption d'un photon par le chromophore déclenche une cascade d'événements moléculaires d'abord localisés sur le photorécepteur, puis

propagés *via* la « chaîne de transduction sensorielle » jusqu'à l'activation des organes du mouvement, comme la rotation de flagelles ou le battement de cils [9-11]. Hormis les rhodopsines, les récepteurs d'organismes photomotiles sont encore peu étudiés ; certains ont été découverts récemment et il en reste probablement beaucoup d'autres à découvrir.

Au Département de Chimie de l'École normale supérieure (Paris), l'équipe de Monique Martin a étudié, par spectroscopie femtoseconde, la protéine jaune photoactive (PYP), localisée dans le cytosol de la bactérie flagellée *Halorhodospira halophila* [11], et l'oxyblépharismine (OBIP), localisée au sein d'organites spécialisés sous-membranaires de *Blepharisma japonicum*, un protozoaire cilié [10]. La bactérie évite la lumière bleue en nageant dans la direction opposée à la source lumineuse (phototaxie négative). Le protozoaire montre un comportement « photophobique » : soumis à une augmentation soudaine de lumière visible, il s'arrête, tourne et nage vers une zone plus sombre, sans reconnaissance directionnelle.

La protéine jaune photoactive (PYP)

Le chromophore de PYP est un dérivé de l'acide *p*-coumarique, relié par une liaison thioester à l'unique résidu cystéine (Cys69) de la protéine et par des liaisons hydrogène avec des résidus proches (*figure 2*) [11]. L'ion phénolate est hypothétiquement stabilisé par la charge positive de l'arginine voisine (Arg52). La double liaison éthylénique centrale est au cœur du fonctionnement de l'édifice dont la réponse repose sur la photoisomérisation du chromophore, comme dans les rhodopsines. L'équipe de M. Martin a étudié l'influence de la structure du chromophore (substituant du carbonyle, protonation du phénolate) et d'environnement (solvant, poche protéique) sur la photoisomérisation et sa cinétique, avec la collaboration des équipes de K. Hellingwerf (Swammerdam Institute for Life Sciences, Amsterdam) pour la protéine et de L. Jullien (ENS-Paris) pour le chromophore [12-14]. Les mesures de fluorescence résolues en temps ont été réalisées par A. Espagne dans le groupe de A. Zewail (CalTech,

Pasadena, E.-U.). Un fait marquant est que l'isomérisation met en jeu un transfert de charge, mais le chemin réactionnel suivi n'aboutit à la formation du *cis* que si le caractère donneur-accepteur d'électron de la structure du chromophore est faible. En solution polaire, le chromophore de PYP se désactive en ~ 1 ps mais ne forme pas ou très peu d'isomère *cis*. Pour expliquer son isomérisation au sein de la protéine, l'hypothèse avancée est que la présence de l'ion arginium contrecarrerait en partie le transfert de charge photoinduit au sein du chromophore. L'étude de protéines mutantes où l'on a modifié sélectivement les acides aminés autour du chromophore a été entreprise, en collaboration avec l'équipe de N. Mataga (Institute for Laser Technology, Osaka, Japon). Les premiers résultats obtenus ne permettent pas d'appuyer cette hypothèse.

Oxyblépharismine (OBIP)

Le rôle de la lumière dans la vie de *Blepharisma japonicum* est remarquable [10]. Le photorécepteur est formé de la blépharismine complexée avec une protéine dont la structure n'est pas encore connue. La blépharismine possède un rendement de triplet favorable à la production d'oxygène singulet, un poison cellulaire qui permet au protozoaire de se défendre contre ses prédateurs. Son comportement photophobique constitue en partie une protection contre cette stratégie de défense photochimique. Toutefois, sous éclairage prolongé, le protozoaire est capable d'autoprotection. La blépharismine se transforme en oxyblépharismine (*figure 2*), mieux insérée au sein de la protéine (oxyblépharismine, OBIP) et isolée de l'oxygène. Le pouvoir phototoxique de l'oxyblépharismine est inactivé, mais le photomouvement est conservé.

