

# Processus photochimiques ultra-rapides

## Du laboratoire aux systèmes photoactifs naturels

Monique M. Martin, Pascal Plaza, Pascale Changenet-Barret, Agathe Espagne, Mathilde Mahet, Christian Ley et Fabien Lacombat

**Résumé** La spectroscopie d'absorption transitoire UV-Vis subpicoseconde a été utilisée pour caractériser et suivre en temps réel les processus chimiques primaires photoinduits au sein de deux protéines photosensorielles extraites de micro-organismes unicellulaires photomotiles. Cette approche de la relation structure-fonction de ces protéines photoactives consiste à comparer leur photophysique à celle de leur chromophore isolé en solution, de manière à mettre en évidence la spécificité de l'assemblage chromophore-protéine naturel. Il a été ainsi montré que la cinétique et le rendement de photoisomérisation du chromophore de la protéine jaune photoactive (PYP) sont contrôlés par les propriétés de la poche protéique dans laquelle il est inséré, et que l'oxyblépharismineprotéine (OBIP) est le siège de réactions photoinduites intervenant dans le régime picoseconde.

**Mots-clés** Spectroscopie subpicoseconde, photoisomérisation, transfert d'électron, protéines photoactives, photomouvement.

**Abstract** Ultrafast photochemical processes: from the lab to natural photoactive systems

The UV-Vis subpicosecond absorption spectroscopy has been used to characterize and probe in real-time the primary photoinduced chemical processes in two photosensory proteins extracted from phototile micro-organisms. This approach to the structure-function relationship of these photoactive proteins consists in comparing their photophysics to that of their chromophore isolated in solution, in order to evidence the specificity of the natural chromophore-protein complex. It has been shown that the photoisomerisation kinetic and quantum yield of the chromophore of photoactive yellow protein (PYP) are controlled by the properties of the protein nanospace in which it is embedded, and also that the oxyblepharism binding protein (OBIP) undergoes photoinduced picosecond reactions.

**Keywords** Subpicosecond spectroscopy, photoisomerisation, electron transfer, photoactive proteins, photomovement.

Une conversion efficace de l'énergie lumineuse en énergie chimique implique souvent une cinétique ultra-rapide des actes photophysiques primaires intervenant à l'échelle moléculaire. Ces actes élémentaires mettent typiquement en jeu des déplacements de charges et des changements de conformation. La caractérisation et la compréhension des paramètres de structure moléculaire et d'environnement qui contrôlent la cinétique de ces processus fondamentaux ont été rendues possibles grâce au formidable développement des méthodes de spectroscopie résolue en temps tout au long de la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle. La technique expérimentale d'excitation suivie de sondage optique, dite pompe-sonde UV-Visible, a été initiée peu avant 1950 par Ronald Norrish et George Porter. Concepteurs de la photolyse éclair microseconde [1], Norrish et Porter ont reçu en 1967, avec Manfred Eigen, le prix Nobel de chimie pour leurs « études des réactions extrêmement rapides effectuées par de courtes impulsions énergétiques ». Comme il est rappelé dans l'article précédent, c'est dans ce courant scientifique que s'inscrivent les contributions de Jacques-Émile Dubois. L'accès aux gammes temporelles permettant l'observation directe du mouvement des atomes est devenu possible grâce au développement des sources d'excitation laser

picosecondes ( $10^{-12}$  s), puis femtosecondes ( $10^{-15}$  s), et à l'amélioration incessante de leurs performances au cours des trente dernières années [1-3]. Neuf ordres de grandeur cinétiques séparent le prix Nobel de femtochimie attribué à Ahmed Zewail en 1999 de celui couronnant la photolyse éclair de Norrish et Porter.

Au sein d'assemblages macromoléculaires naturels, les réponses photoinduites d'un chromophore – molécule qui absorbe la lumière – peuvent modifier l'interaction entre celui-ci et son environnement proche et déclencher ainsi d'autres réactions, transformant l'énergie lumineuse en énergie chimique ou mécanique et véhiculant l'information lumineuse. Ces réactions photoinduites ultra-rapides existant depuis des milliards d'années dans la nature sont caractérisées en laboratoire depuis quelques décennies et deviennent maintenant source d'inspiration pour l'élaboration de composants photoniques. Dans cet article, nous décrivons notre approche de la relation structure-fonction de protéines photosensorielles à l'origine du photomouvement de micro-organismes unicellulaires [4-5], par une étude comparée de la photophysique de leur chromophore, isolé en solution et en interaction avec leur environnement protéique naturel. Nous utilisons la spectroscopie d'absorption UV-Vis pico-femtoseconde

pour disséquer les étapes décisives du fonctionnement de ces assemblages photoactifs naturels.

## Spectroscopie d'absorption transitoire UV-Visible pico-femtoseconde

La spectroscopie pompe-sonde optique permet de suivre en temps réel le déroulement de processus photoinduits rapides parce qu'elle offre simultanément un moyen de les initier par une excitation brève (« le pompage »), qui fournit un signal de départ, et un moyen de les sonder ensuite spectroscopiquement au cours du temps. Plus l'excitation est brève, plus rapides sont les événements que l'on peut ainsi observer. Les figures 1 et 2 montrent l'équipement utilisé.

