



HAL
open science

Etudes photo-physiques et ingénierie des protéines fluorescentes photo-transformables

Virgile Adam

► **To cite this version:**

Virgile Adam. Etudes photo-physiques et ingénierie des protéines fluorescentes photo-transformables. Biophysique. Université Grenoble Alpes, 2023. tel-04322660

HAL Id: tel-04322660

<https://hal.science/tel-04322660>

Submitted on 5 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire d'habilitation à diriger des recherches

Discipline : **Biologie**

Présenté et soutenu le 24 novembre 2023 par

Virgile ADAM

**Groupe Imagerie Intégrée de la Réponse au Stress (I2SR) / Equipe PIXEL
Institut de Biologie Structurale CNRS (UMR 5075) / CEA / UGA**

Au sein de l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Etudes photophysiques et ingénierie des protéines fluorescentes phototransformables

Composition du jury :

Rapporteurs :

Dr. Emmanuel Margeat

Directeur de recherche au CNRS, Montpellier

Pr. Marie Erard

Professeure à l'Université Paris Saclay, Orsay

Dr. Jean-Denis Pedelacq

Directeur de recherche au CNRS, Toulouse

Examineurs :

Dr. Eve de Rosny

Maître de conférences à l'Université Grenoble Alpes, Grenoble

Pr. Antoine Delon

Professeur à l'Université Grenoble Alpes, Grenoble

Remerciements

Ce manuscrit représente pour moi un achèvement... celui de la mise à plat de tout mon travail des années passées depuis mon doctorat. Tant de thématiques se sont croisées que tout réordonner a représenté un accouchement difficile mais extrêmement instructif pour moi. Je tenais à remercier certaines personnes ayant contribué à mon habilitation à diriger des recherches :

Les membres de mon jury en premier lieu: Antoine Delon, Marie Erard, Emmanuel Margeat, Eve de Rosny et Jean-Denis Pédelacq ; Un profond merci pour votre enthousiasme à évaluer mon travail, vos retours si positifs, vos rapports élogieux et vos précieux conseils plein d'encouragements.

Un remerciement spécial à Dominique Bourgeois avec qui nous avons eu l'idée, il y a près de 20 ans de nous lancer dans cette folle aventure de l'étude photophysique des protéines fluorescentes. Peu y croyaient à cette époque qui n'avait pas encore connu le prix Nobel pour la découverte et le développement de la protéine fluorescente verte ni celui pour le développement de la microscopie à fluorescence à très haute résolution. Merci de m'avoir toujours fait confiance et laissé développer mes idées. Je suis vraiment heureux et fier de voir que malgré les difficultés, la porte que nous avons ouverte dans ce monde si passionnant de la bioluminescence a mené à nombre d'étudiants, de collaborations, de financements, de publications durant toutes ces années.

Merci à tous les étudiants en thèse et aux post-doctorants qui ont tellement apporté, que ce soit à Grenoble ou en Belgique, et sans qui rien n'aurait été possible : Aline Faro, Benjamien Moeyaert, Delphine Arcizet, Chenxi Duan, Romain Berardozzi, Sergiy Avilov, Mudalige Siyath Gunewardene, Maxime Jacq, Mariam El Khatib, Joyce Woodhouse, Daniel Thédié, Nina Christou, Clarissa Liesche, Angela Mantovanelli, Arijit Maity, Jip Wulffelé... merci à tous pour l'ambiance et la qualité de vos apports scientifiques.

Merci à mes collègues qui ont participé et participent toujours pour certains à tant d'interactions enrichissantes au jour le jour, tant par leur joie de vivre que pour leurs compétences indispensables : Johan Hofkens, Hideaki Mizuno, Peter Dedecker, Eduard Fron, Martin Byrdin, Virginia Derive, Cécile Morlot, Alexandre Martins, Jacques-Philippe Colletier, Martin Weik, Elke De Zitter, Irina Gutsche, Ninon Zala, Bernhard Brutscher, Oleksandr Glushonkov, Jean-Philippe Kleman... sans oublier mes collègues en or : Pascale Tacnet et Philippe Frachet qui ne font pas que partager le bureau avec moi mais participent à mon plaisir d'y venir chaque jour.

Merci aux groupes DYNAMOP et I2SR dans leur ensemble au sein desquels je me suis épanoui depuis mon recrutement au CNRS et à l'IBS dans son ensemble qui, nous l'oublions parfois, est un environnement extrêmement privilégié et rempli de personnes brillantes sous tellement d'aspects.

Une grande reconnaissance pour mes collègues faisant confiance en mes projets actuels et à venir, c'est très important pour moi : Anne Martel, Ambroise Desfosses, Audrey Dussutour, Antoine Royant.

Merci enfin à ma petite famille qui m'a tant soutenu ces dernières années. Merci à mon épouse Irène... tu as été une lumière bienveillante qui m'a guidé dans la nuit de mes doutes. Tes attentions constantes, ton soutien et nos discussions, sans oublier ta relecture de mon manuscrit ont été tellement importants pour moi. Merci enfin à mes deux fils : Gabriel et Matthieu qui restent de très loin mes productions biologiques les plus réussies. Merci pour votre amour inconditionnel, vos sourires et tous ces moments si précieux.

Table des matières

1. Curriculum vitae résumé	vii
1.1. Etat civil et coordonnées	vii
1.2. Compétences	vii
1.3. Résumé de productions scientifiques	vii
2. Avant-propos	viii
I. Introduction	1
1. Que sont les protéines fluorescentes phototransformables et à quoi servent-elles ?	3
2. Des protéines fluorescentes intelligentes	4
3. Microscopie de super-résolution	9
II. Photocommutation	11
1. Comment les protéines fluorescentes commutent-elles ?	13
2. rsEGFP2 et rsFolder	15
2.1. Un nouveau type de RSFP	15
2.2. Ingénierie de RSFPs améliorées pour sonder les compartiments cellulaires oxydants	16
2.3. Jouer sur la vitesse de photocommutation	20
2.4. Apports de la RMN à l'étude de la dynamique de rsFolder	22
3. Etudes des RSFPs par spectroscopie et cristallographie ultra-rapides	26
3.1. A la recherche d'états intermédiaires réactionnels photoinduits	26
3.2. Etudes par cristallographie femtoseconde et spectroscopie résolue en temps de rsEGFP2	28
4. Mutants Val151Ala et Val151Leu de rsEGFP2	33
III. Photoconversion	37
1. Comment les protéines fluorescentes changent-elles de couleur ?	39
2. Les protéines fluorescentes biphotochromiques : à la fois PCFPs et RSFPs	41
2.1. IrisFP et ses suites	41
2.2. Création d'une famille de protéines biphotochromiques	42
3. Dynamique à l'état excité des PCFPs	44
3.1. Etude de la photoconversion de Kaede	44
3.2. Etude de la photoconversion de Dendra2	47
IV. Limitations photophysiques des PTFPs	53
1. Comment les protéines fluorescentes "meurent"-elles ?	55
1.1. Deux voies de photoblanchiment par la lumière visible	57
1.2. Un variant plus photostable	59
1.3. Limiter chimiquement le photoblanchiment	60
1.4. Etat de l'art et suite des travaux	62
2. Clignotement et isomérisation dans les PCFPs	63
2.1. Le problème des états noirs	63
2.2. Formation d'états « noirs » des PCFPs	66
2.3. Conséquence de la lumière d'excitation sur l'efficacité de photoconversion	68
2.4. Etats noirs de longue durée de vie : de l'isomérisation chez les PCFPs	71

3. Hétérogénéité conformationnelle et conséquences sur les efficacités d'isomérisation et de photoconversion	76
3.1. Mesures à l'état vert de mEos4b	77
3.1.1. Création d'un mutant représentant l'état A : mEos4b-E212Q	77
3.1.2. Création d'un mutant représentant l'état B : mEos4b-H62L	79
3.2. Conséquences sur la photocommutation à l'état vert	79
3.3. Conséquences sur la photoconversion	82
V. Applications	85
1. Introduction	87
2. Les PTFPs comme stockage de données	87
2.1. Stockage bidimensionnel irréversible et réversible	87
2.2. Stockage tridimensionnel	88
2.3. Stockage quaternaire	90
3. Etudes de la morphogénèse de <i>S. pneumoniae</i>	91
4. Etude du complexe Ldcl-RavA d'<i>E. coli</i>	93
VI. Perspectives	99
1. CryoPALM, futur ou utopie ?	101
2. Objectifs concernant mes projets de recherche	109
VII. Annexes et références	113
1. Curriculum vitae intégral	115
1.1. Expérience professionnelle	115
1.2. Formation	115
1.3. Distinctions scientifiques	116
1.4. Enseignement, production et diffusion de la culture scientifique	116
1.4.1. Expérience d'enseignement	116
1.4.2. Communication/organisation de réunions	117
1.4.3. Conférences et séminaires	117
1.4.4. Encadrement, animation et management de la recherche	120
1.4.5. Financements	121
1.5. Production scientifique	122
1.5.1. Publications scientifiques	122
1.5.2. Structures tridimensionnelles	127
2. Vaincre la limite de résolution optique	128
2.1. Diffraction de la lumière et limite de résolution	128
2.2. Précision de localisation en SMLM	131
3. Nomenclature des isomères de chromophores	132
3.1. Distinction entre les nomenclatures <i>cis/trans</i> et <i>Z/E</i>	133
3.2. Cas du chromophore des protéines fluorescentes	134
4. Maturation du chromophore	135
5. Références bibliographiques	137

1. Curriculum vitae résumé

Pour consulter le CV intégral, voir "*Curriculum vitae intégral*" dans les Annexes, p.115.

1.1. Etat civil et coordonnées

- Virgile ADAM
- Marié, deux enfants
- Adresse: Institut de Biologie Structurale (CNRS/CEA/UGA) / équipe PIXEL
71, avenue des Martyrs, CS 10090 – 38044 Grenoble Cedex 9, France
- Téléphone: +33 (0)4 57 42 85 67 - E-mail: virgile.adam@ibs.fr
- Tous les liens, documents et plus d'information sur www.virgile-adam.com

1.2. Compétences

- Biologie moléculaire/biochimie : clonage, mutagenèse, surexpression, purification
- Cristallographie macromoléculaire (croissance cristalline, collecte de données, traitement des données)
- Spectroscopie d'ensemble en solution et en cristaux (fluorescence UV/Vis, Raman, temps de vie) & spectroscopie sur molécules uniques
- Microscopies optiques conventionnelles et sur molécules uniques

1.3. Résumé de productions scientifiques

- **40 articles parus** dans des journaux internationaux à comité de lecture
dont 10 en (co)premier auteur et 9 en auteur correspondant.
 - 35 cités plus de 10 fois, 14 cités plus de 50 fois, 4 cités plus de 100 fois
 - Moyenne des citations par an (par article) : 80 (44)
 - Médiane (moyenne) des facteurs d'impact : 6,3 (8,5)
 - *h*-index : 26
 - Depuis mon recrutement: 24 publications
 - Pendant mon postdoc: 5 publications
 - Pendant ma thèse: 7 publications
 - Avant ma thèse: 4 publications
- **52 structures tridimensionnelles**
dont 49 protéines par RX, 2 protéines par microscopie électronique, 1 petite molécule
- **26 communications orales**
dont 18 en tant qu'orateur invité ou keynote speaker lors de séminaires (6), de conférences locales (8), nationales (6) ou internationales (6)
- **4 articles de vulgarisation** scientifique et 2 chapitres de livre

2. Avant-propos

A l'issue de ma thèse concernant les études mécanistiques des protéines fluorescentes phototransformables (PTFPs) alors nouvellement découvertes, effectuée sous la codirection du Dr. Dominique Bourgeois et du Dr. Sean Mc Sweeney au synchrotron européen (Grenoble) et cofinancée par l'Université d'Ulm (Allemagne), soutenue il y a près d'une quinzaine d'années, j'ai eu la chance au cours de mon stage postdoctoral de bénéficier d'un environnement scientifique exceptionnel au sein du laboratoire de photochimie et de spectroscopie du Pr. Johan Hofkens, à Leuven (Belgique). Ce groupe réputé dans le monde de la microscopie et de la spectroscopie m'a donné l'opportunité de mettre en pratique les résultats fondamentaux que j'ai obtenus durant ma thèse sur les protéines fluorescentes. J'ai travaillé sur plusieurs thématiques dont la maîtrise me faisait défaut : l'utilisation biotechnologique des PTFPs, la caractérisation extensive des PTFPs existantes (en particulier par spectroscopie ultrarapide et spectroscopie sur molécules uniques), la construction de systèmes de microscopie optique à super-résolution ainsi que l'ingénierie de nouvelles générations de PTFPs aux caractéristiques améliorées et l'application de ces nouveaux marqueurs en microscopie de fluorescence à super-résolution sur cellules vivantes ou fixées.

J'ai ensuite rejoint le CNRS en octobre 2011, en qualité de chargé de recherche dans l'équipe Pixel du Dr. Dominique Bourgeois à l'IBS de Grenoble. La thématique de l'équipe est l'étude des protéines fluorescentes adaptées à la microscopie de fluorescence avancée et de super-résolution. En particulier, nous avons caractérisé par spectroscopie et biologie structurale les protéines fluorescentes phototransformables en vue de leur optimisation par ingénierie moléculaire. Cette activité de recherche se place dans la continuité de mes travaux de thèse sur la caractérisation fondamentale des mécanismes des premières protéines fluorescentes phototransformables découvertes ainsi que de mes travaux de stage postdoctoral durant lequel j'ai appris à maîtriser l'ingénierie et l'application de ces protéines en microscopie à super-résolution.

J'ai eu l'occasion d'encadrer plusieurs stagiaires de M2 sur la conception, la caractérisation et les études structurales de nouvelles protéines fluorescentes. J'ai également co-encadré (avec le Dr. D. Bourgeois) le doctorat de Romain Berardozzi, moniteur agrégé de l'ENS de Lyon – *"Développement et étude du comportement photophysique des protéines fluorescentes phototransformables pour la microscopie avancée"* (thèse soutenue le 2 décembre 2016). Sans en être officiellement le co-superviseur, j'ai également supervisé au jour le jour le travail expérimental de Mariam El Khatib (doctorante du Dr. J.P. Colletier) entre 2013 et 2016 sur

l'ingénierie d'une nouvelle protéine fluorescente photocommutable. Les travaux de ces étudiants ont fait l'objet de six publications dans des revues à comité de lecture.

En parallèle de mon travail expérimental et de l'encadrement de ces étudiants, je me suis investi depuis mon recrutement dans divers enseignements en licence, master et doctorat ainsi que dans des demandes de financement en tant que porteur ou collaborateur et des financements auprès de Alpes Grenoble Innovation Recherche (AGIR) et de CNRS DEFI instrumentation aux limites.

Mon activité actuelle se refocalise sur l'obtention de méthodes et de protéines plus performantes pour la microscopie de super-résolution avec une nouvelle thématique de l'équipe vers la photophysique des PTFPs à température cryogénique, ainsi que vers un modèle d'étude cellulaire : *Physarum polycephalum*, qui devrait avoir toute sa place au sein des études sur l'imagerie intégrée de réponse au stress dans le cadre du nouveau groupe que nous avons formé en 2021 à l'occasion du renouvellement quinquennal.

Ce document s'attache à décrire les travaux de recherche effectués sur les protéines fluorescentes phototransformables, et en particulier leur photophysique, depuis ma thèse de doctorat [1]. Il vise à faire un état des lieux des connaissances et du travail auquel j'ai participé à ce sujet et n'a pas pour but (malgré une brève introduction récapitulative) de reprendre tout l'historique de la fluorescence ni les détails des protéines fluorescentes et des premières protéines fluorescentes phototransformables qui sont consultables dans mon manuscrit de thèse (<https://hal.science/tel-00449332>).

Ce mémoire s'organise en plusieurs parties décrivant les différents phénomènes photophysiques des PTFPs et leur utilisation, illustrées par une trentaine de mes publications réalisées après ma thèse de doctorat dans des journaux ou livres. Après une **introduction** sur les protéines fluorescentes et les protéines fluorescentes phototransformables, cinq parties décriront les cinq axes que j'ai pu étudier au cours de cette dernière décennie : la **photocommutation** réversible, la **photoconversion** irréversible du vert au rouge et les protéines biphotochromiques, les **limitations** photophysiques à l'utilisation des PTFPs (blanchiment, clignotements, états noirs, hétérogénéités...) et les solutions que nous proposons ainsi que des exemples d'**utilisation** pratique de nos PTFPs. Pour finir, je parlerai de la thématique émergente de PALM à température cryogénique et des **perspectives** de recherche seront présentées.



Introduction

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. D. Bourgeois*, A. Regis-Faro & **V. Adam**, “Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins”, *Biochemical Society Transaction* (2012) **40**(3): 531-538
02. **V. Adam***, R. Berardozzi, M. Byrdin & D. Bourgeois*, “Phototransformable fluorescent proteins: future challenges”, *Current Opinion in Chemical Biology* (2014) **20**: 92-102
03. **V. Adam***, “Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application?”, *Histochemistry and Cell Biology* (2014) **142**(1): 19-41
04. C. Duan, **V. Adam**, M. Byrdin & D. Bourgeois, “Structural basis of photoswitching in fluorescent proteins”
Methods in Molecular Biology (2014) **1148**: 177-202
05. D. Bourgeois & **V. Adam**, “La microscopie de fluorescence à super-résolution : un outil révolutionnaire pour imager le vivant à l'échelle nanométrique”, *Photoniques* (2015) 34-39

Illustration de chapitre : passage de l'océan vers le laboratoire des protéines fluorescentes

1. Que sont les protéines fluorescentes phototransformables et à quoi servent-elles ?

Les protéines fluorescentes sont des marqueurs biologiques codés génétiquement largement utilisées de nos jours dans les cellules vivantes. Cette famille de marqueurs trouve son origine dans l'isolement de la protéine fluorescente verte sauvage (GFP, green fluorescent protein) de son hôte, la méduse *Aequorea victoria*, par Osamu Shimomura en 1962 [2-5] puis de son gène codant en 1992 par Douglas Prasher. Sont alors devenus possibles à la fois son utilisation en tant que marqueur biologique dans le nématode *Caenorhabditis elegans* en 1994 par Martin Chalfie et son amélioration en termes de brillance en 1995 avec la création de la Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).

L'élucidation de la nature peptidique du chromophore [6] et des structures cristallographiques de la GFP et de l'EGFP obtenues en 1996 montreront un repliement de 11 brins β en un tonneau, schéma qui se révélera commun pour toutes les protéines fluorescentes découvertes par la suite. Les possibilités ouvertes par la biologie moléculaire permettront d'obtenir une palette de couleurs diversifiées grâce à l'obtention de divers mutants par Roger Tsien, démocratisant ainsi leur utilisation en tant que marqueurs de protéines en cellules vivantes et a mené à l'obtention du Prix Nobel de Chimie 2009 pour O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien [7].

A la suite de ces travaux, d'autres chercheurs ont pu trouver un grand nombre de protéines fluorescentes naturellement produites par d'autres animaux marins, non seulement dans d'autres hydrozoaires que la méduse *A. victoria* mais également chez d'autres cnidaires comme les anthozoaires (coraux ou des anémones) [8]. Plus récemment, des protéines fluorescentes ont même été découvertes dans des animaux marins assez développés comme des copépodes : sous-classe d'arthropodes [9-13] ou des céphalocordés comme les amphioxus [14-17].

A noter qu'étant majoritairement utilisées comme marqueurs biologiques fluorescents, ces protéines subissent en général de nombreuses modifications non seulement pour les adapter à leur utilisation en terme de propriétés photophysiques mais également afin de former de vrais monomères. En effet, les protéines fluorescentes sont soit dimériques soit tétramériques sous leur forme sauvage et la rupture insuffisante des interactions menant à la multimérisation peut provoquer des artefacts optiques en particulier par transfert de fluorescence d'une sous-unité à une autre comme nous le verrons dans le chapitre « Etude de la photoconversion de Kaede »,

page 44, mais également des artefacts physiques dus à la reformation d'oligomères *in cellulo*, menant à des phénomènes comme l'agrégation ou la mauvaise localisation des protéines d'intérêt comme nous en verrons un exemple dans le chapitre « Etude du complexe LdcI-RavA d'*E. coli* », page 93.

2. Des protéines fluorescentes intelligentes

Parmi ces protéines fluorescentes, un sous-groupe de protéines, appelées protéines fluorescentes phototransformables (PTFPs), sont des outils inestimables en microscopie de fluorescence avancée, notamment en microscopie à super-résolution et comme outils biotechnologiques car l'intensité ou la couleur d'émission de leur fluorescence peut être contrôlée par une illumination à des longueurs d'ondes spécifiques (Figure 1). Les PTFPs sont subdivisées en trois groupes principaux que nous avons décrit dans deux revues et un chapitre de livre [18-20].

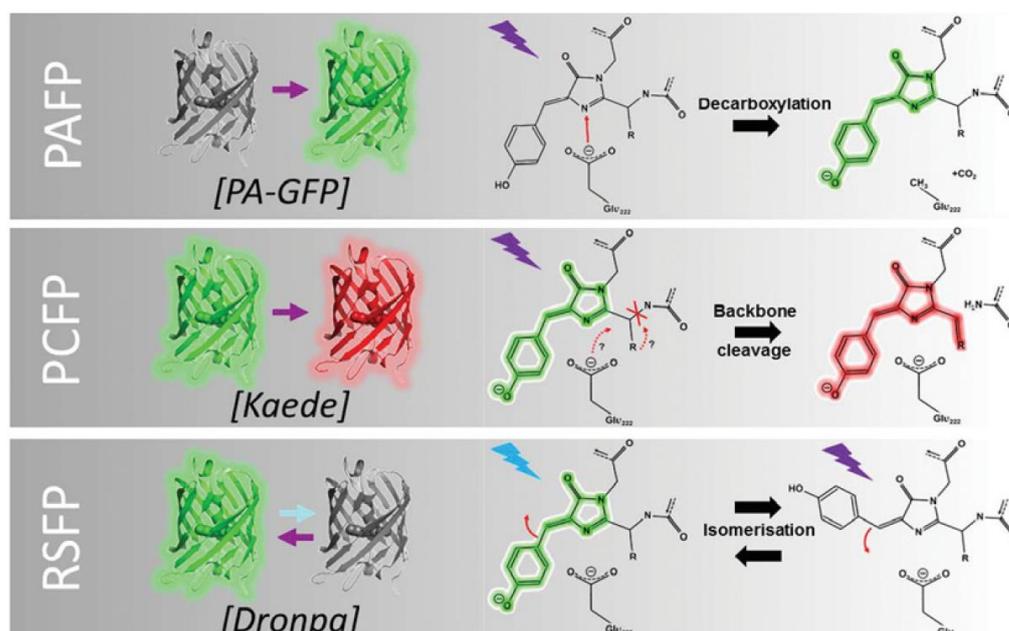


Figure 1 – Représentation des trois types de protéines fluorescentes phototransformables (PTFPs) : les protéines fluorescentes photoactivables (PAFPs), photoconvertibles (PCFPs) et réversiblement photocommutables (RSFPs). Pour chaque catégorie sont illustrés le changement typique de couleur et la couleur de la lumière utilisée pour effectuer la phototransformation, ainsi que les modifications altérant le chromophore. Le nom des premières protéines découvertes de chacun des types est noté entre crochets.

Les protéines du premier groupe subissent une phototransformation irréversible d'un état non-fluorescent vers un état fluorescent, on parle dans ce cas de protéines fluorescentes photoactivables (photoactivatable fluorescent proteins, PAFP). Le premier membre de ce groupe,

est la Photoactivatable Green Fluorescent Protein (PA-GFP), conçue en 2002 à partir de la protéine fluorescente verte sauvage de la méduse *Aequorea victoria* (*avGFP*) [21].

Celles du deuxième groupe subissent également une phototransformation irréversible mais entre deux états fluorescents avec différentes longueurs d'onde d'émission, on parle dans ce cas de protéines fluorescentes photoconvertibles (photoconvertible fluorescent proteins, PCFPs). Le premier membre historique de ce groupe est la protéine fluorescente Kaede, découverte en 2002 dans le corail scléactiniaire *Trachyphyllia geoffroyi* [22].

Enfin, les protéines du troisième groupe, appelées protéines réversiblement photocommutables (RSFPs, Reversibly Switchable Fluorescent Proteins) subissent une photocommutation réversible entre des états fluorescent et non fluorescent. Le premier membre de ce groupe est Dronpa, dont l'ingénierie est réalisée en 2004 à partir de la protéine 22G produite par le corail scléactiniaire *Echinophyllia sp.* [23].

Grâce à l'ingénierie des protéines fluorescentes et la découverte d'autres protéines fluorescentes sauvages dans les océans, la palette des PTFPs (PhotoTransformable Fluorescent Proteins) s'est largement étendue au cours de cette dernière décennie, tant au niveau des couleurs que des photoréactions (Figure 2).

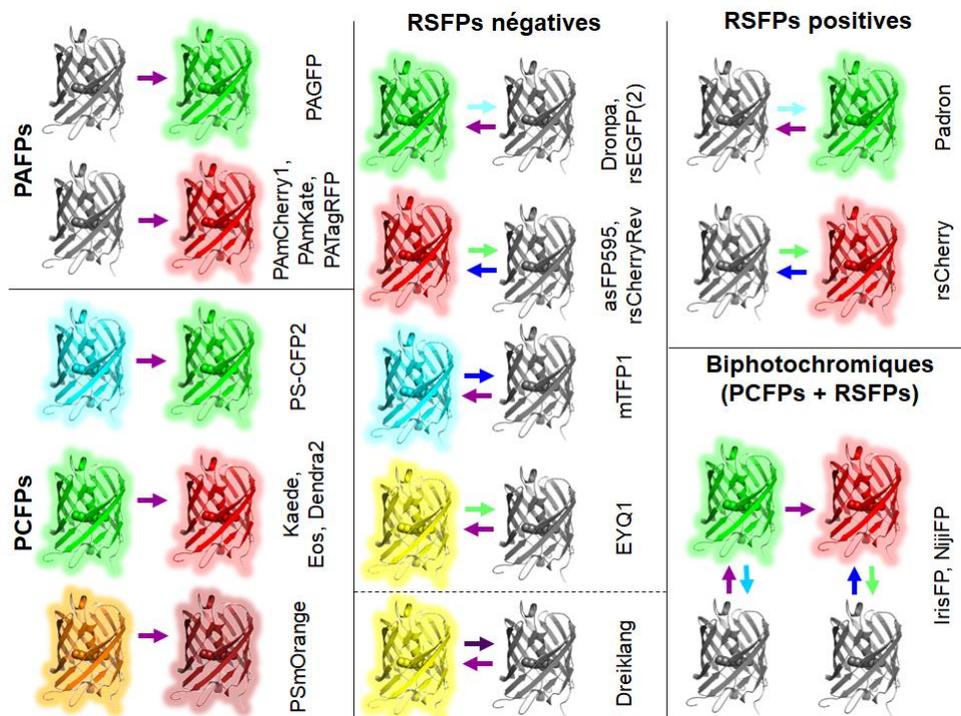


Figure 2 – Représentation des différentes classes de PTFPs illustrée par des exemples de membres de chaque famille. Les longueurs d'onde d'excitation permettant les phototransformations sont représentées par des flèches colorées.

Nous pouvons désormais distinguer les RSFPs négatives et positives selon l'ordre de photocommutation, soit d'une forme stable fluorescente vers une forme métastable non-fluorescente (RSFPs négatives) telles que Dronpa, soit d'une forme stable non fluorescente vers une forme métastable fluorescente (RSFPs positives) telles que Padron. Les spécificités des RSFPs seront décrites dans un chapitre ultérieur. De nouvelles protéines fluorescentes combinant à la fois les propriétés de photoconversion irréversible et de photocommutation réversible existent également.

Ces PTFPs appelées protéines fluorescentes biphotochromiques et issues du travail de mon doctorat et de mon postdoctorat seront détaillées dans un chapitre ultérieur. Chacune de ces PTFPs a ses particularités propres et sont utilisables à la fois en tant qu'outils biotechnologiques innovants pour la photonique [24] et marqueurs cellulaires fluorescents intelligents et génétiquement codés [18] comme nous le verrons dans un chapitre ultérieur dédié à quelques exemples d'applications des PTFPs que j'ai pu faire ces dernières années. Les différents domaines d'application des PTFPs sont résumés dans la Figure 3.

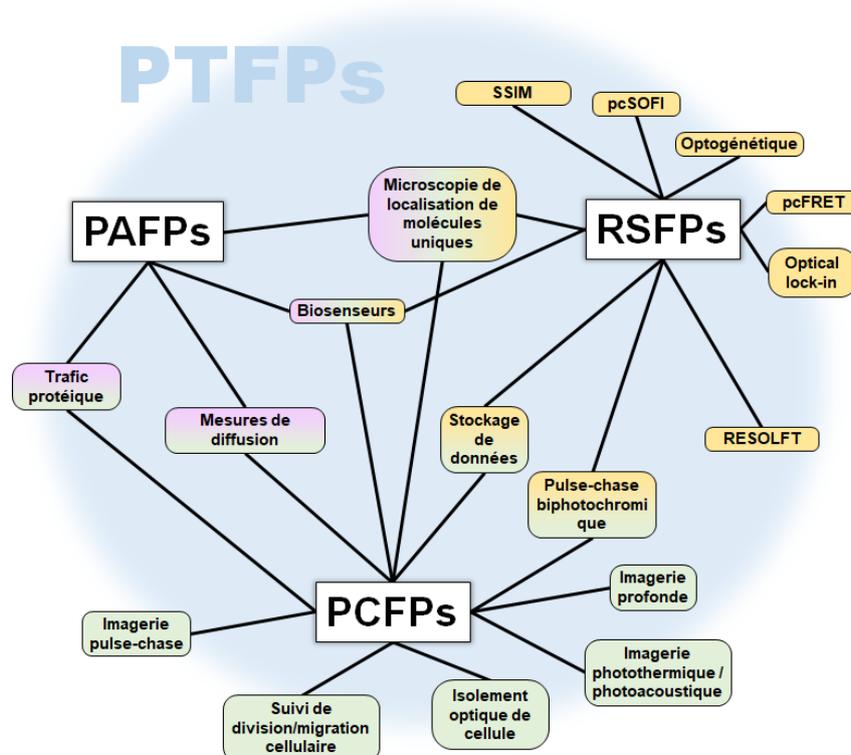


Figure 3 – Vue générale des différents types d'applications possibles avec des PTFPs.

Brièvement, la nature irréversible des phénomènes de photoactivation et de photoconversion permet d'utiliser les protéines fluorescentes photoactivables (PAFPs, PhotoActivatable Fluorescent Proteins) et les protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs, PhotoConvertible Fluorescent Proteins) comme des traceurs cellulaires de diffusion moléculaires (trafic intracellulaire, suivi de molécules uniques...) ou cellulaires (division, migration, pulse-chase...). PCFPs et PAFP peuvent par exemple être utilisés dans une technique similaire à celle de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching).

En FRAP, une zone choisie d'une cellule produisant une protéine d'intérêt marquée par une protéine fluorescente est fortement illuminée. Les protéines fluorescentes se trouvant dans cette zone supposément irréversiblement photoblanchies, si un retour de fluorescence y est observé, il doit provenir de l'extérieur de cette zone et l'on peut donc mesurer une cinétique de diffusion en suivant ce retour (Figure 4a).

L'utilisation d'une PAFP ou d'une PCFP est avantageuse à plusieurs niveaux : avec une PAFP, la mesure est inverse de celle faite en FRAP, c'est le déclin d'un signal qui est suivi, permettant d'éviter des mesures bruitées en cas de faible diffusion (Figure 4b). L'utilisation de PCFP permet également le suivi en double couleur de chacune des deux zones (illuminée et non illuminée) et donc le devenir des molécules se trouvant dans chacune de ces zones (Figure 4c).

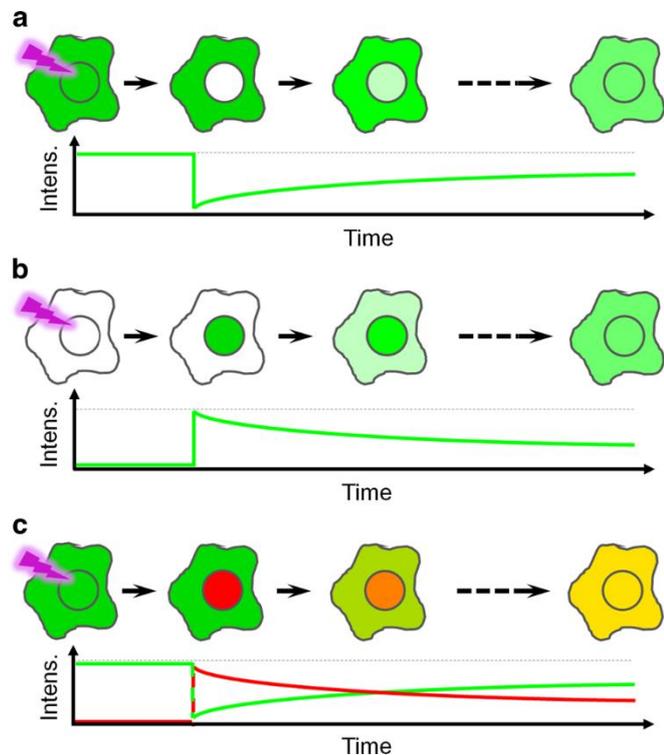


Figure 4 - Différences et similarités entre techniques permettant le suivi de diffusion intracellulaire de protéines fluorescentes. (a) dans le FRAP, une région d'intérêt est photoblanchie et la cinétique de diffusion peut être extraite en suivant le retour de fluorescence produit par le déplacement de molécules non photoblanchies. (b) L'utilisation de PAFPs permet des mesures similaires mais également de suivre la diffusion d'un signal positif, évitant les effets indésirables qui peuvent arriver en FRAP comme des états sombres de longue durée. (c) Les PCFPs fournissent plus de précision dans ce type de mesures puisque les molécules diffusant depuis et vers la région d'intérêt sont fluorescentes.

La réversibilité du phénomène de photocommutation des RSFPs, à l'inverse, permet d'être beaucoup plus versatile et d'utiliser les protéines fluorescentes réversiblement commutables comme des outils optiques dont le signal peut être modulé dans des buts d'optogénétique, d'imagerie ou de stockage de données effaçables, par exemple. En dehors de ces applications biotechnologiques, l'une des premières et principales utilisations des PTFPs est sans aucun doute la microscopie de fluorescence et en particulier la microscopie optique dite de super-résolution.