Dans l'étude de la photoactivité de OBIP, en collaboration avec l'équipe de F. Lenci (CNR, Pise, Italie), spécialiste de *Blepharisma japonicum*, l'équipe de M. Martin a mis en évidence une nouvelle réaction, attribuée à un transfert d'électron et/ou de proton en 4 ps vers un résidu protéique proche, suivie d'une recombinaison sub-100 ps [15-16]. Si la recombinaison d'électron et/ou de proton n'est pas gémignée, alors la réaction photoinduite observée serait vraisemblablement l'étape déterminante pour déclencher le photomouvement. Dans le cas contraire, ce photocycle très bref de consommation de photons pourrait constituer une protection supplémentaire de *Blepharisma japonicum* pour résister à une exposition solaire excessive.

Le cryptochrome : un récepteur de la lumière bleue encore mal connu

Alors que Darwin avait déjà remarqué que le développement des plantes peut être modifié spécifiquement par la lumière bleue [17] (voir par exemple l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle montrée dans la *figure 3*), ce n'est qu'en 1993 que le récepteur impliqué a été découvert [18]. Il a été baptisé « cryptochrome » en référence à cette mise en évidence tardive et au fait que son mécanisme de fonctionnement n'était pas connu. Il s'agit d'une protéine présente non seulement chez les plantes, mais aussi chez les animaux (Homme compris), où elle participe à la régulation des rythmes circadiens (changements physiologiques qui interviennent avec une périodicité d'environ 24 h).

Depuis sa découverte, beaucoup de progrès ont été faits dans la compréhension du rôle physiologique du

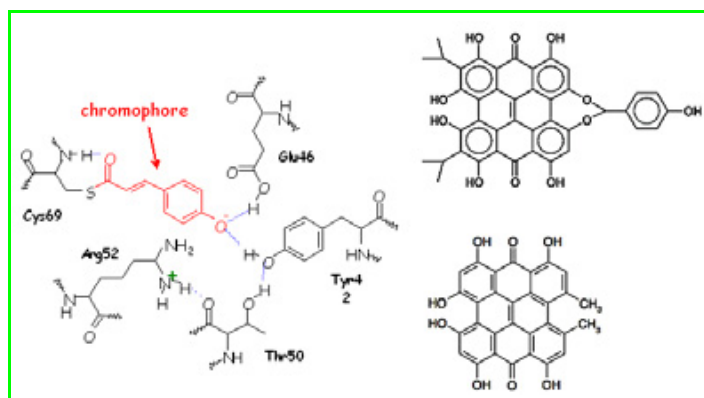


Figure 2 - A gauche : représentation schématique du cœur photoactif de la protéine jaune (PYP). La photoisomérisation du chromophore entraîne la restructuration de la protéine. L'énergie lumineuse est convertie en un signal chimique qui *in fine* active la rotation des flagelles de la bactérie porteuse de PYP. A droite : l'oxyblépharismine (en haut) est le chromophore de l'ensemble macromoléculaire supposé être le photorécepteur responsable de la photophobie du protozoaire *Blepharisma japonicum* dans sa forme adaptée à la lumière. L'oxyblépharismine a une structure voisine de l'hypéricine (en bas), molécule prometteuse pour la photothérapie dynamique du cancer.

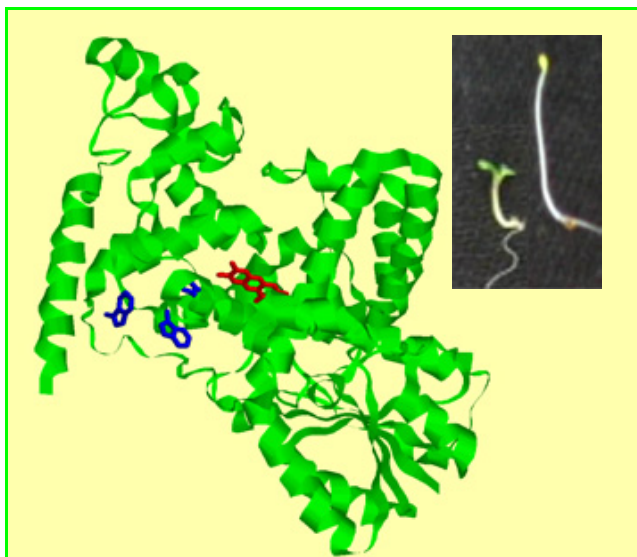


Figure 3 - Structure du cryptochrome-1 d'*Arabidopsis thaliana* (Protein Data Base code : 1UC3) avec la flavine (en rouge) et la chaîne de trois résidus tryptophane (en bleu). En insert : plantes d'*Arabidopsis thaliana* poussées sous lumière bleue (gauche) ou à l'obscurité (droite) ; image aimablement fournie par Margaret Ahmad.

