

Combiner cristallographie cinétique et spectroscopie optique

Application à l'étude des protéines fluorescentes

Delphine Arcizet, Virgile Adam, Philippe Carpentier, Aline Faro et Dominique Bourgeois

Résumé Chaque année, grâce au rayonnement synchrotron, les structures tridimensionnelles d'une myriade de macromolécules biologiques de plus en plus complexes sont déterminées par cristallographie aux rayons X. Malgré toute l'importance de ces structures, la seule connaissance de l'organisation spatiale d'une protéine « au repos » reste souvent insuffisante pour en comprendre la fonction biologique, celle-ci résultant fondamentalement des mouvements conformationnels exécutés lors du cycle réactionnel. Pour comprendre cette synergie structure-dynamique-fonction, il est essentiel de recourir à la cristallographie « cinétique », qui permet d'obtenir les structures de protéines dans différents états le long de leur cycle réactionnel. De plus, la caractérisation par spectroscopie optique de ces états s'avère souvent cruciale pour les identifier et en affiner la connaissance. Cet article décrit l'intérêt de ce couplage cristallographie cinétique/spectroscopie optique *in crystallo* dans le cas des protéines fluorescentes de la famille GFP, en particulier pour les protéines fluorescentes « phototransformables » dont la photophysique très complexe peut être appréhendée en corrélant les structures caractéristiques de chaque état de fluorescence avec leur signature spectroscopique électronique (absorbance et fluorescence) ou vibrationnelle (Raman). Le cas de la protéine IrisFP, particulièrement fascinant, est décrit en détail.

Mots-clés Rayonnement synchrotron, protéines fluorescentes, cristallographie cinétique, spectroscopie *in crystallo*.

Abstract **Combining kinetic crystallography and optical spectroscopy for studying fluorescent proteins** Every year, the three-dimensional structures of numerous and increasingly complex biological macromolecules are obtained by X-ray crystallography, using synchrotron radiation. However, the knowledge of the spatial organization of a protein in the resting state is often insufficient to understand its biological function. Indeed, protein function results from the conformational changes that take place during the reaction cycle. In order to understand this structure-dynamics-function relationship, it is fundamental to resort to "kinetic" crystallography, a technique allowing the determination of protein structures in different states along their reaction cycle. Moreover, the characterization of these various states by optical spectroscopy is often crucial to correctly identify them, and to gather complementary knowledge. This article describes how fruitful the coupling between kinetic crystallography and optical spectroscopy can be for the study of fluorescent proteins of the GFP family, with a focus on phototransformable fluorescent proteins, whose complex photophysical properties can be understood through the correlation, for each fluorescent state, between the structure (obtained by X-ray crystallography) and the spectroscopic signature of the electronic and vibrational states (respectively measured by absorption/fluorescence and Raman spectroscopy). The fascinating case of the protein IrisFP is detailed.

Keywords Synchrotron radiation, fluorescent proteins, kinetic crystallography, *in crystallo* spectroscopy.

Biologie structurale et rayonnement synchrotron : structure, dynamique et fonction des protéines

Le rayonnement synchrotron permet chaque année de résoudre la structure tridimensionnelle de nombreuses macromolécules biologiques de plus en plus complexes, comme en témoigne le prix Nobel de chimie 2009 récompensant Ada Yonath, Tom Steitz et Venkatraman Ramakrishnan pour avoir élucidé la structure du ribosome. La principale technique utilisée est la cristallographie aux rayons X. Les molécules d'intérêt, protéines ou assemblages de protéines et d'acides nucléiques, sont cristallisées puis soumises à un intense faisceau de rayons X monochromatique de longueur

d'onde $\sim 1 \text{ \AA}$, c'est-à-dire la longueur caractéristique d'une liaison interatomique. Leur structure peut être reconstituée après traitement des données, à une résolution spatiale proche de la résolution atomique.

Cependant, cette représentation statique d'une protéine reste largement insuffisante pour en comprendre la fonction biologique. D'une part les fluctuations structurales (la dynamique) jouent un rôle clé dans cette fonction et d'autre part, une protéine ne peut pas être complètement décrite par sa structure cristallographique qui ne rend pas compte, par exemple, de son état redox, de son état de protonation ou de ses propriétés d'absorption de la lumière.

Il devient donc nécessaire non seulement d'obtenir les structures des différentes conformations qu'adopte une

Encadré 1

La cristallographie cinétique

Un grand nombre de macromolécules restent biologiquement actives sous leur forme cristallisée. C'est notamment le cas lorsque les changements conformationnels nécessaires à la fonction biologique sont de faible amplitude et ne sont pas empêchés par les contacts cristallins. Il est alors possible d'induire la fonction biologique directement dans le cristal, de façon à déclencher le cycle réactionnel. Dans le cas d'une protéine photosensible, le déclenchement s'effectue par action de la lumière, typiquement avec un laser. Dans le cas d'une enzyme, on pourra tremper le cristal dans une solution contenant son substrat. On laisse alors évoluer l'échantillon et on peut piéger un état intermédiaire le long du cycle réactionnel par refroidissement rapide. La structure de cet état peut alors être résolue par cristallographie classique. Pour que l'expérience fonctionne, il faut que le déclenchement de la réaction dans le cristal, qui contient environ 10^{14} molécules, soit synchrone, c'est-à-dire beaucoup plus rapide que le temps de vie de l'état que l'on souhaite observer. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées à cette fin, souvent basées sur un abaissement de la température pour ralentir la réaction si besoin.