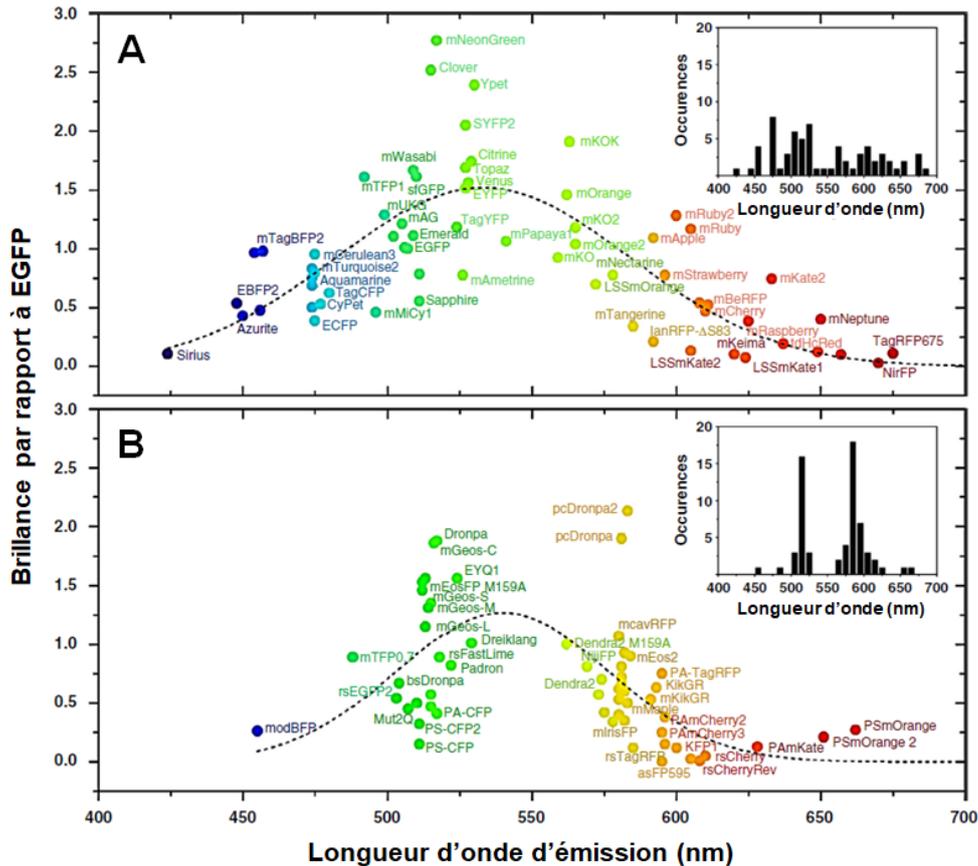


Figure 5 – Distribution de brillance des protéines fluorescentes conventionnelles (A) et des PTFPs (B) en fonction de leur couleur d'émission. Les lignes pointillées représentent la distribution générale de brillances. L'absence des PTFPs émettant dans la fenêtre 530-560 nm est visible. Les histogrammes (en encarts) représentent la distribution des protéines fluorescentes en fonction de leur longueur d'onde d'émission.

Il reste encore beaucoup de marge de progression quant à l'ingénierie des protéines fluorescentes. Beaucoup ayant été des dérivés de la GFP, la majeure partie des membres existants sont bien plus brillants dans le vert que dans les autres couleurs (Figure 5A). La répartition des PTFPs est différente puisqu'étant majoritairement des dérivés de protéines fluorescentes soit vertes soit rouges, nous nous retrouvons avec deux groupes autour de ces couleurs et en découlent à la fois un manque évident de PTFPs bleues (qui ne représentent pas une priorité

puisqu'excitables avec des longueurs d'ondes toxiques pour le vivant et qui ne permettent pas d'imager dans des échantillons épais) mais également de PTFPs émettant dans le jaune et le rouge lointain (Figure 5B). La découverte de nouvelles sources naturelles de protéines fluorescentes et la meilleure compréhension de la photophysique de ces protéines devrait combler cette lacune et améliorer la variété et la brillance des PTFPs dans le rouge lointain à l'avenir.

3. Microscopie de super-résolution

La microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM, Single Molecule Localization Microscopy) [25-27] est venue combler une gamme de résolution qui n'était pas atteignable en biologie structurale sur échantillons vivants (Figure 6A). Pour plus de détails sur la problématique de la résolution optique, voir le chapitre "*Vaincre la limite de résolution optique*", dans les Annexes, p. 128.

La technique de SMLM que nous développons et utilisons dans l'équipe, avec nos protéines fluorescentes est le PALM (PhotoActivated Localization Microscopy, microscopie de localisation photoactivée). Cette technique est basée sur la détection de molécules uniques de PTFPs qui sont aléatoirement photoactivées, photoconverties ou photocommutées en très petit nombre à la fois grâce à l'excitation alternée de deux lasers (Figure 6B) : un laser actinique de faible intensité (servant à produire la phototransformation de quelques molécules) et d'un laser de sonde synchronisé avec la caméra (servant à exciter la fluorescence de ces molécules jusqu'à leur photoblanchiment). Ces pulses lasers alternés sont répétés un grand nombre de fois, permettant l'obtention d'un grand nombre d'images contenant chacune un nombre limité de molécules uniques, assez distantes pour permettre leur isolement spatial des molécules voisines et leur localisation précise (Figure 6C). Après fusion des localisations, on obtient une image PALM avec une bien meilleure précision que celle autorisée par la résolution optique limitée par la diffraction de la lumière (Figure 6D).

Il y a essentiellement trois limitations à la pleine utilisation du PALM:

- Une limitation instrumentale tenant au développement de caméras plus rapides et sensibles,
- Une limitation sur le nombre et la qualité des protéines fluorescentes disponibles

- Une limitation quant à la compréhension des phénomènes photophysiques parasites des protéines fluorescentes lors des mesures (photoclightement trop important, photorésistance limitée, photoconversion incomplète...)

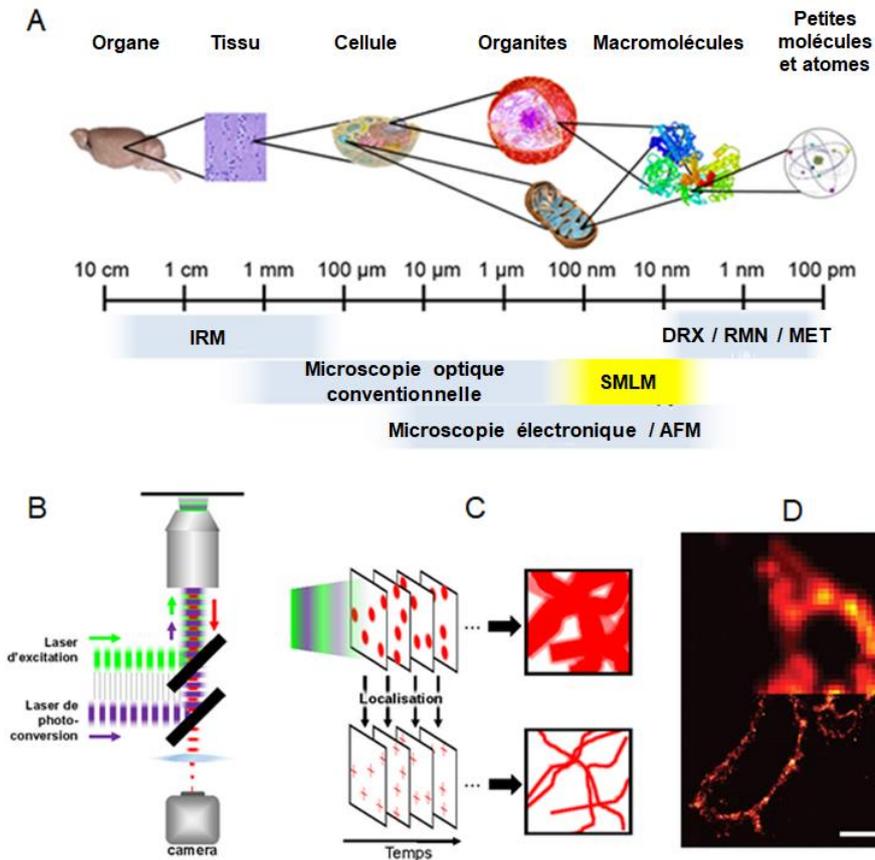
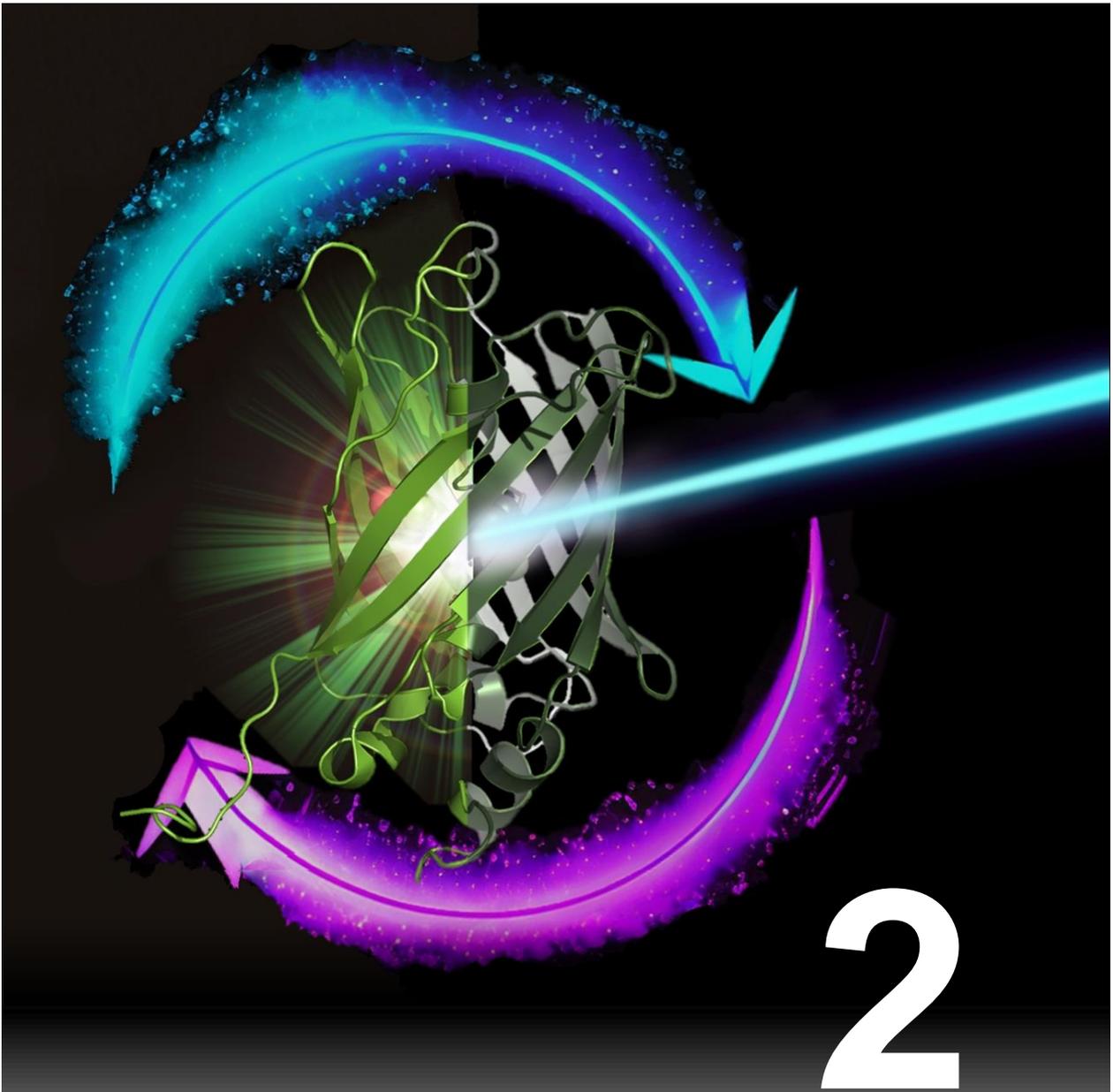


Figure 6 – SMLM : échelles et principes. (A) Techniques permettant d'étudier les échantillons biologiques à différentes échelles, de l'organe/tissu (sondables par imagerie à résonance magnétique (IRM)) à la molécule et place la SMLM entre la microscopie optique conventionnelle et des techniques de très hautes résolutions comme la diffraction aux rayons X (DRX), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la microscopie à effet tunnel (MET). La microscopie électronique et la microscopie à force atomique (AFM) comble également la gamme de résolution couverte par la SMLM mais ne sont pas compatibles avec des échantillons vivants. (B) Schéma du montage : des lasers de photoconversion et d'excitation illuminent en champ large un échantillon de manière alternée. (C) Une succession de multiples cycles de photoactivation localisation-photoblanchiment permet de cumuler toutes les positions en une image super-résolue. Le laser de photoconversion (405 nm, violet) photoconvertit en rouge simultanément quelques molécules qui seront excitées par le laser de sonde (561 nm, vert) et localisées avec une précision sub-diffractionnelle, avant de blanchir. La fusion des positions localisées constitue une image super-résolue. (D) Amélioration de la résolution en visualisant dans une cellule des protéines transmembranaires CD65 par microscopie TIRF (haut) et par microscopie PALM (bas), reproduit de [25]. Echelle : 1 µm.

Hormis le premier point pour lequel je ne suis pas qualifié, je me suis attaché ces dernières années à essayer de combattre les limitations liées aux protéines fluorescentes afin de proposer à la communauté des microscopistes des protéines fluorescentes plus performantes. Je me suis en particulier intéressé à la conception, la caractérisation et l'amélioration des protéines fluorescentes photochromiques (i.e. réversiblement photocommutables). Cette expertise semble avoir été appréciée comme en témoignent les invitations à écrire des revues sur le sujet [18, 28-30].



Photocommutation

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. D. Bourgeois* & **V. Adam**, “Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view”
IUBMB Life (2012) **64**(6): 482-492
02. J.-P. Colletier*, M. Sliwa*, F.-X. Gallat, M. Sugahara, V. Guillon, G. Schirò, N. Coquelle, J. Woodhouse, L. Roux, G. Gotthard, A. Royant, L. Martinez, C. Ruckebusch, Y. Joti, M. Byrdin, E. Mizohata, E. Nango, T. Tanaka, K. Tono, M. Yabashi, **V. Adam**, M. Cammarata, I. Schlichting, D. Bourgeois & M. Weik*, “Serial femtosecond crystallography and ultrafast absorption spectroscopy of the photoswitchable fluorescent protein IrisFP”
The Journal of Physical Chemistry Letters (2016) **7**(5):882-887
03. M. El Khatib, A. Martins, D. Bourgeois, J.-P. Colletier* & **V. Adam***
“Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm”, Scientific Reports (2016) **6**:18459
04. N. Coquelle#, M. Sliwa#, J. Woodhouse#, G. Schirò#, **V. Adam**#, [...], M. Cammarata, I. Demachy, M. Field, R. Shoeman, D. Bourgeois, J.-P. Colletier*, I. Schlichting*, M. Weik*, “Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography”
Nature Chemistry (2018) **10**(1):31-37
05. N.E. Christou, I. Ayala, K. Giandoreggio-Barranco, M. Byrdin, **V. Adam**, D. Bourgeois and B. Brutscher*, “NMR reveals light-induced changes in the dynamics of a photoswitchable fluorescent protein”
Biophysical Journal (2019) **117**(11):2087-2100
06. J. Woodhouse, G. Nass Kovacs#, N. Coquelle#, L. Uriarte#, **V. Adam**#, [...], M. Cammarata, L. Foucar#, D. Bourgeois, M. Sliwa*, J.-P. Colletier, I. Schlichting*, “Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved serial femtosecond crystallography and transient absorption spectroscopy”
Nature Communications (2020) **11**: 741
07. N.E. Christou, K. Giandoreggio-Barranco, I. Ayala, O. Glushonkov, **V. Adam**, D. Bourgeois & B. Brutscher*, “Disentangling chromophore states in a reversibly switchable green fluorescent protein: mechanistic insights from NMR spectroscopy”
Journal of the American Chemical Society (2021) **143**(19):7521-7530
08. **V. Adam**#, K. Hadjidemetriou#, N. Jensen#, R.L. Shoeman#, J. Woodhouse#, [...], T. Domratcheva*, S. Jakobs, M. Sliwa, I. Schlichting, J.-P. Colletier, D. Bourgeois* & M. Weik*, “Rational control of off-state heterogeneity in a photoswitchable fluorescent protein provides switching contrast enhancement”
ChemPhysChem (2022) **23**(19):e202200192

Illustration de chapitre : commutation d'une RSFP verte d'un état allumé vers un état éteint sous illumination de lumière cyan et de son retour vers un état allumé sous illumination de lumière violette

1. Comment les protéines fluorescentes commutent-elles ?

Certaines PTFPs sont capables de voir leur fluorescence rapidement et réversiblement éteinte et allumée. Cette famille de protéines appelées protéines fluorescentes réversiblement commutables (RSFP, Reversibly Switchable Fluorescent Proteins) est à la fois très variée et dynamique. Le chromophore des RSFPs présente la particularité de s'isomériser entre une forme allumée et une forme éteinte dont l'une est stable et l'autre est métastable. Trois exemples typiques sont montrés dans la Figure 7, extraite d'une de nos revues [29].

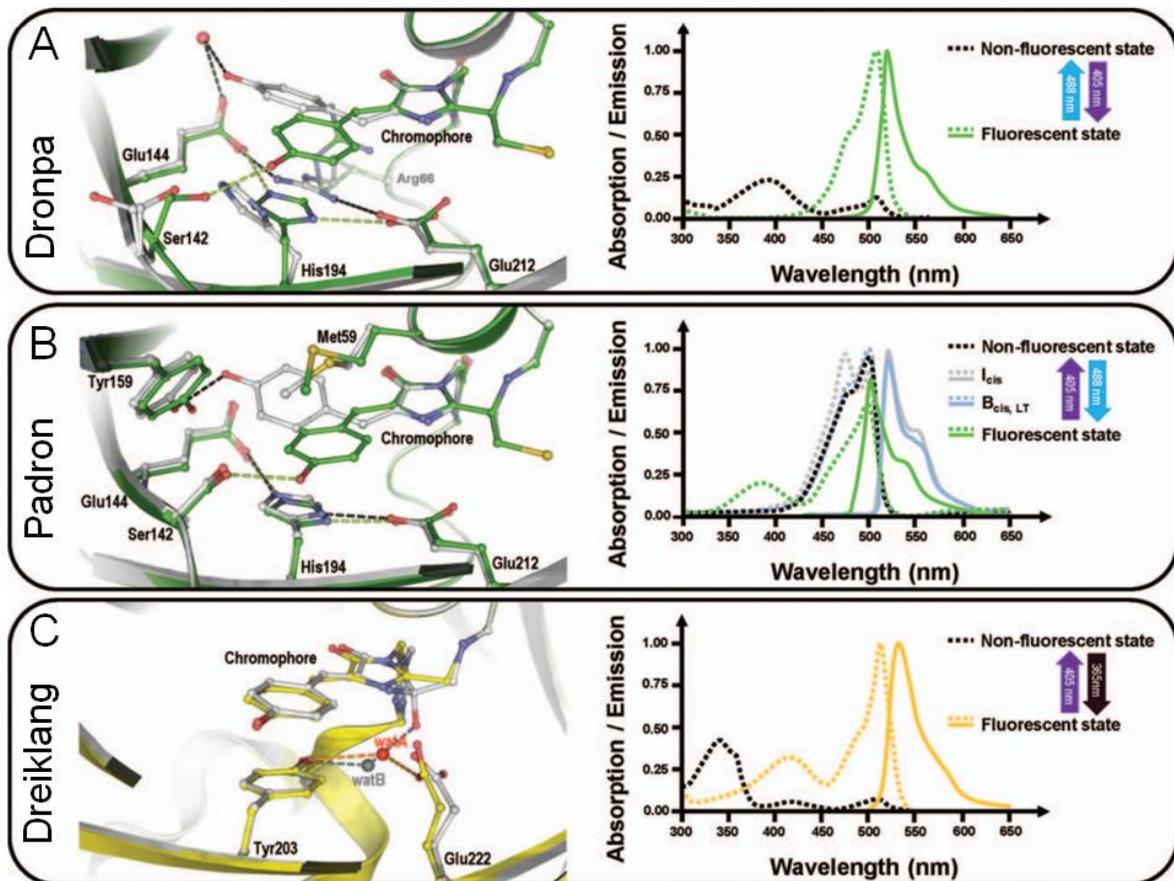


Figure 7 – Mécanismes de photocommutation des RSFPs. Les changements structuraux (gauche) et spectroscopiques (droite) lors de la photocommutation sont indiqués pour les RSFPs représentatives: (A) Dronpa, anthozoaire, commutation négative; (B) Padron, anthozoaire, commutation positive et (C) Dreiklang, hydrozoaire, commutation découplée. Les états structuraux non fluorescents sont représentés en gris et les états fluorescents en vert (Dronpa et Padron) ou jaune (Dreiklang). Les réseaux de liaisons hydrogènes essentielles sont mis en évidence par des lignes pointillées. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont représentés respectivement par des lignes pointillées et continues. Dans le cas de Padron, les signatures spectroscopiques de deux intermédiaires fluorescents le long de la voie de commutation *off-on* (appelées I_{cis} et B_{cis,LT}) sont également illustrés [31].

Lorsque la forme stable est la forme allumée, on parle de RSFPs négatives : une illumination correspondant au pic d'absorption du chromophore anionique (~500 nm pour une RSFP verte) va à la fois exciter l'émission de fluorescence et la commutation vers la forme protonée du chromophore, métastable et non-fluorescente. La forme non fluorescente pourra revenir vers l'état fluorescent soit rapidement lors d'une excitation lumineuse correspondant au pic d'absorption du chromophore protoné (~400 nm pour une RSFP verte), soit plus lentement, sans illumination. La première protéine ingénierée de ce type est Dronpa [23] (Figure 7A).

Lorsque la forme stable est la forme éteinte, on parle de RSFPs positives : contrairement aux RSFPs négatives, la forme éteinte correspond à un chromophore anionique et une illumination lumineuse correspondant au pic d'absorption de cette forme (~500 nm pour une RSFP verte) va commuter la protéine vers sa forme allumée métastable, présentant un spectre montrant un mélange de formes anionique et protonée. L'excitation de la forme protonée (~400 nm pour une RSFP verte) permettra à la protéine de revenir rapidement vers sa forme stable éteinte, ce qu'elle fera également plus lentement en l'absence d'illumination. La première protéine ingénierée de ce type est Padron [32] (Figure 7B).

Enfin, une troisième catégorie existe où les excitations actiniques des formes protonée (permettant la commutation vers la forme anionique, ~360 nm pour une RSFP verte) et anionique (permettant la commutation vers la forme protonée, ~400 nm pour une RSFP verte) sont découplées de l'excitation de sonde (~500 nm pour une RSFP verte) permettant l'émission de fluorescence. Ainsi, contrairement à une RSFP négative, le signal ne diminue pas à cause de la commutation pendant l'excitation de fluorescence. La première protéine ingénierée de ce type est Dreiklang [33], dérivée de la protéine fluorescente jaune EYFP (Figure 7C).

Chimiquement et spectroscopiquement, les formes allumées et éteintes correspondent respectivement à des chromophores anioniques et protonés. Structuralement, cette (dé)protonation est associée à une isomérisation du chromophore permettant au micro-environnement du groupement hydroxybenzylidène de plutôt stabiliser une forme chargée négativement ou une forme neutre.

Il convient de faire ici une remarque importante concernant la nomenclature chimique des isomères de chromophores des protéines fluorescentes. En effet, il est d'usage dans ce domaine de parler d'isomères *cis* et *trans* en fonction de l'orientation de la fonction phénol du chromophore, ce que nous avons-nous-mêmes beaucoup fait au cours des années passées. Cependant, cette dénomination est chimiquement incorrecte. Il convient formellement en effet de parler d'isomères *Z* et *E*, formalisme que nous allons utiliser ici. Pour en savoir plus sur ces différences de nomenclature, voir le chapitre "*Nomenclature des isomères de chromophores*" dans les annexes, p.132.

2. rsEGFP2 et rsFolder

2.1. Un nouveau type de RSFP

En 2011 et 2012, l'équipe de Stefan Jakobs du laboratoire de Stefan Hell au Max Planck Institute de Göttingen (Allemagne), a publié trois articles rapportant la création et la caractérisation des premières protéines réversiblement commutables issues d'un ancêtre hydrozoaire (méduse), respectivement appelées Dreiklang [33], rsEGFP [34] et rsEGFP2 [35]. J'ai rencontré Stefan Jakobs et Tim Grotjohann (qui passait alors sa thèse) lors du Single Molecule Localization Symposium (SMLMS) à Francfort en 2013 et leur ai proposé de travailler sur leur dernière protéine, rsEGFP2 pour tenter d'obtenir sa structure 3D. La protéine fluorescente réversiblement photocommutable rsEGFP2 est un dérivé de la GFP utilisable en microscopie de fluorescence à super-résolution RESOLFT (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) mais possède une vitesse de photocommutation trop rapide pour pouvoir être utilisée efficacement en PALM (pas assez de photons émis par des molécules uniques à chaque cycle pour une localisation suffisante). Toutes les RSFPs conçues jusqu'alors, telles que Dronpa, étaient d'une origine phylogénétique anthozoaire (coraux et anémones). Cela peut paraître anecdotique mais le fait que des RSFPs d'origine phylogénétique différente, malgré des environnements totalement différents du chromophore en termes d'acides aminés, présentent des phénomènes photophysiques identiques était une première. Etudier leur structure et comprendre leur mécanisme de phototransformation étaient donc essentiels dans l'apprentissage d'éléments clés devant permettre de concevoir de futurs marqueurs plus performants.

J’ai résolu les structures statiques de rsEGFP2 dans l’état fluorescent initial (“*on*”) et dans l’état non-fluorescent photocommuté (“*off*”) par cristallographie aux rayons X au synchrotron européen (ESRF, Grenoble) à 1.4 Å et 1.5 Å de résolution, respectivement. Les données [36] montrent sans ambiguïté et comme attendu que le chromophore s’isomérise entre les deux formes. Cela dit, l’environnement du chromophore étant différent entre rsEGFP2 et les autres RSFPs issus d’organismes anthozoaires, l’amplitude de l’isomérisation, les propriétés de charge et de polarité de l’environnement dans lequel la forme photocommutée du chromophore se trouve et les acides aminés avec lesquels le chromophore tisse des liens sont très différents et peuvent expliquer en grande partie les différences de cinétique observées entre ces types de protéines. Par ailleurs, la comparaison entre les structures de rsEGFP2 et de protéines comme IrisFP dans les mêmes formes permet de proposer des mutants à tester pour altérer de façon raisonnée la vitesse de photocommutation de la protéine afin d’adapter la protéine à des techniques différentes comme les microscopies RESOLFT qui a besoin de protéines à photocommutation rapide et le PALM qui nécessite des protéines à photocommutation plus lentes de manière à optimiser le nombre de photons collectés par cycle de commutation.

J’ai également collecté et traité 27 jeux de données avec des doses de rayons X croissantes absorbées par un cristal de rsEGFP2 afin de générer des dommages d’irradiation. Nous avons en effet démontré dans une précédente étude avec IrisFP [37] que les dommages radiatifs induits par les rayons X à 100 K générant surtout des électrons aqueux, leur réabsorption par le chromophore, imitait le processus qui avait lieu lors du photoblanchiment par la lumière visible. Les cartes de densité différence entre les 27 jeux de données montrent clairement que les dommages visibles apparaissent à des doses bien plus faibles chez IrisFP que chez rsEGFP2. Il s’agit d’une démonstration structurale de la forte photorésistance observée lors de l’utilisation de rsEGFP2.

2.2. Ingénierie de RSFPs améliorées pour sonder les compartiments cellulaires oxydants

La microscopie super-résolue permet de visualiser des détails intracellulaires à des échelles nanoscopiques grâce à l’utilisation de protéines fluorescentes phototransformables génétiquement fusionnées aux protéines d’intérêt. Toutefois, certains compartiments cellulaires (peroxysomes, espace intermembranaire mitochondrial, périplasme bactérien...) de par leur environnement particulièrement oxydant, sont très hostiles pour un grand nombre de protéines fluorescentes qui

sont incapables de s’y replier correctement, à l’exception notable de Superfolder-GFP [38] une protéine extrêmement résistante et se repliant remarquablement efficacement mais qui n’est pas phototransformable et donc pas adaptée à la super-résolution. Cette absence de marqueurs cellulaires adaptés rend donc impossible l’exploration de ces compartiments cellulaires par microscopies de super-résolution (PALM ou RESOLFT) alors même qu’un grand nombre de cibles potentielles s’y trouvent, comme des protéines membranaires, des cytochromes ou encore des enzymes oxydantes.

Lors de nos études sur la possibilité de fusionner une protéine fluorescente phototransformable, nous nous sommes rendu compte que toutes les protéines fluorescentes connues à ce jour, à l’exception notable de la Superfolder-GFP, étaient incapables de se replier dans le périplasma si elles y pénétraient dépliées par le système de sécrétion *Sec* [39, 40]. Ce fait, rapporté de nombreuses fois dans la littérature nous a fait nous intéresser aux propriétés de Superfolder-GFP, protéine réputée comme étant capable de se replier extrêmement rapidement et efficacement mais qui n’est pas photomodulable et donc n’est pas adaptée à la microscopie de super-résolution. Son utilisation ne nous permettrait donc pas de visualiser les porines de façon individuelle. Comme dit ci-avant, la protéine fluorescente rsEGFP [34] et son variant optimisé rsEGFP2 [35] ont été mis au point récemment et représentent les premières protéines dérivées directement de la GFP capables d’être utilisées en microscopie optique de super-résolution puisqu’elles sont photochromiques (i.e. peuvent être réversiblement photocommutées entre des états fluorescent et non fluorescent). Nous avons donc imaginé une protéine chimérique combinant à la fois l’architecture robuste de Superfolder-GFP et la photomodulabilité de rsEGFP2. Après optimisation partielle de codons pour l’expression à la fois dans les bactéries Gram(-) et dans les cellules mammifères, ajout de séquence de Kozak et optimisation des extrémités pour l’utilisation en tant que marqueur de fusion, nous avons obtenu le gène de notre nouvelle protéine: rsFolder.

Les tests biochimiques et photophysiques (Figure 8a,c) montrent que notre protéine rsFolder, de façon similaire à rsEGFP2 mais contrairement à Superfolder-GFP, ses parents, est capable de photocommutation réversible *in-vitro* et que de façon similaire à Superfolder-GFP mais contrairement à rsEGFP2, rsFolder se replie très efficacement après dénaturation. Nous avons obtenu les structures cristallographiques de rsEGFP2 et de rsFolder dans l’état fluorescent et

dans l'état non fluorescent après photocommutation des protéines à l'état cristallin. Les structures (Figure 8d,e) montrent une isomérisation *Z/E* du chromophore, associée dans rsFolder à la relocalisation d'une histidine importante dans la GFP.

Ces structures, au-delà de nous permettre de comprendre le mécanisme de photocommutation de rsFolder et de rsEGFP2, nous ont permis de créer un mutant de rsFolder : rsFolder2, qui se comporte de façon similaire à rsEGFP2, en particulier concernant le contraste on-off et conservant les propriétés de robustesse de l'architecture Superfolder-GFP.

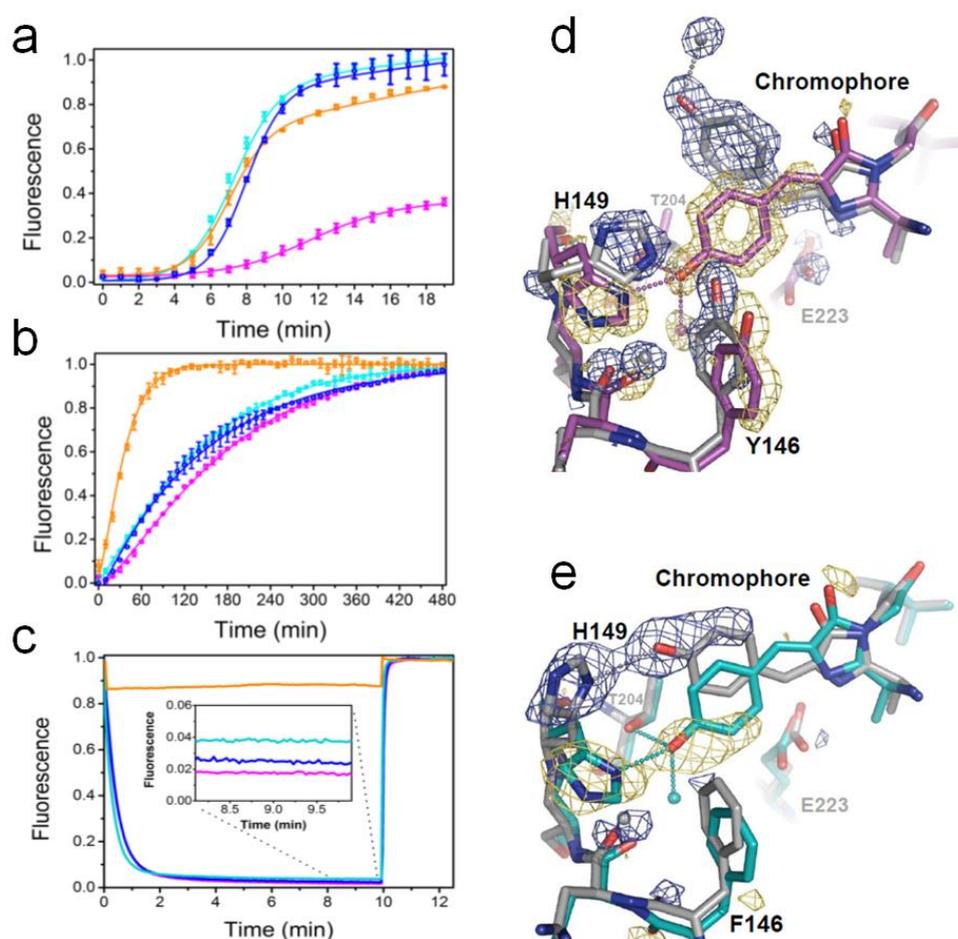


Figure 8 – Caractérisation photophysique, biochimique et structurale de rsEGFP2, rsFolder et rsFolder2. (a-c) Comparaison des caractéristiques spectroscopiques de Superfolder-GFP (orange), rsEGFP2 (magenta), rsFolder (cyan) et rsFolder2 (bleu). (a) La cinétique de retour de fluorescence après repliement de FPs suite à dénaturation chaotrope à la guanidine hydrochloride montre que les protéines basées sur structure de Superfolder se replient beaucoup plus vite que rsEGFP2. (b) La cinétique de maturation du chromophore montre que les chromophores de rsEGFP2, rsFolder et rsFolder2 (Ala-Tyr-Gly) mûrissent à la même vitesse alors que celui de Superfolder-GFP (Thr-Tyr-Gly) mûrit plus vite. (c) Un cycle on-off à basse intensité démontre que rsFolder s'éteint plus vite que rsEGFP2 mais atteint un contraste moins bon (inset). rsFolder2 se comporte de façon similaire à rsEGFP2 tant concernant la vitesse de switching que le contraste. (d-e) Les modèles affinés des chromophores et des acides aminés environnants sont montrés pour rsEGFP2 (d) et rsFolder (e). Les états "off" sont montrés en gris et les états "on" sont colorés. Les densités électroniques différences ($\pm 4.5 \sigma$) contourne les atomes montrant un déplacement important entre l'état initial fluorescent (*Z*) et l'état photocommuté (*E*).