cryptochrome chez les plantes et les animaux et dans l'identification de certains de ses partenaires moléculaires, mais rien jusqu'à très récemment n'était connu sur la première étape essentielle : la transduction du signal lumineux en signal chimique. En effet, le seul mécanisme établi pour ce type de réaction dans les photorécepteurs biologiques impliquait l'isomérisation du pigment à la suite de l'excitation lumineuse. Or le pigment lié au cryptochrome étant une flavine (flavine adénine dinucléotide, FAD) qui ne peut pas isomériser, le mécanisme impliqué restait énigmatique.

L'équipe de K. Brettel (CEA, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay) s'intéresse aux cryptochromes pour encore une autre raison : leur structure ressemble fortement à celle d'une flavoprotéine de fonction très différente : la photolyase. Cette dernière répare certaines lésions induites par les UV dans l'ADN. L'équipe a précédemment caractérisé une réaction partielle de la photolyase : suite à l'absorption d'un photon, la flavine est réduite par un électron qui provient d'un agent réducteur externe. En suivant les changements d'absorption transitoire liés à cette réaction *in vitro* (solution de protéines isolées), elle a pu établir que ce transfert d'électron se fait par sauts successifs le long d'une chaîne de trois résidus tryptophane qui connectent la flavine à la surface de la protéine. La flavine excitée arrache un électron au tryptophane le plus proche, qui fait de même au second tryptophane, et ainsi de suite jusqu'au dernier tryptophane qui prélève un électron au réducteur externe. La première étape de ce transfert d'électron ne prend que 30 ps. Le suivi de photoréactions aussi rapides est possible grâce à l'utilisation d'impulsions laser de très courte durée (en collaboration avec l'équipe de M. Vos à l'École polytechnique, Palaiseau) [19-20].

Guidée par l'analogie structurale entre photolyase et cryptochrome (notamment la chaîne de trois tryptophanes mentionnée ci-dessus qui est complètement conservée), l'équipe s'est demandée si un tel transfert d'électron pourrait également intervenir dans le cryptochrome et donc résoudre l'énigme de son mécanisme primaire.

Avec M. Ahmad *et col.* (Laboratoire de physiologie moléculaire et cellulaire des plantes, Université Pierre et Marie

Curie, Paris), l'équipe de K. Brettel a donc étudié un cryptochrome végétal, le cryptochrome-1 d'*Arabidopsis thaliana*. Pour obtenir une quantité suffisante de protéine, le gène a été surexprimé dans des cellules d'insectes. De la même façon que pour la photolyase, ces équipes ont suivi les changements d'absorption du cryptochrome qui accompagnent les réactions déclenchées par une brève excitation lumineuse. La séquence de réactions suivante a ainsi été établie : suite à l'absorption d'un photon, la flavine passe dans un état excité et arrache un électron à un résidu tryptophane au sein de la protéine, conduisant à la formation d'un radical flavine et d'un radical tryptophane ; ce transfert d'électron se fait en moins de 100 μ s (une meilleure résolution temporelle n'a pas encore pu être obtenue avec le cryptochrome) et implique très probablement la même chaîne de tryptophanes que dans la photolyase. A son tour, le radical tryptophane est réduit par un électron provenant d'un résidu tyrosine qui n'est pas encore identifié. Ce dernier devrait se trouver exposé à la surface de la protéine, puisqu'il peut à son tour recevoir un électron d'un agent réducteur extérieur [21-22]. Il est donc probable qu'un des produits observés dans le cryptochrome isolé (radical FAD ou radical tyrosine) vive assez longtemps pour interagir (directement ou indirectement) avec des partenaires cellulaires et transférer l'information du signal lumineux désormais traduit en signal chimique.