protéine le long de son cycle réactionnel, en utilisant la cristallographie cinétique (encadré 1) [1], mais aussi de compléter ces structures avec une caractérisation spectroscopique *in crystallo* (figure 1 et encadré 2) [2]. Il convient aussi d'utiliser la spectroscopie *in crystallo* pour s'assurer que le comportement de la macromolécule cristallisée reste bien fidèle à celui observé dans les conditions physiologiques en solution.

De nombreuses lignes de lumière synchrotron dédiées à la cristallographie s'équipent donc actuellement d'une panoplie de « microspectrophotomètres » (absorption UV/visible, fluorescence ou Raman) permettant d'analyser l'échantillon sous toutes ses coutures.

Dans cet article, nous illustrerons ces propos par la description de nos travaux sur les protéines fluorescentes, particulièrement bien adaptées à des études couplées cristallographie/spectroscopie.

Encadré 2

La spectroscopie optique *in crystallo*

En général, les expériences de spectroscopie optique (absorbance UV/visible, fluorescence ou Raman) sont effectuées sur des échantillons dilués en solution, avec des cuvettes de volume important (typiquement $\sim 100 \mu\text{L}$ ou plus). Les cristaux de protéines imposent une autre approche du fait de leur taille (typiquement $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, soit $\sim 1 \text{ nL}$), de la forte concentration en matériel biologique et de leur comportement anisotrope. De plus, il convient de les étudier dans des conditions exactement identiques à celles utilisées dans les expériences de diffraction, c'est-à-dire montés sur un goniomètre et refroidis à des températures cryogéniques de l'ordre de 100 K, afin de bien pouvoir corréler les résultats spectroscopiques et structuraux. Il est donc nécessaire de mettre au point des « microspectrophotomètres », comme celui du laboratoire Cryobench (IBS/ESRF) représenté figure 1. Ces appareils sont constitués d'un certain nombre d'objectifs à miroirs, placés autour du cristal monté sur un goniomètre, permettant de focaliser la lumière incidente sur le cristal et de recueillir la lumière transmise ou émise par fluorescence ou diffusion Raman vers des spectromètres. Un microspectrophotomètre présente l'avantage de permettre la combinaison sur un seul appareil de plusieurs techniques de spectroscopie optique et de pouvoir en outre analyser des microvolumes de solutions protéiques concentrées en matériel biologique, le tout en fonction de la température.

Les protéines fluorescentes, au carrefour entre biologies structurale et cellulaire

C'est sur la côte de Friday Harbor, au large de l'État de Washington, qu'Osamu Shimomura a pêché et étudié, dans les années 1960, une méduse, *Aequorea victoria*, dans laquelle est produite une protéine fluorescente verte : la GFP (« green fluorescent protein »). Éclairée par de la lumière de couleur cyan, cette protéine émet de la lumière verte. S'ensuit alors la découverte d'une large famille de protéines de type GFP, aux multiples couleurs et propriétés de fluorescence, qui va révolutionner la biologie cellulaire [3].

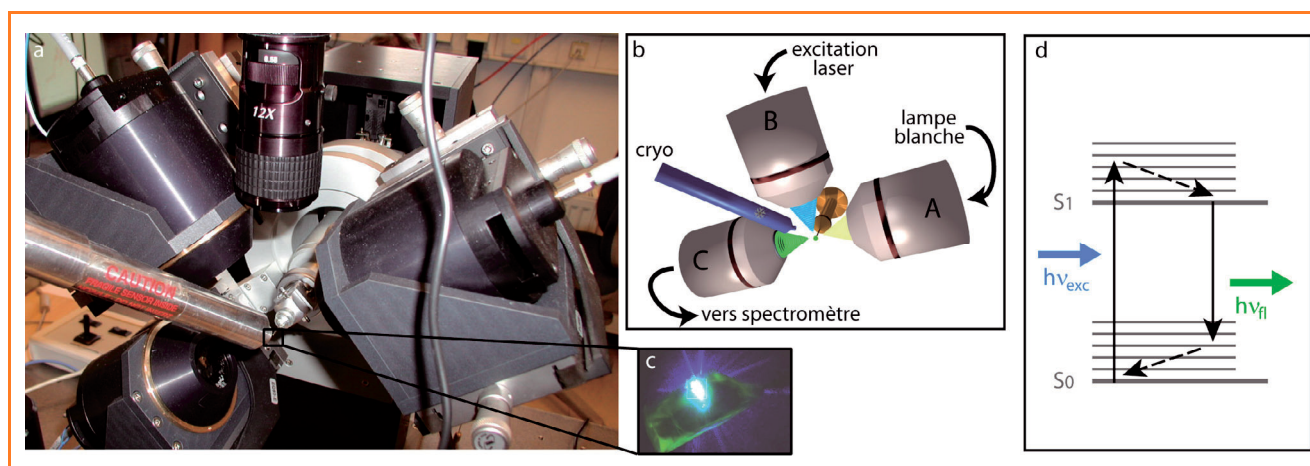


Figure 1 - Le microspectrophotomètre : principe des expériences de spectroscopie *in crystallo* sur les protéines fluorescentes.