Les résultats d'expression de rsFolder et rsFolder2 au périplasma sont très encourageants. Après fusion de la protéine fluorescente à une séquence signal d'adressage au périplasma d'*E. coli* nous sommes parvenus à obtenir des images de microscopie de fluorescence conventionnelle prouvant que si rsFolder et rsFolder2 se repliaient bien dans cet environnement oxydant, rsEGFP2 ne le pouvait pas (Figure 9a,b).

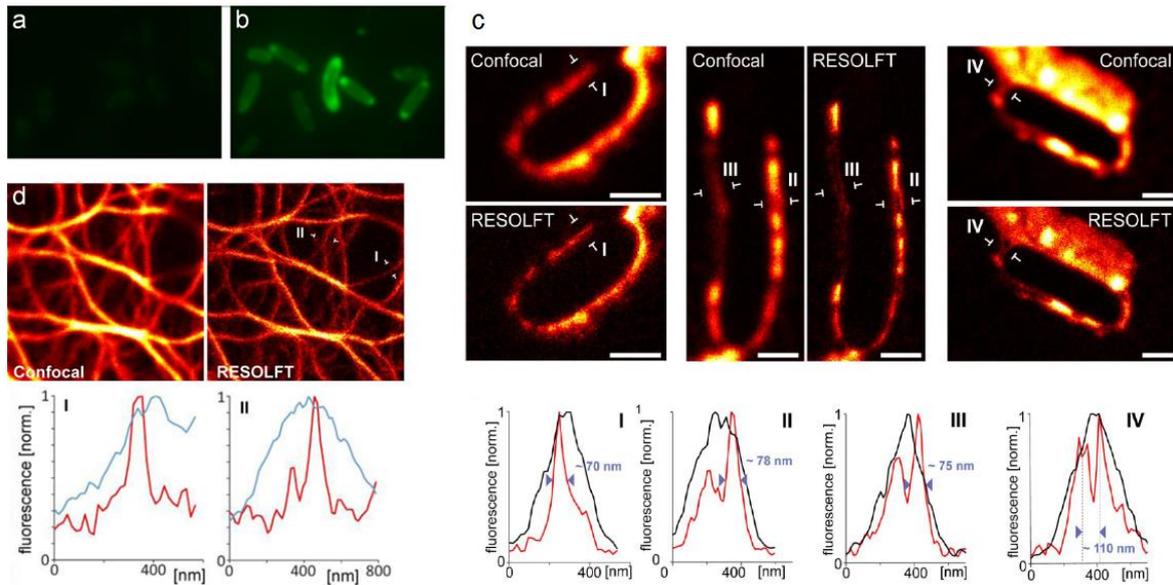


Figure 9 – Amélioration de résolution permise par rsFolder. (a,b) Images de bactéries *E. coli* fixées et exprimant rsEGFP2 (a) et rsFolder (b) dans leur périplasma en microscopie de fluorescence conventionnelle. (c) Figure représentant l'amélioration de résolution entre la microscopie confocale et la microscopie RESOLFT (droite) permise par rsFolder2 dans le périplasma de bactéries *E. coli* vivantes, permettant de distinguer deux périplasmes côte à côte et d'observer l'hétérogénéité du périplasma. (d) Images confocales et super-résolue RESOLFT de fibres de kératine marquées par rsFolder2. La résolution atteinte en RESOLFT par rsFolder2 tant en bactéries qu'en cellules humaines est ~ 75 nm comme en témoignent les profils d'intensité mesurés.

La nanoscopie RESOLFT fonctionne également sur bactéries vivantes, fournissant des images convaincantes (Figure 9c). Après isolement des fractions membranaires et cytoplasmiques de bactéries transformées soit par rsFolder seule soit par rsFolder en fusion avec le tag périplasmique, la mesure de fluorescence de ces fractions montre bien une répartition cytoplasmique/périplasmique en accord avec les images de microscopie et l'ensemble de nos résultats ont été publiés dans Scientific Reports [36]. De nombreuses améliorations sont toutefois à prévoir puisqu'une faible fraction de la protéine normalement exprimée dans le cytoplasme est mesurée dans le périplasma, suggérant soit un repliement modéré dans le périplasma, soit une construction non adaptée puisque notre séquence signal est basée sur la protéine PBP2, nativement exprimée en peu de copies dans la cellule.

Dans l’optique d’obtenir un meilleur variant de notre protéine rsFolder et en nous inspirant de rsEGFP2, nous avons obtenu un nouveau variant de rsFolder (rsFolder F145Y, appelé rsFolder2) pour sonder des compartiments cellulaires oxydants [36].

2.3. Jouer sur la vitesse de photocommutation

Nous avons ensuite entrepris de procéder à une mutagenèse saturée à la position du premier acide aminé du chromophore (A66) dans le but de faire varier sa vitesse de photocommutation. En effet, rsFolder2 est pour l’instant inutilisable en microscopie PALM car sa vitesse de commutation est trop élevée pour détecter suffisamment de photons par cycle. Afin de pouvoir adapter l’environnement du chromophore à de plus gros acides aminés, les positions 45 et éventuellement 221 ont été également mutées de leucine vers des alanines.

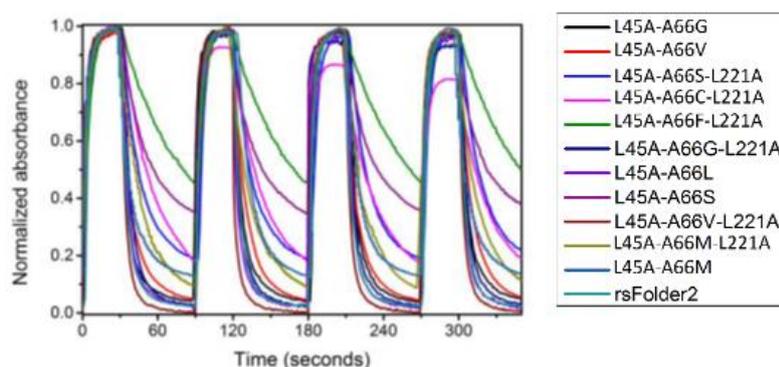


Figure 10 – (A) Photofatigue et vitesse de photocommutation sur plusieurs cycles de tous les mutants de rsFolder2, avec une excitation à 405 nm pour allumer toutes les protéines et une excitation à 488 nm pour les éteindre progressivement.

Nous avons obtenu 14 variants de rsFolder2 dont 11 se sont révélés fluorescents et ont été purifiés et analysés spectroscopiquement pour évaluer la vitesse de commutation, la résistance au photoblanchiment au cours des cycles (photofatigue) et le contraste de ces variants par rapport à rsFolder2 (Figure 10).

Ces analyses ont montré que deux variants étaient intéressants pour une caractérisation plus poussée car leur brillance, contraste et vitesse de photocommutation étaient extrêmes : rsFolder2-L45A-A66F-L221A et rsFolder2-L45A-A66V-L221A. Le premier est très brillant et le plus lent de nos variants mais son contraste est mauvais, c’est l’inverse pour le second mutant. En plus de la

mesure de ces paramètres, nous avons cristallisé et obtenu la structure « on » et « off » de ces deux variants (Figure 11).

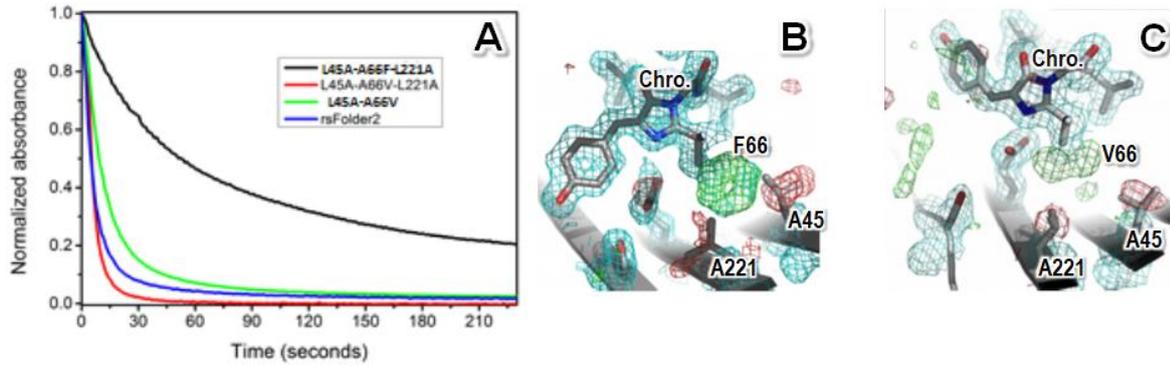


Figure 11 – (A) Vitesse de photocommutation pour rsFolder2-L45A-A66F-L221A (noir), compare à rsFolder2 et deux mutants rapides. (B) Modèle de rsFolder2 dans la carte de densité électronique de de rsFolder2-L45A-A66F-L221A “on” (B) et dans la carte de densité électronique de rsFolder2-L45A-A66V-L221A, montrant les mutations par densité différence négative (rouge) et positive (verte)

Les structures « on » et « off » des deux mutants (Figure 12A, B) montrent étonnamment peu de différences puisque l’amplitude du chromophore et l’accompagnement de ce mouvement par His149 sont semblables. Une différence est que la valine à la position 66 se déplace lors de l’isomérisation du chromophore et pousse le glutamate 223 hors de sa position initiale en interaction avec le chromophore (Figure 12B).

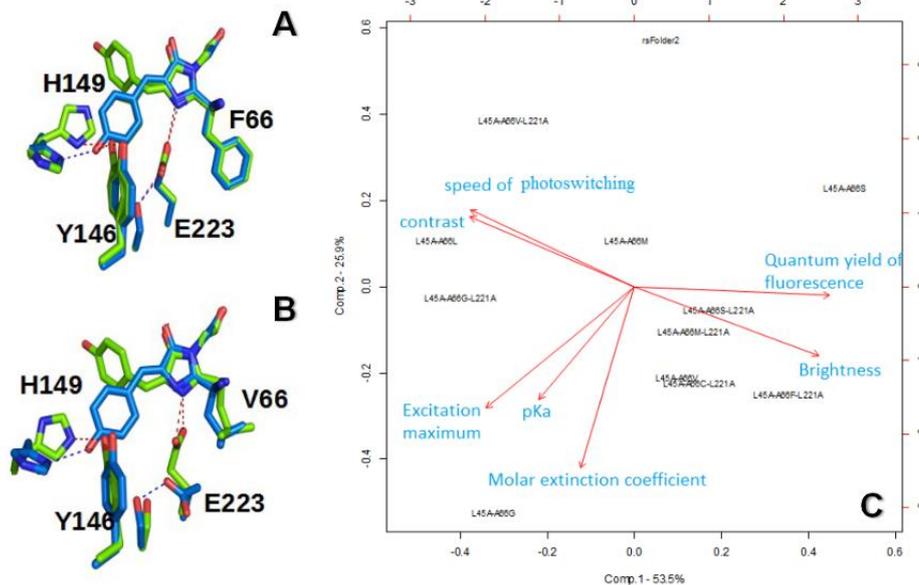


Figure 12 – (A) Structure de rsFolder2-L45A-A66F-L221A “on” (bleu) et “off” (vert), (B) Structure of rsFolder2-L45A-A66V-L221A “on” (bleu) et “off” (vert). Les liaisons hydrogène sont représentées par des tirets. (C) Principal Component Analysis (PCA) sur tous les paramètres des mutants de rsFolder2

Cette différence d'orientation pourrait présenter un nouvel angle d'attaque pour découpler l'augmentation du contraste des autres paramètres car pour l'instant, une analyse PCA (Principal Component Analysis) réalisée par Guillaume Tetraud, alors postdoc dans notre groupe, montre que la vitesse de photocommutation est d'autant plus lente que le contraste, la brillance et le rendement quantique de fluorescence augmentent (Figure 12C). Le but du PCA est de représenter graphiquement un ensemble d'informations contenu dans une table de données quantitatives. Toutes les corrélations sont faites dans une limite d'acceptation de 80% de variance.

2.4. Apports de la RMN à l'étude de la dynamique de rsFolder

Lors des applications pratiques des protéines fluorescentes phototransformables (PTFPs), les chercheurs rencontrent souvent des problèmes lors de l'utilisation de PTFPs dans un contexte cellulaire particulier parce que les conditions environnementales (pH, température, potentiel redox, niveau d'oxygène, viscosité, etc.) affectent leur luminosité, leur photostabilité et leur cinétique de phototransformation.

Afin de concevoir de nouveaux variants de PTFPs avec propriétés améliorées, l'ingénierie rationnelle des protéines fluorescentes exploite les informations mécanistiques disponibles à partir d'études structurales, principalement la cristallographie aux rayons X, mais beaucoup de ces mécanismes dépendent d'états de protonation qui doivent être supposés ou modélisés car les atomes d'hydrogène sont en général indétectables dans les structures 3D obtenues par rayons X. Les états de protonation peuvent en revanche être connus avec précision grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN). En collaboration avec notre équipe, Bernhard Brutscher du groupe RMN biomoléculaire de l'IBS et Nina Christou, alors doctorante entre nos deux groupes, ont utilisé la spectroscopie RMN en solution pour étudier les changements dans la dynamique conformationnelle de rsFolder induits par la lumière. Lors de ces expériences, la protéine en solution a été illuminée via une fibre insérée dans l'aimant RMN (Figure 13A) et a permis de suivre la cinétique de photocommutation en suivant l'apparition et la disparition de pics

spécifiques de certains acides aminés (Figure 13B). L'ensemble de ces acides aminés est regroupé sur une même région de la protéine (Figure 13C).

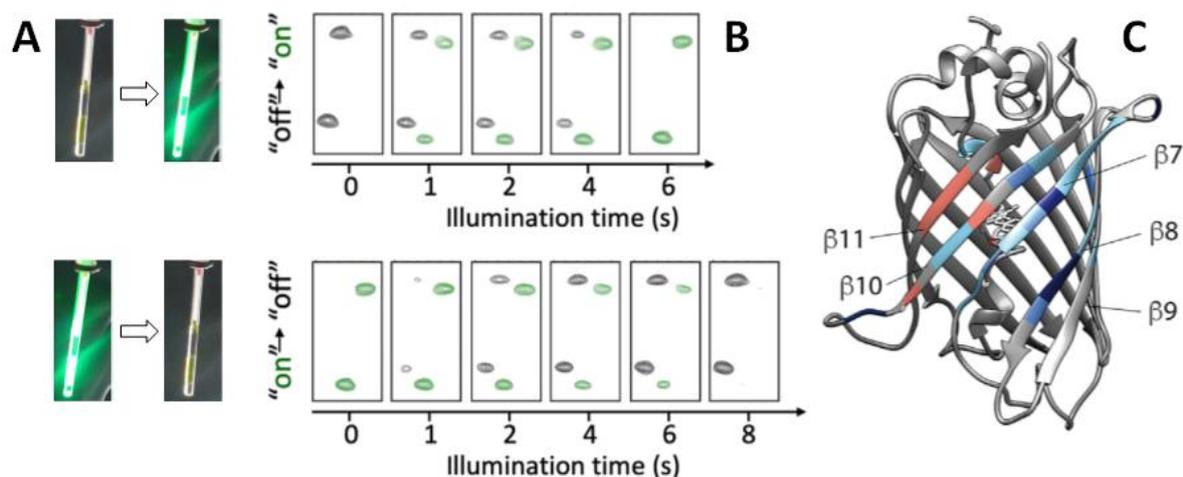


Figure 13 – (A) Tube Shigemi contenant une solution de rsFolder sous forme "on" et "off". (B) Les transitions de l'état "off" vers "on" (haut) ou "on" vers "off" (bas) sont visualisables par des disparitions et apparitions de pics spécifiques de la forme éteinte (noir) ou allumée (vert). (C) Les positions les plus dynamiques sont représentées sur la structure de rsFolder et sont les cibles de mutations à venir pour rendre la protéine plus ou moins dynamique.

La vue dynamique offerte par la RMN met en évidence dans ce travail, publié dans *Biophysical Journal* [41], les régions protéiques qui contiennent des points de mutation potentiellement intéressants pour des mutagénèses futures sur des RSFPs.

Forts de ces premiers résultats encourageants, nous avons poursuivi l'étude de rsFolder, en particulier concernant l'état de protonation du chromophore et de son micro-environnement en fonction de sa configuration *Z* ou *E*.

Il a été ainsi possible d'assigner un pic clair pour chacun des 4 états de la protéine (*Z*-anionique, *Z*-neutre, *E*-anionique, *E*-neutre) grâce au suivi de la liaison hydrogène de l'atome $C_{\beta 2}$ du chromophore à différents pH avec et sans illumination à 488 nm dans l'aimant (Figure 14A). De même, l'attribution des acides aminés T204 et H149 proches du groupement benzylidène du chromophore dans sa conformation *Z* a permis de mesurer la cinétique d'interconversion entre les formes neutres et anioniques en fonction du pH, la proportion de chacune des espèces et la stabilité du chromophore. Ainsi par exemple, à pH 6.2, l'échange est très en faveur de la forme anionique (85% de la population) où le chromophore est très stabilisé via trois liaisons hydrogènes alternatives avec une molécule d'eau, T204 et H149 comme attesté par une dynamique de rotation du cycle benzène bien plus réduite (Figure 14B).

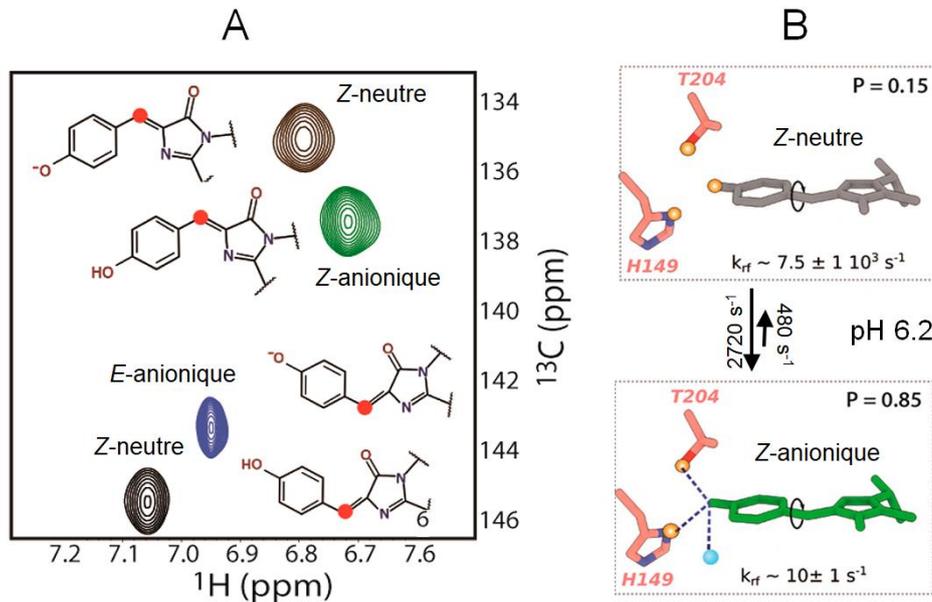


Figure 14 – (A) Signatures RMN bidimensionnelle ^1H - ^{13}C caractéristiques du site C_β du chromophore sous ses quatre configurations Z-neutre, Z-anionique, E-neutre et E-anionique et structures correspondantes. La position du carbone beta est indiquée par un point rouge. Les spectres ont été obtenus à pH 8 (Z-anionique), à pH 4.5 (Z-neutre), sous illumination 488 nm à pH 8 (E-neutre) et sous illumination à 488 nm à pH 11,5 (E-anionique). (B) Structures du chromophore de rsFolder, montrant la dynamique de rotation du cycle (k_{rf}) et de protonation/déprotonation ainsi que la stabilisation de la forme Z anionique (représentant 85% des espèces à pH 6.2) par des liaisons hydrogènes entre l'hydroxybenzyle et les hydrogènes de T204 et H149 et une molécule d'eau.

L'attribution de tous les acides aminés proches du chromophore permet un suivi des signaux RMN en fonction du pH de sorte qu'il est possible de mesurer le pKa du chromophore sous sa conformation Z. Ainsi, le suivi à différents pH des pics des carbones C_β du chromophore, C_γ de la Thr63, C_δ et C_ϵ de la Phe146 et C_γ de la Thr204 permettent de mesurer un pKa de 5.45, valeur très proche du pKa de 5.5 que nous avons mesuré précédemment par méthode biochimique [36] (Figure 15)

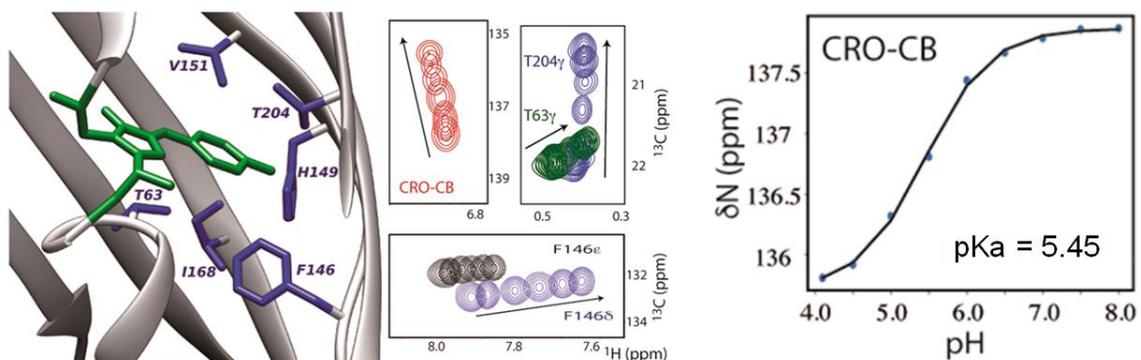


Figure 15 – Représentation structurale de la forme Z du chromophore de rsFolder et des acides aminés proches qui peuvent être titrés en suivant l'évolution de leur signal RMN en fonction du pH. L'ajustement de ces signaux par une fonction d'Henderson-Hasselbalch permet de mesurer une valeur de pKa de 5.45.

La même chose est possible pour le chromophore sous sa conformation *E*. Ainsi, le suivi des signaux de trois histidines montre des comportements très différents selon leur proximité au chromophore en fonction du pH (Figure 16A). En particulier, l'état de protonation de l'histidine 149 qui a régulièrement été pointée comme jouant un rôle crucial lors de l'isomérisation (voir chapitre suivant) a été clarifiée. Entre des pH 4.5 et 7.5, le chromophore *E* est constamment protoné mais la protonation de l'histidine 149 évolue. A pH acide (4.5), His149 est doublement protonée, empêchant toute liaison au chromophore, à pH 5.0 His149 n'est plus protonée sur son azote N_{ε2}, d'où une liaison possible avec le chromophore et l'azote N_{δ1} de His149, et à pH 7.5 c'est l'azote N_{δ1} qui est protoné, empêchant à nouveau une liaison avec le chromophore (Figure 16B).

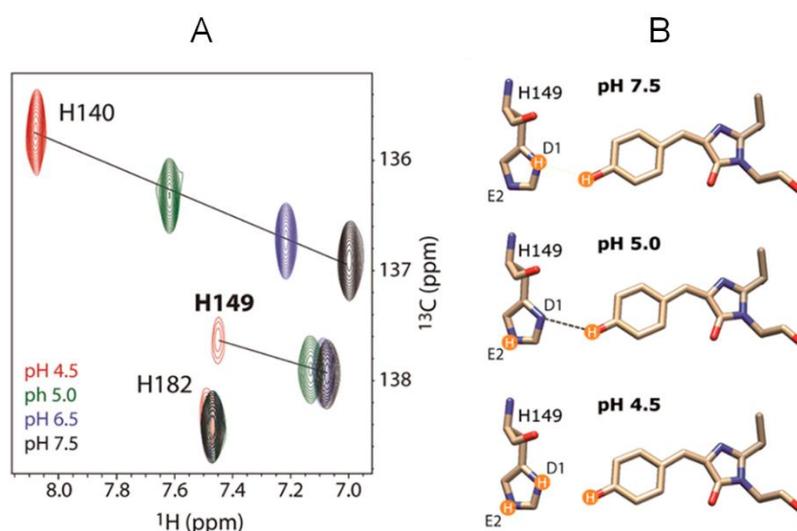


Figure 16 – (A) Superposition des signaux RMN de corrélation 1H-13C, pour trois histidines en fonction du pH. H182 reste neutre sur toute la gamme de pH mais H140 se comporte comme une histidine libre avec un pKa de ~6.5 et H149 commence à changer d'état de protonation seulement en dessous de pH 5. (B) Les trois types d'interactions entre le chromophore et l'histidine 149 selon la forme tautomérique de cette dernière, dépendant du pH.

Cette interaction renforcée à pH 5.0 entre le chromophore et l'histidine 149 explique pourquoi c'est aussi le pH où on trouve le plus de population de chromophore *E* lors de l'isomérisation (~30%). C'est également à ce pH que le retour thermique de la conformation *E* vers la conformation *Z* est la plus lente : 125 h à pH 5.0 contre 14h à pH 7.5 et 16 h à pH 4.2.

Ce travail, publié dans le Journal of the American Chemical Society [42] met en évidence le rôle crucial de l'histidine 149 sur l'isomérisation et la stabilisation du chromophore *E* de rsFolder ainsi que le rôle du microenvironnement du chromophore sur sa dynamique en fonction du pH. Il montre également l'apport complémentaire de la RMN aux études biochimiques et structurales par rayons X afin de sonder les dynamiques de protéines fluorescentes phototransformables lors de la conception de nouveaux variants.

3. Etudes des RSFPs par spectroscopie et cristallographie ultra-rapides

3.1. A la recherche d'états intermédiaires réactionnels photoinduits

Si j'ai résolu les structures statiques de protéines photochromiques comme IrisFP et rsEGFP2 par cristallographie aux rayons X, les potentiels états intermédiaires se formant le long de la réaction de photoisomérisation restaient hors de notre portée. De premiers résultats de spectroscopie en temps résolu sur IrisFP et de rsEGFP2 nous ont montré que des états intermédiaires se formaient rapidement sur des temps de vie s'échelonnant d'une centaine de femtosecondes à quelques picosecondes ainsi que des intermédiaires plus lents se formant à l'échelle de la microseconde. Les méthodes de cristallographie aux rayons X au synchrotron ne permettent pas de piéger ces états intermédiaires et seules les impulsions femtosecondes XFEL pourraient nous permettre de les capturer.

La cristallographie sérielle femtoseconde (Serial Femtosecond Crystallography, SFX) par laser rayons X à électrons libres (X-ray Free Electrons Laser, XFEL) peut être qualifiée de nanocristallographie femtoseconde puisqu'une impulsion de rayons X issue d'une installation XFEL dure moins de 50 fs et est ~ 100 fois plus intense que la dose de rayons X reçue par un cristal en 1 seconde d'irradiation sur les synchrotrons de 3^{ème} génération. Cela résulte en la vaporisation du microcristal touché par une telle impulsion (ionisation en plasma par explosion coulombienne) mais dans un temps suffisamment long (~ 500 femtosecondes) pour acquérir un cliché de diffraction avant la destruction du cristal [43-46].

En utilisant un grand nombre de petits cristaux qui seront injectés en flux laminaire via une solution portante ou via une matrice de graisse minérale, chaque cristal injecté possédant une orientation propre et ne donnant lieu qu'à un seul cliché de diffraction, au mieux, la très grande majorité des cristaux n'étant jamais touchée par les impulsions de rayons X. En cumulant assez de clichés (typiquement des centaines de milliers) nous pouvons donc espérer peupler suffisamment la sphère d'Ewald pour obtenir un jeu de données complet et donc une structure.

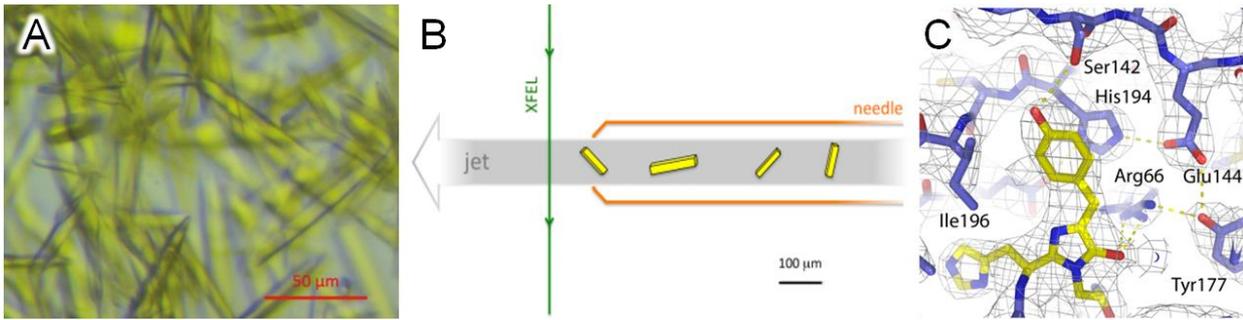


Figure 17 – IrisFP verte pour le XFEL. (A) Cristaux d'IrisFP utilisés pour les mesures SFX. (B) Schéma de la configuration expérimentale SFX. Les cristaux d'IrisFP (jaune) sont intégrés dans la matrice de graisse (gris) et amenés à la zone d'interaction du XFEL (vert) à travers l'aiguille (orange) d'une seringue Hamilton. (C) Le chromophore d'IrisFP dans la structure SFX est en conformation Z. Le modèle Z affiné présente l'Arg66 dans deux conformations alternatives. Les cartes de densité électronique $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contourées en gris à 1σ) et $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (contourées en rouge et vert à -3σ et $+3\sigma$, respectivement) obtenues à partir des données SFX après remplacement moléculaire par le modèle Z d'IrisFP.

Nous avons ainsi utilisé de microcristaux ($10 \times 10 \times 50 \mu\text{m}^3$) d'IrisFP (Figure 17A) mélangés à de la graisse minérale¹ et injectés sur la ligne de lumière BL3 du XFEL SACLA (Japon). Lors de cette expérience, 500 μg de cristaux ont été injectés et illuminés par des pulses de rayons X (< 10 fs, 7 keV, fréquence de 30 Hz, Figure 17B). 10 899 clichés ont pu être indexés sur les 66 300 collectés, permettant l'obtention d'une structure (2.75 Å de résolution) quasi identique à celle d'IrisFP obtenue par cryo-cristallographie conventionnelle et en particulier un chromophore en conformation Z, sans signes visibles de dommages radiatifs induits par les rayons X (Figure 17C).

Nos résultats [47] représentent une preuve de principe de l'utilisation du XFEL pour étudier les modifications structurales des RSFPs. Cette stratégie, bien que très complexe, coûteuse et exigeante en matériel biologique présente deux avantages majeurs pour les protéines fluorescentes:

- Elle permet l'utilisation de cristaux de petite taille, permettant une pénétration homogène des lasers visibles utilisés pour phototransformer les protéines fluorescentes
- Elle fonctionne à température ambiante et permet donc les modifications structurales normalement figées à basses températures et potentiellement plus représentatives de la réalité physiologique

Les impulsions ultra-courtes utilisées permettent d'intercaler des impulsions lasers ultra-courts, permettant d'induire des phototransformations et de sonder les éventuelles modifications structurales en découlant à des échelles de temps femtoseconde/picoseconde/nanoseconde. Il en résulte que l'utilisation de cette technique peut nous permettre de reconstituer un "film" des

¹ Super Lube® (#21030, Synco Chemical Co., New York, USA)

structures de nos protéines fluorescentes à l'état excité par la lumière et de potentiellement piéger des états intermédiaires réactionnels ultrarapides.

De tels états ont déjà été détectés par spectroscopie ultra-rapide chez plusieurs protéines telles que les protéines fluorescentes photoconvertibles du vert au rouge Dendra2 et Kaede que j'ai étudié par spectroscopie ultrarapide pendant mon postdoctorat [48, 49] ; voir "*Dynamique à l'état excité des PCFPs*", pp.44 et suivantes. Une étude sur la protéine réversiblement photocommutable Dronpa a permis la détection d'états intermédiaires lors de l'isomérisation E/Z du chromophore permettant le retour de la protéine de sa forme photocommutée "off" non-fluorescente vers sa forme "on" fluorescente [50]. Nous avons détecté de tels signaux transitoires par spectroscopie ultrarapide dans nos protéines réversiblement commutables IrisFP [47] et rsEGFP2, laissant l'espoir de pouvoir piéger les états structuraux correspondants lors d'expériences SFX, en particulier pour rsEGFP2 sur laquelle nous nous sommes concentrés.

3.2. Etudes par cristallographie femtoseconde et spectroscopie résolue en temps de rsEGFP2

Nous souhaitons dès lors tenter d'élucider les structures des états intermédiaires détectés par spectroscopie ultrarapide grâce au fait d'intercaler les impulsions d'un laser femtoseconde aux impulsions XFEL, le but étant, grâce à un laser nanoseconde, de former et piéger les états structuraux intermédiaires lents se formant à l'échelle microseconde. Contrairement à l'expérience visant à capturer les états intermédiaires rapides (fs-ns), les états intermédiaires lents peuvent, en principe, être obtenus par cristallographie synchrotron résolue en temps (la cristallographie Laue est limitée à >100 ps). Cela dit, deux problèmes cruciaux nous en empêchent : la taille des cristaux qui limite fortement la pénétration de la lumière, empêchant une phototransformation rapide et homogène et les dommages d'irradiation provoqués par les rayons X et les lasers alors que le XFEL devrait nous assurer une structure sans dégâts d'irradiation (puisque ces dommages se produisent à des échelles plus lentes que l'acquisition d'une image issue d'un cristal unique).