Les auteurs remercient chaleureusement Sandrine Villette (CEA, Institut de Biotechnologie et de Technologies de Saclay) pour sa contribution à la rédaction de cette section.

La protéine fluorescente GFP, une sonde biophotonique efficace : test de la solubilité cytoplasmique de fragments d'anticorps

Les trois sections précédentes illustrent l'intérêt que présentent les protéines photoactives en liaison avec une activité photosensorielle ou photophysologique particulière. Elles sont également très intéressantes comme sonde de l'environnement et/ou de l'activité biologique. Sommairement, on peut distinguer deux situations où une protéine photoactive, comme par exemple la protéine GFP (« green fluorescent protein ») (figure 4a), joue le rôle d'une sonde biophotonique. La première est celle où la protéine fluorescente est utilisée comme marqueur pour effectuer de l'imagerie optique, par exemple de milieux cellulaires. Les techniques de microscopies correspondantes sont variées, comme par

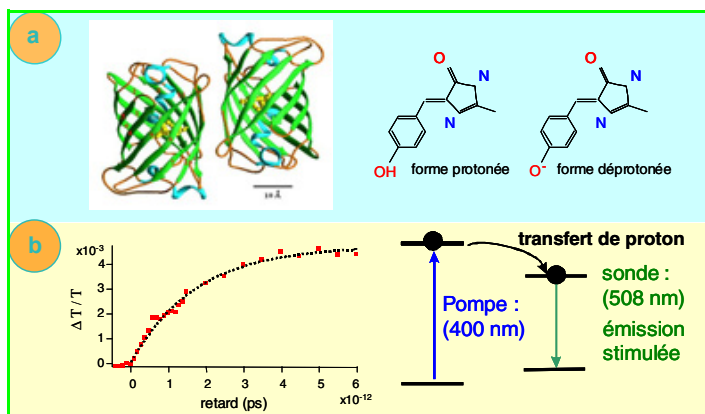


Figure 4 - (a) Structure de la protéine verte fluorescente (GFP) et de son chromophore ; (b) Dynamique du transfert de proton dans l'état excité.

exemple l'imagerie par fluorescence à un ou deux photons, le FRET (« Förster resonant energy transfer »), le FRAP (« fluorescence recovery after photobleaching »), la spectroscopie de corrélation de fluorescence, la spectroscopie de molécules uniques. Une deuxième situation correspond au cas où la protéine fluorescente peut être partiellement dénaturée par son environnement au point que ses propriétés optiques en sont affectées. C'est ce qui va être illustré ici dans le cas de fusions génétiques de fragments d'anticorps avec la protéine GFP. Ces fragments d'anticorps, élaborés par l'équipe de E. Weiss (Laboratoire de biotechnologie des interactions macromoléculaires, ESBS, Strasbourg), sont capables d'inhiber la protéine E6 qui contribue au développement du cancer du col de l'utérus. La problématique biologique ainsi que la préparation des fusions génétiques sont le fruit d'une collaboration étroite entre l'équipe de J.-Y. Bigot (Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg) et celle de E. Weiss et ce travail a fait l'objet de la thèse de Pascal Didier [23].

Problématique biologique : vers une thérapie génique du cancer du col de l'utérus

La présence d'une oncoprotéine produite par le papillomavirus contribue grandement au développement du cancer du col de l'utérus. Le rôle néfaste de cette protéine E6 est d'inhiber l'action de la protéine P53 qui est une sorte de garant de l'intégrité génomique. En effet, une duplication anormale de l'ADN suite à des « erreurs » conduit à une augmentation importante du taux de P53 dans la cellule, provoquant des conditions favorables à une réparation de l'ADN. Lorsqu'il est mal réparé, l'accroissement de P53 conduit à la mort de la cellule, favorisant ainsi le nombre de cellules saines. En inhibant l'action de P53, la protéine E6 empêche la régulation des cellules normales « réparées », conduisant à une prolifération des cellules infectées. Dans ce contexte, E. Weiss *et col.* ont mis au point une stratégie de thérapie génique consistant à développer des fragments d'anticorps dirigés contre E6. Ces fragments, qui sont de simples chaînes d'anticorps appelées scFv, sont destinés à être introduits directement dans le cytoplasme afin de combattre les antigènes correspondants. La difficulté est qu'ils sont difficilement solubles et ont tendance à former des agrégats néfastes pour la cellule. Pour contourner le problème, l'idée de E. Weiss est de réaliser des fragments de scFv solubles en partant d'un autre fragment d'anticorps dont les propriétés de solubilité dans le contexte cytoplasmique sont avérées. *In fine*, il s'agit de réaliser une banque de fragments d'anticorps du type scFv solubles dans le cytoplasme et pouvant lutter efficacement contre les antigènes que constituent les protéines E6. Cette stratégie requiert une méthodologie de caractérisation permettant de savoir si les fragments d'anticorps sont solubles ou non.