(a) : photographie et (b) schéma du dispositif expérimental : trois objectifs identiques sont focalisés au même point d'un cristal de protéine (c). La lumière blanche à large spectre est envoyée à travers l'objectif A ; le laser excitant la fluorescence passe à travers l'objectif B et la lumière résultant de l'absorption ou de l'émission de fluorescence par le cristal est collectée par l'objectif C et envoyée vers un spectromètre. L'analyse du spectre ainsi obtenu permet de caractériser l'état photophysique de la protéine. De l'azote gazeux à température cryogénique permet de maintenir le cristal à 100 K. (c) : cristal de la protéine IrisFP, illuminé par un laser à 488 nm. La fluorescence verte est clairement visible. (d) : principe de la fluorescence selon le diagramme de Jablonski. S_0 , état fondamental ; S_1 , premier état électronique excité ; ν_{exc} , fréquence de la lumière d'excitation ; ν_{fl} , fréquence de la lumière émise par fluorescence ; flèches noires pointillées : conversions internes non radiatives.

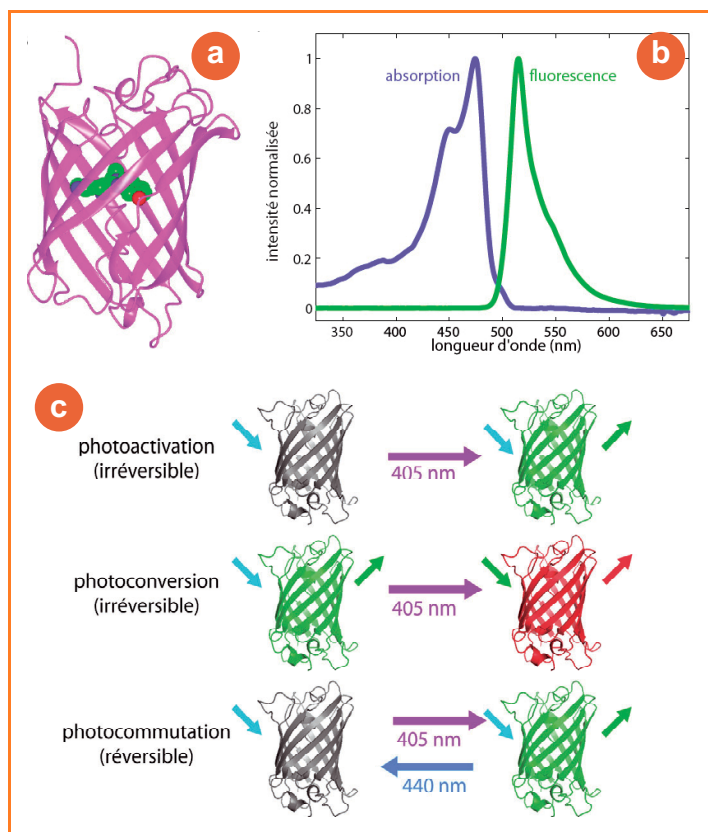


Figure 2 - Structure et propriétés des protéines fluorescentes phototransformables.

(a) : structure d'IrisFP : comme dans toutes les GFP, un « tonneau » constitué de feuillets β entoure le chromophore et le protège du milieu extérieur ; (b) spectres d'absorption et d'émission de la protéine dans son état natif (enregistrés à 100 K) : IrisFP présente un pic d'absorption à 488 nm et un pic d'émission de fluorescence à 516 nm ; (c) schéma des différents types de phototransformations observées chez les protéines fluorescentes issues de coraux ou d'anémones. Les flèches colorées indiquent les excitations laser et la fluorescence émise en réponse ; les flèches horizontales représentent les illuminations laser nécessaires aux phototransformations.

Ceci vaudra à Osamu Shimomura de partager avec Roger Tsien et Martin Chalfie le prix Nobel de chimie en 2008. En effet, en enregistrant par microscopie de fluorescence le signal provenant de la GFP après sa fusion avec une protéine d'intérêt, on peut suivre dans l'espace et dans le temps des processus intra- et intercellulaires dynamiques tels que l'expression des gènes, la division cellulaire, les voies de transport intracellulaire, les adhésions cellule-cellule, etc.