Nous sommes parvenus à obtenir un protocole nous permettant de produire plusieurs grammes de protéine pure (Figure 18A) et de cristallisation très efficace et reproductible menant à la formation de cristaux de tailles compatible avec les injecteurs XFEL de cristaux (~ 5 μm , Figure 18A). Ces cristaux sont injectés dans la chambre d'injection où ils rencontrent des pulses de rayons X auxquels il est possible d'intercaler des pulses lasers permettant d'initier les

photoréactions dans les cristaux (Figure 18C). Cela nous a permis d'obtenir la structure statique de rsEGFP2 au XFEL du LCLS à Stanford (Figure 18D) qui est identique à la structure que j'ai résolue à l'ESRF ainsi que des structures d'états intermédiaires correspondants aux temps sondés par les délais autorisés entre pulses lasers et pulses de rayons X.

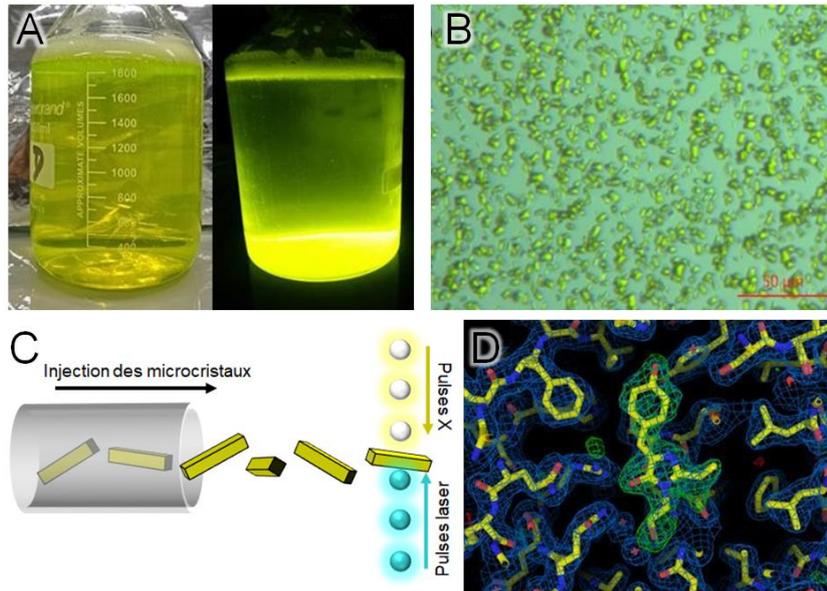


Figure 18 – rsEGFP2 pour le XFEL – (A) Bouteille de 2L de protéine pure, sous lumière visible et sous excitation de fluorescence, produite dans le but de fabriquer une grande masse de microcristaux. (B) Microcristaux de rsEGFP2 (5×5×10 µm), (C) Schéma d'injection des cristaux et de l'irradiation par pulses de rayons X auxquels il est possible d'intercaler des pulses laser, (D) Structure statique de rsEGFP2 obtenue à 2.0 Å de résolution sur l'installation XFEL du LCLS à partir de 28 320 cristaux et montrant la conformation correcte du chromophore et de son environnement.

Malgré une solidité de la protéine typique de l'architecture des protéines de la famille des GFP et une excellente résistance au photoblanchiment, le contrôle de la vitesse de l'isomérisation et du contraste entre les formes allumée et éteinte, est encore mal maîtrisé et nécessite l'étude détaillée du phénomène d'isomérisation et en particulier des éventuels intermédiaires formés le long de cette isomérisation. Si de tels intermédiaires existent, ils sont inconnus et la récente méthode de cristallographie sérielle femtoseconde permise par les installations XFEL est la méthode de choix pour tenter de capturer ces intermédiaires. En effet, de récents résultats en spectroscopie ultrarapide nous ont indiqué que des intermédiaires semblaient se former à l'échelle de la picoseconde et la résolution temporelle de l'ordre de quelques centaines de femtosecondes [51, 52] des XFEL permettrait donc d'obtenir leurs structures. Les installations synchrotron à l'inverse ne permettent pas l'étude d'états de très courte durée de vie. Dans le cadre de ces études, j'ai pu participer au consortium franco-allemand ayant mené des études sur rsEGFP2 aux deux

sources XFEL américaine (Figure 19A) et japonaise (Figure 19B) pour tenter de capturer ces états intermédiaires.

Révéler de tels détails structuraux devait permettre d'élucider la photochimie intime des protéines fluorescentes et de concevoir le design rationnel de protéines optimisées pour la microscopie de super-résolution. En utilisant des pulses ultra courts et ultra brillants de rayons X sur des cristaux injectés dans un flux liquide (Figure 19C), nous avons collecté des centaines de milliers de clichés de diffraction nous ayant permis de reconstruire la structure tridimensionnelle de rsEGFP2 dans différentes conditions : sans illumination ou juste après illumination par un pulse laser. Le délai entre le pulse laser visible et le pulse laser X constituait le temps de relaxation typique que nous voulons observer (picoseconde à microseconde).

Nos acquisitions ont permis de détecter plusieurs état intermédiaires de la réaction d'isomérisation, en particulier un hétérogénéité de la forme « *off* » constituée d'une superposition de deux états où le chromophore adopte des conformations *E* différentes, appelées *E1* et *E2* (ou *trans 1* et *trans 2*) (Figure 19D).

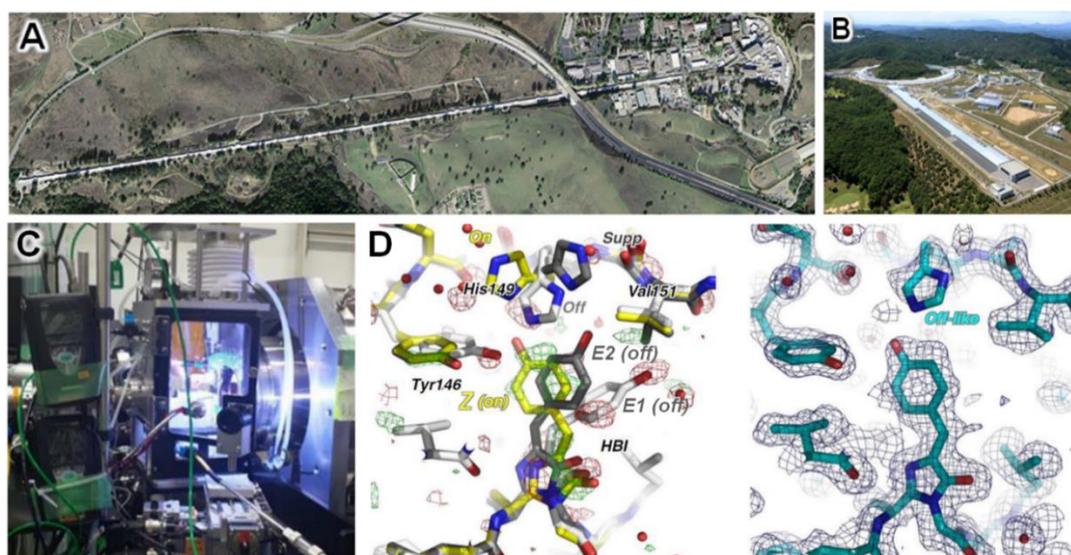


Figure 19 – (A) Installation Linear Coherent Light Source (LCLS) du Stanford Linear Accelerator Center (SLAC) aux Etats-Unis. (B) Installation SACLA (Spring-8 Angstrom Compact free electron LAser) au Japon. (C) Chambre d'injection des cristaux au XFEL SACLA. (D) : Gauche : Densités électroniques différences obtenues par cristallographie sérielle et contourées à $+3\sigma$ (vert) et -3σ (rouge). Les modèles de la conformation *Z* et des deux conformations *E* sont présentés. Droite : Modèle de la structure intermédiaire 10 ns présentant un chromophore *Z* et l'histidine 149 en conformation similaire à l'état *off*, protonée. La carte de densité électronique extrapolée est présentée, contourée à 1σ .

Les résultats obtenus par nos expériences XFEL aux Etats-Unis et au Japon, complétés par nos expériences au synchrotron et par spectroscopie ultrarapide sont résumés sous forme d'un photocycle (Figure 20). Ce photocycle nous révèle qu'après isomérisation $Z \rightarrow E$ du chromophore

de rsEGFP2 sous illumination à 488 nm (Figure 20D→A), l'état *E* protoné (observable au XFEL comme au synchrotron) est formé, accompagné par la formation d'une liaison entre Tyr146 et His149 et le retrait de Val151 (Figure 20A). Lors de l'illumination par un pulse de 405 nm, un état intermédiaire excité du chromophore distordu observable au LCLS est formé en moins de 1 ps (Figure 20B) associé à une réorganisation de la matrice protéique environnante, en particulier du déplacement de Tyr146 et de His149 qui perdent leur interaction. Nous pouvons alors observer une superposition de deux états *off* du chromophore (non représentés ici), l'un correspondant à l'état *E* représenté en Figure 20A et un distordu représenté en Figure 20B). Cet état instable se dépeuple en moins de 3 ps et évolue vers un autre état intermédiaire proche de la conformation *Z* initiale (Figure 20C).

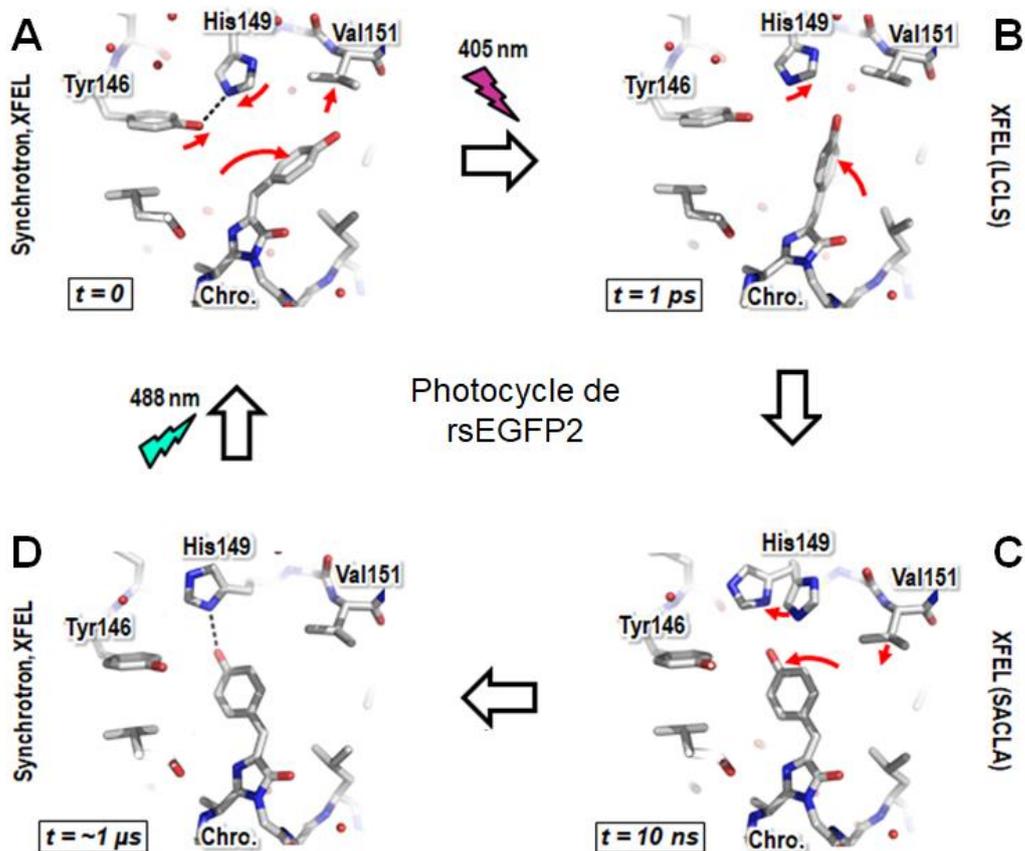


Figure 20 – Photocycle de rsEGFP2 obtenu à partir des expériences XFEL, synchrotron et de spectroscopie ultrarapide

Dans cet état formé en moins de 10 ns et observé à SACLA, le chromophore revient en conformation *Z* mais est toujours protoné, rendant impossible sa liaison avec His149 dont la double conformation indique un retour progressif vers la conformation initiale pour des raisons stériques. De la même façon, le portillon que représente Val151 se referme derrière le chromophore. Au final, le chromophore se déprotonne à l'échelle de la microseconde comme attesté par

spectroscopie ultrarapide, permettant la formation du conformère stable *Z* déprotoné dont le chromophore établit une liaison avec His149 (Figure 20D). Cet état fluorescent est observable au XFEL comme au synchrotron.

En combinant cristallographie sérielle femtoseconde et spectroscopie d'absorption UV-visible pompe-sonde résolue en temps (en collaboration avec le Dr. Michel Sliwa à Lille), nous avons déterminé plus précisément les constantes de temps des différents états intermédiaires sondés par les délais ci-dessus (Figure 21).

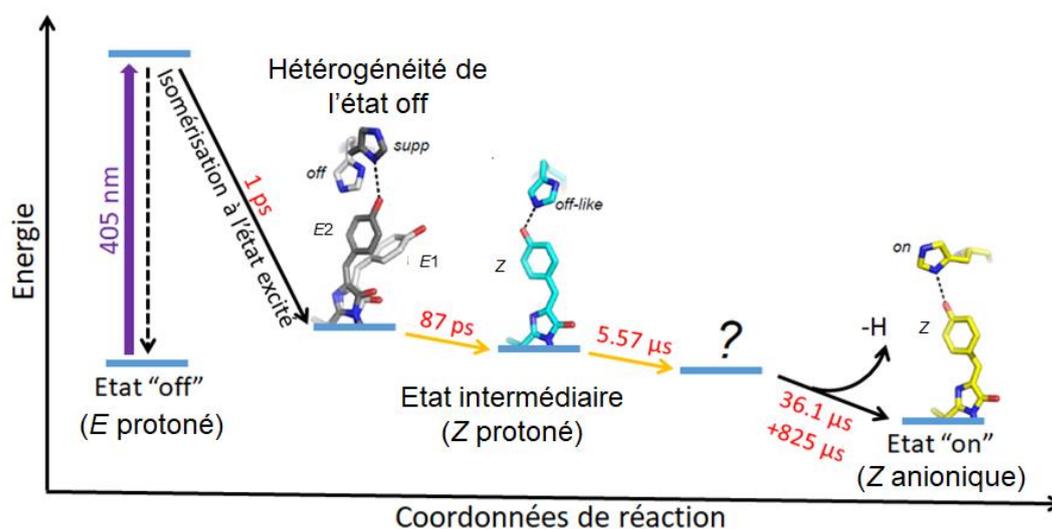


Figure 21 – Modèle du processus de commutation de "off" vers "on" pour rsEGFP2. Les constantes de temps ont été déterminées par spectroscopie d'absorption UV-visible pompe-sonde résolue à la femtoseconde (87 ps) et résolue à la nanoseconde (5.57, 36.1 et 825 μs) en solution aqueuse. Le détail des chromophores issus des structures cristallographiques correspondantes (résolues aux XFEL américain et japonais) est représenté. Les réarrangements de la matrice protéique (flèches oranges) se font entre les conformations *Z* à l'état fondamental. L'état intermédiaire formé après 5.57 μs reste à déterminer.

Ces travaux permettent de clarifier le mécanisme photoréactionnel dans les RSFPs, apportant pour la première fois une vision structurale d'états intermédiaires clés. Ils tranchent un débat long de 10 ans sur l'ordre des événements réactionnels lors de la photocommutation de l'état "off" vers l'état "on" au sein des RSFPs. Ces résultats ont été publiés dans *Nature Chemistry* pour la forme « 1 ps » [53] et dans *Nature Communications* pour la forme « 10 ns » [54].

Ayant mis en évidence l'importance de certains acides aminés, et en particulier le rôle de portillon de la Valine 151, nous avons entrepris la conception de mutants à cette position, soit pour ouvrir le portillon (Val151Ala), soit pour le fermer (Val151L).

4. Mutants Val151Ala et Val151Leu de rsEGFP2

Suite à nos études XFEL, j'ai réalisé la mutation de la valine 151 de rsEGFP2, soit vers une alanine, soit une leucine, avec l'idée d'autoriser une amplitude maximale et une amplitude minimale lors de l'isomérisation du chromophore.

Les deux mutations ont mené à des protéines fonctionnelles mais avec des propriétés photophysiques assez différentes de leur parent puisque la brillance du mutant V151L est fortement augmentée par rapport à celle du variant V151A qui est diminuée. A l'inverse le contraste (ratio entre l'intensité maximale et minimale de fluorescence) entre les formes allumée et éteinte de la protéine est très nettement en faveur du variant V151A alors que le contraste du variant V151L est devenu extrêmement faible (Figure 22).

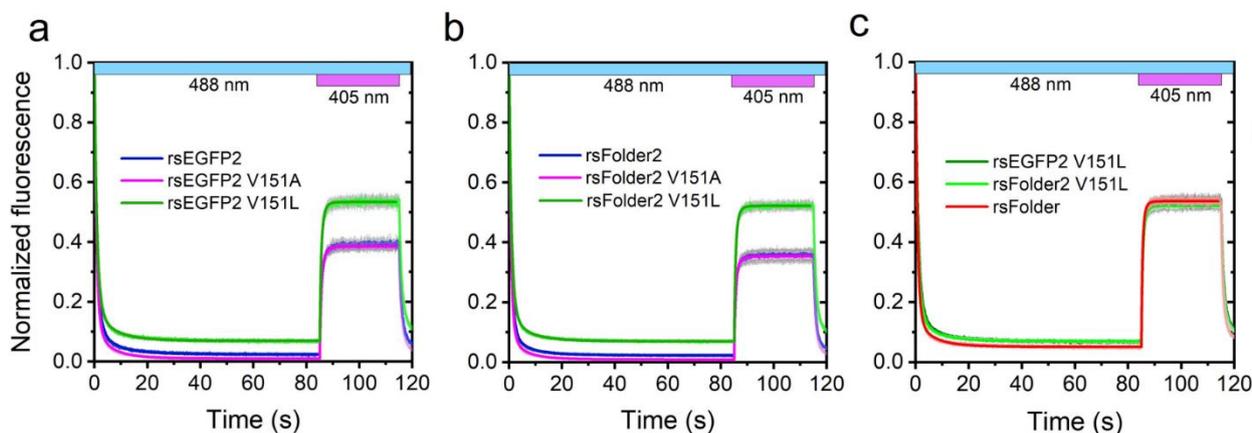


Figure 22 – Courbes de photocommutation de fluorescence. (a, b) protéines rsEGFP2 et rsFolder2 et leurs variants V151A et V151L. (c) rsFolder par rapport aux variants V151L de rsEGFP2 et rsFolder2. Données obtenues à partir de mesures in-vitro de protéines purifiées incorporées dans un gel de polyacrylamide (pH 8.0), sur un microscope à épifluorescence utilisant un éclairage constant à 488 nm (0.27 W/cm^2), et 405 nm supplémentaire (0.03 W/cm^2) lors de la commutation on-off. Les couleurs pâles représentent les valeurs moyennes calculées à partir de six mesures avec des écarts types montrés en gris, tandis que les lignes pleines sombres représentent les ajustements du modèle cinétique utilisé.

Afin d'étudier les raisons des fortes différences de contraste observées entre les variants V151A et V151L, nous avons acquis les spectres et résolu les structures des deux variants (Figure 23) sous leur forme *on* et *off* et comparé ces résultats avec ceux déjà acquis sur le parent rsEGFP2 [36]. L'analyse de nos résultats nous montre que la raison du mauvais contraste de rsEGFP2-V151L est une amplitude très limitée du chromophore qui reste bloqué par la leucine 151, à l'inverse de rsEGFP2-V151A où l'amplitude du chromophore est très large. Cette amplitude faible semble donner lieu à une absorption de la forme *off* très décalée vers le rouge pour ce mutant. Ce décalage provoque une compétition entre l'absorption de la forme anionique (fluorescente) et celle

de la forme neutre (non fluorescente) menant à la formation d'un état d'équilibre entre ces deux formes, ce qui limite l'extinction de fluorescence.

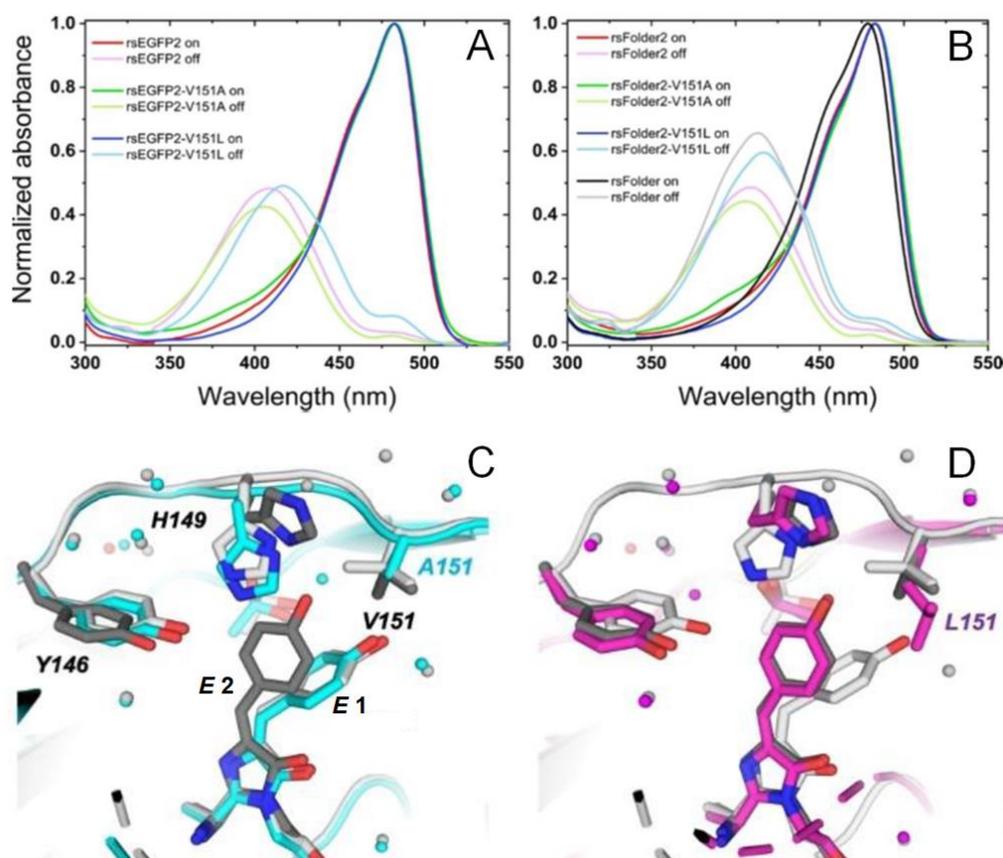


Figure 23 – Structure de l'état éteint (off) de rsEGFP2 obtenue par cristallographie sérielle et montrant les deux conformations *E* du chromophore : *E1* en blanc et *E2* en gris (PDB : 7O7U). Sur ces structures sont superposés les modèles *off* (C) de rsEGFP2-V151A en cyan, PDB : 7O7X et (D) de rsEGFP2-V151L en magenta, PDB : 7O7W. Les conformations *Z* ont été effacées pour plus de clarté.

Nous supposons que le rôle de portillon observé en XFEL pour l'acide aminé V151 chez rsEGFP2 participe au blocage d'une petite fraction de chromophores lors de l'isomérisation *Z* vers *E*. Ce blocage résulte en la superposition du conformère *E* du chromophore également observé dans la structure de rsEGFP2-V151A (fort contraste) et d'une forme minoritaire du chromophore similaire au conformère *E* observé dans la structure de rsEGFP2-V151L (faible contraste); cette superposition d'états mène au contraste imparfait de cette protéine. Une autre conclusion importante de nos résultats est que chacun de nos mutants V151A et V151L semble supprimer l'hétérogénéité des états *off* puisqu'un seul état est visible dans chacune des structures.

Le contraste étant un paramètre crucial en microscopie de fluorescence puisqu'il constitue l'élément clé d'un bon signal sur bruit permettant de détecter des signaux faibles comme des molécules individuelles, apprendre à le maîtriser constituerait une étape majeure dans la

compréhension des mécanismes photophysiques des RSFPs et la conception de protéines améliorées.

L'apport de la cristallographie ultra-rapide permise par les sources XFEL a été déterminant dans ce travail, publié dans ChemPhysChem [55], afin de nous permettre d'identifier au cours du photocycle de la protéine, une position clef permettant d'homogénéiser les formes éteintes vers une seule conformation et d'améliorer le contraste de nos protéines.

Parmi toutes nos constructions, la plus prometteuse s'est avérée être rsFolder2-V151A puisqu'elle présente le meilleur contraste entre les formes allumée et éteinte. Nous l'avons donc utilisé dans une construction avec la kératine humaine afin de marquer les fibres dans une cellule HeLa et réaliser une image super-résolution RESOLFT. Le résultat permet sans aucun doute d'améliorer fortement la résolution de l'image (Figure 24). Il reste cependant des améliorations à réaliser puisque si le contraste est amélioré dans les variant V151A, c'est au détriment de la résistance à la photofatigue (séries de cycles *on-off* utilisées en RESOLFT) qui est grandement appauvrie.

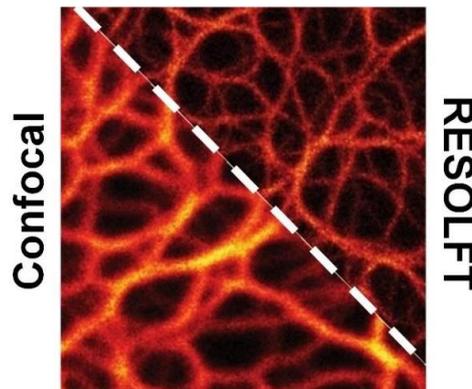
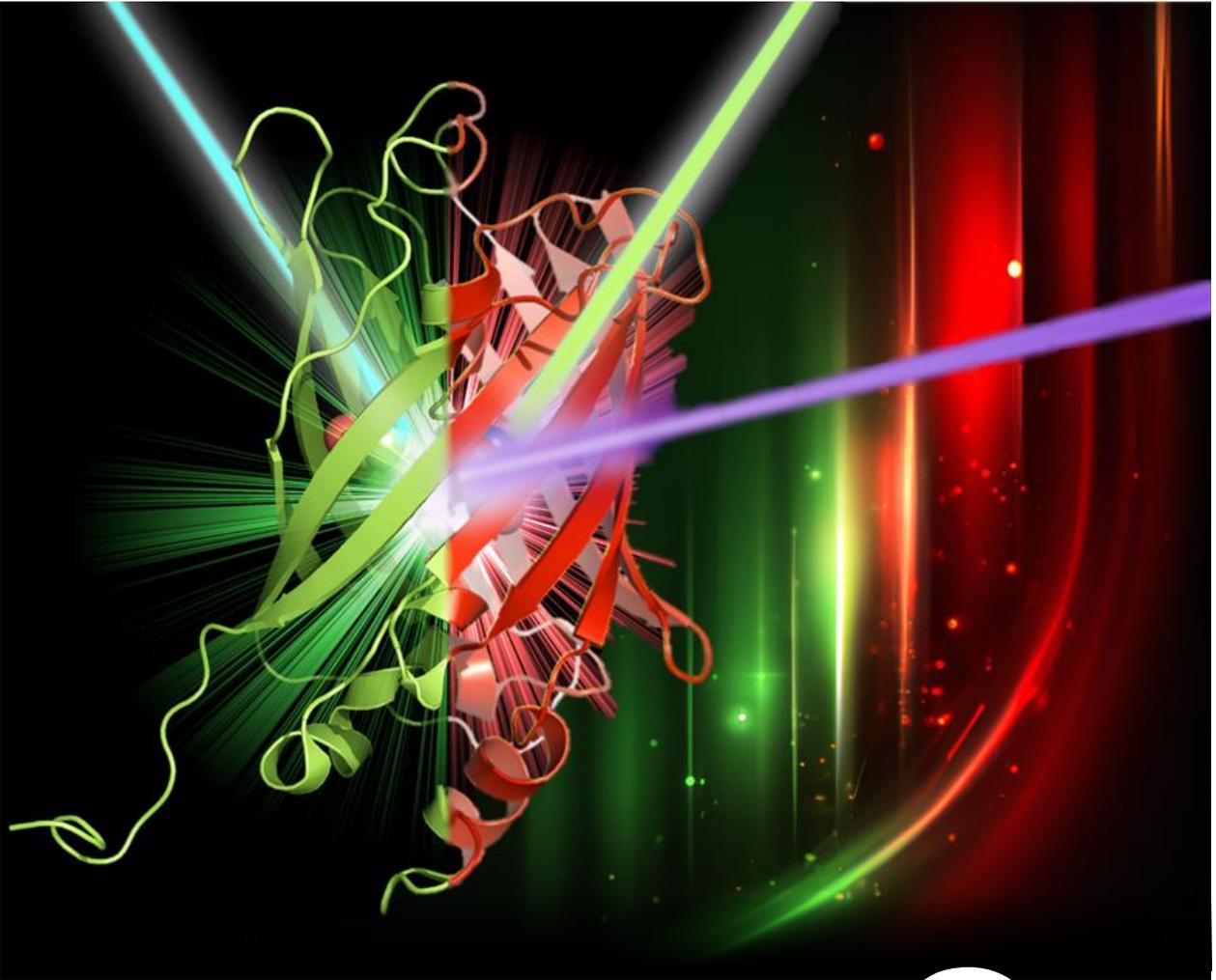


Figure 24 – Comparaison des images de microscopie confocale et de super résolution RESOLFT d'une cellule HeLa exprimant des fibres de kératine marquées par rsFolder2-V151A.



3

Photoconversion

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. J. Wiedenmann, S. Gayda, **V. Adam**, F. Oswald, K. Nienhaus, D. Bourgeois & G.U. Nienhaus* , “*From EosFP to mIrisFP: structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family*”, Journal of Biophotonics (2011) **4**(6): 377-390
02. **V. Adam***, B. Moeyaert, C.C. David, H. Mizuno, M. Lelimousin, P. Dedecker, R. Ando, A. Miyawaki, J. Michiels, Y. Engelborghs & J. Hofkens, “*Rational design of photoconvertible and bi-photochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications*” Chemistry & Biology (2011) **18**(10): 1241-1251
03. Roy, M.J. Field*, **V. Adam** & D. Bourgeois
“*The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein*”
Journal of the American Chemical Society (2011) **133**(46): 18586-18589
04. E. Fron, M. Van der Auweraer, B. Moeyaert, J. Michiels, H. Mizuno, J. Hofkens & **V. Adam***
“*Revealing the excited state dynamics in the fluorescent protein Dendra2*”
Journal of Physical Chemistry B (2013) **117**(8): 2300-2313
05. E. Fron, M. Sliwa, **V. Adam**, J. Michiels, S. Rocha, P. Dedecker, J.Hofkens & H. Mizuno*
“*Excited state dynamics of photoconvertible fluorescent protein Kaede revealed by ultrafast spectroscopy*”, Photochemical & Photobiological Sciences (2014) **13**(6): 867-874

Illustration de chapitre : photoconversion du vert (excitable par un laser cyan) au rouge (excitable par un laser vert) d'une PCFP sous illumination actinique par un laser violet.

1. Comment les protéines fluorescentes changent-elles de couleur ?

Certaines protéines fluorescentes phototransformables (PTFPs) possèdent la capacité d'être photoconvertibles irréversiblement d'une forme fluorescente initiale (généralement verte) vers une forme fluorescente d'une autre couleur (généralement rouge). Dans ce type de PTFPs, dites protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs), la présence d'une histidine dans la triade d'acides aminés constituant le chromophore est constante et le clivage photoinduit d'une liaison peptidique liant le chromophore au reste de la protéine permet d'inclure le cycle imidazole de cette histidine dans le système conjugué du chromophore, avec pour conséquence de déplacer la fluorescence vers le rouge.

Si la formation d'une double liaison permettant l'extension du système conjugué π du chromophore et donc la formation d'une nouvelle espèce chimique de chromophore (rouge) via une β -élimination fait consensus, les détails du mécanisme réactionnel et l'ordre des événements de clivage peptidique et de déprotonation durant la photoconversion est un sujet controversé depuis le début des années 2000 où les premières PCFPs ont été découvertes [56-61].

Durant la décennie suivante, trois modèles hypothétiques principaux ont été proposés :

- un modèle, proposé par le groupe d'Atsushi Miyawaki, suivant une élimination monomoléculaire (cinétique d'ordre 1, E1) en deux étapes avec le clivage peptidique précédant la déprotonation [58]. L'étape d'initiation de la réaction se ferait par transfert de proton à l'état excité (Excited State Proton Transfer, ESPT) depuis le groupe hydroxybenzylidène (Figure 25A)
- un modèle variante du précédent, également proposé par le groupe d'Atsushi Miyawaki, suivant une élimination d'ordre 1 inversée (E1cb) où la déprotonation précède le clivage peptidique [57] (Figure 25B)
- un modèle, proposé par le groupe de Rebekka Wachter, suivant une élimination bimoléculaire (cinétique d'ordre 2, E2) en une seule étape où la déprotonation et le clivage sont coordonnés [62, 63] (Figure 25C). Des modèles alternatifs E2 (avec ESPT et d'autres accepteurs de protons) sont également proposés par le groupe de Gerd Ulrich Nienhaus [60], et par nous-mêmes [64].

Ces différents modèles sont basés sur les structures cristallographiques des PCFPs EosFP, Kaede ou KikGR ainsi que sur des simulations. Tous considèrent l’histidine 62 du chromophore comme acide aminé essentiel et passant par une étape où son cycle imidazole est cationique (groupement imidazolium), ainsi que le glutamate 212 strictement conservé et sans lequel la photoconversion est abolie.