Problématique photophysique : étude de la protéine fluorescente GFP-uv comme test de la solubilité cytoplasmique des fragments d'anticorps dirigés contre l'oncoprotéine E6

Une bonne solubilité des fragments d'anticorps scFv dans le cytoplasme implique qu'ils soient bien repliés. Ce type d'information peut être obtenu non pas directement sur scFv mais sur une protéine fluorescente, la GFP, avec laquelle elle est fusionnée de manière covalente. D'une manière générale, lorsque deux chaînes polypeptidiques

sont assemblées, un mauvais repliement de l'une des chaînes affecte également le repliement de la seconde. Il s'agit dans le cas présent d'étudier l'effet d'un mauvais repliement de scFv sur la protéine GFP dont les propriétés photophysiques sont très sensibles à son état de repliement.

Rappelons que la GFP (*figure 4a*) est une protéine naturelle (GFP-wt) exprimée par la méduse *Aequorea victoria*. Depuis son clonage (1992) et son expression dans des organismes hôtes (1994), elle a connu un grand succès, notamment comme marqueur [24]. De nombreuses études ont conduit à la production de variétés « mutantes », qui se différencient de la protéine naturelle par des rendements de fluorescence accrues et par différents spectres d'émission s'étendant dans le visible. L'équipe de J.-Y. Bigot a étudié un mutant de la GFP qui absorbe dans le proche ultraviolet (GFP-uv). Le mécanisme photophysique conduisant à une émission fluorescente efficace de la GFP est un transfert de proton du chromophore actif de la cage protéique lorsqu'il se trouve dans l'état excité par absorption d'un photon (*figure 4b*). La stratégie d'étude photophysique comporte deux étapes reposant sur des mesures pompe-sonde spectrales et temporelles effectuées avec une résolution de 100 fs (le faisceau pompe est à 400 nm et la sonde une lumière blanche ultrabrève). Dans un premier temps, ils ont mesuré le temps nécessaire au transfert de proton dans l'état excité de la GFP-uv (4 ps) [25] et montré qu'il est plus court que celui de la GFP-wt (7 ps). De plus, ils ont pu définir un critère dynamique permettant d'évaluer le bon ou mauvais repliement de la GFP : le rapport d'intensité $R = I_{\text{émis}}/I_{\text{absorb}}$ entre la bande d'émission stimulée située à 508 nm (caractéristique de l'émission fluorescente) et une bande d'absorption induite située à 650 nm (caractéristique de transitions vers des états excités supérieurs). Un mauvais repliement est caractérisé par un renforcement de l'absorption induite et donc par une diminution de R. L'équipe a observé que $R(\text{GFP-uv})/R(\text{GFP-wt}) = 4$, ce qui témoigne du meilleur repliement de la GFP mutante par rapport à la GFP sauvage. Dans un deuxième temps, ils ont mesuré ce rapport R pour différentes fusions de fragments d'anticorps avec la GFP-uv dont le degré de solubilité était connu auparavant [23, 26]. Ils ont ainsi pu établir de manière très claire qu'une meilleure solubilité des fragments se traduit par une augmentation de R (*figure 5*).