Les protéines fluorescentes ont toutes en commun une structure tridimensionnelle très particulière : leur chaîne polypeptidique, constituée de 225 à 250 acides aminés, se replie sous la forme d'un tonneau presque parfait (figure 2a). Au centre de ce tonneau, et ainsi protégé du milieu extérieur, se trouve le chromophore 4-(p-hydroxybenzylidène)-5-imidazolinone, formé de trois acides aminés (pour la GFP sauvage, Ser65/Tyr66/Gly67), ayant subi une suite de réactions chimiques complexes dites « de maturation » [4]. Grâce à la présence d'une série de doubles liaisons conjuguées, le chromophore absorbe la lumière. Maintenu de manière relativement rigide au cœur de la protéine, il réémet cette lumière sous forme de fluorescence (figure 2b). Selon la nature des trois acides aminés constituant le chromophore et en fonction de l'interaction entre celui-ci et le reste de la protéine, les protéines fluorescentes émettent à des longueurs d'onde allant du bleu au rouge lointain [5]. Certaines protéines fluorescentes issues de coraux ou d'anémones de mer montrent des

propriétés remarquables de phototransformations (figure 2c) [6]. Il peut s'agir de photoactivation (la protéine ne devient fluorescente qu'après illumination avec de la lumière violette), de photoconversion (la couleur d'émission change du vert au rouge après illumination avec de la lumière violette) ou de photocommutation (la protéine peut être réversiblement éteinte ou allumée par illumination à certaines longueurs d'onde). De plus, toutes les protéines fluorescentes scintillent (elles passent rapidement, de manière stochastique, d'un état éteint à un état allumé) et photoblanchissent (après avoir émis un certain nombre de photons, le chromophore est irrémédiablement détruit).

Ainsi, malgré leur structure d'apparence relativement simple, les protéines fluorescentes recèlent une très grande richesse de processus photophysiques. Des réactions acido-basiques et d'oxydo-réduction participent étroitement aux mécanismes réactionnels mis en jeu lors de l'absorption et de l'émission de photons. La compréhension des interactions lumière-matière au sein de ces protéines revêt donc un intérêt fondamental et est aussi essentielle pour interpréter correctement les expériences d'imagerie cellulaire, ou encore pour envisager une ingénierie rationnelle visant à améliorer leur comportement naturel par mutagenèse dirigée. Il devient alors essentiel de recourir à une approche couplée cristallographie cinétique/spectroscopie *in crystallo*.

Étude de cas : la protéine IrisFP

IrisFP, une protéine fluorescente fascinante

La protéine fluorescente IrisFP, issue d'un corail, *Lobophyllia hemprichii*, montre un comportement photophysique extraordinaire (figure 3) [7]. Excitée par de la lumière cyan à 488 nm, IrisFP fluoresce en vert. Mais cette lumière cyan fait aussi photocommuter IrisFP dans un état non fluorescent. Une faible illumination avec de la lumière violette, à 405 nm, restaure l'état fluorescent vert, et ce cycle peut être répété un grand nombre de fois. Cependant, une illumination intense avec cette même lumière violette photoconvertit la protéine en un état fluorescent rouge de manière non réversible. Remarquablement, cet état rouge est à nouveau photocommutable, cette fois-ci au moyen d'une illumination à 532 nm. Et en illuminant à 440 nm l'état non fluorescent obtenu, la fluorescence rouge réapparaît. Bien sûr, en plus de ces phénomènes, IrisFP scintille et photoblanchit. Ces propriétés photophysiques permettent d'envisager des applications remarquables en imagerie cellulaire ou en biotechnologie (conception de mémoires de stockage de masse biologiques) [8].

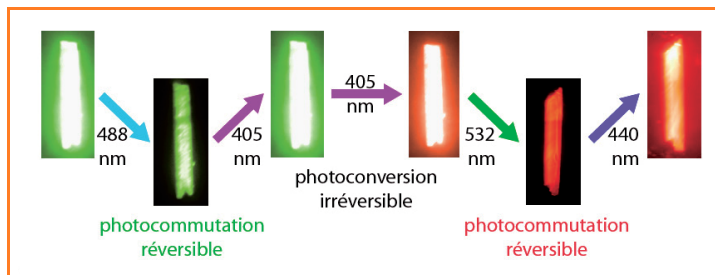


Figure 3 - Propriétés de phototransformations multiples d'IrisFP.

Par absorption de lumière cyan (488 nm), la protéine émettant initialement dans le vert commute vers un état éteint et retourne vers l'état fluorescent par absorption de lumière violette (405 nm). Cette même longueur d'onde a aussi une certaine probabilité de convertir la protéine irréversiblement vers un état fluorescent rouge. Une fois photoconvertie, la protéine peut de même passer réversiblement d'un état fluorescent à un état éteint, par absorption respective de lumière verte (532 nm) et bleue (440 nm).

Mécanismes de photoconversion et photocommutation

Mais à quoi les phototransformations d'IrisFP sont-elles dues ? Pour le savoir, il est possible de générer les différents états fluorescents et non fluorescents de la protéine *in crystallo* en illuminant les cristaux avec des lasers de longueurs d'onde bien choisies, puis, après avoir vérifié par microspectrophotométrie UV-visible la formation des états escomptés, d'en résoudre la structure. Des modifications structurales évidentes du chromophore et de son environnement protéique apparaissent alors (figure 4) [7]. La photoconversion non réversible de l'état vert à l'état rouge est associée à une rupture de la chaîne peptidique juste en amont du chromophore, au niveau de la liaison entre la phénylalanine 61 et l'histidine 62 qui fait partie du chromophore. En résulte un allongement de la chaîne de liaisons conjuguées dans ce dernier, décalant l'absorbance et l'émission de fluorescence vers le rouge. Les photocommutations réversibles, à partir de l'état vert ou de l'état rouge d'IrisFP, sont quant à elles associées à une isomérisation du chromophore, qui passe d'une configuration *cis* vers une configuration *trans* (figure 4a). Mais une question se pose alors : pourquoi la configuration *cis* du chromophore est-elle fluorescente et la configuration *trans* non fluorescente ? Pour le comprendre, il est nécessaire d'avoir recours à la spectroscopie : les spectres d'absorption UV-visible et surtout les spectres Raman (figure 4b), particulièrement sensibles aux modes de vibration du chromophore, permettent de montrer que dans la configuration *trans*, le groupement hydroxybenzylidène se trouve dans un état protoné. Or seuls les états déprotonés du chromophore sont fluorescents.