De la photolyse éclair microseconde à la photolyse laser femtoseconde [1-3], le principe de la méthode pompe-sonde UV-Visible consiste à porter une proportion non négligeable de molécules dans un état électronique excité par une excitation optique suffisamment puissante, et à mesurer, au moyen d'une deuxième source de lumière de faible intensité, le changement d'absorbance de l'échantillon à différents délais après l'excitation. En spectroscopie ultra-rapide, l'utilisation de lasers à impulsions ultra-brèves puissantes offre la possibilité de produire, grâce à des phénomènes optiques non linéaires, des impulsions sondes à la fois ultra-brèves et spectralement larges (continuum de lumière blanche). On peut ainsi mesurer le spectre d'absorption ou de gain (amplification par émission stimulée) d'un échantillon excité sur une très large gamme spectrale (typiquement de



Figure 1 - La source laser (financée par la Région Île-de-France ; SESAME 99 - C. Amatore).

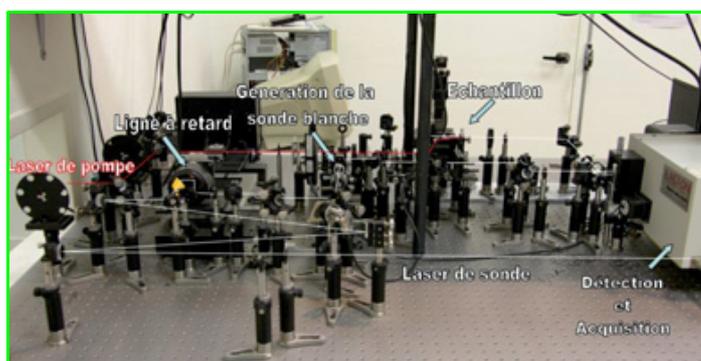


Figure 2 - L'installation pompe-sonde.

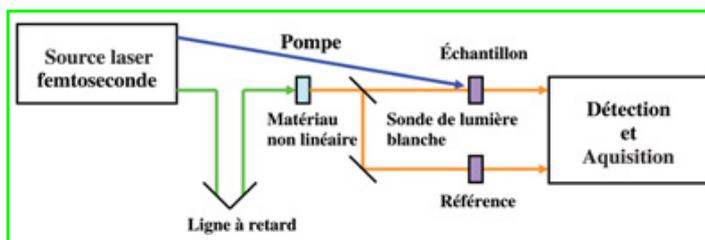


Figure 3 - Schéma de principe des expériences pompe-sonde.

L'échantillon est soumis à une excitation lumineuse ultra-brève (pompe). L'évolution des populations ou espèces moléculaires photoinduites est sondée spectroscopiquement à l'aide d'une impulsion sonde brève polychromatique (continuum de lumière blanche) envoyée sur l'échantillon à différents délais après excitation (ligne à retard variable).

350 à 900 nm). La résolution temporelle de l'expérience est assurée en faisant varier le délai entre les impulsions de pompe et de sonde au moyen d'une ligne à retard optique. Un schéma de principe des montages utilisés dans le présent travail est présenté dans la figure 3.

Deux types de sources laser ont été utilisés :

- Un système non conventionnel à colorants délivrant des impulsions de 500 fs de durée, accordables en fréquence, à la cadence de 10 Hz [6]. Le système produit simultanément deux faisceaux de fréquences différentes dont l'un est directement utilisé comme pompe et l'autre sert à produire une impulsion sonde de lumière blanche.
- Un laser à cristal de saphir dopé au titane (Ti:saphir) commercial amplifié, couplé à un amplificateur paramétrique optique non colinéaire, fournissant des impulsions pompe de 30 fs de durée, accordables en fréquence, à la cadence de 1 kHz. La sonde de lumière blanche est produite à l'aide d'un faisceau générateur à 800 nm. En raison de la dispersion de vitesse de groupe dans les milieux matériels traversés par la sonde, ses différentes composantes spectrales n'arrivent pas en même temps sur l'échantillon : on parle de dérive de fréquence ou « chirp ». Lorsque l'on calcule les spectres d'absorption différentielle résolus en temps, cette dérive de fréquence doit être corrigée numériquement. L'analyse des spectres par des méthodes d'analyse globale ou des cinétiques à des longueurs d'onde particulières permet de proposer un schéma réactionnel [7].