L'étude des propriétés optiques dynamiques d'une protéine fluorescente comme la GFP peut donc apporter des

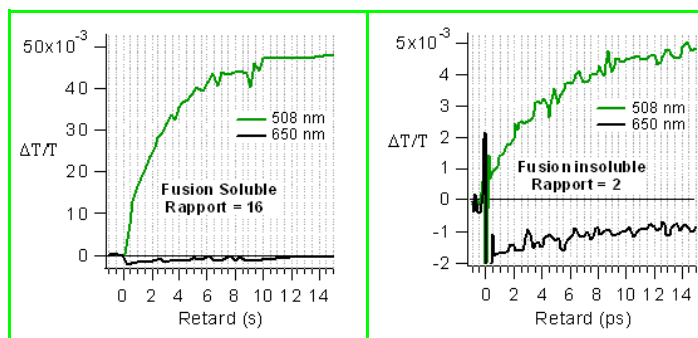


Figure 5 - Variations de l'intensité de la bande d'émission stimulée (508 nm) et d'absorption induite (650 nm) obtenues dans le cas d'une fusion d'anticorps scFv-GFP soluble (a) et insoluble (b). Le rapport d'intensité entre ces deux composantes varie de 16 à 2, et est de plus parfaitement corrélé à la solubilité de ces deux anticorps.

informations très précieuses sur l'état de repliement d'autres protéines auxquelles elle est fusionnée. En particulier, ces informations sont extrêmement utiles lorsque l'objectif est de créer des banques d'anticorps destinés à agir efficacement dans le cytoplasme lors d'une stratégie de thérapie génique. Insistons sur le fait que cette approche implique une sonde protéique photoactive (la GFP dans le cas présent) utilisée non pas en tant que marqueur spatial, comme c'est le cas dans l'imagerie, mais comme sonde temporelle témoignant de l'état de repliement de son partenaire de fusion génétique.

Références

- [1] Wald G., Molecular basis of visual excitation, *Science*, **1968**, *162*, p. 230.
- [2] Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D., Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1999**, *28*, p. 367.
- [3] Kochendoerfer G.G., Mathies R.A., Ultrafast spectroscopy of rhodopsins. Photochemistry at its best!, *Isr. J. Chem.*, **1995**, *35*, p. 211.
- [4] Kobayashi T., Saito T., Ohtani H., Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization, *Nature*, **2001**, *414*, p. 531.
- [5] Herbst J., Heyne K., Diller R., Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization, *Science*, **2002**, *297*, p. 822.
- [6] Groma G.I., Colonna A., Lambry J.-C., Petrich J.W., Váró G., Joffre M., Vos M.H., Martin J.-L., Resonant optical rectification in bacteriorhodopsin, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2004**, *101*, p. 7971.
- [7] Schenkl S., van Mourik F., van der Zwan G., Haacke S., Chergui M., Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin, *Science*, **2005**, *309*, p. 917.
- [8] Zadok U., Khatchaturians A., Lewis A., Ottolenghi M., Sheves M., Light-induced charge redistribution in the retinal chromophore is required for initiating the bacteriorhodopsin photocycle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, p. 11844.
- [9] Häder D.-P., Lebert M. (eds), *Comprehensive Series in Photosciences volume 1 - Photomovement*, Elsevier, Amsterdam, **2001**.
- [10] Sgarbossa A., Checcucci G., Lenci F., Photoreception and photomovements of microorganisms, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, p. 459.
- [11] Hellingwerf K.J., Hendriks J., Gensch T., Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein: will this "yellow lab" bring us where we want to go?, *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, p. 1082.
- [12] Changenet-Barret P., Espagne A., Plaza P., Hellingwerf K.J., Martin M.M., Investigations of the primary events in a bacterial photoreceptor for photomotility: photoactive yellow protein (PYP), *New J. Chem.*, **2005**, *29*, p. 527.
- [13] Espagne A., Changenet-Barret P., Plaza P., Martin M.M., Solvent effect on the excited-state dynamics of analogues of the photoactive yellow protein chromophore, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, p. 3393.
- [14] Espagne A., Changenet-Barret P., Baudin J.-B., Plaza P., Martin M.M., Photoinduced charge shift as the driving force for the excited-state relaxation of analogues of the photoactive yellow protein chromophore in solution, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2007**, *185*, p. 245.
- [15] Plaza P., Mahet M., Martin M.M., Angelini N., Malatesta M., Checcucci G., Lenci F., Spectroscopic study of the chromophore-protein association and primary photoinduced events in the photoreceptor of *Blepharisma japonicum*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, *4*, p. 754.
- [16] Mahet M., Plaza P., Martin M.M., Checcucci G., Lenci F., Primary photoprocesses in oxyblepharismine interacting with its native protein partner, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2007**, *185*, p. 345.
- [17] Darwin C., *The power of movement in plants*, D. Appleton & Co., New York, **1881**.
- [18] Ahmad M., Cashmore A.R., HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, **1993**, *366*, p. 162.
- [19] Aubert C., Vos M.H., Mathis P., Eker A.P.M., Brettel K., Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase, *Nature*, **2000**, *405*, p. 586.
- [20] Byrdin M., Eker A.P.M., Vos M.H., Brettel K., Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, p. 8676.
- [21] Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K., Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor, *Nature Struct. Biol.*, **2003**, *10*, p. 489.
- [22] Zeugner A., Byrdin M., Bouly J.-P., Bakrim N., Giovani B., Brettel K., Ahmad M., Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, p. 19437.
- [23] Didier P., Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique en interaction avec leur environnement: étude par spectroscopie femtoseconde, Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, **2004**.
- [24] Tsien R.Y., The green fluorescent protein, *Ann. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, p. 509.
- [25] Didier P., Guidoni L., Schwalbach G., Bourotte M., Follenius-Wund A., Pigault C., Bigot J.-Y., Ultrafast gain dynamics of the green fluorescent protein, *Chem. Phys. Lett.*, **2002**, *364*, p. 503.
- [26] Didier P., Guidoni L., Schwalbach G., Weiss E., Bourotte M., Follenius-Wund A., Pigault C., Bigot J.-Y., Ultrafast excited-state dynamics of the green fluorescent protein, *Femtosecond Laser Applications in Biology*, S. Avriplier, J.-M. Tualle (eds), Proceedings of SPIE, **2004**, vol. 5463, p. 118.