On voit donc bien que c'est la combinaison des structures cristallographiques et des signatures spectroscopiques de la protéine « dans tous ses états » qui permet de commencer à en comprendre la photophysique. Notons qu'à partir de ces résultats expérimentaux, il est possible, en utilisant une approche théorique par chimie quantique, de proposer des mécanismes encore plus précis expliquant cette photophysique. Par exemple, nos simulations suggèrent que le mécanisme de photoconversion d'IrisFP implique un état excité triplet à l'origine d'un transfert de proton très particulier entre le cycle imidazole de l'histidine 62 du chromophore et la phénylalanine 61 [9].

Mécanismes de scintillement

Si la photoconversion et les photocommutations d'IrisFP peuvent être bien contrôlées en utilisant des illuminations laser adéquates, ce n'est pas le cas du scintillement, qui est un phénomène stochastique conduisant à des états transitoires non fluorescents particulièrement instables. Il est donc en principe très difficile d'isoler de tels états et d'en élucider la structure. Cependant, en travaillant à très basse température, le problème peut être contourné : nous avons montré qu'un état transitoirement non fluorescent peut être relativement stabilisé chez IrisFP à 100 K en présence d'une illumination non pas avec de la lumière visible, mais avec une faible dose de rayons X [10]. Les modifications structurales obtenues sont beaucoup plus subtiles que celles observées dans le cas de la photoconversion ou de la photocommutation, montrant une légère distorsion du chromophore (figure 5a). Le spectre Raman associé montre une diminution

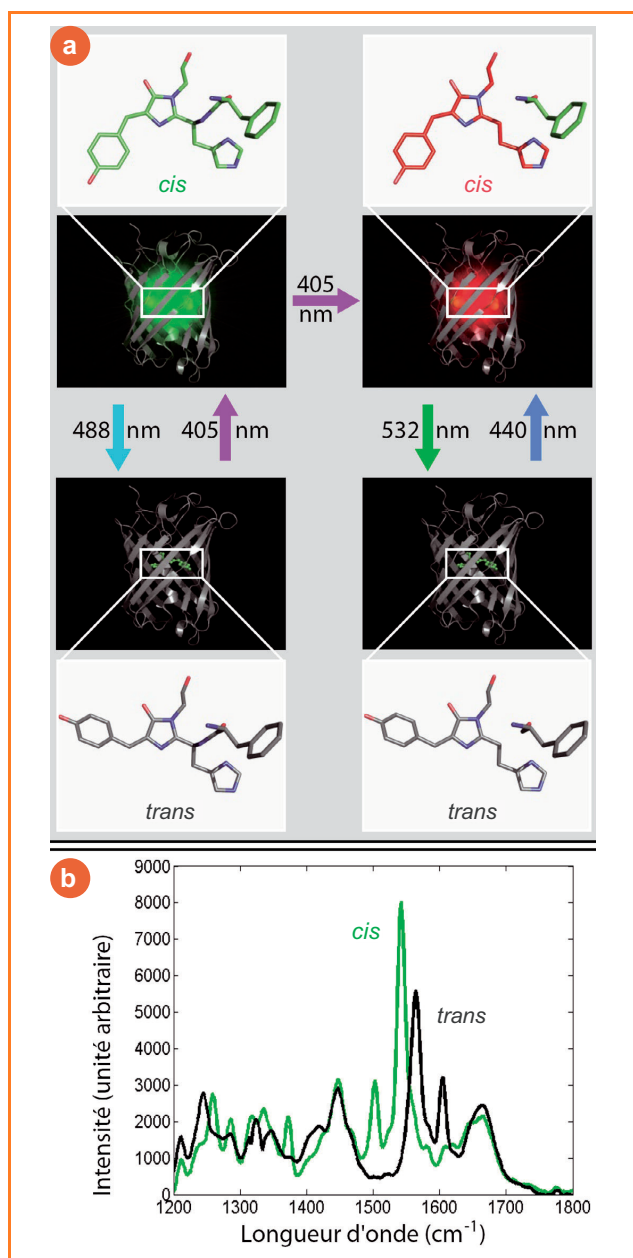


Figure 4 - Changements de conformation du chromophore à l'origine des phototransformations d'IrisFP.