## Photomouvement de micro-organismes

Dans leur environnement naturel, certains micro-organismes unicellulaires (bactéries, algues, protozoaires) sont attirés par les zones ensoleillées, d'autres repoussés. Une variété de réponses comportementales à l'éclairement a été répertoriée [4-5] : les cellules peuvent modifier leur trajectoire ou leur vitesse, elles peuvent percevoir des gradients d'intensité, voire la direction de propagation de la lumière. Cette réponse leur permet d'éviter des dommages ou d'optimiser leur activité photosynthétique, si elles en ont une, ou encore de reconnaître les endroits propices à leur nutrition ou reproduction, la lumière les informant sur leur environnement. Le photomouvement est initié au sein d'un photorécepteur constitué d'un assemblage chromophoreprotéine (chromoprotéine). Cette photoperception cellulaire s'apparente à une vision élémentaire. L'absorption d'un photon par le chromophore déclenche une cascade d'événements moléculaires [8], d'abord localisés au sein de la chromoprotéine, puis propagés via une chaîne de transduction sensorielle jusqu'aux organes du mouvement (flagelles, cils). Les photorécepteurs de cette classe de

phénomènes sont le plus souvent des rhodopsines, qui utilisent le rétinol comme chromophore et sont aussi impliquées dans la vision des mammifères. D'autres récepteurs d'organismes photomotiles ont cependant été découverts récemment et sont encore peu étudiés malgré le fort développement des recherches sur la vision des organismes supérieurs. On dénombre aujourd'hui six familles de photorécepteurs naturels, classées en fonction de la structure chimique de leur chromophore [4-5].

Nous nous sommes intéressés aux processus moléculaires primaires de conversion de l'énergie lumineuse au sein de deux photorécepteurs du photomouvement cellulaire qui n'appartiennent pas à la famille des rhodopsines :  
 - La protéine jaune photoactive (« photoactive yellow protein », PYP) [9], localisée dans le cytosol de la bactérie flagellée *Halorhodospira halophila*, une bactérie qui évite la lumière bleue en nageant dans la direction opposée à la source lumineuse (phototaxie négative). La lumière bleue est captée par un chromophore dérivé de l'acide *p*-coumarique.  
 - L'oxyblépharismine (OBIP), localisée au sein d'organites submembranaires spécialisés de *Blepharisma japonicum*, un protozoaire cilié qui présente un comportement photophobique [5, 10], sans reconnaissance directionnelle. L'absorption de la lumière visible est due à un chromophore diantraquinonique complexé à la protéine.

## Processus photochimiques primaires du photomouvement

### Protéine jaune photoactive (PYP)

PYP est une petite protéine de 14 kDa dont la structure est bien connue [9] (figure 4a). Le chromophore est l'acide *trans-p*-hydroxycinnamique ou *trans-p*-coumarique déprotoné. Il est relié par une liaison thioester à la chaîne latérale du résidu Cys69 (à gauche sur le schéma de la figure 4b). Le noyau phénol déprotoné (au centre) est lié par deux ponts hydrogène avec les résidus Glu46 et Tyr42. Il est admis que sa charge négative est stabilisée par le résidu Arg52 proche,

chargé positivement. Une double liaison éthylénique relie les groupements terminaux phénolate et thioester. Elle est au cœur du fonctionnement de cet assemblage moléculaire dont la réponse repose sur la photoisomérisation du chromophore, comme dans les rhodopsines.

Les études de spectroscopie ultra-rapide de la PYP [9, 11-12] ont révélé un chemin réactionnel complexe dans le régime femto-picoseconde, conduisant à la formation de l'isomère *cis* du chromophore. Nous avons cherché à comprendre quels paramètres déterminent l'efficacité de la conversion de l'énergie lumineuse au sein de ce système photoactif naturel en étudiant le rôle respectif de la structure chimique du chromophore et de l'environnement protéique sur le chemin réactionnel (coordonnées de réaction) et sur la cinétique des réactions mises en jeu.

### Rôle de la structure du chromophore

Nous avons étudié le rôle de la structure chimique du chromophore en collaboration avec l'équipe de L. Jullien (UMR 8640, ENS Paris) qui a synthétisé une série d'analogues du chromophore de PYP où le substituant X, en  $\alpha$  du carbonyle, a été changé. Les analogues ont été étudiés principalement en solution basique, sous leur forme déprotonée (figure 5, gauche) [12-14]. Dans la série illustrée, l'acide *p*-coumarique ( $\text{pCA}^{2-}$ ,  $\text{X} = \text{O}^-$ ) et l'analogue cétonique ( $\text{pCK}^-$ ,  $\text{X} = \text{CH}_3$ ) sont disponibles commercialement. L'étude de l'analogue cétonique nous a été proposée par A. Zewail (CalTech, Pasadena, États-Unis). En complément de nos travaux d'absorption transitoire, des mesures de fluorescence résolue en temps ont en effet été réalisées à CalTech. Nous avons en particulier examiné l'effet de la protonation du groupement phénolate dans le cas de l'ester ( $\text{pCE}^-$  et  $\text{pCEH}$ ,  $\text{X} = \text{O}-\text{CH}_3$ ) et de la cétone ( $\text{pCK}^-$  et  $\text{pCKH}$ ) [13].

Les faits marquants de nos travaux sur les formes déprotonées [12-14] sont les suivants :

- La vitesse de désactivation de l'état excité croît avec le caractère accepteur d'électron du groupement carbonyle substitué CO-X. Comme le montre la figure 5, la durée de vie de l'état excité décroît de 10 ps pour  $\text{X} = \text{O}^-$  à environ 2 ps pour  $\text{X} = \text{S}-\text{C}_6\text{H}_5$  ( $\text{pCT}^-$ ) ou  $\text{X} = \text{CH}_3$  ( $\text{pCK}^-$ ).