M. Martin



P. Plaza



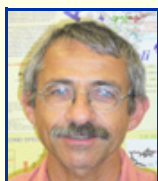
P. Changenet-Barret



S. Haacke



M. Chergui



K. Brettel



M. Byrdin



J.-Y. Bigot



L. Guidoni



P. Didier

Monique Martin (coordinatrice) et **Pascal Plaza** sont directeurs de recherche CNRS, et **Pascale Changenet-Barret** est chargée de recherche CNRS, dans le Groupe de Photochimie ultrarapide à l'ENS Paris¹.

Stefan Haacke est professeur à l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg².

Majed Chergui est professeur au Laboratoire de spectroscopie ultrarapide, École Polytechnique Fédérale de Lausanne³.

Klaus Brettel et **Martin Byrdin** sont chercheurs CEA à l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay⁴.

Jean-Yves Bigot est directeur de recherche CNRS et **Luca Guidoni** est chargé de recherche CNRS, à l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg⁵. **Pascal Didier** a soutenu sa thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur⁵. Il est actuellement maître de conférence à l'Université Louis Pasteur.

¹ Groupe de Photochimie ultrarapide, UMR CNRS 8640, Pasteur, Département de Chimie, École normale supérieure, 24 rue Lhomond, 75005 Paris.

Courriel : Monique.Martin@ens.fr

² Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, UMR 7504 CNRS-ULP, 23 rue du Loess, BP 43, 67034 Strasbourg Cedex 2.

Courriel : Stefan.Haacke@ipcms.u-strasbg.fr

³ École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratoire de spectroscopie ultrarapide, Institut des Sciences et Ingénierie Chimiques (ISIC), Faculté des Sciences de Base, BSP, CH-1015 Lausanne-Dorigny (Suisse).

Courriel : majed.chergui@epfl.ch

⁴ CEA, iBiTecS, URA 2096 CNRS, Bât. 532, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Courriels : klaus.brettel@cea.fr, martin.byrdin@cea.fr

⁵ Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, Groupe d'Optique non linéaire, UMR 7504 CNRS-ULP, 23 rue du Loess, BP 43, 67034 Strasbourg Cedex 2.

Courriel : Jean-Yves.Bigot@ipcms.u-strasbg.fr