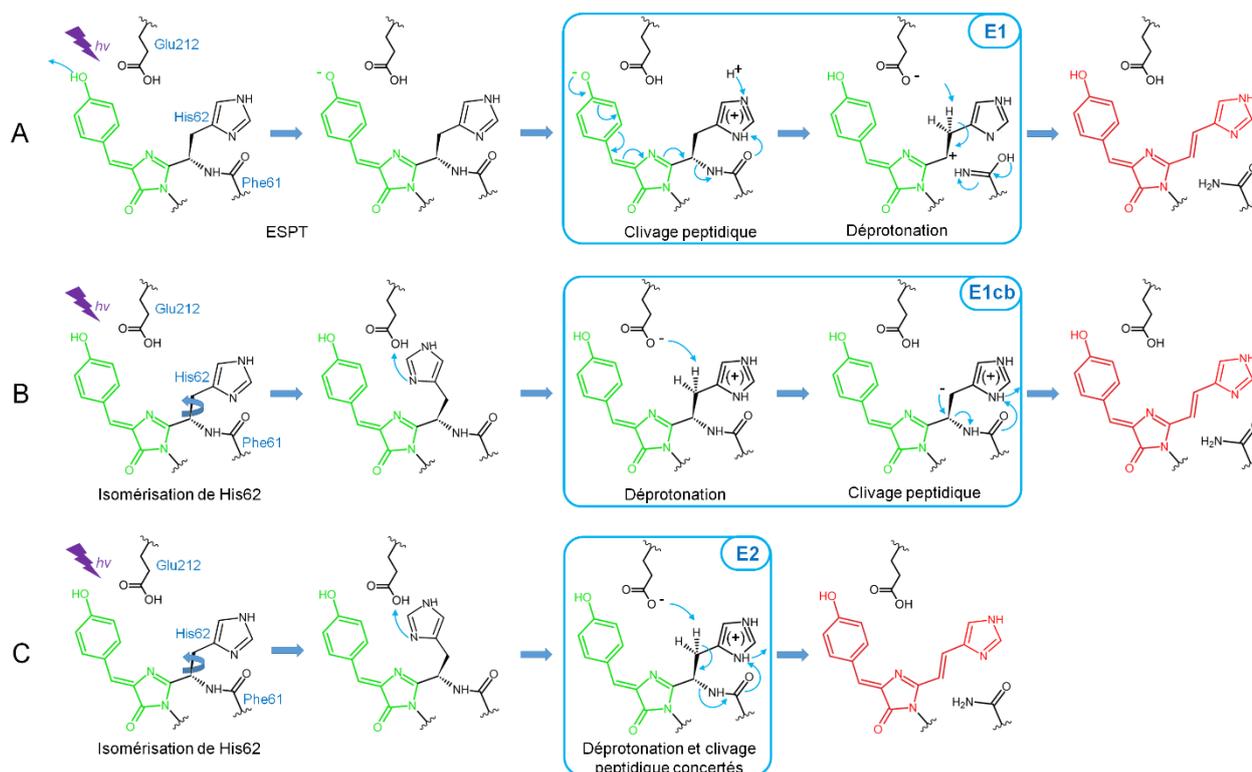


Figure 25 – Trois scénarios simplifiés de β -élimination proposés pour expliquer le mécanisme de photoconversion vert-rouge des PCFPs suite à une excitation lumineuse violette. (A) Hypothèse d’élimination d’ordre 1 où le clivage peptidique précède la déprotonation et où la réaction est initiée par un ESPT, (B) hypothèse d’élimination d’ordre 1 où l’ordre entre le clivage et la déprotonation est inversé, (C) hypothèse d’élimination d’ordre 2 où la déprotonation et le clivage peptidique sont concertés en une seule étape.

Durant ma thèse, j’ai pu obtenir des cristaux de la PCFP Dendra2 et résoudre sa structure, inconnue jusqu’ici. Cette structure a permis de comprendre les raisons de la photoconversion particulièrement efficace de cette protéine : la présence d’un réseau de liaisons hydrogènes permettant d’éloigner une arginine (Arg66) normalement en interaction avec le chromophore, ce qui stabilise chez les autres PCFPs une charge négative sur le chromophore [65]. La déstabilisation de la charge négative produit une augmentation du pKa du chromophore correspondant mieux à pH physiologique avec le spectre d’action de la photoconversion.

J'ai également étudié EosFP, PCFP déjà bien caractérisée et dont j'ai pu obtenir de nouvelles structures 3D, pour élucider le mécanisme de photoconversion à proprement parler. A partir de ces structures, des calculs de mécanique quantique et moléculaire (QM/MM) ont pu mettre en évidence qu'un passage par l'état triplet pouvait permettre d'expliquer comment le clivage peptidique, pouvait avoir lieu à l'état excité [64].

Ces études ont permis d'éclairer le mécanisme de photoconversion en corrigeant certaines propositions précédentes. Elles ont également mis en évidence l'importance de quelques acides aminés dans l'environnement du chromophore qui maintiennent une répartition des charges permettant à la photoréaction de se dérouler. Si l'un de ces acides aminés est modifié, l'efficacité de la photoconversion de la protéine est altérée, ce qui devrait permettre l'ingénierie de nouvelles protéines fluorescentes capables de se photoconvertir.

2. Les protéines fluorescentes biphotochromiques : à la fois PCFPs et RSFPs

2.1. IrisFP et ses suites

Lors de mon travail de thèse, j'ai pu découvrir et caractériser un variant de la protéine photoconvertible du vert au rouge EosFP capable de multiphotoactivations [66]. Ce variant, appelé IrisFP, à la différence de EosFP, est capable de photocommutations réversibles entre des états allumés et éteints sous sa forme verte à l'instar de Dronpa. IrisFP a conservé de son parent la possibilité de se photoconvertir irréversiblement du vert au rouge. Une fois sous sa forme rouge, elle est à nouveau capable de photocommuter réversiblement entre des états allumés et éteints (Figure 26A). IrisFP est donc la première PTFP de son type, regroupant les deux types de photoactivations décrits précédemment sur un seul chromophore et montrant un comportement photochromique (commutation réversible et répétée) à la fois en vert et en rouge (Figure 26B). J'ai qualifié ce type de protéine de « biphotochromique ».

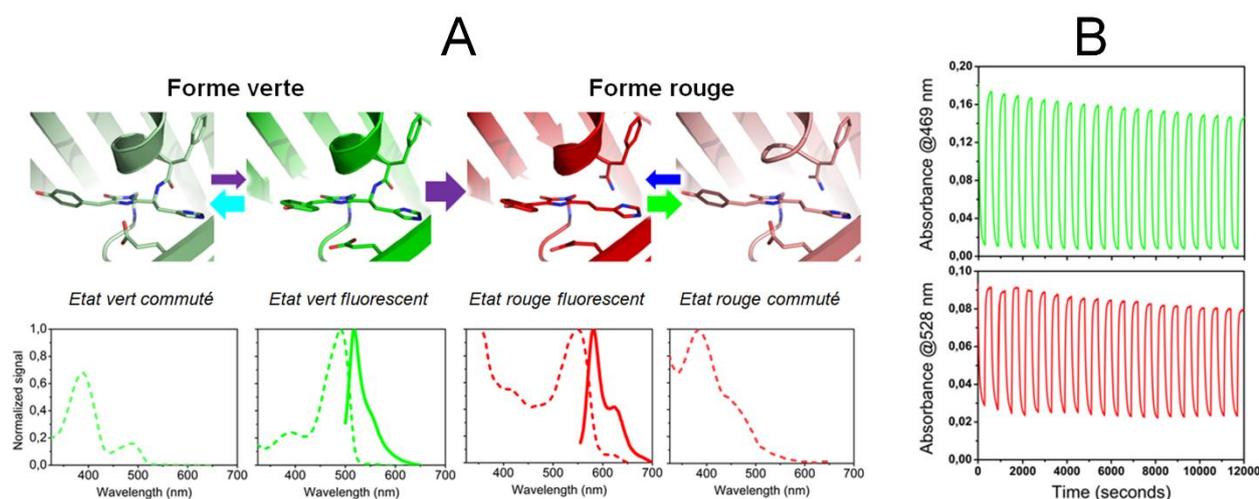


Figure 26 – Protéines fluorescentes biphotochromiques. (A) Le chromophore de la forme verte des protéines biphotochromiques montre une structure qui peut alterner réversiblement entre conformation *Z* anionique (allumée) et *E* protonée (éteinte) selon l'illumination à 488 nm (flèche cyan) et 405 nm (flèche violette), respectivement. Les spectres d'absorption (courbes pointillées) montrent une diminution réversible de la bande correspondant à la forme anionique absorbant à ~490 nm et donnant lieu à un signal de fluorescence (courbe pleine) au profit de l'augmentation de la bande correspondant à la forme protonée absorbant à ~400 nm. Après photoconversion vers la forme rouge, la rupture d'une liaison peptidique rend la photoconversion irréversible mais le même phénomène de commutation réversible sous forme rouge peut se dérouler entre des conformations *Z* anionique (allumé) et *E* protonée (éteinte) selon l'illumination à 561 nm (flèche verte) et 440 nm (flèche bleue). (B) A) Suivi de l'absorbance des formes verte et rouge lors de photocommutation réversible.

Au-delà de la découverte elle-même, cette nouvelle sonde fluorescente s'est montrée très utile en microscopie de fluorescence à super-résolution. En effet, une version monomérique de ce tétramère (EosFP étant un tétramère) a été conçue, appelé mIrisFP [67, 68], ouvrant la voie à un marquage cellulaire plus aisé. mIrisFP a permis d'imager des détails nanoscopiques en mode deux couleurs (*i.e.* le suivi nanométrique d'éléments photoconvertis par rapport à des éléments non photoconvertis également localisables à super-résolution [67, 69]).

2.2. Création d'une famille de protéines biphotochromiques

En me basant sur les connaissances acquises lors de mes travaux de thèse et en étudiant en détail la photophysique de la PCFP Dendra2, j'ai pu pendant mon postdoc proposer plusieurs mutations ponctuelles sur plusieurs PCFPs existantes, afin de tenter de leur ajouter la capacité de photocommutation réversible et de générer de nouvelles protéines fluorescentes biphotochromiques. Ces mutations ont apporté leur lot de surprises et ont donné naissance à une série de protéines intéressantes qui, comme IrisFP, accumulent les propriétés de photoconversion et de photocommutation réversible (Figure 27).

		mEosFP	mEosFP M159A	mEosFP F173S	Dendra2	Dendra2 M159A	Dendra2 F173S	Dronpa	IrisFP	mlrisFP
Green species	λ_{ex} (nm)	504	487	486	490	471	469	503	488	486
	λ_{em} (nm)	516	512	514	505	504	507	517	516	516
	Stokes shift (nm)	12	25	28	15	33	38	14	28	30
	pKa	5.3 [5.5]	4.3	5.8	7.2 [7.1]	6.5	7.0	5.3 [5.0]	5.7 [6.4]	5.7 [5.4]
	ϵ ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)	97,200 [67,200]	98,600	53,200	45,100 [45,000]	51,100	41,100	94,100 [95,000]	57,800 [52,000]	74,000 [47,000]
	Φ_{fluor}	0.67	0.52	0.43	0.55 [0.50]	0.55	0.64	0.67 [0.85]	0.48 [0.43]	0.60 [0.54]
	Brightness	1.94	1.53	0.68	0.74	0.84	0.78	1.88	0.83	1.32
	Φ_{off}	1.8×10^{-7}	2.6×10^{-3}	2.2×10^{-3}	5.7×10^{-6}	1.1×10^{-3}	1.8×10^{-3}	3.0×10^{-4}	3.2×10^{-3}	2.2×10^{-3}
	Φ_{on}	0.79	0.15	0.20	0.10	0.08	0.10	0.70	0.15	0.13
	Red species	λ_{ex} (nm)	569	NA	550	553	528	526	NA	551
λ_{em} (nm)		581	NA	581	573	562	569	NA	580	578
Stokes shift (nm)		12	NA	31	20	34	43	NA	29	32
pKa		6.5 [5.5]	NA	6.2	7.8 [7.5]	6.8	7.3	NA	6.8 [7.2]	7.0 [7.6]
ϵ ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)		41,300 [37,000]	NA	25,000	36,200 [35,000]	45,000	42,000	NA	27,000 [35,000]	26,000 [33,000]
Φ_{fluor}		0.66	NA	0.41	0.55 [0.55]	0.75	0.65	NA	0.50 [0.47]	0.44 [0.59]
Brightness		0.81	NA	0.31	0.55	1.00	0.81	NA	0.40	0.34
Φ_{off}		3.5×10^{-5}	NA	0.4×10^{-3}	5.0×10^{-7}	3.2×10^{-3}	1.0×10^{-3}	NA	2.0×10^{-3} [2.0×10^{-3}]	0.4×10^{-3} [0.3×10^{-3}]
Φ_{on}		0.05	NA	0.06	0.50	0.01	0.10	NA	0.05 [0.047]	0.11 [0.28]

Figure 27 – Propriétés photophysiques *in vitro* des protéines fluorescentes biphotochromiques présentées dans [70]. La brillance est exprimée relativement à celle de EGFP. Les valeurs précédemment rapportées dans la littérature sont mises entre crochets et sont extraites de [71] pour mEosFP, [65, 72, 73] pour Dendra2, [23] pour Dronpa, [66] pour IrisFP et [67] pour mlrisFP. NA, non applicable.

Nous nous sommes en particulier intéressés à un variant basé sur Dendra2 et portant la même mutation qui a permis de créer IrisFP (F173S). Dendra2 F173S possède une meilleure efficacité de photoconversion qu'IrisFP et, à la différence d'IrisFP, est un monomère très stable, ce qui facilite grandement son utilisation en tant que marqueur fluorescent biologique. L'utilisation de cette protéine *in vitro* démontre une grande stabilité au photoblanchiment, une photoconversion très efficace et une grande répétabilité des commutations réversibles en vert et en rouge.

Contrairement à IrisFP, dont l'efficacité de photoconversion est très faible dans les conditions physiologiques, l'utilisation de notre variant, que nous avons appelé NijiFP [70, 74], a également démontré une très grande efficacité de phototransformations en cellules vivantes (Figure 28B).

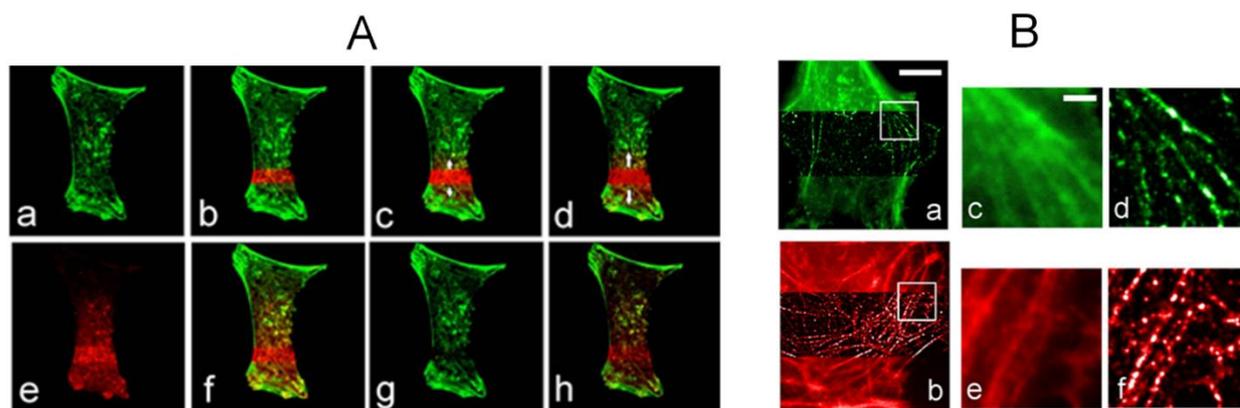


Figure 28 – Utilisation de la protéine fluorescente biphotochromique NijiFP. (A) Images acquises par microscopie confocale sur une cellule HeLa vivante par excitation simultanée des formes verte et rouge (a) dont une petite zone est de plus en plus photoconvertie en rouge (b-d). La zone photoconvertie diffuse avec les mouvements du cytosquelette (flèches). Nous pouvons "éteindre" les molécules vertes par illumination à 488 nm pour n'observer que les molécules photoconverties (e) ou les réactiver par illumination à 405 nm (f). De façon similaire, les molécules rouges peuvent être désactivées par illumination à 561 nm (g) et réactivées par illumination à 440 nm (h). A noter que dans le temps de mesure, les molécules rouges continuent à diffuser dans la cellule. (B) Images obtenues sur des cellules HeLa exprimant la β -actine marquée en microscopie de fluorescence par ondes évanescentes (TIRFM et PALM). Images acquises sur cellule non photoconvertie (a) et sur cellule photoconvertie (b) ; (échelle=10 μ m). Le zoom des zones encadrées montre la différence entre les résolutions des images acquises en TIRFM (c, e) et les images correspondantes reconstruites par PALM (d, f) ; (échelle = 2 μ m).

3. Dynamique à l'état excité des PCFPs

Les calculs théoriques de mécanique quantique et de mécanique moléculaire (quantum mechanics/molecular mechanics, QM/MM) sont nécessaires pour ce genre d'études puisque les mesures spectroscopiques sont complexes (rendement quantique de photoconversion faible, réaction irréversible) et les structures cristallographiques statiques des états initial (vert) et final (rouge) aident mais ne permettent pas de reconstituer le mécanisme réactionnel. Mais pour mieux comprendre les phénomènes de photoconversion, en particulier pour sonder les étapes précoces de la réaction de photoconversion, les événements intramoléculaires et entre monomères à courte distance dont les vitesses sont rapides, la spectroscopie femtoseconde s'est vite révélée être une méthode de choix. J'ai eu l'opportunité de faire ces études pendant mon postdoc et me suis intéressé au mécanisme de photoconversion de deux PCFPs : Kaede et Dendra2.

3.1. Etude de la photoconversion de Kaede

Comme dit dans l'introduction sur les protéines fluorescentes phototransformables, Kaede, tétramère sauvage, est historiquement la première protéine fluorescente photoconvertible (PCFP). Nous avons décidé lors d'une première étude [48] de sonder la photoconversion par spectroscopie

ultrarapide dans le but de mieux comprendre cette phototransformation. Plus précisément, il s'agissait de mesures d'absorption transitoire (transient absorption) et de conversion ascendante femtoseconde de fluorescence (femtosecond fluorescence up-conversion). Ces mesures permettent de mesurer des tracés de décroissance (en ps) après excitation, en fonction des longueurs d'onde sondées. On peut donc reconstruire des spectres associés à ces temps de décroissance. Nous avons également réalisé des mesures de temps de vie de fluorescence par comptage de photons (Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC).

Lors de l'excitation d'un **échantillon partiellement photoconverti en rouge** à 395 nm, cinq constantes de temps ont été mesurées : 3600, 20, 13.4, 2.87 et 1.37 ps (Figure 29A).

La composante à 3.6 ns est attribuée à un mélange des temps de vie mesurés par TCSPC : 3.4 ns (vert) et 4.2 ns (rouge) qui sont trop longues pour pouvoir être temporellement distinguées dans ce type de mesures. D'ailleurs cette composante présente un pic dans le vert et un pic dans le rouge, ce qui est cohérent avec cette attribution.

La composante à 20 ps présente une amplitude positive dans la partie correspondant à l'espèce verte neutre et une forte amplitude négative vers 510 nm, suggérant un phénomène de transfert d'énergie du vert au rouge par FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Cette amplitude négative un peu décalée avec le pic de fluorescence de l'espèce verte neutre observée à 480 nm et semble correspondre à l'émission de fluorescence de l'espèce neutre rouge déjà décrite comme ayant un maximum à 508 nm chez Kaede en condition acide [75]. La décroissance de fluorescence de l'état vert neutre (à 480 nm) concertée avec l'augmentation de fluorescence de l'espèce rouge neutre (à 510 nm) suggère lors d'une excitation à 395 nm suggère que la contribution de 20 ps corresponde à l'évènement de photoconversion vert à rouge. Afin de vérifier si cet évènement de FRET du vert neutre vers le rouge neutre était associé à un ESPT à l'œuvre dans le mécanisme de photoconversion, nous avons refait nos mesures en présence d'eau lourde (D_2O) puisqu'il est établi que la vitesse d'un ESPT diminue environ 5 fois lorsque la protéine est en présence de D_2O . C'est le cas dans la littérature [57] ainsi que dans nos contrôles réalisés sur la GFP (sauvage) et pour laquelle la déprotonation photoinduite menant à la forme anionique fluorescente est médiée par un ESPT. Cependant, pour Kaede, la vitesse de décroissance de l'espèce verte neutre excitée à 395 nm s'est révélée être la même en milieu aqueux qu'en milieu deutéré, suggérant qu'un ESPT n'a pas lieu durant cette étape de clivage menant à la photoconversion.

La composante à 13.4 ps présente une dépendance à la longueur d'onde, ayant une amplitude positive dans la partie spectrale verte et négative dans la partie rouge. Cela est caractéristique d'un FRET entre sous-unités du tétramère de Kaede suite à l'excitation de la forme protonée, ce qui est confirmé par les mesures d'absorption transitoire. Au vu de la localisation spectrale et du spectre correspondant à cette composante de 13.4 ps, ce FRET peut se dérouler soit de la forme anionique verte vers la forme anionique rouge, soit de la forme protonée rouge vers la forme anionique rouge, mais puisque l'excitation à 395 nm excite essentiellement la forme protonée rouge et qu'un FRET depuis la forme protonée a déjà été décrit dans la littérature pour le tétramère de Kaede [75], nous l'attribuons à un FRET entre formes rouge.

La composante à 2.87 ns est située dans une partie bleue du spectre de la forme verte de Kaede, nous l'associons donc à un état protoné de la forme verte.

La composante à 1.37 ps est présente et positive dans les parties verte et rouge du spectre, suggérant une relaxation des espèces verte et rouge protonées (excitées à 395 nm)

Lors de l'excitation d'un **échantillon vert** à 495 nm, trois constantes de temps sont détectées : 3400, 13.2 et 1.5 ps. La composante à 3.4 ns correspond au temps de vie de fluorescence de l'espèce verte anionique, aucun signe d'espèce rouge n'a été détecté durant cette expérience. Les deux composantes rapides sont d'amplitudes extrêmement minoritaires et peuvent être attribuées à des phénomènes de relaxation intramoléculaires (Figure 29B).

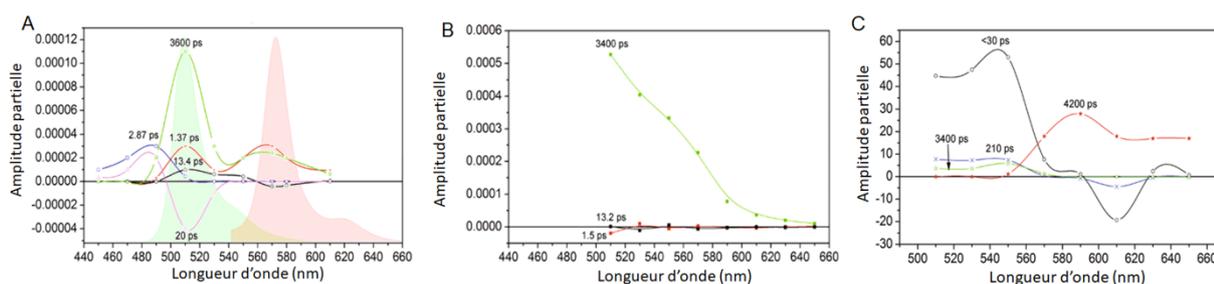


Figure 29 – (A) Spectres d'émission associés au temps de décroissance mesurés sur un échantillon partiellement photoconverti de Kaede (pH 7.4). Excitation : 395 nm, Détection : 450-610 nm. Les spectres d'émission des formes verte et rouge sont mis en arrière-plan. (B) Spectres d'émission associés au temps de décroissance mesurés sur un échantillon vert de Kaede (pH 7.4). Excitation : 495 nm, Détection : 510-650 nm. (C) Spectres d'émission associés au temps de décroissance mesurés sur un échantillon rouge de Kaede (pH 7.4). Excitation : 495 nm, Détection : 510-650 nm.

Lors de mesures TCSPC sur un **échantillon rouge** excité à 488 nm, deux temps de vie correspondant à la forme rouge majoritaire (4.2 ns) et la forme verte résiduelle (3.4 ns) sont détectées ainsi que deux nouvelles contributions : <30 ps et 210 ps. La contribution avec une constante de temps <30 ps (résolution temporelle insuffisante en TCSPC) est positive dans la zone spectrale de la forme anionique rouge (500-550 nm) et négative dans la zone spectrale de la forme anionique rouge, suggérant qu'il s'agit de la composante à 13.4 ps observée dans l'échantillon partiellement converti et confirmant qu'il s'agit bien d'un FRET de la forme neutre vers la forme anionique rouge. La composante à 210 ps évolue de la même façon mais avec des amplitudes plus faibles, suggérant une autre voie de FRET entre deux sous-unités plus distantes du tétramère (Figure 29C).

Pris tous ensemble, nos mesures de dynamique à l'état excité permettent de proposer le mécanisme réactionnel résumé sur le diagramme de Jablonski de la Figure 30, de Kaede. Le mécanisme se révèle assez simple avec un phénomène de FRET entre les formes neutres verte et rouge et également entre les formes neutres et anioniques rouges. Aucun ESPT n'a été détecté.

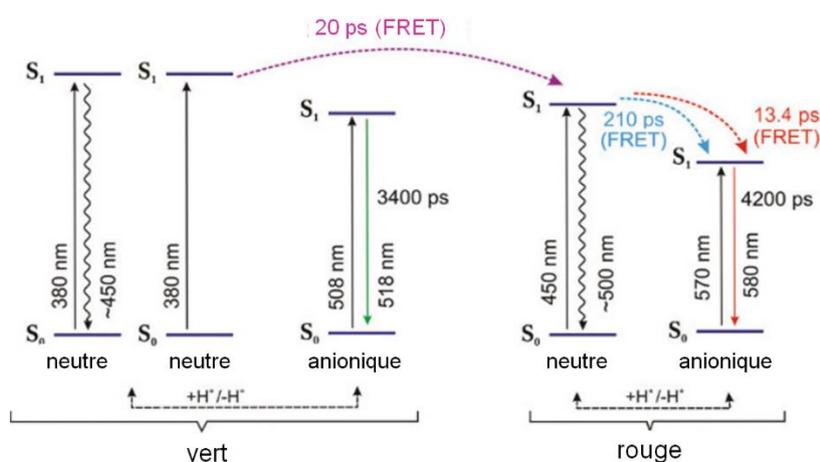


Figure 30 – Modèle de mécanisme photophysique proposé montrant les différents états détectés lors de la photoconversion du vert au rouge de Kaede. Les deux voies de FRET dans le rouge sont attribuées à une résonance du neutre à l'anionique entre sous-unités voisines (13.4 ps) ou sous-unités opposées (210 ps).

3.2. Etude de la photoconversion de Dendra2

Lors d'une seconde étude [49], nous avons réalisé des séries de mesures d'absorption transitoire de spectroscopie et de conversion ascendante femtoseconde de fluorescence similaires à Kaede sur un **échantillon de Dendra2 partiellement converti**, sous excitation 395 nm. (Figure 31A). Les temps de vie mesurés par TCSPC des formes verte et rouge sont de 3.4 ns et 3.8 ns,

respectivement. Ces temps sont trop longs pour être distingués par les méthodes de spectroscopie ultra rapide et sont, comme pour Kaede, retrouvés comme une somme des contributions verte et rouge dans un spectre correspondant à une constante de temps de ~ 3.5 ns. Deux contributions sont mesurées : une à ~ 2.7 ps et une à ~ 25 ps. La première étant positive sur le spectre rouge peut être attribuée à la relaxation de cette forme, la seconde est positive sur la partie verte du spectre et négative sur la partie rouge, ce qui suggère un FRET du vert au rouge.

Alors que Dendra2 est reportée comme un monomère en solution, la structure de Dendra2 que j'avais résolue [65] montrait la présence de quatre dimères dans l'unité asymétrique. Ceci est expliqué par la concentration dans le cristal d'environ 30 mM (favorisant la reformation des tétramères des formes sauvages), soit bien supérieure à la concentration de 233 μM utilisée ici et à partir de laquelle nos mesures d'ultracentrifugation analytique [70] montrent une présence équiprobable de monomères et de dimères (Figure 31B). La distance entre chromophores d'un dimère est de 2.7 nm. L'équation $R_0 = 0.02108 \left(\frac{\kappa^2 \cdot \Phi_D}{n^4} \times \int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda \right)^{1/6}$ permet de calculer le rayon de Förster, distance à laquelle le FRET d'une molécule verte vers une molécule rouge voisine se déroule avec une probabilité de 50%. Avec n l'indice de réfraction (1.4 pour les molécules biologiques), κ^2 le facteur d'orientation dipôle-dipôle entre chromophores (calculé à 1.64), Φ_D le rendement quantique du donneur vert en l'absence de transfert (mesuré à 0.55), $I_D(\lambda)$ est le spectre normalisé d'émission du donneur et $\varepsilon_A(\lambda)$ le rendement quantique de l'accepteur rouge (mesuré à 36200 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), nous trouvons un R_0 de 6 nm, bien supérieur à la distance interchromophorique de 2.7 nm et suggérant une efficacité de FRET de plus de 99%.

Nous avons mesuré le temps de vie de fluorescence par comptage de photons (Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC) du donneur en l'absence de l'accepteur $\tau_D = 3.3$ ns. Avec $R = 2.7$ nm, $R_0 = 6$ nm, via la formule $\frac{1}{k_T} = \tau_D \left(\frac{R}{R_0} \right)^6$ nous calculons $k_T = 36.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ et une valeur de constante de temps du transfert d'énergie de 27 ps, cohérente avec notre valeur mesurée.

Nous avons tenté d'étudier un **échantillon vert** sous excitations 395 nm et 495 nm pour exciter les formes neutre et anionique. Malgré le flux constant de protéine afin de présenter aux lasers un échantillon vierge, une petite photoconversion vert-rouge induite par le laser 395 nm a tout de même eu lieu. En plus des composantes de 3.5 ns, 25 ps et 2.7 ps dont nous avons déjà

parlé et que nous retrouvons donc, trois autres composantes ont été trouvées : 40, 3.4 et 1.8 ps (Figure 31C).

La composante à 40 ps est attribuable à la forme neutre verte et suggère que la fraction protonée de Dendra2 émet à ~450 nm avec un temps de vie très court. La fraction protonée est importante à pH physiologique, Dendra2 ayant un pKa particulièrement élevé (7.1 pour le vert et 7.5 pour le rouge [65]). Cette composante disparaît d'ailleurs lorsque nous faisons les mesures sur des variants de Dendra2 avec des pKa plus bas et devient visible à bas pH.

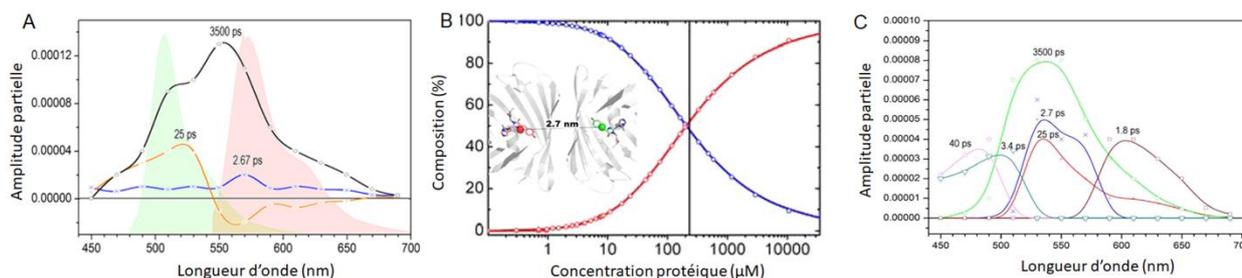


Figure 31 – (A) Spectres d'émission associés au temps de décroissance mesurés sur un échantillon partiellement photoconverti de Dendra2 (pH 7.4). Excitation : 395 nm, Détection : 450-690 nm. Les spectres d'émission des formes verte et rouge sont mis en arrière-plan. (B) Ratio de monomères (ligne bleue) et de dimères (ligne rouge) en fonction de la concentration de Dendra2, déterminé par ultracentrifugation analytique. La ligne verticale indique la concentration (233 μM) à laquelle les deux populations sont équilibrées. L'encart montre la distance (2.7 nm) entre un chromophore vert (donneur) et un chromophore rouge (accepteur) dans un dimère. (C) Spectres d'émission associés au temps de décroissance mesurés sur un échantillon vert de Dendra2 (pH 7.4). Excitations : 395 nm et 495 nm, Détection : 450-690 nm.

La composante à 3.4 ps évolue en même temps que celle à 40 ps et en est très proche spectralement. Cette composante ressemble et à une constante de temps proche de la constante de temps de 2.7 ps observée dans les mêmes conditions chez Kaede. Il est donc proposé qu'elle corresponde à une autre forme de l'espèce protonée verte. Par ailleurs, et à la différence de Kaede, les mesures d'absorption transitoire montrent que la composante à 3.4 ps devient négative lors d'une excitation à 440 nm, suggérant un processus de transfert de proton à l'état excité (Excited State Proton Transfer, ESPT).

Enfin, la composante à 1.8 ps est très décalée dans le rouge, d'environ 30 nm par rapport à l'espèce photoconvertie. Une telle espèce "super rouge" a été rapportée dans la protéine fluorescente rouge DsRed [76, 77] chez laquelle des chromophores verts doivent d'abord mûrir vers le rouge et a été également observable sous illumination intense [78]. La très courte durée de vie et le faible rendement quantique de fluorescence estimé rend cette espèce impossible à observer

dans des conditions classiques de mesure à pH physiologique mais nous l'avions déjà observée chez Dendra2 à pH 10 sous très forte illumination lumineuse [65]. Le processus de formation de l'état super rouge est spéculatif mais est proposé comme conséquence d'une réaction de photo-Kolbe à partir de l'état vert protoné. Dans cette réaction, l'abstraction par le chromophore d'un électron du glutamate voisin strictement conservé dans les protéines fluorescentes (Glu212±3 chez les FPs anthozoaires, Glu222±2 chez les FPs hydrozoaires) peut mener à la décarboxylation du glutamate et à une forme zwitterionique du chromophore, voire à une β-élimination et à son élongation vers des formes plus rouges.

De façon intéressante, toutes les formes super rouges rapportées l'ont été sur DsRed et Dendra2 uniquement. J'ai donc comparé leurs structures et trouvé un point commun : dans ces deux protéines, à la différence de la majorité des autres structures de FPs connues, le glutamate conservé est en interaction forte avec un acide aminé chargé positivement (Lys70 pour DsRed, Arg66 pour Dendra2). J'ai également trouvé cette configuration structurale dans les FPs mKO, mTFP1, cmFP512 et amFP486. L'orientation de cet acide aminé en interaction avec le glutamate est alors toujours favorisée par un autre acide aminé : Ser197 pour DsRed, Thr69 pour Dendra2, par exemple (Figure 32).