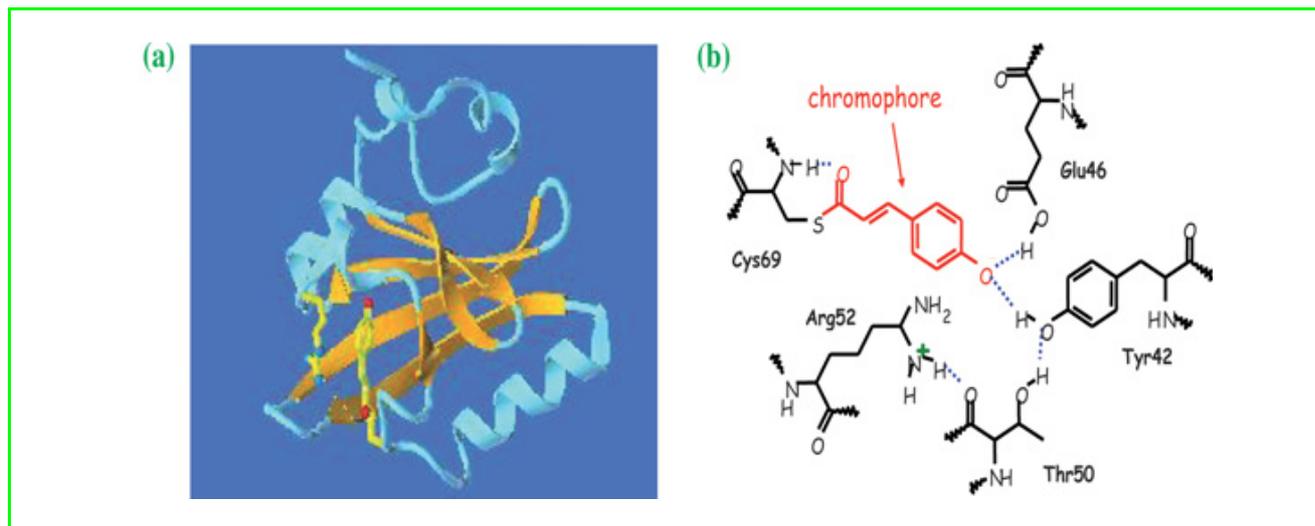


Figure 4 - (a) Structure de la protéine jaune photoactive (PYP) constituée d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle à six brins et entouré de plusieurs hélices  $\alpha$  (d'après Borgstahl G.E.O *et al.*, *Biochemistry*, **1995**, *34*, p. 6278). Le chromophore (en jaune et rouge) se situe dans l'un des deux cœurs hydrophobes situés de part et d'autre du feuillet  $\beta$ . La structure du cœur photoactif est détaillée en (b). La photoisomérisation du chromophore entraîne la restructuration de la protéine et la protonation/déprotonation du groupement phénolate dans un photocycle qui ramène l'ensemble dans sa structure initiale au bout d'une seconde environ. Lors de ce photocycle, l'énergie lumineuse est convertie en un signal chimique intracellulaire qui *in fine* active la rotation des flagelles de la bactérie porteuse de PYP.

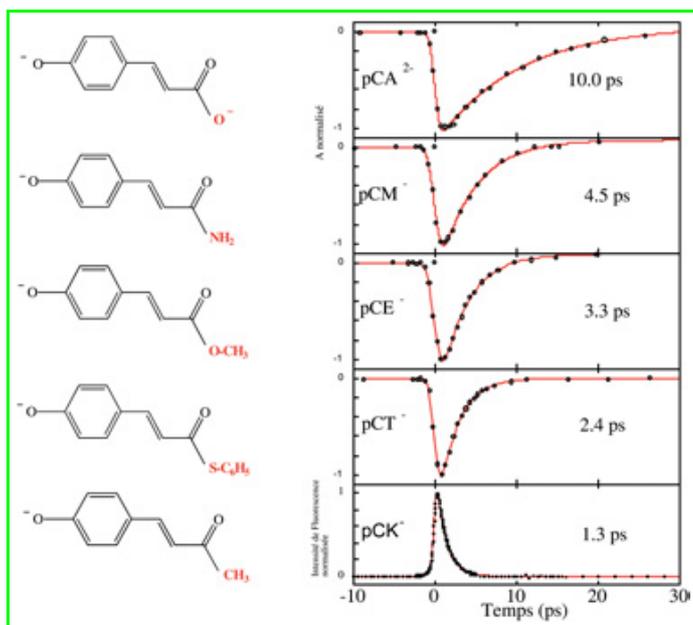


Figure 5 - Structure des analogues du chromophore de la protéine jaune photoactive étudiés. Déclin de l'état excité initial de ces analogues en solution aqueuse, suivi par spectroscopie d'absorption transitoire dans la région du maximum d'émission stimulée (pCA<sup>2-</sup>, pCM<sup>-</sup>, pCE<sup>-</sup> et pCT<sup>-</sup>) et par spectroscopie de fluorescence (pCK<sup>-</sup>) [13].