(a) : représentation des différentes formes fluorescentes (verte et rouge) et éteintes d'IrisFP et structure du chromophore associée à chacune de ces formes. Chaque structure a été déterminée par diffraction aux rayons X après avoir induit la phototransformation dans le cristal par illumination laser. (b) : spectres Raman de la protéine dans son état fluorescent vert (chromophore en conformation *cis*) et dans son état éteint (conformation *trans*). Le déplacement de la bande à 1545 cm⁻¹ rend compte de la protonation du chromophore. Cette protonation, qui se produit simultanément avec l'isomérisation *cis/trans*, est invisible par cristallographie aux rayons X.

drastique d'une bande essentielle à 1545 cm⁻¹, suggérant une rupture de conjugaison entre les deux cycles du chromophore (figure 5b). On comprend ainsi l'absence de fluorescence dans cet état distordu. Le mécanisme peut être expliqué par un phénomène de transfert d'électron et le chromophore distordu serait alors de type radicalaire. Ces résultats permettent d'envisager une stratégie d'ingénierie des protéines fluorescentes pour tenter de minimiser ces transferts d'électrons parasites et diminuer les phénomènes de scintillement et/ou de photoblanchiment.

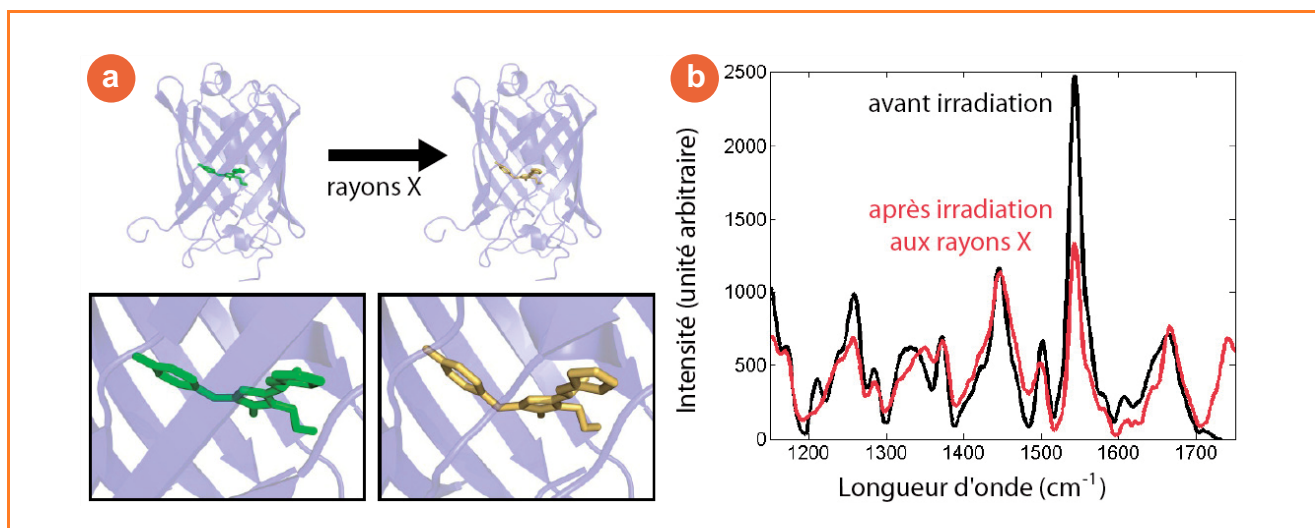


Figure 5 - Un mécanisme de scintillement chez IrisFP.

(a) : suite à une faible irradiation aux rayons X, un transfert d'électron se produit, qui induit une distorsion réversible du chromophore. Celui-ci perd transitoirement sa planéité, et donc ses propriétés de fluorescence ; (b) : spectres Raman du cristal avant et après irradiation aux rayons X. La très nette diminution de la bande à 1 545 cm⁻¹ est une preuve de la rupture de conjugaison du chromophore, à l'origine de la perte transitoire de fluorescence.

Conclusion et perspectives

Le cas d'IrisFP montre bien toute l'utilité d'une caractérisation croisée cristallographie cinétique/spectroscopie optique *in crystallo* pour étudier les mécanismes des protéines fluorescentes. Les comportements singuliers de bien d'autres protéines fluorescentes peuvent être appréhendés de la même manière. C'est par exemple le cas de la protéine fluorescente rouge Keima qui montre un déplacement de Stokes⁽¹⁾ d'amplitude exceptionnelle [11]. Ainsi, grâce au rayonnement synchrotron associé à la spectroscopie, le développement de sondes lumineuses de plus en plus sophistiquées peut être envisagé. Les protéines fluorescentes phototransformables en sont l'illustration : elles jouent un rôle fondamental dans certaines techniques d'imagerie de fluorescence révolutionnaires dites « super-résolution » ayant récemment vu le jour et permettant d'obtenir une résolution optique dix fois meilleure que la limite de diffraction théorique [6].

Il convient cependant de garder la tête froide : dans le cas des protéines fluorescentes, les mécanismes photophysiques mis en jeu sont extrêmement complexes, et notre capacité à les comprendre, et surtout à les prévoir, reste limitée. Ainsi, l'ingénierie rationnelle des protéines fluorescentes n'est pas souvent couronnée de succès. La plupart des nouvelles protéines fluorescentes produites artificiellement résultent de la combinaison d'une petite part d'ingénierie rationnelle et d'une grosse part de mutagenèse aléatoire [12]. Certaines sont même intégralement issues d'une approche par évolution dirigée.