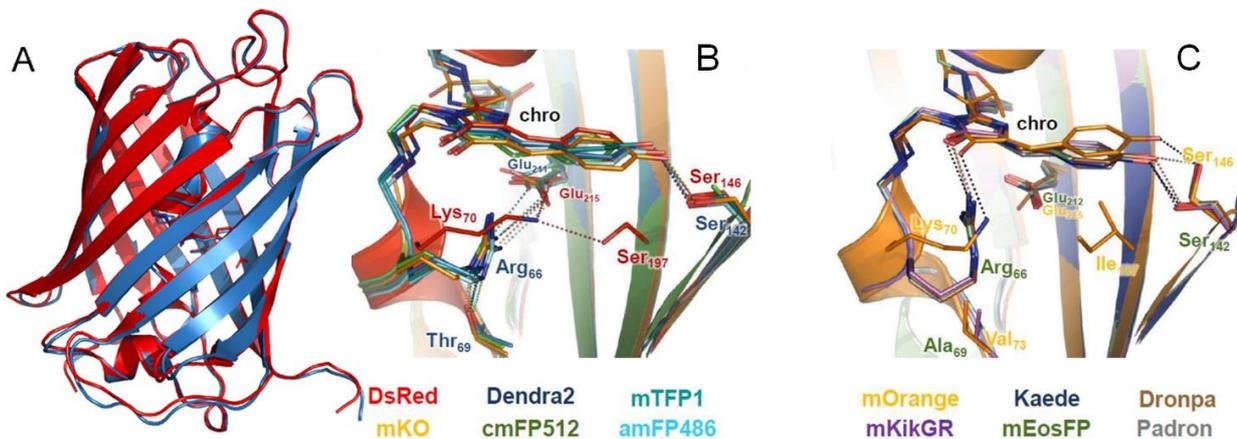


Figure 32 – Dendra2 et DsRed (A) partagent un point commun structural avec très peu de FPs (B) et diffèrent de la majorité des autres (C). Le glutamate conservé est en interaction avec un acide aminé chargé positivement (DsRed : Lys70, Dendra2 : Arg66), lui-même en interaction avec un autre acide aminé (DsRed : Ser197, Dendra2 : Thr69).

Il serait intéressant d'étudier les quelques FPs présentant ces caractéristiques à la recherche de formes fluorescentes décalées, ainsi que de concevoir des variants introduisant ou supprimant l'interaction entre un acide aminé chargé et le glutamate conservé. Pour Dendra2, l'influence de la thréonine 69 avait déjà été décrite comme responsable du fort pKa de son chromophore et du

décalage dans le bleu de ses spectres mais son influence sur l'implication d'une liaison forte entre le glutamate et l'arginine 66 avait été négligé.

Pris tous ensemble, nos mesures de dynamique à l'état excité permettent de proposer le mécanisme réactionnel résumé sur le diagramme de Jablonski de la Figure 33, démontrent la complexité photophysique d'une PCFP comme Dendra2 et la variété des espèces formées à partir de la forme verte neutre lors de la photoconversion.

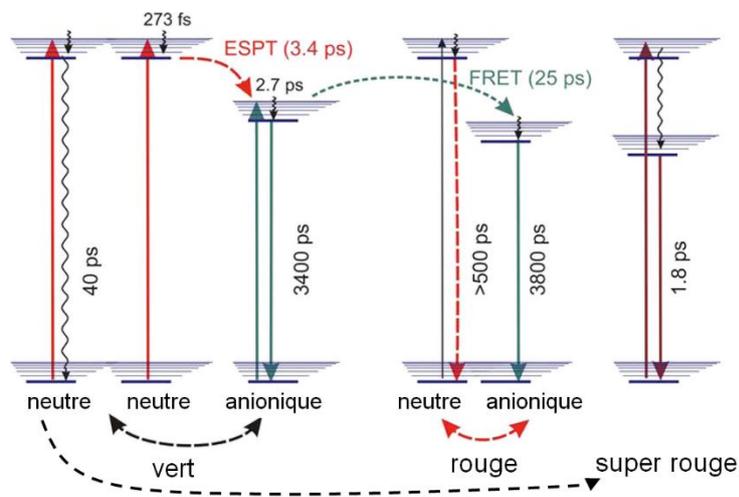
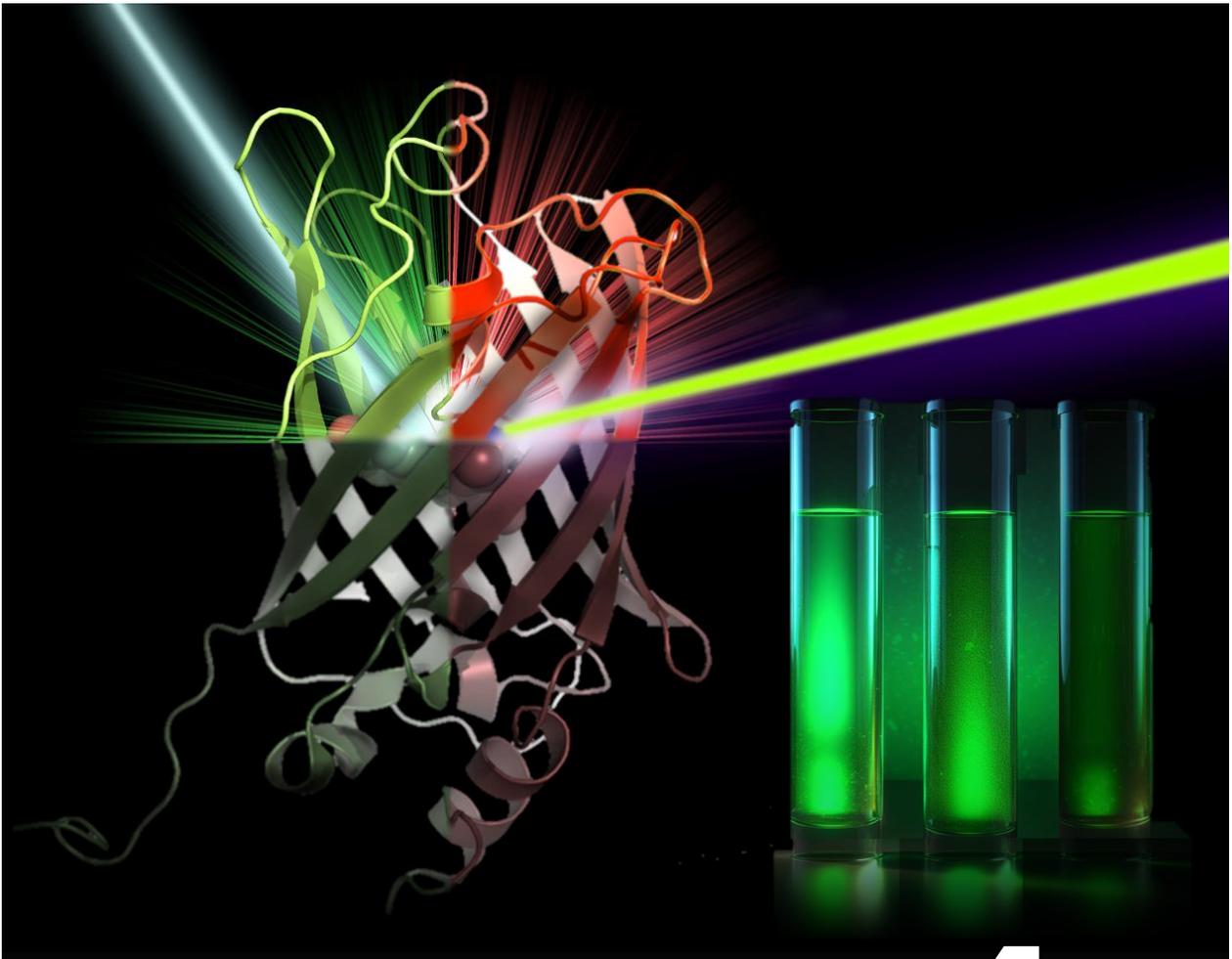


Figure 33 – Modèle de mécanisme photophysique proposé montrant les différents états détectés lors de la photoconversion du vert au rouge de Dendra2.



4

**Limitations
photophysiques
des PTFPs**

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. C. Duan, **V. Adam**, M. Byrdin, J. Ridard, S. Kieffer-Jacquino, C. Morlot, D. Arcizet, I. Demachy & D. Bourgeois*, “*Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein*”
Journal of the American Chemical Society (2013) **135**(42): 15841-15850
02. S. Avilov, R. Berardozi, M.S. Gunewardene, **V. Adam**, S.T. Hess* & D. Bourgeois*
“*In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy*”, PLoS One (2014) **9**(6): e98362
03. C. Duan, M. Byrdin, M. El Khatib, **V. Adam*** & D. Bourgeois*, “*Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein*”
Methods and Applications in Fluorescence (2015) **3**: 014004
04. R. Berardozi, **V. Adam***, A. Martins & D. Bourgeois*
“*Arginine 66 controls dark-state formation in green-to-red photoconvertible fluorescent proteins*”, Journal of the American Chemical Society (2016) **138**(2):558-565
05. D. Thédié, R. Berardozi, **V. Adam** & D. Bourgeois*
“*Photoswitching of green mEos2 by intense 561-nm light perturbs efficient green-to-red photoconversion in localization microscopy*”
The Journal of Physical Chemistry Letters (2017) **8**(18):4424-4430
06. E. De Zitter, D. Thédié, V. Monkemöller, S. Hugelier, J. Beaudouin, **V. Adam**, M. Byrdin, M. Van Meervelt, P. Dedecker* and D. Bourgeois*
“*Mechanistic investigation of mEos4b reveals a strategy to reduce track interruptions in sptPALM*”, Nature Methods (2019) **16**(8):707-710
07. E. De Zitter, J. Ridard, D. Thédié, **V. Adam**, B. Lévy, M. Byrdin, G. Gotthard, L. Can Meervelt, P. Dedecker, I. Demachy, D. Bourgeois *
“*Mechanistic investigations of green mEos4b reveal a dynamic long-lived dark state*”
Journal of the American Chemical Society (2020) **142**(25):10978-10988
08. Maity, J. Wulffélé, I. Ayala, A. Favier, **V. Adam**, D. Bourgeois* & B. Brutscher*
“*Structural heterogeneity in a phototransformable fluorescent proteins impacts its photochemical properties*” – En revision à Advanced Science (2023)

Page précédente : illustration du passage d'une protéine fluorescente d'un état fluorescent à un état blanchi ou « noir » lors d'une illumination par un laser

1. Comment les protéines fluorescentes "meurent"-elles ?

Le photoblanchiment est un terme définissant l'arrêt d'émission de fluorescence. Il s'agit souvent d'une nuisance majeure des sondes fluorescentes utilisées en microscopie, particulièrement pour les protéines fluorescentes, plus sensibles que les fluorophores chimiques. Bien qu'il soit nécessaire dans certaines techniques comme en FRAP par exemple, le photoblanchiment est généralement délétère puisqu'il limite la durée de vie des molécules observées mais malgré son importance, peu d'études se sont intéressées à ce que signifiait physiquement le photoblanchiment pour une protéine fluorescente.

Nous avons découvert à la fin de ma thèse que lors de l'acquisition de données cristallographiques, les cristaux de IrisFP perdaient très rapidement leur fluorescence. Ce blanchiment sous rayonnement X n'avait jamais été rapporté auparavant et se produisait à des doses de rayons X bien inférieures que celles utilisées lors de la collecte d'un jeu de données complet (Figure 34A). Toutefois, dans des limites de doses acceptables, ce processus était lentement réversible (Figure 34B). Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence la formation d'une espèce radicalaire instable et non fluorescente sur le chromophore, générée par les rayons X du Synchrotron Européen. En combinant cristallographie, spectroscopie Raman, et spectroscopie d'absorption et de fluorescence, nous avons pu montrer que l'état radicalaire s'accompagne d'une grande distorsion du chromophore (Figure 34C), responsable de la perte de fluorescence [37].

Lors d'une illumination par lumière visible, le chromophore excité peut transitoirement passer à un état triplet, ce qui peut lui donner assez de temps pour réagir avec son environnement et devenir radicalaire. Cette espèce radicalaire peut alors relaxer vers un chromophore non radicalaire ou se dégrader irréversiblement, donnant lieu à une molécule photoblanchie. Le spectre Raman de la protéine irradiée par lumière visible nous a montré, là encore, la signature d'un chromophore distordu (Figure 34C).

Le but de cette expérience était d'essayer de générer des électrons aqueux par interaction des rayons X avec le solvant, seules espèces a priori capables de diffuser à température cryogénique. Les électrons ainsi formés vont très facilement interagir avec le réservoir d'électrons que représente le chromophore et toutes ses liaisons conjuguées, imitant ainsi l'absorption supposée par la littérature d'électrons par le chromophore lors de son passage à l'état excité, suite à une illumination. Les structures qui ont découlé de ce travail ont permis de mettre en évidence que le glutamate 212 (acide aminé strictement conservé dans les protéines fluorescentes) était déstabilisé, voire décarboxylé, provoquant l'affaissement de tous les acides aminés stabilisant le chromophore et la propre distorsion de ce dernier. Le caractère irréversible du chromophore distordu et non fluorescent provient de la protonation terminale d'un carbone central du chromophore si ce dernier ne parvient pas à éliminer l'électron autrement sous son état ionisé.

Bien qu'issues de mécanismes différents, les conséquences d'une irradiation par rayons X ou par lumière visible semblent être comparables et remettent en question l'aspect irréversible de tout photoblanchiment. Ces résultats donnent pour la première fois des bases de compréhension structurale d'une protéine fluorescente dans un état transitoirement éteint. Cette étude nous donne également des pistes pour envisager l'ingénierie de protéines fluorescentes plus photorésistantes grâce, par exemple, à la mutation de résidus stabilisant le chromophore sous une forme moins apte à se tordre.

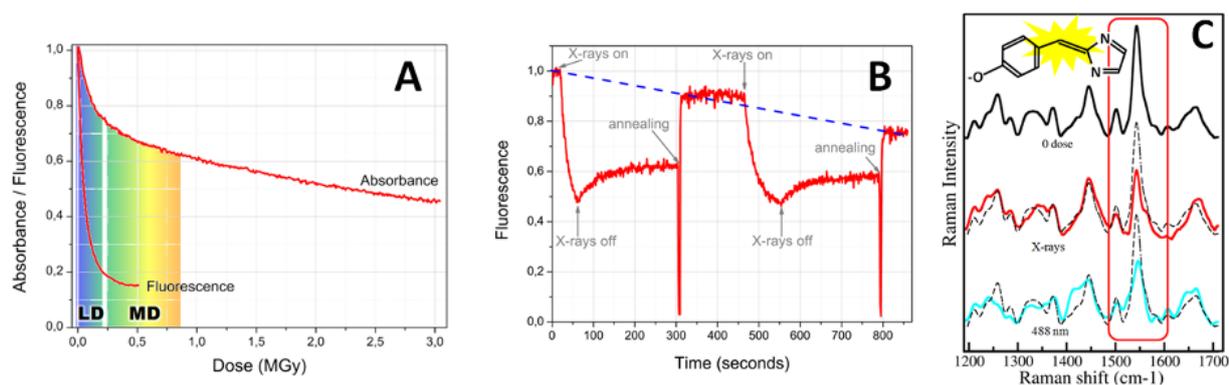


Figure 34 – Perte de fluorescence lors de l'illumination en lumière visible ou aux rayons X. (A) La perte de fluorescence induite par une irradiation aux rayons X a lieu à basse dose (LD) soit bien plus vite qu'une dose moyenne reçue lors de la collecte de données cristallographiques (MD) mais la perte d'absorbance, très limitée montre que le chromophore est toujours chimiquement intact. (B) cette perte de signal est essentiellement réversible, particulièrement lors d'excursions à températures plus élevées. (C) La spectroscopie Raman démontre que la liaison éther du pont méthine du chromophore subit une rotation, que ce soit sous irradiation aux rayons X ou sous forte lumière visible.

1.1. Deux voies de photoblanchiment par la lumière visible

Plus récemment, nous avons reproduit des travaux similaires à nouveau sur des cristaux de IrisFP mais en provoquant le photoblanchiment par de la lumière visible [79]. La difficulté résidait dans le fait qu'IrisFP photocommute rapidement vers un état transparent lors d'une excitation à 488 nm, le protégeant contre un photoblanchiment ultérieur. Nous avons contourné cette difficulté en effectuant des centaines de cycles alternant entre la forme allumée et la forme éteinte de la protéine grâce à l'usage alterné de deux lasers : 488 nm et 405 nm. Ce phénomène répété d'isomérisation *Z/E* du chromophore et menant à son photoblanchiment et connu sous le nom de photofatigue. Étonnamment nous avons découvert des comportements spectroscopiques différents lors de la photofatigue d'IrisFP sous forte intensité lumineuse (100 W/cm^2) et sous faible intensité lumineuse (10 W/cm^2). Alors que sous forte intensité lumineuse, la forme photoblanchie n'absorbait plus dans le visible, sous faible intensité lumineuse, seule la forme anionique absorbant à 490 nm avait diminué, la forme neutre absorbant à 400 nm avait augmenté et restait verrouillée comme en atteste nos mesures de pKa du chromophore soudainement bloqué à ~ 12 .

Nous sommes parvenus à enregistrer des jeux de données au synchrotron, sous chacune des formes et les comparer avec les structures provenant de zones de cristaux non illuminées. La structure correspondant à la protéine photofatiguée à forte intensité lumineuse a montré une déstabilisation du chromophore associée à la décarboxylation du glutamate 212, de façon similaire à ce que j'avais observé par endommagement par rayons X quelques années plus tôt (Figure 35A). Par contre, la forme photofatiguée sous faible intensité lumineuse montrait une structure avec un glutamate intact, un chromophore toujours plan mais avec la surprenante signature d'une sulfoxydation des acides aminés soufrés directement à proximité du chromophore, particulièrement la méthionine 159 (Figure 35B). Cette observation a été confirmée par spectrométrie de masse montrant que les fragments peptidiques contenant la méthionine 159 avaient des niveaux 320% plus importants après illumination visible à basse intensité. Aidés par les calculs de mécanique quantique et moléculaire, nous avons pu proposer un modèle réactionnel présentant une double voie menant au photoblanchiment (Figure 35C) :

- Une première voie, sous forte intensité lumineuse, provoque le passage du chromophore dans un état excité d'énergie élevée, ce qui ne lui laisse pas le temps de réagir avec son environnement et mène à la photodestruction des résidus soutenant le chromophore via la décarboxylation du glutamate 212.

- Une seconde voie, jamais observée auparavant, sous faible intensité lumineuse, permet l'excitation du chromophore dans un état triplet long où il a assez de temps pour réagir avec l'oxygène triplet, ce qui forme de l'oxygène singulet qui peut réagir avec les résidus soufrés de l'environnement immédiat et verrouiller le chromophore dans son état protoné (neutre) non fluorescent à cause d'une liaison hydrogène forte.

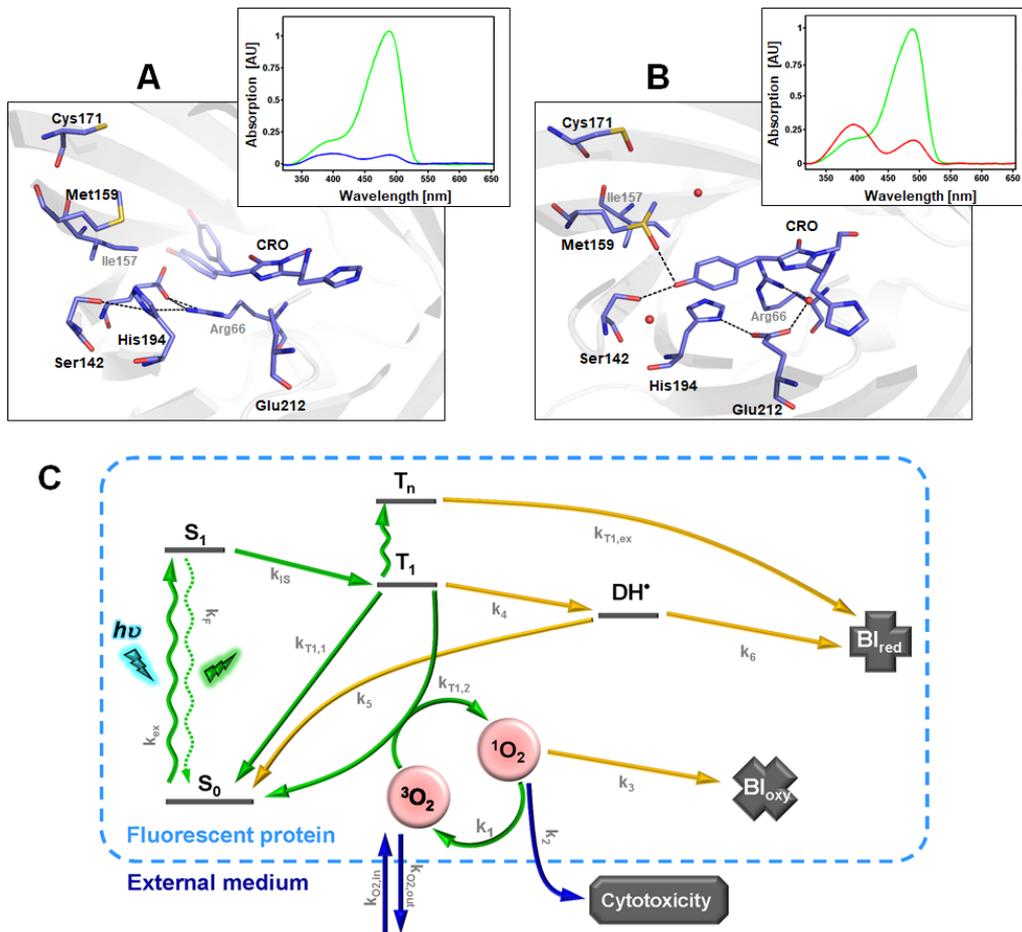


Figure 35 – Mise en évidence de deux chemins réactionnels différents menant au blanchiment des protéines fluorescentes – (a) Lors d'une illumination à forte intensité lumineuse, la structure correspondante montre un chromophore désordonné à cause de la décarboxylation photo-induite du Glu212, très conservé. Le spectre d'absorption correspondant montre une perte à la fois des pics spécifiques de la forme protonée et de la forme anionique. (b) Lors d'une illumination à faible intensité lumineuse, la structure correspondante montre un chromophore ordonné et une absence de décarboxylation du Glu212, mais une sulfoxydation de la Met159 et de la Cys171. Le spectre d'absorption correspondant montre une décroissance du pic spécifique de la forme anionique mais une augmentation du pic spécifique de la forme neutre. (c) Le modèle proposé met en évidence une voie de photoblanchiment indépendante de l'oxygène (à forte intensité), menant au photodommage du Glu212 et une voie dépendante de l'oxygène (à faible intensité), menant à la sulfoxydation des résidus soufrés proches du chromophore et du verrouillage de ce dernier dans une forme protonée.

Ces résultats corroborent au moins en partie le fait que les temps de survie mesurés pour les protéines fluorescentes sont très différents si les mesures sont prises sur un microscope de faible intensité ou bien de forte intensité comme un microscope confocal.

Nous avons naturellement pensé qu'il suffisait d'enlever la méthionine 159 qui est très touchée dans cette voie pour se débarrasser au moins en partie du problème.

1.2. Un variant plus photostable

Nous avons généré le mutant IrisFP-M159A [80] et obtenu sa structure cristallographique. La structure générale, bien que très similaire, montre que la disparition de la longue chaîne latérale de la méthionine 159 a mené à la réorganisation de plusieurs nouvelles molécules d'eau formant un réseau de liaisons hydrogènes entre la sérine 173 et le chromophore (Figure 36A).

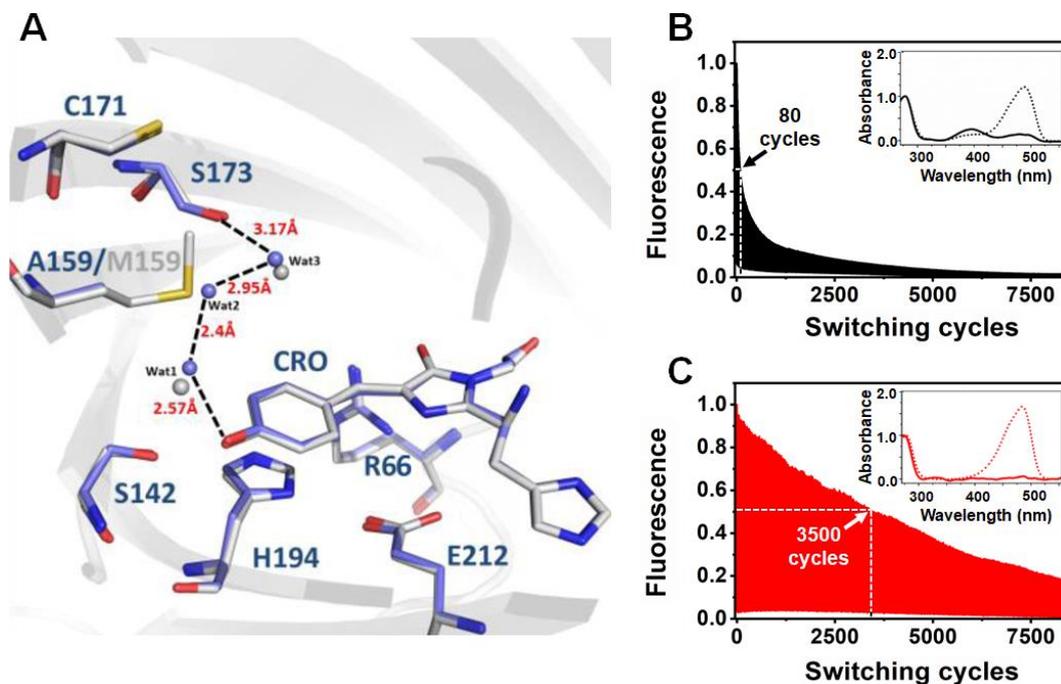


Figure 36 – Structure cristallographique de IrisFP-M159A (carbones et molécules d'eau en bleu) superposée avec la structure de IrisFP (carbones et molécules d'eau en gris). Le nouveau réseau d'eau formé est représenté par les liaisons hydrogènes. Comparé à la protéine parente soumise à un photoblanchiment à faible intensité lumineuse (B), le mutant Met159A démontre une photorésistance accrue (C).

La brillance du variant M159A est plus de deux fois plus faible que son parent à cause d'une diminution importante du rendement quantique malgré une augmentation de 12% d'extinction molaire. Les spectres d'absorption et d'émission du variant sont très peu modifiés mais le pKa du chromophore diminue d'un point. Cette acidification du chromophore, couplée à l'augmentation du coefficient molaire par rapport à IrisFP suggère que la fraction neutre est très faible dans ce variant et en effet, à pH physiologique, aucune fraction protonée n'est observée dans le spectre d'absorption que ce soit avant ou après photofatigue du chromophore (Figure 36B,C). En

revanche, ce variant démontre en effet une photorésistance particulièrement accrue par rapport à la protéine parente (Figure 36B,C).

En prenant en compte la plus grande rapidité de photocommutation du variant M159A, en intégrant le signal de fluorescence et en corrigeant par la différence entre coefficients d’extinction, on trouve que la mutation M159A apporte environ 5.2 fois plus de photorésistance à basse intensité lumineuse (40 W/cm^2). A forte intensité lumineuse (400 W/cm^2), les différences de photorésistance s’effaçaient, comme c’était prévisible. Quand les molécules étaient incluses dans une matrice de PVA (polyvinyle alcool), les différences disparaissaient également, probablement par manque d’accessibilité de l’oxygène puisque le PVA est connu pour empêcher l’oxygène de diffuser [81] et que le mécanisme de photoblanchiment à basse intensité est dépendant de l’oxygène.

Notre variant IrisFP-M159A bien qu’imparfait représente clairement un progrès quant aux différentes techniques de microscopie de fluorescence avancée utilisant les multiples photocommutations des RSFPs comme le RESOLFT [82], le pcFRET (photochromic Förster Resonance Energy Transfer) [83], la microscopie OLID (Optical Lock-In Detection) [84] ou le pcSOFI (photochromic Stochastic Optical Fluctuation Imaging) [85]. Il serait surement préférable dans ces cas d’utiliser des variants monomériques plus adaptés à la fusion comme mEosFP-M159A, Dendra2-M159A [70] ou pcDronpa2 [86], par exemple et permettant même via des variants M159A de protéines fluorescentes biphotochromiques, d’envisager du RESOLFT bicolore par pulse-chase similaire au PALM bicolore pulse-chase [67].

Cela dit, puisque le variant M159A présente une bien plus rapide efficacité de photocommutation, une autre explication au phénomène de photorésistance observée peut être que les molécules passent au total beaucoup plus de temps dans un état non absorbant que son parent. Cet état photoprotégé de la lumière visible pendant une plus grande fraction du temps permet une plus longue exposition lumineuse.

1.3. Limiter chimiquement le photoblanchiment

Nous avons publié une méthode basée sur l’utilisation d’un algorithme MATLAB et qui permet l’extraction de rendements quantiques de phototransformations des PTFPs et en particulier de blanchiment à partir de jeux de données PALM [87]. Cela constituait la base nous

permettant de mesurer et de comparer différentes protéines fluorescentes dans différentes conditions expérimentales.

Grâce à ce logiciel, nous avons pu mesurer le rendement de photoblanchiment de Dendra2 (rouge) fusionnée à l'actine à partir de jeux de données PALM. Ce rendement, initialement mesuré à $2.5 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ en cellules mammifères fixées (cellules Vero) est diminué lorsque la protéine purifiée est piégée dans un film à 1% de polyvinyle-alcool (PVA), probablement, comme nous dit plus haut, à cause de sa propension à limiter la diffusion d'oxygène moléculaire. En présence de PVA, le rendement de clignotement "off" diminue fortement et le rendement de clignotement "on" augmente (Figure 37). Les molécules de Dendra2, lorsque l'accès à l'oxygène moléculaire devient difficile, sont donc plus souvent présentes sur les clichés PALM et sont plus stables.

Nous nous sommes donc intéressés aux agents chimiques utilisés pour limiter le photoblanchiment des marqueurs fluorescents organiques, en particulier le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) connu pour limiter la diffusion d'oxygène et d'espèces activées de l'oxygène qui participent à détruire les chromophores fluorescents [88]. En présence de 10% de DABCO, le rendement de photoblanchiment diminue fortement (environ d'un facteur 2) que ce soit en cellules fixées ou dans un film de PVA. Le rendement de clignotement "off" diminue encore alors que le rendement de clignotement "on" augmente encore (Figure 37)

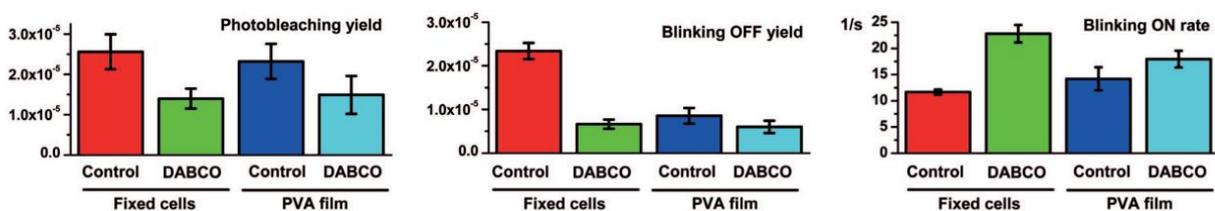


Figure 37 – Rendements de photoblanchiment et de photocliques de Dendra2-actine exprimée en cellules fixées et de Dendra2 purifiée piégée dans un film de PVA, en présence ou absence de DABCO. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types ($n=3-5$).

Ainsi, nous proposons pour les expériences de PALM sur cellules fixées, l'ajout d'une petite quantité de DABCO afin d'augmenter le nombre et la durée de présence de molécules fluorescentes, et donc la qualité des images finales.

1.4. Etat de l'art et suite des travaux

De façon captivante, une protéine fluorescente rouge : mStable, variante de la protéine fluorescente mKate2 et présentée dans une étude de 2016 [89] a mis en évidence un mécanisme de photorésistance mettant également en œuvre la sulfoxydation d'un acide aminé soufré. Dans ce variant, la sérine 143 (S142 chez IrisFP) faisant face au groupe phénol du chromophore et qui est très conservée chez les protéines fluorescentes anthozoaires, a été substituée par une cystéine. Les auteurs rapportent une plus forte photostabilité que le parent mKate2 au détriment d'une bien plus faible brillance puisque à la fois le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique diminuent (-27% et -57%, respectivement). Les mesures de spectrométrie de masse montrent une sulfoxydation de la cystéine 143 que les auteurs associent à une plus forte photorésistance avec comme preuve le fait que lors d'une exposition au rose Bengale (un dérivé de la fluorescéine générateur d'oxygène singulet), la fraction de Cys146 sulfoxydée et la photorésistance augmentent drastiquement.

mKate (ainsi que mKate2) présente un chromophore subissant une isomérisation Z/E dépendante du pH [90] et les auteurs attribuent donc à la sulfoxydation de la cystéine 143 la capacité de stabiliser le chromophore sous sa conformation Z , augmentant ainsi sa photorésistance. Ainsi, les mécanismes d'action pourraient s'avérer être similaires puisque dans notre cas, la sulfoxydation d'un acide aminé soufré vient bloquer le chromophore sous sa forme protonée et sa suppression améliore la photorésistance alors que dans le cas de mStable, l'introduction d'un acide aminé soufré susceptible d'être sulfoxydé stabilise le chromophore. Dans tous les cas, ces travaux permettent d'envisager des pistes d'ingénierie rationnelle en visant à l'ajout ou la suppression d'acides aminés soufrés près du chromophore pour tenter d'améliorer la photorésistance des protéines fluorescentes.

Récemment, une étude mettant en avant une nouvelle protéine fluorescente très photostable, appelée StayGold est sortie [91]. Cette protéine qui est un simple mutant (V168A) de la protéine fluorescente CU17S issue de la méduse *Cytaeis uchidae* présente une photorésistance bien supérieure à l'ensemble des protéines fluorescentes. La mutation V168A double le coefficient d'extinction apparent de la protéine sauvage tout en conservant son extrême photostabilité. En mutant deux acides aminés soufrés (des cystéines contre des isoleucines), les auteurs ont généré oxStayGold, mieux adaptée pour des milieux oxydants comme le réticulum endoplasmique. Les

raisons de cette photostabilité exceptionnelle ne sont pas connues et nécessiteront d'après les auteurs la résolution de la structure tridimensionnelle encore inconnue.