- La réaction photoinduite met en jeu un transfert de charge mais le chemin réactionnel n'aboutit pas toujours à la formation de l'isomère *cis*. L'issue de la réaction dépend du caractère donneur-accepteur d'électron de la structure du chromophore. S'il est faible, l'isomère *cis* est produit, alors que s'il est grand, l'isomère initial *trans* est reformé. Ainsi l'analogue du chromophore de PYP, le dérivé thioester pCT<sup>-</sup>, se désactive en ~ 2 ps en solution polaire mais ne forme pas ou très peu d'isomère *cis*. Sachant que l'étape primaire du photocycle de PYP repose sur la photoisomérisation de son chromophore, ce résultat est surprenant et indique que l'environnement protéique joue un rôle important sur le chemin réactionnel.

#### Rôle de l'environnement protéique

En collaboration avec le groupe de K. Hellingerwerf (Université d'Amsterdam, Pays-Bas), nous avons dans un premier temps réalisé une étude comparative de la protéine native et de sa forme dénaturée (chromophore directement exposé au solvant). Nous avons trouvé une similitude de comportement spectroscopique aux temps courts de la forme dénaturée avec le chromophore isolé en solution (pCT<sup>-</sup>), avec toutefois une cinétique plus lente, hypothétiquement due à la présence du dénaturant utilisé en forte concentration [12]. Cette similitude démontre que l'environnement protéique contrôle les voies de relaxation du chromophore lorsque la protéine est dans sa conformation native.

Plus récemment, en collaboration avec les groupes de N. Mataga (Institute for Laser Technology, Osaka, Japon) et de Y. Imamoto (Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japon), nous avons entrepris l'étude de protéines mutantes dans lesquelles les acides aminés autour du chromophore ont été sélectivement modifiés [15]. Nous avons démontré que les étapes primaires du photocycle de la protéine mutante R52Q, où l'on a remplacé l'ion argininium (Arg52, figure 4) par une glutamine neutre [16], sont similaires

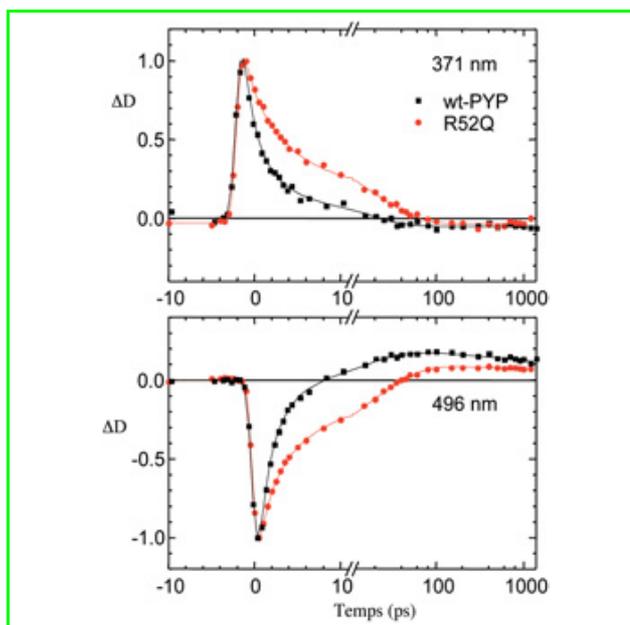


Figure 6 - Ralentissement du déclin de l'état excité de la protéine jaune photoactive native (wt-PYP) après mutation (R52Q) où l'on a remplacé l'ion argininium (figure 4) par une glutamine neutre, mis en évidence dans la bande d'absorption du premier état excité (haut) et d'émission stimulée (bas).

À 496 nm, une fois que l'état excité émissif a disparu, on observe l'absorption de l'isomère *cis* dont le temps de stabilisation au sein de la cage protéique est également ralenti (d'après [15]).

à celles de la protéine native PYP et conduisent à la photoisomérisation du chromophore à l'échelle femtopicoseconde [15]. L'idée que l'Arg52 chargée positivement joue un rôle prépondérant dans le chemin réactionnel primaire du chromophore est donc écartée. En revanche, nos expériences révèlent que la charge positive favorise la stabilisation en énergie de l'isomère *cis* du chromophore au sein de la protéine. Le rôle de la mutation dans le ralentissement de la cinétique de désactivation de l'état excité par un facteur 3, illustré par la figure 6, n'est pas complètement élucidé. Le groupe de N. Mataga a montré que la désactivation est accélérée par les contraintes protéiques [11]. Le ralentissement observé pour R52Q peut donc trouver son origine dans le fait que la poche protéique qui héberge le chromophore est rendue plus lâche par la mutation [15-16]. Dans l'hypothèse que PYP existe dans différentes conformations plus ou moins réactives, fondée sur la présence de plusieurs composantes temporelles dans le déclin de l'état excité, les résultats montrent que la mutation tendrait à éliminer la conformation la plus réactive [15].