La caractérisation photophysique des protéines fluorescentes ne s'arrête pas non plus au synchrotron et les techniques de spectroscopie *in crystallo* décrites ici ont leurs limites. En effet, la spectroscopie sur cristaux présente des difficultés intrinsèques, inhérentes à la très forte concentration de matériel protéique dans ce type d'échantillons (souvent plusieurs dizaines de mmol.L⁻¹). Ainsi, la densité optique (l'opacité) des cristaux est souvent très forte, ce qui pose des problèmes de pénétration de la lumière lors d'excitations lumineuses, ou induit des effets non linéaires de filtre interne ou de quenching⁽²⁾ dans le cas de la fluorescence [13]. Les

résultats obtenus sont donc difficiles à évaluer de manière quantitative. Par contre, dans le cas de la spectroscopie Raman « non résonnante », qui est une technique de très faible sensibilité intrinsèque, les cristaux constituent des échantillons idéaux, du fait même de cette très grande concentration en matériel biologique et du faible contenu en solvant [14]. Malgré tout leur apport, les études couplées cristallographie/spectroscopie *in crystallo* n'exonèrent donc pas de devoir aussi recourir à la spectroscopie en solution, et notamment à la spectroscopie ultrarapide et sur molécule unique.

Bien sûr, les protéines fluorescentes ne sont pas les seuls candidats pouvant bénéficier de la méthodologie décrite dans cet article. L'ensemble des protéines naturellement photosensibles, comme par exemple celles impliquées dans la photosynthèse ou la vision, sont bien entendu concernées. C'est aussi le cas des protéines possédant des cofacteurs « colorés », comme les flavo-enzymes. Les métalloprotéines constituent en outre une famille de protéines pour lesquelles une approche combinée cristallographie/spectroscopie optique est essentielle [15]. En effet, leur caractérisation spectroscopique permet de corréler l'état redox de leurs centres métalliques avec leur structure cristallographique, ce qui est capital pour comprendre leurs mécanismes d'action biologique. Plus généralement, un grand nombre d'enzymes, pas nécessairement colorées, peuvent bénéficier d'une approche combinée cristallographie/spectroscopie Raman *in crystallo* pour des études mécanistiques [16]. Notamment, la spectroscopie « Raman différence », où l'on compare un spectre initial aux spectres obtenus à différents temps après l'ajout de substrat, permet de suivre en temps réel l'évolution d'une réaction enzymatique. On peut alors, aux temps appropriés, congeler l'échantillon pour figer la réaction et collecter les données structurales correspondantes.

Le développement de lignes de lumière synchrotron dédiées à la biologie structurale et offrant la complémentarité entre plusieurs techniques spectroscopiques est donc amené à s'accélérer, comme on l'observe actuellement dans la plupart des synchrotrons nationaux récemment construits en Europe comme Swiss Light Source, SOLEIL ou DIAMOND [17-19]. Cette complémentarité ne se limite pas nécessairement à la spectroscopie optique et peut s'étendre à d'autres

types de spectroscopie, notamment la spectroscopie d'absorption X de type EXAFS ou XANES, particulièrement utile pour l'étude des métalloprotéines [20].

À l'avenir, il serait extrêmement intéressant de pouvoir recourir à une combinaison entre la cristallographie cinétique résolue en temps réel (utilisant la diffraction de Laue ou éventuellement le rayonnement issu des futures sources lasers X à électrons libres de quatrième génération) et la spectroscopie *in crystallo* ultrarapide comme la spectroscopie Raman stimulée femtoseconde [21]. Beaucoup plus complexes et exigeantes, ces approches permettraient sans aucun doute d'appréhender les mécanismes de nombre de protéines d'intérêt biologique, et notamment les protéines fluorescentes, avec encore plus de finesse.

Les auteurs remercient Uli Nienhaus et son équipe (Université de Karlsruhe, Allemagne) pour la collaboration sur IrisFP, ainsi que l'ANR BLAN-0107-01 (DSPF) qui finance ces travaux.