Nous avons initié un projet financé par l'ANR appelé "STABLE-FP" entre notre groupe, le groupe RMN de l'IBS et deux groupes bordelais. Ce projet vise à mieux comprendre le phénomène et photoblanchiment et d'obtenir des variants plus photorésistants de PCFPs afin de pouvoir les utiliser en microscopie de super-résolution selon la stratégie suivante :

- Choisir quelques protéines fluorescentes modèles soit une PCFP (dans le but de la rendre photostable), soit une protéine très photostable (dans le but de la rendre photoconvertible)
- Utiliser la RMN et la cristallographie cinétique afin de localiser dans ces protéines les positions les plus critiques à muter
- Appliquer une mutagénèse saturée de ces régions
- Sélectionner les meilleurs variants et les caractériser (structure et photophysique)
- Utiliser ces nouveaux marqueurs en cellules eucaryotes et procaryotes

2. Clignotement et isomérisation dans les PCFPs

2.1. Le problème des états noirs

En microscopie de super-résolution PALM, et en particulier en PALM quantitatif, les PCFPs sont des marqueurs de choix puisque leur photoconversion du vert au rouge est irréversible et permet donc en théorie de compter sans artefacts le nombre de molécules marquées. Il y a cependant des limitations fortes à leur utilisation telles que le repliement incomplet des protéines, une maturation incomplète des chromophores ou la sensibilité des protéines à l'environnement et au blanchiment. Mais la première des limitations pratiques est que les PCFPs ont une forte tendance à clignoter ou scintiller (phénomène de « blinking ») tant sous leur forme initiale verte que sous leur forme photoconvertie (rouge).

Ces clignotements sporadiques des molécules entre des états fluorescents et des états sombres est mal compris pour les protéines fluorescentes mais a de grandes conséquences : lorsqu'il est très rapide, il participe à diminuer la brillance effective puisque la protéine passe une partie de son temps dans des états non fluorescents, lorsqu'il est plus lent il crée des artefacts de localisation et de surcomptage puisque des molécules que l'on pensait photoblanchies résident en fait dans un

état « noir », dans lequel elles vont rester plus ou moins de temps avant de revenir à l'état fluorescent [92-94] (Figure 38).

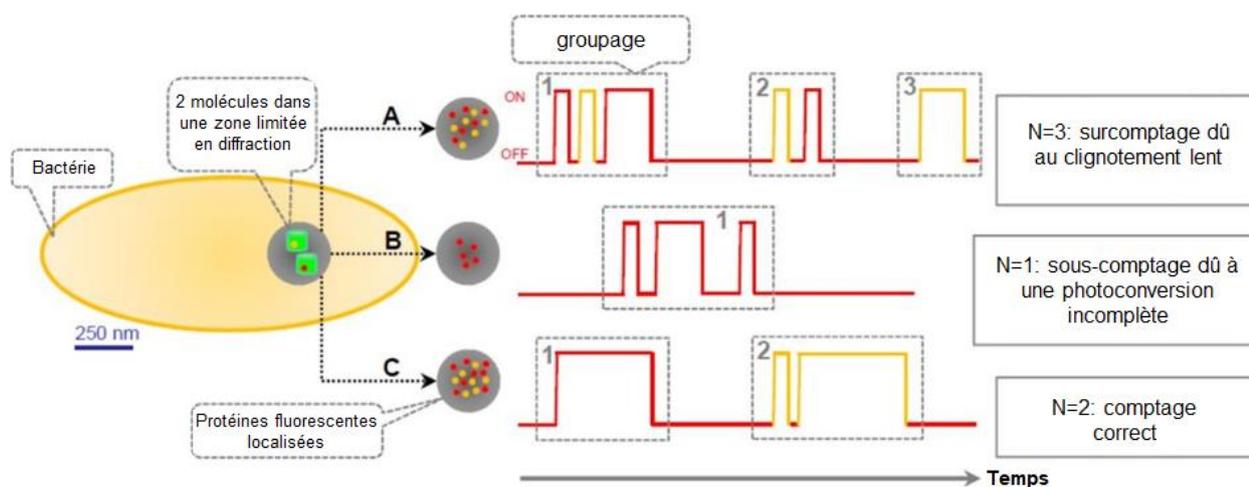


Figure 38 – Artefacts de comptage en microscopie de super-résolution PALM – Lorsque deux protéines fluorescentes phototransformables sont présentes simultanément dans un volume d'excitation de taille limitée par la diffraction de la lumière (~250 nm de diamètre), plusieurs scénarios sont possibles si l'on cherche à faire du comptage. (A) Si les molécules clignotent lentement, le regroupement des signaux de molécules uniques risque de correspondre aux mêmes molécules comptées plusieurs fois. (B) A l'inverse, si la photoconversion d'un état à l'autre de la protéine fluorescente est très incomplète, trop peu de molécules risquent d'être comptabilisées. (C) La conception d'une protéine fluorescente avec un faible clignotement et une bonne efficacité de photoconversion faciliterait grandement le comptage correct du nombre de molécules présentes.

Il y a donc toujours une incertitude quant à l'origine de la molécule localisée : nouvelle molécule ou molécule déjà localisée et revenue d'un état noir ? Diverses méthodes de correction *a posteriori* de ces effets de clignotement ont déjà été proposées mais aucune n'est parfaite [87, 95-99]. La compréhension de ces mécanismes est la clé permettant d'espérer créer des molécules clignotant moins à l'avenir. Nous avons donc tenté ces dernières années de comprendre l'origine de ce ou ces état(s) noir(s) dans les PCFPs, leur durée de vie, leur signature spectroscopique et leur structure.

Nous avons déjà eu l'expérience à la fin de ma thèse d'un état de la protéine IrisFP rendue transitoirement non fluorescente lors de son irradiation aux rayons X [37].

Nos résultats suggèrent que la structure que nous avons alors observé d'un chromophore distordu est similaire à celle obtenue lors d'une illumination optique et pouvait constituer un état noir expliquant le phénomène de clignotement long, nous avons affiné à nouveau la structure initiale et après irradiation X d'IrisFP (Figure 39A,B). La géométrie du chromophore distordu suggère fortement une protonation (réversible) du pont méthine du chromophore, provoquant le

changement de configuration d'un carbone (de sp^2 à sp^3). Les structures montrent que dans l'état distordu, le carbone $C\alpha$ du chromophore s'approche à environ 3Å du groupement guanidinium de l'arginine 66 (très conservée dans les FPs) qui semble être le candidat le plus probable pour un échange de proton.

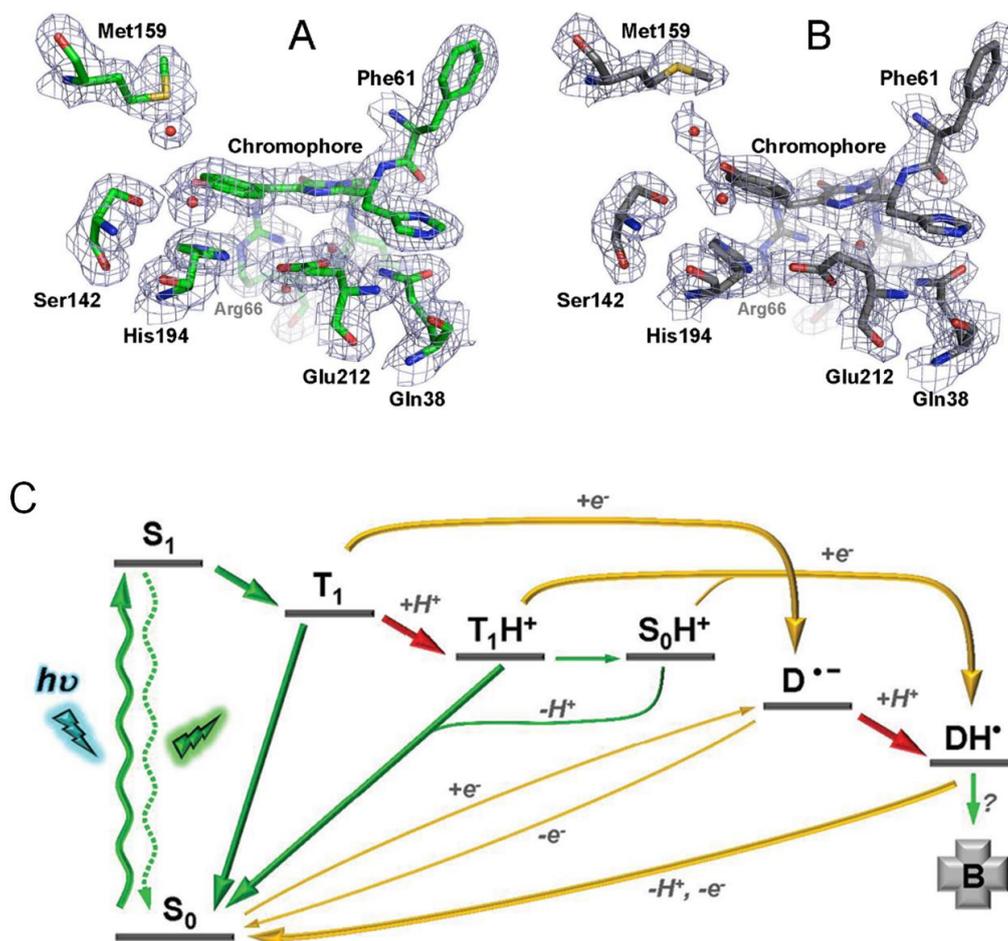


Figure 39 – Vue globale du chromophore d'IrisFP et de son microenvironnement dans la structure initiale (A) et distordue (B), contournée à 1σ par la carte de densité électronique. (C) Mécanisme proposé pour la génération d'état sombre transitoire dans IrisFP. Les flèches épaisses oranges et rouges correspondent respectivement aux étapes de transfert d'électrons et de protons dans le schéma de réaction induit par lumière visible, et les flèches vertes indiquent d'autres processus. Les flèches les plus fines oranges indiquent les processus induits par les rayons X ou, éventuellement, par des agents réducteurs forts; tandis que la flèche avec un point d'interrogation met en évidence une voie de décarboxylation potentielle. D: doublet, S: singulet, T: triplet, B: blanchi.

Nous avons ensuite appliqué des calculs de mécanique quantique et de mécanique moléculaire sur ces modèles afin de déterminer le chemin réactionnel le plus probable. Nos résultats [29, 100] permettent d'identifier deux voies possibles (Figure 39C) :

Dans la première voie, le chromophore excité de l'état S_0 à l'état S_1 passe par un état triplet T_1 par croisement intersystème (intersystem crossing, ISC). L'implication d'un transfert de proton

permet le passage subséquent dans l'état T_1H^+ et finalement le retour vers l'état fondamental protoné S_0H^+ . Cette voie résulte en un chromophore protoné sur le carbone $C\alpha$.

La seconde route requière un état doublet dans lequel un électron a été ajouté au système à l'état fondamental. Après excitation vers S_1 ou T_1 , l'état excité relaxe vers l'état fondamental radicalaire $D^{\bullet-}$ (comme déjà observé pour plusieurs marqueurs fluorescents organiques [101]). Cette voie est cohérente avec le fait que de plus en plus de mécanismes de transfert d'électrons photoinduits sont mis en évidence dans les FPs [102].

2.2. Formation d'états « noirs » des PCFPs

En analysant les comportements de clignotement de nos deux PCFPs modèles en microscopie PALM : Dendra2 et mEos2, nous avons remarqué que Dendra2 clignotait beaucoup moins que mEos2. Nous nous sommes donc intéressés à la structure des deux protéines et avons remarqué qu'une différence majeure entre l'environnement de chacun des chromophores était l'orientation de l'arginine 66, acide aminé conservé dont nous venons de parler.

La structure que j'avais obtenu de [65] montrait que la présence d'une thréonine à la position 69 chez Dendra2 interagissait avec cette arginine 66 et l'éloignait ainsi du chromophore. Ce n'était pas le cas chez mEos2 où la thréonine était remplacée par un acide aminé non chargé : une alanine ne permettant plus une interaction avec l'arginine qui était donc, comme pour IrisFP, en interaction avec le chromophore (Figure 40a).

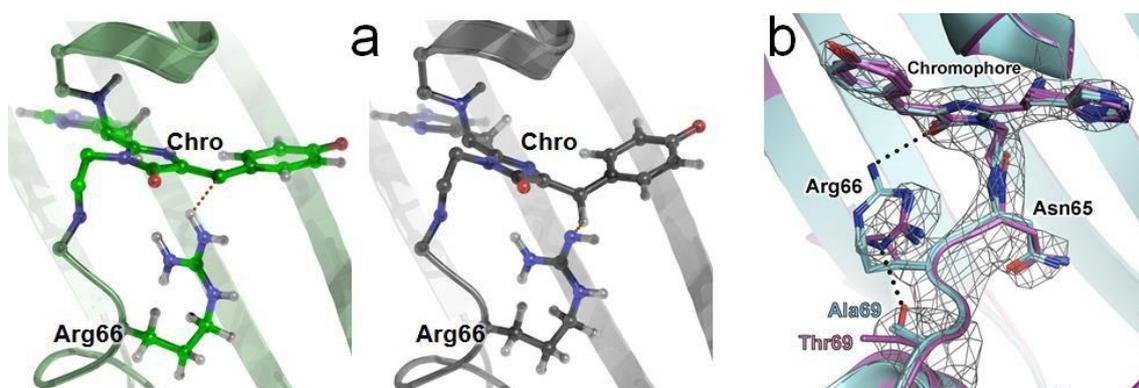


Figure 40 – Une relocalisation de l'Arg66 dans mEos2-A69T – (a) Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle de l'Arg66 dans le transfert de proton réversible avec le chromophore, menant à un état clignoté (état sombre réversible). (b) Superposition des structures affinées de mEos2 et de mEos2-A69T. Un zoom sur la région du chromophore est représenté des différentes chaînes présentes dans les unités asymétriques pour mEos2 (carbones cyan, quatre chaînes) et pour mEos2-A69T (carbones violets, douze chaînes). Une carte NCS-averaged simulated-annealing omit map contourée à 5.5σ est montrée sur le modèle de mEos2-A69T, démontrant sans ambiguïté la relocalisation reproductible de l'Arg66 loin du chromophore dans ce variant.

Comme nous avons suggéré chez IrisFP que cette position pouvait influencer l'efficacité de clignotement, nous avons entrepris de créer les mutants inversés pour chacune de ces PCFPs : Dendra2-T69A et mEos2-A69T. Les structures de ces mutants ont bien montré une orientation inversée de l'arginine 66 entre Dendra2/mEos2 et leurs mutants respectifs, tout le reste étant inchangé.

Après étude de la photophysique de nos quatre PCFPs, nous avons constaté, comme attendu, une inversion du rendement de clignotement entre les protéines parentes et leurs mutants (Figure 41, gauche). Le nombre moyen de clignotements par molécule de mEos2 (0.49) est divisé par plus de 1.4 dans son mutant mEos2-A69T (0.34) alors que pour Dendra2 (0.18) il est multiplié par plus de 2.7 chez son mutant Dendra2-T69A (0.49). A l'inverse, les rendements quantiques de photoblanchiment mesurés sont plus élevés chez mEos2-A69T et plus bas chez Dendra2-T69A par rapport à leurs parents (Figure 41, droite). Le taux élevé de photoblanchiment chez Dendra2 est probablement explicable également par l'orientation de l'arginine 66 facilitant la décarboxylation du glutamate 212, acide aminé strictement conservé avec lequel elle interagit mais il explique également que la faible propension de cette protéine à clignoter est en partie due au fait que les molécules blanchissent rapidement après avoir été photoconverties en rouge.

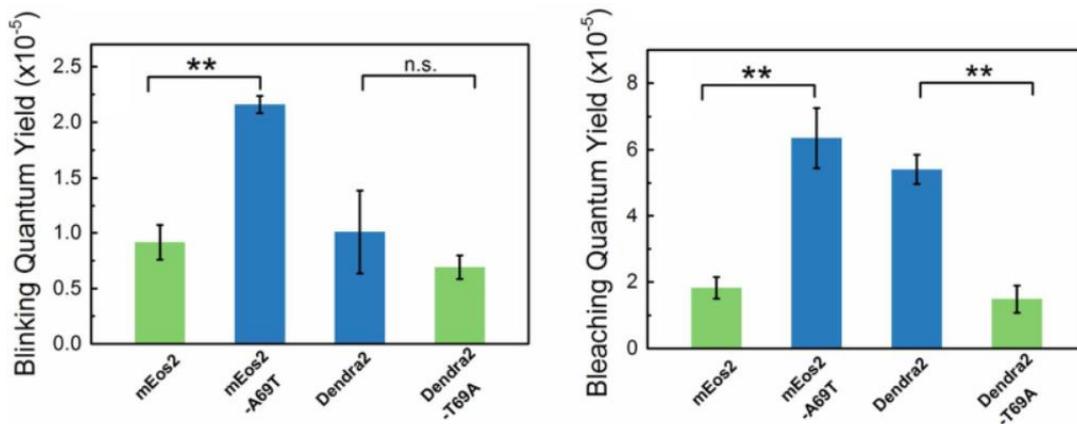


Figure 41 – Rendements quantiques de clignotement (gauche) et de photoblanchiment (droite) pour mEos2, Dendra2 et leurs mutants

Dendra2 devrait donc être privilégiée pour des expériences de comptage alors que mEos2 est souvent préférée pour des expériences où un budget photonique élevé est important. Cependant, mEos2, comme tous les membres de la famille EosFP, présente d'importants défauts d'oligomérisation à forte concentration. Ces défauts sont absents des protéines ayant l'architecture de Dendra2 et nous proposons donc notre variant Dendra2-T69A comme pouvant

avantageusement remplacer mEos2 en ce qu'il a des propriétés spectrales similaires à mEos2 tout en ayant la même faible propension que Dendra2 à oligomériser. Puisque tous nos résultats, publiés dans le Journal of the American Chemical Society [92], mettent en évidence qu'à l'inverse de Dendra2, mEos2 était fortement sujette au clignotement, nous avons poursuivi nos études sur mEos2.

2.3. Conséquence de la lumière d'excitation sur l'efficacité de photoconversion

Les PCFPs de la famille de EosFP sont très utilisées en PALM. Toutefois les mécanismes photophysiques complexes sous-jacents complexifient l'extraction d'informations quantitatives en PALM. Alors que le clignotement de la forme rouge des PCFPs provoque des artefacts de sur-comptage, une efficacité de photoconversion limitée induit à l'inverse des artefacts de sous-comptage du nombre de molécules présentes. Traditionnellement, les aspects mécanistiques de la photoconversion ont été envisagés uniquement sous illumination actinique à 405 nm. Nous avons démontré que l'illumination à 561 nm utilisée pour visualiser et pour blanchir les molécules photoconverties en rouge et qui est utilisée habituellement à très forte densité de puissance, affecte considérablement la photophysique de mEos2 dans sa forme initiale verte.

Nos mesures de fluorescence sur mEos2 montrent que le signal de fluorescence verte de mEos2 diminue sous illumination 488 nm et est restaurée sous illumination 405 nm, à l'instar des RSFPs. Alors qu'elles sont connues pour être des PCFPs et non pas des protéines fluorescentes réversiblement commutables (RSFPs), à l'échelle de l'ensemble, mEos2 et mEos4b présentent un photochromisme prononcé lorsqu'elles sont irradiées par un laser cyan (488 nm) ou vert (561 nm), *on*→*off* ou un laser violet (405 nm), *off*→*on*. Ce phénomène est similaire chez ses prédécesseurs comme mEos3.2 (Figure 42A). Lorsque l'on compare la cinétique de photocommutation de mEos4b avec des protéines réputées être réversiblement commutables, on se rend compte qu'elle est très similaire à celle de protéine fluorescente verte comme mGeosM [103] pourtant publiée en tant que RSFP, mais bien plus lente que les cinétiques d'extinction des RSFPs moyenne Dronpa [23] et surtout de RSFPs rapides comme IrisFP [66] (Figure 42B) ou rsEGFP2. Dans des conditions identiques d'illumination et sur des courts temps d'illumination, on constate que la différence de contraste de photocommutation entre une PCFP (sous forme verte) comme mEos4b

et une RSFP rapide comme rsEGFP2 et qu'il faut des temps d'illumination bien plus longs ou des densités de puissance bien plus fortes pour parvenir à des contrastes similaires pour mEos4b (Figure 42C). Nos expériences montrent également un taux de photofatigue beaucoup plus fort pour les PCFPs que pour les RSFPs.

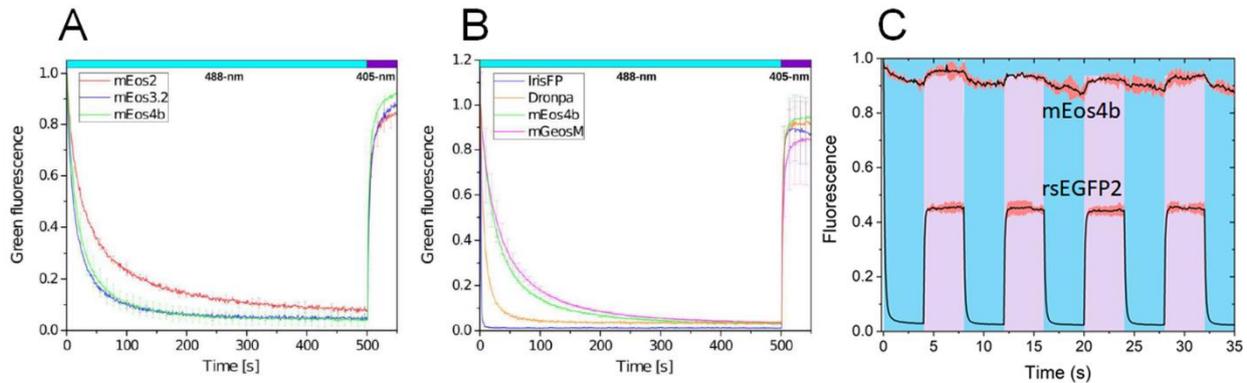


Figure 42 – Comparaison des cinétiques de commutation des PCFPs mEos2, mEos3.2 et mEos4b (A) et de mEos4b avec les RSFPs mGeosM, Dronpa et IrisFP (B), illuminations 488 nm (1 W/cm^2) et 405 nm (0.04 W/cm^2). Comparaison de cinétiques de photocommutation entre rsEGFP2 (20.8 mg/mL) et mEos4b (forme verte, 17 mg/mL) en solution entre deux lamelles, illuminés par laser 488 nm (cyan, 1.8 W/cm^2) et 405 nm (violet, 0.1 W/cm^2), issu de mesures en triplicats, 40 pulses de 5 ms de chaque laser par cycle.

Nous attribuons cette photocommutation du signal de fluorescence à la formation d'un ou plusieurs états noirs formés depuis la forme verte sous illumination 488 nm. A l'échelle de la molécule unique, ce phénomène se traduit par une proportion de molécules importante formant des états noirs de longue durée (mesurés comme une partie importante que passe la molécule dans un état *off*).

De façon plus surprenante, sous illumination 561 nm, le même phénomène est visible que ce soit en protéine purifiée ou en cellule (Figure 43A). La sensibilité de la forme verte à une longueur d'onde aussi longue (561 nm) peut paraître déconcertante mais est explicable par l'effet dit de queue d'Urbach : processus dans lequel une molécule se situant dans un état vibrationnel excité peut être pompée vers un état électronique excité. La formation d'états noirs dans la forme verte de mEos2 sous illumination 561 nm, longueur d'onde normalement utilisée pour exciter la forme rouge lors d'expériences PALM, va retarder la photoconversion vers le rouge. mEos2, dans une matrice de PVA, subit une perte d'autant plus prononcée sous lumière 561 nm additionnelle quand la puissance de cette dernière est forte. Nous constatons le même phénomène chez mEos4b, version plus récente de la famille EosFP (Figure 43B, haut), mais pas avec Dendra2 (Figure 43B, bas) qui présente donc une propension bien plus faible à la formation d'états noirs sous la forme verte mais aussi sous la forme rouge comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Ces

résultats suggèrent d'utiliser Dendra2 ou ses variants [92] plutôt qu'une PCFP de la famille EosFP lors d'expériences quantitatives.

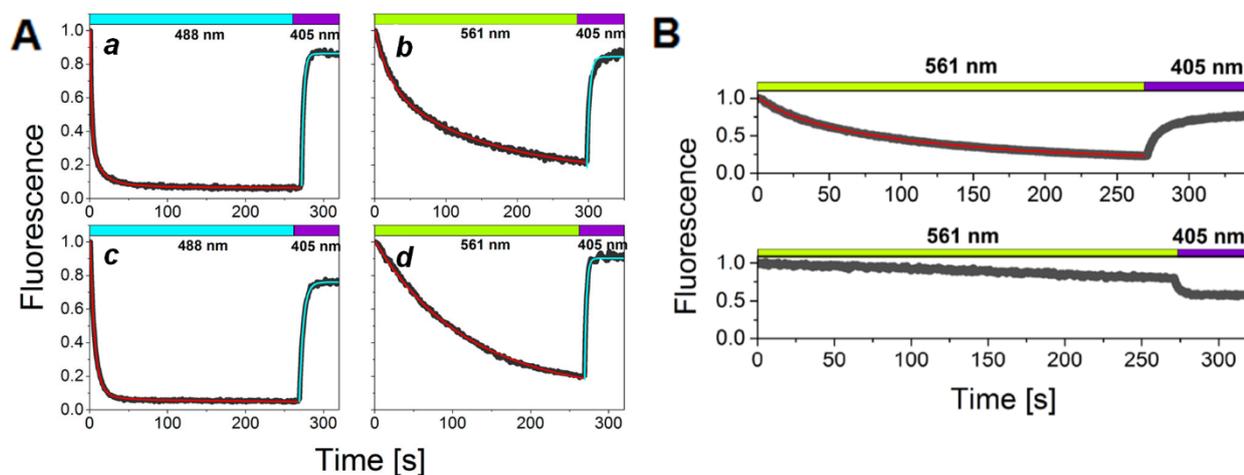


Figure 43 – Influence de la lumière 561 nm sur la formation d'états noirs de mEos2. (A) Fluorescence d'ensemble montrant une commutation *on*→*off* de la fluorescence verte de mEos2 sous illumination 488 nm (a,c) ou 561 nm (b,d) sous forme purifiée en film PVA (a,b) ou exprimée en *E. coli* BL21 (c,d). Cette commutation est réversible sous illumination faible à 405 nm. (B) Observation du même phénomène que mEos2 avec mEos4b (haut) mais pas avec Dendra2 (bas), démontrant une propension bien plus faible chez Dendra2 à la formation d'états noirs.

Nos données, publiées dans le *Journal of Physical Chemistry Letters* [79], montrent qu'une forte illumination à 561 nm entraîne dans la forme verte de mEos2 la formation de deux états noirs distincts, l'un revenant thermiquement (sans illumination) vers l'état initial fluorescent et l'autre étant rapidement dépeuplé vers l'état fluorescent par une illumination faible à 405 nm. Plus l'illumination à 561 nm est forte, plus la formation d'états noirs à partir de la forme verte initiale est rapide, ce qui peut expliquer le taux de photoconversion particulièrement bas chez mEos2 (~60%). De plus, cette sensibilité à la lumière 561 nm est un problème majeur ignoré jusqu'ici pour les expériences de PALM où les densités de puissance utilisées sont très fortes afin de collecter rapidement les photons. Cette sensibilité doit donc être gardée à l'esprit lors d'expériences PALM.

Des résultats ultérieurs de notre équipe sur mEos4b confirment des résultats complémentaires sur mEos4b. Sous illumination à 488 nm, la proportion d'états *off* est réduite dans la forme rouge de mEos4b puisque l'illumination participe à faire revenir les états noirs formés par l'illumination à 561 nm mais lors de fortes illuminations 488 nm, le photoblanchiment de la forme verte contrebalance cette réduction d'états *off* en limite l'efficacité de photoconversion. Étonnamment, alors qu'il est coutumier d'utiliser également d'assez fortes densités de puissance à 405 nm, l'étude [104] montre également une diminution de l'efficacité de photoconversion via la formation d'états noirs d'autant plus forte que la densité de puissance 405 nm est importante. Il convient donc de

garder à l'esprit d'utiliser des densités de puissance 405 nm, 488 nm et 561 nm modérées ($<10 \text{ W/cm}^2$) avec les PCFPs lors de mesures PALM.

2.4. Etats noirs de longue durée de vie : de l'isomérisation chez les PCFPs

Lors d'illumination de cristaux de mEos4b (obtenus par le Dr. Elke de Zitter) sous forme verte ou sous forme rouge (après photoconversion), nous avons mesuré en temps réel les spectres et congelé les cristaux afin d'espérer piéger les états noirs transitoirement formés lors de cette illumination (Figure 44A,B). Les jeux de données obtenus au synchrotron européen (ESRF, Grenoble) par cristallographie aux rayons X ont permis d'obtenir trois structures : la structure de la forme verte (PDB : 6GOY), la structure de la forme rouge (PDB : 6GP0) et la structure de la forme rouge avec un état noir de longue durée (PDB : 6GP1). Ces structures nous ont révélé des réarrangements majeurs du chromophore et de son environnement (Figure 44C,D).

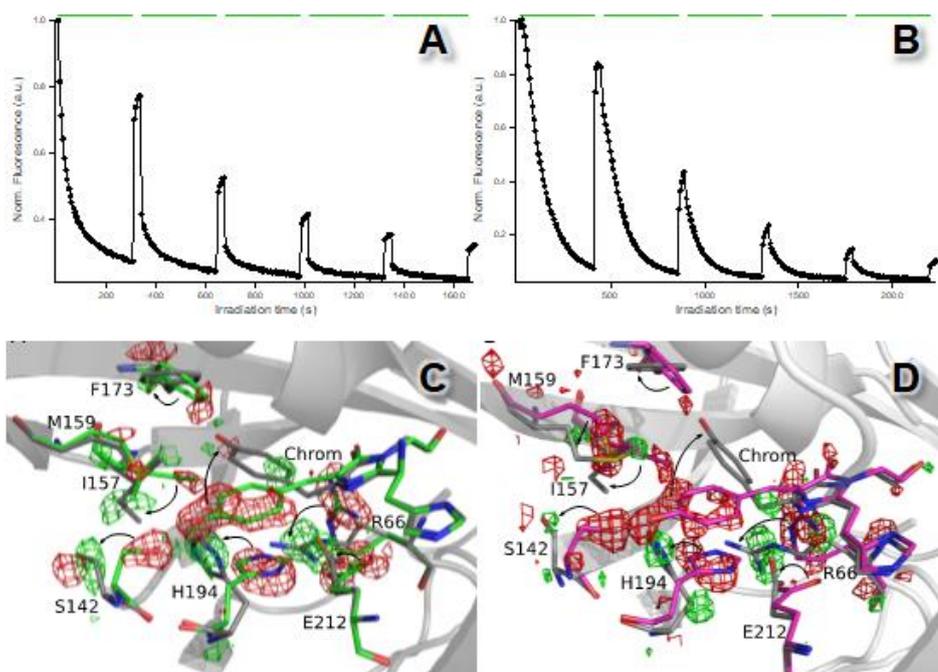


Figure 44 – Comportement de photocommutation obtenue en suivant le signal de fluorescence sur un échantillon cristallin de mEos4b sous son état initial vert (A) ou photoconverti rouge (B). Structures verte (C) et rouge (D) du chromophore et de son environnement avec la réorganisation du chromophore et des acides aminés voisins lors d'isomérisation frustrée (gris)

De façon intéressante, les mêmes acides aminés déjà identifiés comme étant impliqués lors d'isomérisation *Z-E* de chromophores de protéines fluorescentes réversiblement commutables (RSFPs) ont subi des réarrangements : Arg66, Ser142, Ile157, Phe173, His194 et Glu212.

Cependant, mEos4b n'étant pas conçue pour être une RSFP, son architecture n'est pas adaptée à l'isomérisation *Z-E* du chromophore et nous observons un état nouveau du chromophore ayant amorcé une isomérisation mais restant bloqué dans une conformation que nous avons qualifié « isomérisation frustrée ». Ces résultats suggèrent que l'isomérisation est une réaction naturelle du chromophore excité, plus ou moins observable chez les protéines fluorescentes existantes à cause de l'environnement du chromophore contraignant ces changements de conformation.

Un des changements les plus notables se fait à la position 173, que nous avons déjà identifié il y a 15 ans comme étant crucial pour permettre l'isomérisation du chromophore de EosFP dans notre variant photocommutable nommé IrisFP [66] ainsi que plus tard dans un mon variant photocommutable de Dendra2 appelé NijiFP [70]. Ici, Phe173 se tourne lors de l'essai avorté d'isomérisation, laissant à penser qu'il s'agit d'un acide aminé clé permettant de stabiliser le chromophore et lui permettant donc d'entrer dans un état noir de longue durée de vie.

Sur la base de nos précédents travaux, nous pouvons dire qu'au moins trois types de clignotements de nature et de vitesse différentes semblent coexister dans les protéines fluorescentes :

- Un très rapide (μs - ms) associé à la protonation de la fonction phénol du chromophore
- Un rapide (ms) associé au passage à l'état triplet du chromophore et à la formation d'états radicalaires en découlant, menant à des états distordus réversiblement du chromophore
- Un lent (ms - s) associé à l'isomérisation frustrée ou non du chromophore

Ce dernier est le plus problématique car il correspond aux temps typiques d'acquisition des images en microscopie PALM et est délétère pour la détermination quantitative de données, en particulier le comptage de molécules individuelles et le suivi de diffusion de molécules uniques en microscopie de suivi de particules uniques (single particle tracking PALM, sptPALM).

Cette étude, publiée dans Nature Methods [105], nous a surtout permis de démontrer que la sensibilité de la forme rouge à la lumière 561 nm (utilisée pour exciter la fluorescence) produit également une isomérisation frustrée qui peut être contrebalancée par absorption de lumière à 488 nm qui résulte en un retour vers la forme fluorescente rouge. En procédant à une illumination 488 nm faible concomitante à l'illumination 561 nm, nous pouvons ainsi maximiser la probabilité d'existence de la forme fluorescente et ainsi considérablement augmenter la longueur des traces sptPALM (Figure 45).

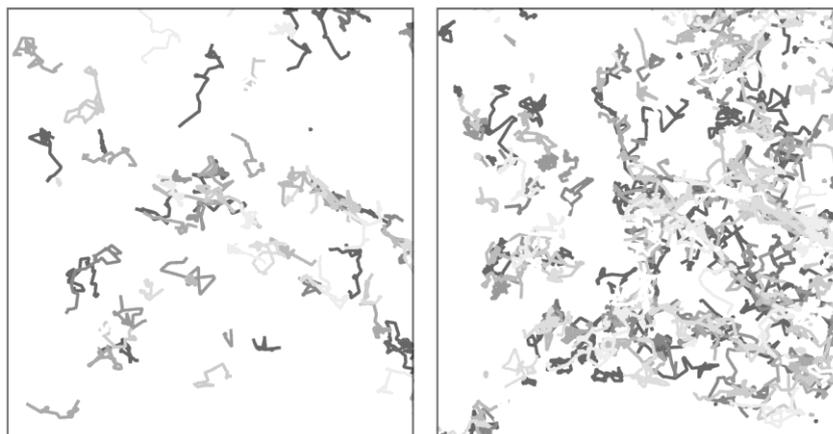


Figure 45 – Mesures de suivi (> 1 s) de molécules uniques de mEos4b rouge en absence (gauche) et en présence (droite) d'illumination 488 nm faible (4.8 W/cm^2) concomitante à l'illumination d'excitation à 561 nm. Les traces longues sont plus nombreuses en présence d'illumination 488 nm qui fait revenir le chromophore sous sa forme non isomérisée.