#### Oxyblépharismine (OBIP)

Bien qu'il n'ait pas d'activité photosynthétique, le protozoaire cilié *Blepharisma japonicum* est extrêmement sensible à la lumière [4-5, 10, 17]. Soumise à une illumination soudaine, la cellule s'arrête pendant une fraction de seconde, tourne et nage vers une zone plus sombre. La chaîne de transduction sensorielle est un peu mieux connue que pour la phototaxie de la bactérie *Halorhodospira halophila*. Les photorécepteurs sont localisés dans des granules placés au voisinage immédiat de la base des cils et contiennent un pigment absorbant dans le rouge, la blépharismine [18], qui appartient à la famille des benzoanthrapléiadène-diones (figure 7). La blépharismine

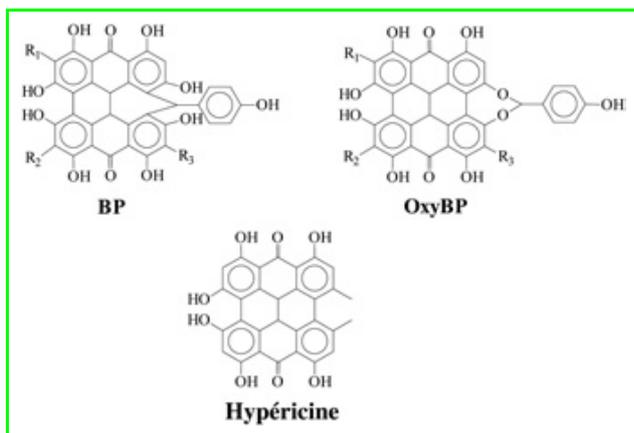


Figure 7 - Structure chimique de la blépharismine (BP), de l'oxyblépharismine (OxyBP) et de l'hypéricine.

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 (OxyBP, une phénanthropérylène-quinone comme l'hypéricine, *figure 7*), mieux isolée de l'oxygène moléculaire au sein d'une protéine partenaire. Le pouvoir phototoxique de l'OxyBP est inactivé mais le photomouvement de la cellule est conservé. En collaboration avec le groupe de F. Lenci (Istituto di Biofisica, CNR, Pise, Italie), spécialiste de *Blepharisma japonicum*, nous avons étudié le processus photochimique primaire mis en jeu au sein du photorécepteur de la forme adaptée à la lumière [7, 19-20]. Ce photorécepteur, l'oxyblépharismineprotéine (OBIP), est un complexe chromoprotéique de 200 kDa que l'on extrait par chromatographie sur une colonne d'hydroxyapatite [18-19]. Nous avons confronté les résultats de spectroscopie transitoire du chromophore isolé en solution (OxyBP) et du chromophore complexé avec sa protéine hôte (OBIP).

#### Photophysique de l'oxyblépharismine

Nos expériences de spectroscopie d'absorption transitoire montrent que le déclin de l'état excité initial de l'OxyBP en solution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est essentiellement exponentiel, avec une durée de vie d'environ 1 ns [19-20] correspondant à la durée de vie connue de la fluorescence. Aux temps courts, une composante de faible poids (moins de 10 %) est également observée, avec une durée de vie de 11 ps, attribuée hypothétiquement à une petite relaxation de structure moléculaire après excitation. Aux temps longs, on observe la formation de l'état triplet de la molécule.

#### Photophysique de l'oxyblépharismineprotéine

Comme l'illustre la *figure 8*, les spectres résolus en temps de OBIP, en solution dans un tampon phosphate à pH 7,4, rappellent ceux du chromophore OxyBP isolé en solution, avec toutefois une nouvelle bande d'absorption transitoire aux temps courts (vers 680 nm) qui disparaît en moins de 100 ps [19-20]. Aux temps longs, l'allure redevient similaire à celle du chromophore libre. L'évolution cinétique des spectres montre deux composantes de 4 et 58 ps, dont les poids relatifs sont d'environ 25 % chacune et une

composante nanoseconde voisine de celle observée pour OxyBP. Pour expliquer cette dernière, nous avons invoqué une hétérogénéité de l'échantillon, due par exemple à une variabilité de la structure de l'apoprotéine, qui scinderait la population excitée en deux classes. Une classe serait réactive et donnerait lieu aux dynamiques courtes, alors que la seconde serait non réactive et aurait un comportement comparable à celui du pigment libre.

Les premières expériences répétées avec une résolution sub-100 fs confirment la présence d'une réaction ultra-rapide spécifique lorsque l'OxyBP interagit avec son environnement protéique naturel. La *figure 9* illustre les cinétiques, mesurées à deux longueurs d'onde, caractérisant respectivement l'état excité initial et l'état transitoire formé.

Le groupe de F. Lenci avait montré que la fluorescence de l'oxyblépharismine était inhibée par la *p*-benzoquinone et avait fait l'hypothèse d'un transfert d'électron photoinduit [5]. Afin de caractériser le spectre du radical cation de OxyBP, nous avons réalisé une expérience de transfert d'électron photoinduit vers la *p*-benzoquinone (au sein d'un complexe de rencontre en solution). Le radical cation montre en effet une bande d'absorption caractéristique très voisine de celle observée avec OBIP. Nous n'écartons toutefois pas l'idée qu'un transfert de proton ait lieu également dans la réaction sondée à l'échelle nanoseconde ; auquel cas, le spectre transitoire observé avec OBIP serait attribuable à un transfert d'électron suivi d'un transfert de proton dans le régime picoseconde.