Notes et références

- (1) **Déplacement de Stokes** : différence entre la position du pic du spectre d'absorption et celle du pic du spectre de luminescence (fluorescence ou phosphorescence) de la même transition électronique. Le physicien irlandais Georges G. Stokes a décrit ce phénomène en 1852 dans la fluorescence de la fluorine (CaF₂).
- (2) **Filtre interne** : ré-absorption partielle de l'échantillon de la lumière de fluorescence, produisant en général un décalage vers le rouge du spectre de fluorescence ; **quenching** : diminution d'émission de fluorescence par une molécule excitée (la molécule *a priori* fluorescente, le fluorophore) par transfert d'énergie à une autre molécule (le quencher).
- [1] Bourgeois D., Weik M., Kinetic protein crystallography: a tool to watch proteins in action, *Crystallography Reviews*, **2009**, 15, p. 87.
- [2] Pearson A.R., Owen R.L. Combining X-ray crystallography and single-crystal spectroscopy to probe enzyme mechanisms, *Biochem. Soc. Trans.*, **2009**, 37, p. 378.
- [3] Tsien R.Y., The green fluorescent protein, *Ann. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, p. 509.
- [4] Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J., Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, **1996**, 273, p. 1392.
- [5] Day R.N., Davidson M.W., The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, p. 2887.
- [6] Lippincott-Schwartz J., Patterson G.H., Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging, *Trends Cell Biol.*, **2009**, 19, p. 555.
- [7] Adam V., Lelimosin M., Boehme S., Desfonds G., Nienhaus K., Field M.J., Wiedenmann J., McSweeney S., Nienhaus G.U., Bourgeois D., Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, p. 18343.
- [8] Adam V., Mizuno H., Grichine A., Hotta J.I., Yamagata Y., Moeyaert B., Nienhaus G.U., Miyawaki A., Bourgeois D., Hofkens J., Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins, *J. Biotechnol.*, **2010**, 149, p. 289.
- [9] Lelimosin M., Adam V., Nienhaus G.U., Bourgeois D., Field M.J., Photoconversion of the fluorescent protein EosFP: a hybrid potential simulation study reveals intersystem crossings, *JACS*, **2009**, 131, p. 16814.
- [10] Adam V., Carpentier P., Violot S., Lelimosin M., Darnault C., Nienhaus G.U., Bourgeois D., Structural basis of X-ray-induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein, *JACS*, **2009**, 131, p. 18063.
- [11] Violot S., Carpentier P., Blanchoin L., Bourgeois D., Reverse pH-dependence of chromophore protonation explains the large Stokes shift of the red fluorescent protein mKeima, *JACS*, **2009**, 131, p. 10356.
- [12] Subach F.V., Patterson G.H., Renz M., Lippincott-Schwartz J., Verkhusa V.V., Bright monomeric photoactivatable red fluorescent

protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells, *JACS*, **2010**, 132, p. 6481.

- [13] Barros T., Royant A., Standfuss J., Dreuw A., Kuhlbrandt W., Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state, *Embo J.*, **2009**, 28, p. 298.
- [14] McGeehan J.E., Bourgeois D., Royant A., Carpentier P., Raman-assisted crystallography of biomolecules at the synchrotron: instrumentation, methods and applications, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1814(4), p. 750.
- [15] Katona G., Carpentier P., Niviere V., Amara P., Adam V., Ohana J., Tsanov N., Bourgeois D., Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme, *Science*, **2007**, 316, p. 449.
- [16] Carey P.R., Dong J., Following ligand binding and ligand reactions in proteins via Raman crystallography, *Biochemistry*, **2004**, 43, p. 8885.
- [17] Owen R.L., Pearson A.R., Meents A., Boehler P., Thominet V., Schulze-Briesse C., A new on-axis multimode spectrometer for the macromolecular crystallography beamlines of the Swiss Light Source, *J. Synchrotron Radiat.*, **2009**, 16, p. 173.
- [18] Carpentier P., Royant A., Ohana J., Bourgeois D., Advances in spectroscopic methods for biological crystals. Part 2. Raman spectroscopy, *J. Appl. Cryst.*, **2007**, 40, p. 1113.
- [19] Royant A., Carpentier P., Ohana J., McGeehan J., Paetzold B., Noirclerc-Savoye M., Vernede X., Adam V., Bourgeois D., Advances in spectroscopic methods for biological crystals. Part 1. Fluorescence lifetime measurements, *J. Appl. Cryst.*, **2007**, 40, p. 1105.
- [20] Yano J., Kern J., Irgang K.D., Latimer M.J., Bergmann U., Glatzel P., Pushkar Y., Biesiadka J., Loll B., Sauer K., Messinger J., Zouni A., Yachandra V.K., X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: a case study for metalloprotein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, p. 12047.
- [21] Fang C., Frontiera R.R., Tran R., Mathies R.A., Mapping GFP structure evolution during proton transfer with femtosecond Raman spectroscopy, *Nature*, **2009**, 462, p. 200.



D. Arcizet



P. Carpentier



A. Faro



V. Adam

Delphine Arcizet est post-doctorante, **Philippe Carpentier**, ingénieur de recherche CNRS en instrumentation scientifique, et **Aline Faro**, doctorante, à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, équipe « Pixel »*.

Virgile Adam est post-doctorant au Laboratoire de photochimie et spectroscopie de l'Université catholique de Louvain en Belgique**.



D. Bourgeois

Dominique Bourgeois (auteur correspondant) est directeur de recherche CNRS à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et responsable de l'équipe « Pixel »*, spécialisée dans l'étude de la photophysique structurale des protéines fluorescentes et le développement de la microscopie de fluorescence super-résolution.

* IBS, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA/CNRS, Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble. Courriel : dominique.bourgeois@ibs.fr

** Laboratory of Photochemistry and Spectroscopy, Department of Chemistry, Katholieke Universiteit Leuven, Celestijnenlaan 200F, B-3001 Heverlee.



Connaissez-vous bien le site de l'AC ?

www.lactualitechimique.org

Alors vite, à votre souris !