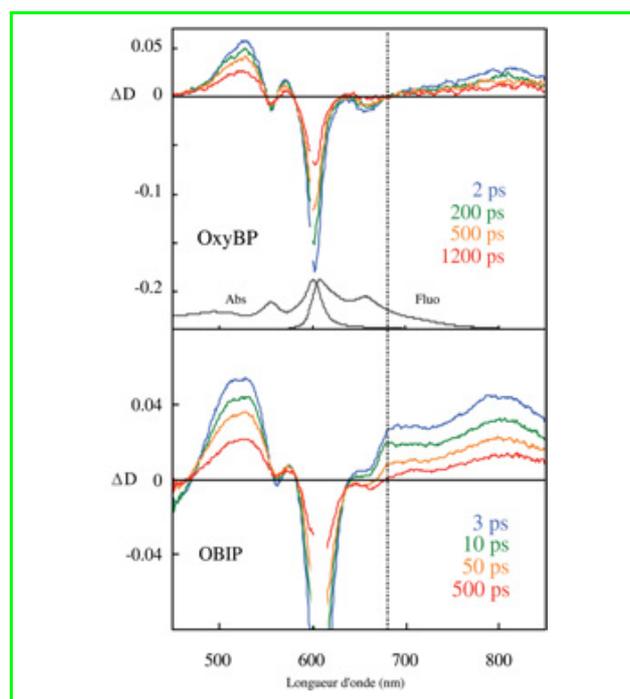


Figure 8 - Spectres d'absorption transitoire résolus en temps de l'oxyblépharismine isolée en solution dans le DMSO (en haut) et au sein de son environnement protéique naturel (OBIP, en bas) mesurés à l'aide d'une excitation de 500 fs autour de 600 nm.

Dans la protéine, une nouvelle bande d'absorption est observée vers 680 nm (pointillés) aux temps courts, traduisant une réaction spécifique au sein de l'assemblage chromophore-protéine. Les spectres observés aux temps longs pour OBIP (500 ps et plus - non représentés) sont attribués à une classe de protéines non réactives, avec hypothétiquement une interaction plus faible au sein de l'assemblage chromophore-protéine. La région spectrale polluée par la diffusion de la longueur d'onde de pompe a été masquée. Les spectres d'absorption (Abs) et de fluorescence (Fluo) stationnaires de OxyBP sont indiqués. Ceux de OBIP sont déplacés vers le rouge d'environ 4 nm.

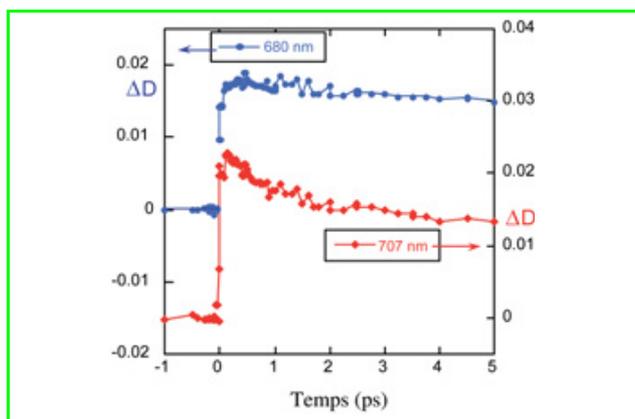


Figure 9 - Cinétiques initiales, caractérisant respectivement l'état excité initial (707 nm) et l'état transitoire formé (680 nm) de l'oxyblépharismineprotéine (OBIP), après excitation avec une impulsion laser de 30 fs à 575 nm.

Les artéfacts dus à la modulation de phase croisée pendant la superposition des impulsions pompe et sonde (autour du temps zéro) ont été masqués.

L'analyse ciblée (« target analysis ») des spectres de OBIP que nous avons réalisée récemment [7] permet de proposer un modèle réactionnel avec un processus primaire de transfert d'électron photoinduit et/ou de proton en 4 ps vers un résidu protéique proche, suivi d'une recombinaison dans le régime sub-100 ps. Ces possibilités appuient l'hypothèse que la protéine pourrait fonctionner comme une pompe à électron ou à proton. En effet, le mécanisme d'ensemble – tel qu'il ressort de la littérature – pour expliquer le photomouvement semble être une translocation de protons depuis les granules contenant les pigments vers la membrane de la cellule, entraînant une dépolarisation de celle-ci et l'activation de canaux à calcium [10]. On pense que l'influx d'ions calcium vient alors modifier temporairement la structure protéique des moteurs moléculaires des cils et inverser leur battement. Si la recombinaison d'électron et/ou de proton que nous observons en moins de 100 ps n'est pas gémée, alors la réaction photoinduite observée serait vraisemblablement l'étape déterminante pour déclencher le photomouvement. Nous avons toutefois proposé une autre hypothèse, originale : le photocycle très rapide observé (< 100 ps) révélerait une autre fonction biologique. La protéine agirait comme un écran solaire, assurant au micro-organisme adapté à la lumière une protection supplémentaire en cas d'éclairement excessif [7, 20].

## Conclusion

Nous avons montré comment la spectroscopie d'absorption transitoire subpicoseconde permet d'approcher la relation structure-fonction de protéines photoactives mises en jeu dans le photomouvement de micro-organismes unicellulaires flagellés ou ciliés. Nous avons réalisé une étude comparée de la dynamique photophysique des chromophores de ces protéines, isolés en solution d'une part et au sein de leur environnement protéique naturel d'autre part. Nous avons démontré que les étapes photochimiques décisives du fonctionnement de ces systèmes photoactifs naturels sont contrôlées par l'interaction et l'architecture de l'assemblage chromophore-protéine. Dans chacun des cas, les structures les plus réactives permettent des cinétiques chimiques photoinduites à l'échelle de la picoseconde.

## Références

- [1] Norrish R.G.W., Porter G., *Nature*, **1949**, *164*, p. 658.
- [2] Fleming G.R., *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*, Oxford University Press, New York, **1986**.
- [3] Gauduel Y., Numéro spécial « La femtochimie », *L'Act. Chim.*, fév. **2001**, *239*, p. 3-49.
- [4] Häder D.-P., Jori G., *Comprehensive series in photosciences*, Vol. 1. Photomovement, D.-P. Häder, M. Lebert (eds), Elsevier, Amsterdam, **2001**.
- [5] Sgarbossa A., Checcucci G., Lenci F., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, p. 459.
- [6] Hung N.D., Plaza P., Martin M., Meyer Y.H., *Applied Physics*, **1992**, *31*, p. 7046.
- [7] Plaza P., Mahet M., Martin M.M., Checcucci G., Lenci F., *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, p. 690.
- [8] Williams R.M., Braslavsky S.E., Triggering of photomovement-molecular basis, *Photomovement*, D.-P. Häder, M. Lebert (eds), Elsevier, Amsterdam, **2001**, vol. 1, p. 15.
- [9] Hellingwerf K.J., Hendriks J., Gensch T., *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, p. 1082.
- [10] Fabczak H., Fabczak S., Song P.-S., Checcucci G., Ghetti F., Lenci F., *J. Photochem. Photobiol. B*, **1993**, *21*, p. 47.
- [11] Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Unno M., Yamauchi S., Hamada N., Kumauchi M., Tokunaga F., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, p. 2686.
- [12] Changenet-Barret P., Espagne A., Plaza P., Hellingwerf K.J., Martin M.M., *New J. Chem.*, **2005**, *4*, p. 527.
- [13] Espagne A., Paik D.H., Changenet-Barret P., Martin M.M., Zewail A.H., *ChemPhysChem*, **2006**, *7*, p. 1717.
- [14] Espagne A., Changenet-Barret P., Plaza P., Baudin J.-B., Martin M.M., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2007**, *185*, p. 245.
- [15] Changenet-Barret P., Plaza P., Martin M.M., Chosrowjan H., Taniguchi S., Mataga N., Imamoto Y., Kataoka M., *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, *434*, p. 220.
- [16] Shimizu N., Kamikubo H., Yamazaki Y., Imamoto Y., Kataoka M., *Biochemistry*, **2006**, *45*, p. 3542.
- [17] Kraml M., Marwan W., *Photochem. Photobiol.*, **1983**, *37*, p. 313.
- [18] Matsuoka T., Murakami Y., Kato Y., *Photochem. Photobiol.*, **1993**, *57*, p. 1042.
- [19] Plaza P., Mahet M., Martin M.M., Angelini N., Malatesta M., Checcucci G., Lenci F., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, *4*, p. 754.
- [20] Mahet M., Plaza P., Martin M.M., Checcucci G., Lenci F., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2007**, *185*, p. 345.



M.M. Martin



P. Plaza



P. Changenet-Barret



C. Ley



F. Lacombar



A. Espagne



M. Mahet

**Monique M. Martin** (auteur correspondant) et **Pascal Plaza** sont directeurs de recherche, **Pascale Changenet-Barret** est chargée de recherche, **Christian Ley** est maître de conférences et **Fabien Lacombar** est assistant ingénieur à l'École Normale Supérieure de Paris<sup>1</sup>.

**Agathe Espagne** est chargée de recherche au Laboratoire de Chimie Physique de l'Université Paris-Sud (Orsay)<sup>2</sup>.

**Mathilde Mahet** est post-doctorante à l'Institut Curie<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> UMR CNRS-ENS 8640 Pasteur, Département de Chimie, École Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05.

<sup>2</sup> Courriels : Monique.Martin@ens.fr, Pascal.Plaza@ens.fr, Pascale.Changenet@ens.fr, Christian.Ley@ens.fr, Fabien.Lacombar@ens.fr

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie Physique de l'Université Paris-Sud, bât. 350, 91405 Orsay Cedex.

Courriel : agathe.espagne@lcp.u-psud.fr

<sup>3</sup> Institut Curie, Section Recherche, UMR 168 CNRS, Physique du cytosquelette et fonctions membranaires, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75248 Paris Cedex 05.

Courriel : Mathilde.Mahet@curie.fr