Les structures 3D des états *off* de mEos4b sous sa forme verte ou rouge sont très similaires à l'isomérisation *on-off* chez IrisFP (Figure 46A). Dans l'étude précédente, nous avons déjà observé la possibilité de l'isomérisation de mEos4b rouge sous irradiation verte (561 nm) que nous avons qualifié de “frustrée” par l'environnement du chromophore qui, contrairement à celui d'IrisFP, n'était pas adapté à maintenir un état stable éteint. Les modèles structuraux issus d'affinement d'ensemble, nous montrent, qu'en effet, le chromophore sous sa forme commutée est très instable mais également que le glutamate 212 est très instable dès la forme verte (Figure 46B).

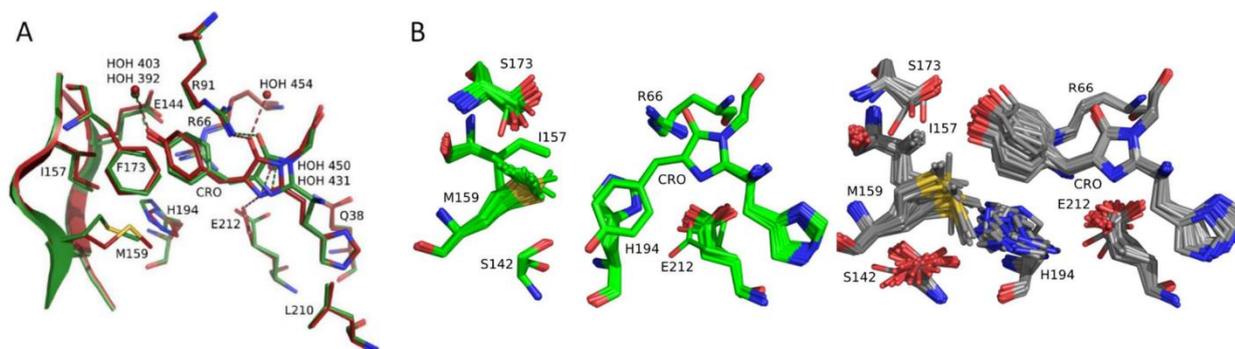


Figure 46 – (A) Comparaison des structures *off* de mEos4b verte et rouge. (B) Superposition des modèles d'affinement d'ensemble de mEos4b vert dans son état *on* et son état *off*

Cette dynamique bien plus forte de mEos4b, expliquée par un microenvironnement moins bien adapté, en particulier un nombre de liaisons hydrogène moindre pour stabiliser la forme éteinte, corrèle bien avec la moins bonne efficacité à photocommuter vers la forme éteinte qu'IrisFP ainsi que son moins bon contraste entre formes allumées et éteintes.

Le clignotement lent menant à des états noirs des PCFPs en microscopie de molécules uniques est donc dû au phénomène de photoisomérisation *Z-E* observé chez les RSFPs. Nous avons donc étudié ce phénomène de commutation entre mEos4b et IrisFP, les deux protéines dérivant du même ancêtre EosFP, en combinant cristallographie aux rayons X, spectroscopie Raman et calculs de dynamique moléculaire. La spectrométrie Raman (Figure 47) sur les formes verte et rouge de mEos4b, soit allumées soit éteintes, nous a permis d'obtenir des spectres qui sont similaires à ceux que nous avons déjà obtenu sur IrisFP [106], permettant l'attribution des pics. Comme attendu, les spectres des formes éteintes contiennent encore des pics résiduels des formes allumées et montrent que le chromophore est protoné sous sa forme éteinte, comme dans le cas d'IrisFP. Ces pics sont également bien plus larges que pour les formes allumées, ce que nous attribuons à l'instabilité et aux diverses conformations adoptées des formes éteintes.

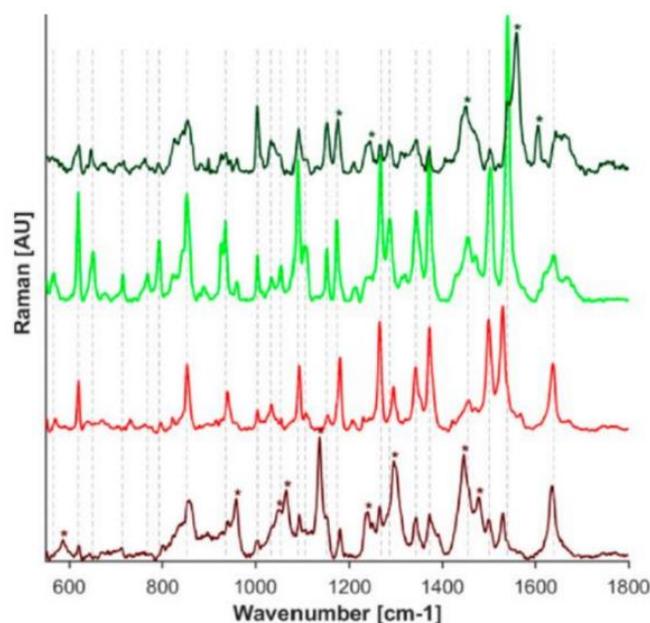


Figure 47 – Spectres Raman de mEos4b sur cristaux à 100K (excitation 785 nm, pH 74.). Les formes vertes et rouges sont représentées par les couleurs correspondantes, plus vives pour les formes allumées et plus foncées pour les formes éteintes. Les astérisques indiquent les positions de bandes associées aux états éteints vert et rouge.

Enfin, les simulations de dynamique moléculaire de mEos4b et IrisFP dans leurs formes éteintes nous montrent que le chromophore alterne rapidement entre deux conformations par rotation des deux axes diédraux représentés en rouge et noir chez mEos4b (Figure 48A). Cette alternance n'est pas observée IrisFP, suggérant un chromophore moins attaché et plus flexible chez mEos4b. La combinaison des données cristallographique et de mécanique moléculaire nous éclaire sur le fait que le chromophore de mEos4b sous sa forme *off* alterne entre deux

conformations : soit l'hydroxybenzylidène interagit avec le glutamate 144 voisin (62% du temps), soit avec une molécule d'eau (38% du temps) (Figure 48B)

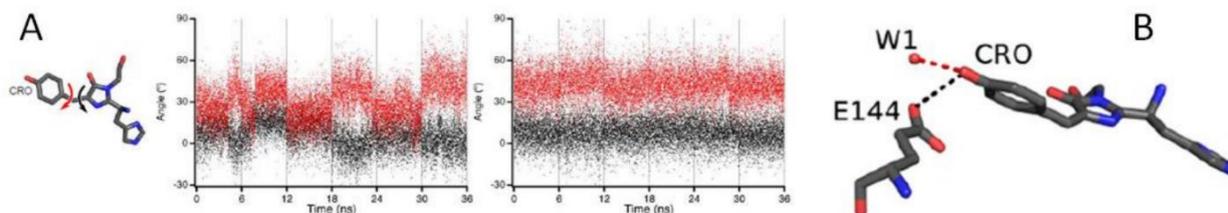


Figure 48 – Simulation de dynamique moléculaire de mEos4b et IrisFP. (A) Evolution des rotations des angles diédraux notés par des flèches chez mEos4b (gauche) et IrisFP (droite). (B) Structure du chromophore de mEos4b montrant les interactions alternatives

Ainsi donc, la formation d'un état noir principal, résulte de l'isomérisation *Z-E* du chromophore associé à sa protonation, de façon similaire au cas des RSFPs. Mais à l'inverse d'IrisFP, par exemple, mEos4b ne peut être complètement éteint, peut-être à cause d'une plus forte flexibilité du chromophore dans son état *off*, d'où une cinétique bien plus lente et un contraste plus bas chez mEos4b. Nous attribuons cela à une différence plus forte entre le nombre de liaisons hydrogène possibles reliant le chromophore à son environnement entre les états *on* et *off* chez mEos4b ($\Delta H\text{-bonds}=3.5$) que IrisFP ($\Delta H\text{-bonds}=2.0$).

Il est intéressant de constater que la corrélation entre ce paramètre et le ratio des rendements quantiques de commutation *off*→*on* et *on*→*off* permet d'identifier deux groupes. Les protéines fluorescentes photocommutant mal ou lentement ont un $\Delta H\text{-bond}$ et un ratio de rendement quantiques élevés et inversement pour les protéines fluorescentes photocommutables les plus efficaces. Cet état de fait est mal compris et nécessite de plus amples études mais pourrait permettre de contrôler de façon rationnelle les phénomènes de commutation et de clignotement.

Ce travail, publié dans le Journal of the American Chemical Society [107] et qui a débuté par l'obtention de la structure de l'état noir de longue durée de mEos4b sous sa forme verte (6GOZ) ne paraissait pas avoir d'intérêt très fort au départ mais s'est révélé être de première importance dans notre activité. Il a permis d'appréhender les phénomènes de photoisomérisation réversibles chez les protéines photoconvertibles comme étant responsables d'états noirs de longue durée dès la forme initiale verte. Ces phénomènes altèrent fortement la qualité des images et du comptage en microscopie de fluorescence sur molécules uniques. Ces résultats nous font également relativiser les limites attribuées trop strictement entre les différents types de PTFPs, et en

particulier entre PCFPs et RSFPs. Ils nous enseignent aussi que la photophysique des protéines fluorescentes est bien plus complexe qu'on pouvait le penser et permettent d'aborder ces photophysiques sous un angle plus unificateur. En identifiant quels acides aminés sont impliqués dans les interactions avec le chromophore permettant son isomérisation frustrée, nous avons désormais les clefs en main pour designer des variants de protéines photoconvertibles au photochromisme/clignotement lent réduit et donc présentant moins d'états noirs.

3. Hétérogénéité conformationnelle et conséquences sur les efficacités d'isomérisation et de photoconversion

En poursuivant nos études par RMN des protéines fluorescentes phototransformables et après avoir étudié la dynamique des RSFPs (voir "*Apports de la RMN à l'étude de la dynamique de rsFolder*", p. 22), nous avons souhaité étudier le mécanisme de photoconversion des PCFPs (toujours débattu, comme nous l'avons vu p.39) par RMN, en prenant comme protéine de référence mEos4b.

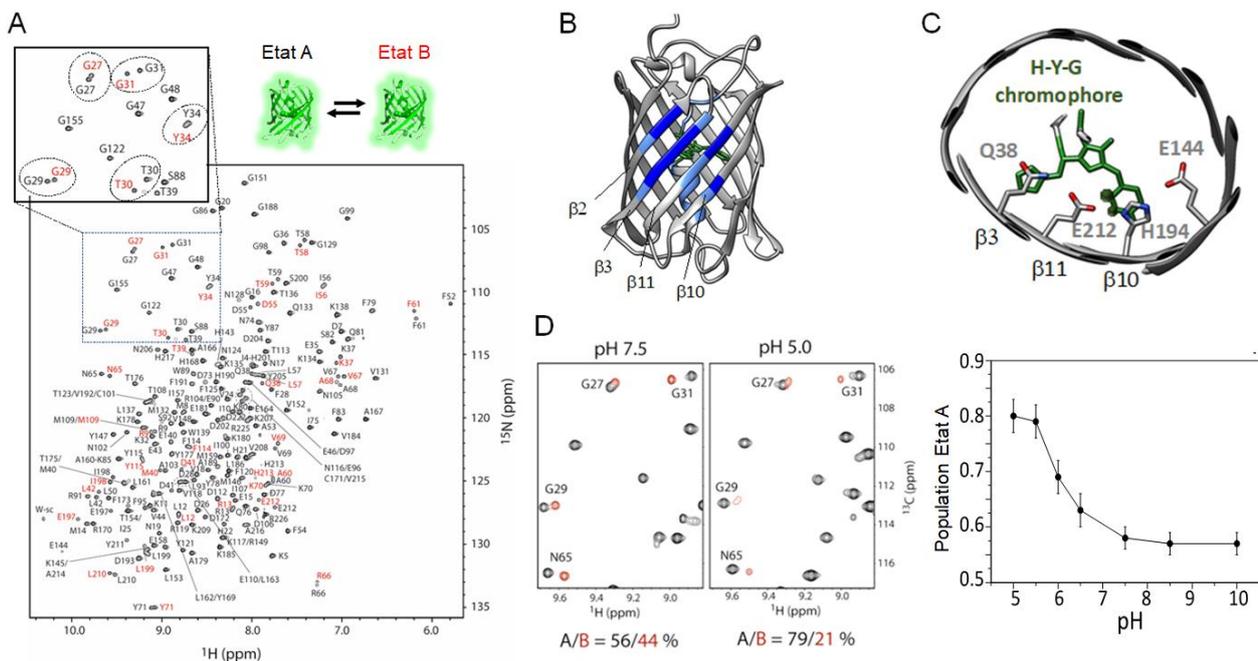


Figure 49 – Hétérogénéité de l'état vert de mEos4b. (A) Spectre de corrélation ^1H - ^{15}N RMN montrant les pics correspondant à l'état B (rouge). (B) Les acides aminés qui montrent les plus gros changements sont montrés en bleu sur la structure cristallographique de mEos4b. (C) Zoom sur le chromophore et le motif Q38-E212-H194-E144 le stabilisant. Les sphères noires indiquent les atomes qui présente un doublement de pics ^1H - ^{13}C dans les spectres RMN, localisés sur His62. (D) Les formes A et B dépendent du pH, la forme A étant majoritaire à pH acide.

3.1. Mesures à l'état vert de mEos4b

Les spectres RMN de mEos4b sous forme verte adoptent clairement deux conformations pour nombre d'acides aminés (voir pics doublés Figure 49A) alors que nous n'observons qu'une seule conformation en cristallographie mais très agitée. Les plus grosses modifications sont situées sur une zone localisée du tonneau : les brins beta 2, 3 10 et 11 (Figure 49B) et l'histidine (His62) du chromophore leur faisant face (Figure 49C). Le ratio entre les deux états dépendant du pH, nous appelons A et B ces deux états par analogie avec les états neutre (A) et anionique (B) du chromophore puisque la forme A est d'autant plus peuplée à bas pH. A pH 7.5 et au-delà, la proportion des deux états est de 56% de A et 44% de B alors qu'à pH 5 l'état A représente 80% de la population (Figure 49D). Cette hétérogénéité est également visible chez mEos4b-V69T et PCStar, deux autres membres de la famille EosFP également étudiés, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un phénomène commun aux membres de cette famille.

3.1.1. Création d'un mutant représentant l'état A : mEos4b-E212Q

Un gros déplacement chimique (2.1 ppm) est notable pour le glutamate 212 sous sa forme A ou sous sa forme B (Figure 50A), ce qui suggère à pH physiologique une hétérogénéité de ce glutamate dans son état protoné (état A) et anionique (état B), générant potentiellement l'hétérogénéité globale de la protéine. Ces résultats confirment l'instabilité du Glu212 que nous avons observé par affinement d'ensemble (Cf. [107] et Figure 46B). Afin de tenter de supprimer l'origine de cette hétérogénéité, nous avons donc muté le glutamate 212 pour une glutamine isostérique (mEos4b-E212Q) car nous suspectons son état de protonation d'être responsable de son instabilité. L'étude RMN du variant E212Q montre que ce dernier n'existe que sous forme protonée (forme A) et qu'il n'y a donc plus d'hétérogénéité de la protéine. En effet, les pics doublés dans la protéine sauvage (WT) sont des pics uniques dans le mutant (E212Q) (Figure 50B).

Nous pouvons donc en conclure que l'état A correspond à une forme où le glutamate 212 est neutre (E212^{OH}) et l'état B correspond à une forme où le glutamate 212 est négatif (E212^{O⁻}). La contrepartie de cette homogénéité est que la protéine se replie mal, est très longue à maturer et que la photoconversion est abolie dès que le Glu212 strictement conservé est muté, ce qui est connu [60, 108].

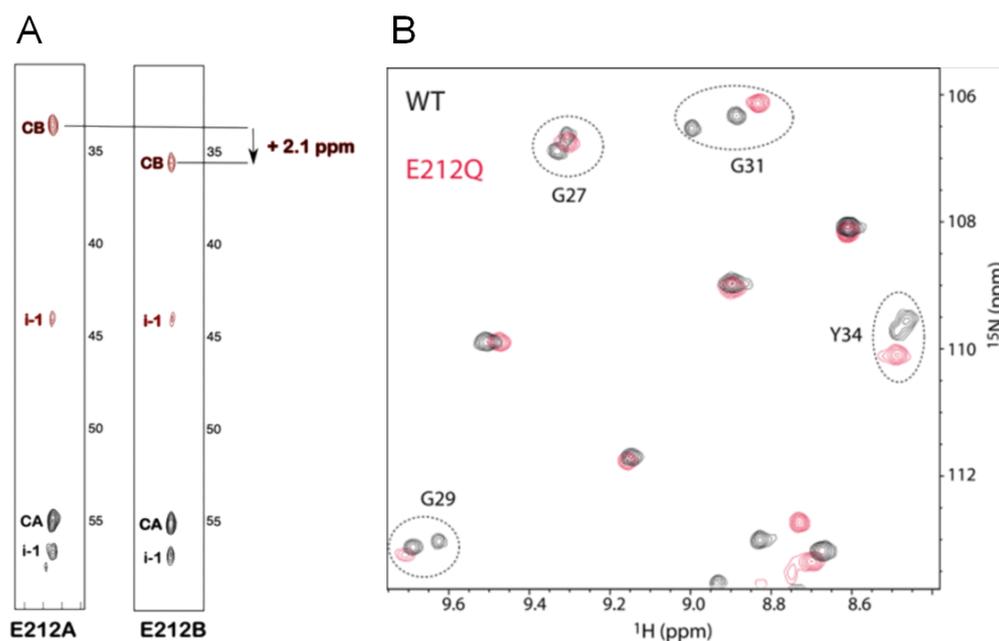


Figure 50 – (A) Spectre de corrélation 3D extrait aux fréquences ^{15}N de E212 dans les états A et B. Une différence de déplacement chimique de 2.1 ppm est observée pour le site CB de E212. (B) Spectre de corrélation ^1H - ^{15}N RMN montrant les pics doublés correspondant aux états A et B de mEos4b (WT, noir) et les pics simples correspondant à l'état A de mEos4b-E212Q (rouge)

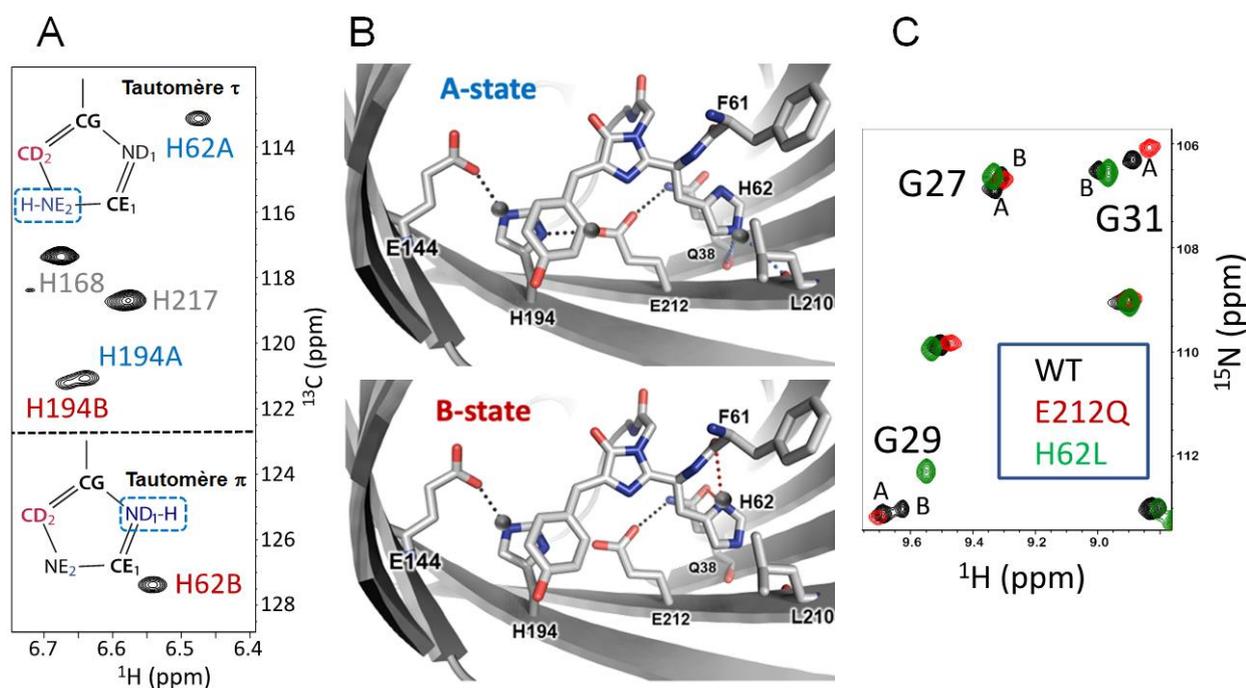
Parmi les cinq cycles imidazole détectés par RMN, deux histidines importantes : His62 (faisant partie du chromophore) et His194 faisant partie du motif Q38-E212-H194-E144 (Figure 49C) ont également été vues dans deux états A et B et leur tautomérie a été déduite (Figure 51A). Il en ressort que l'histidine 194 adopte dans cette forme *on* le tautomère $\text{N}_{\epsilon 2}\text{-H}$. L'histidine 62 du chromophore adopte quant à elle deux conformations, peuplant majoritairement le tautomère τ ($\text{N}_{\epsilon 2}\text{-H}$) dans l'état A et le tautomère π ($\text{N}_{\delta 1}\text{-H}$) dans l'état B. L'état A peut donc être décrit comme étant caractérisé par le couple $\text{E212}^{\text{OH}}\text{-H62}^{\epsilon 2\text{H}}$ tandis que l'état B est caractérisé par le couple $\text{E212}^{\text{O}^-}\text{-H62}^{\delta 1\text{H}}$ et on peut également déduire les structures les plus probables du chromophore et de son environnement avec les liaisons hydrogène dans les états A et B (Figure 51B).

De façon intéressante, alors que le pic de corrélation ^1H - ^{15}N correspondant à l'état B de His62 semble peu sensible à la température, le pic correspondant à l'état A de His62 (qui est déjà plus faible que le pic de l'état B) diminue par phénomène d'élargissement de raie quand la température baisse. Le même phénomène d'élargissement de raie est visible dans le couplage ^1H - ^{13}C du cycle imidazole de His62. Ceci peut s'expliquer par un échange conformationnel rapide entre deux (ou plus) états de protonation suggérant que cet état est bien plus dynamique que l'état B. Dans la structure cristallographique de mEos4b, les états A et B de His62 semblent confondus en une

moyenne où les distances entre les accepteurs d'hydrogènes et H62-N_{ε2} (état A) ou H62-N_{δ1} (état B) sont un peu trop longues pour être compatibles avec la formation de liaisons hydrogènes.

3.1.2. Création d'un mutant représentant l'état B : mEos4b-H62L

De façon similaire à la mutagenèse de E212Q où nous avons remplacé le glutamate par la glutamine non déprotonable, nous avons voulu inspecter l'influence de la protonation de His62 sur la répartition des états A et B en préparant un mutant H62L, inspiré de la protéine Skyln-NS [109] et que nous espérons donc être toujours fluorescent mais bien sûr non photoconvertible. Les données RMN montrent que, de façon similaire au mutant E212Q, le mutant H162L ne présente plus le doublement des pics observé chez mEos4b parent à la différence que cette fois la majorité des pics montrent une protéine dans l'état B (Figure 51C).



3.2. Conséquences sur la photocommutation à l'état vert

Comme discuté auparavant (voir p. 71), mEos4b subit une isomérisation *Z-E* lors de son illumination à 488 nm et nous nous sommes demandés si l'hétérogénéité observée à l'état *on* était conservée ou non à l'état *off* ainsi que les différences de protonation de Glu212 et His62. A

nouveau, le spectre RMN montre deux conformations de l'état *off*. Les assignements des états A et B sous forme *on* permettent d'attribuer à l'état *off* les pics à des proportions relatives de 45% pour l'état A et 55% pour l'état B. Une dépendance au pH similaire à celle de l'état *on* est observée (faible au-delà de pH 7 et forte à pH plus acide) et les plus grandes variations sont dans la même région du tonneau β que dans la Figure 49A. A la différence de l'état *on*, le couplage ^1H - ^{13}C montre un doublement des pics pour le carbone β du pont méthine se trouvant dans la structure cristallographique proche du Glu212 après l'isomérisation du chromophore (Figure 52A). Les deux mêmes états A et B de l'histidine 62 sont observés tandis que l'histidine 194 passe d'une tautomérie $\text{N}_{\epsilon_2}\text{-H}$ dans l'état *on* à une tautomérie $\text{N}_{\delta_1}\text{-H}$ dans l'état *off*. Enfin, les mutants E212Q et H62L montrent, tout comme pour l'état vert une abolition de l'hétérogénéité de mEos4b dans la forme *off* (Figure 52B). Nos résultats montrent donc que dans la forme *off*, l'état protonation/déprotonation de Glu212 et de His62 observé dans la forme *on* est conservé, bien que déplacé plus en faveur de l'état B ($\text{E212}^{\text{O}^-}\text{-H62}^{\delta_1\text{H}}$).

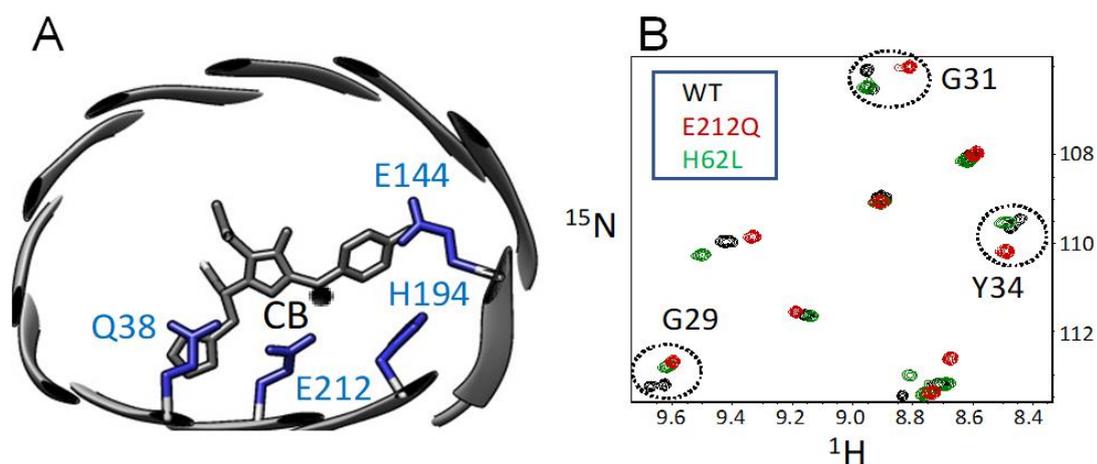


Figure 52 – (A) Zoom sur la structure du chromophore *E* et du motif Q38-E212-H194-E144 dans le tonneau de mEos4b à l'état *off*. Le rond noir marque le site CB du pont méthine qui montre un doublement de pic. (B) Spectres ^1H - ^{15}N de l'état *off* de mEos4b (WT, noir), de mEos4b-E212Q (rouge) et mEos4b-H62L (vert). Le doublement du pic observé pour les acides aminés G29, G31 et Y34 chez mEos4b n'est pas observé chez les deux mutants.

Lors d'une illumination par un laser 405 nm directement dans l'aimant, nous voyons l'état B de la forme verte augmenter au détriment de l'état A, passant de 43% (dans le noir) à 50% (à 3 mW/cm^2) puis 70% (à 25 mW/cm^2) et n'évolue que peu, jusqu'à environ 80% à forte intensité (250 mW/cm^2). Ceci démontre que dès de faibles intensités de 405 nm l'état excité de la protéine favorise l'état B ($\text{E212}^{\text{O}^-}\text{-H62}^{\delta_1\text{H}}$) mais que même à des fortes intensités comme celles utilisées en PALM, l'état A existe toujours.

Sur des temps courts d'illumination à 405 nm avec une intensité de 25 mW/cm², les pics correspondant à l'état rouge de la protéine sont limités. Nous avons donc décidé de ces paramètres d'illumination pour suivre spectroscopiquement la cinétique de commutation on-off de la protéine à partir d'un échantillon conservé dans l'obscurité (57% état A / 43% état B) et lors de son deuxième cycle (après retour photoactivé à 405 nm) où, comme nous venons de le voir, l'équilibre a été déplacé vers l'état B (30% état A / 70% état B).

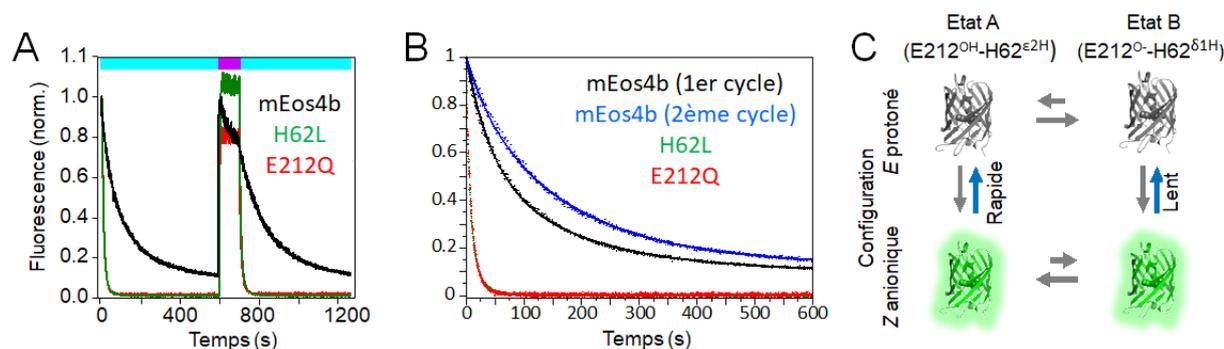


Figure 53 – (A) Intensité de fluorescence de mEos4b, mEos4b-E212Q et mEos4b-H62L mesurée sous illumination 488 nm (cyan) et 405 nm (violet) selon le schéma indiqué en haut (B) Superposition des deux premiers cycles de photocommuration on-off pour mEos4b (1^{er} cycle : noir, 2^{ème} cycle : bleu), et les mutants E212Q (rouge) et H62L (vert). (C) Modèle de photocommuration proposé pour mEos4b vert.

Nous remarquons immédiatement qu'à la différence de leur parent mEos4b, les mutants H62L et E212Q sont bien plus rapides à photocommuter vers leur forme *off*, ont un bien meilleur contraste (>200) et qu'ils sont assez stables sous illumination 405 nm (Figure 53A). Nous avons déjà observé cette corrélation entre vitesse de photocommuration et fort contraste [55, 107]. De la même façon, nous avons pu déduire que la plus vitesse de photocommuration de la protéine dans l'état A était environ 4 fois plus rapide que dans l'état B et corrélée à un meilleur contraste (plus faible résiduel de fluorescence).

Par ailleurs, la superposition des deux premiers cycles pour chacune des protéines ne montre aucune différence notable entre les mutants E212Q et H62L mais pour mEos4b, la cinétique du deuxième cycle est ralentie par rapport au premier cycle (Figure 53B). Le fait qu'aucune différence entre le premier et le deuxième cycle n'est notée pour les deux mutants de mEos4b (qui, pour rappel peuplent chacun essentiellement un seul des deux états A ou B) confirme que la différence entre les cinétiques est bien due au déséquilibre des états A/B sous illumination 405 nm. Si on laisse un délai de relaxation thermique permettant le retour de l'état B vers l'état A, les cinétiques deux cycles de mEos4b redeviennent identiques. Les résultats nous permettent de proposer le modèle de photocommuration présenté en Figure 53C.

3.3. Conséquences sur la photoconversion

Nous avons enfin étudié la photoconversion du vert au rouge en illuminant notre protéine dans l'aimant à des densités de puissance 405 nm ne dépassant pas 25 mW/cm², comme précédemment. A cette intensité, la photoconversion se produit suffisamment lentement pour pouvoir être étudiée en temps réel par RMN. De nombreux pics subissant un décalage entre la forme verte et la forme rouge, la disparition des pics correspondant à la forme verte et l'apparition des pics correspondant à la forme rouge pour ces différents acides aminés permettent de mesurer des cinétiques de photoconversion.

Durant la photoconversion, les cinétiques de décroissance des états A et B sont identiques, ce qui est cohérent avec le fait que l'échange entre les états A et B est bien plus rapide (échelle de la minute) que la vitesse de photoconversion (échelle de l'heure). A une densité de puissance de 3 mW/cm², l'efficacité de photoconversion mesurée par l'intégration des pics RMN monte jusqu'à 50% alors qu'elle inférieure à 30% pour une densité de puissance de 25 mW/cm² (Figure 54A). La diminution du signal RMN suggère la disparition d'espèces par formation d'aggrégats possiblement suite à la dénaturation de protéines photoblanchies ou chauffées par la forte illumination 405 nm. Cela suggère que plus il y a d'état B, moins la photoconversion est efficace. Cela est en faveur d'un modèle où la photoconversion est favorisée dans la population à l'état A et où le photoblanchiment / la photodégradation est favorisé dans la population à l'état B (Figure 54B).

Nos données montrent donc que la photoconversion est favorisée dans la protéine à l'état A (E212^{OH}-H62^{ε2H}) et puisque la photoconversion s'initie à partir de la forme protonée du chromophore, il est probable que la conformation *Z* du chromophore vert protoné favorise l'état A. Il est probable, à la lumière de nos résultats que lors de l'excitation du chromophore *Z* neutre vert, l'état excité attire les électrons du glutamate 212 voisin, le rendant plus acide. Si la protéine est dans l'état A, Glu212 est protoné et peut alors produire un transfert de proton à l'état excité (ESPT) vers l'histidine 62, initiant ainsi la réaction de photo-Kolbe menant au clivage peptidique et à la photoconversion. Au vu de la structure cristallographique, nous penchons plutôt vers un processus tel que proposé par le groupe de Rebekka Wachter [62] où l'histidine 62 a assez de liberté de mouvement pour permettre sa rotation et le placement de son cycle imidazole dans une position assez proche du Glu212 pour permettre ce transfert de proton.

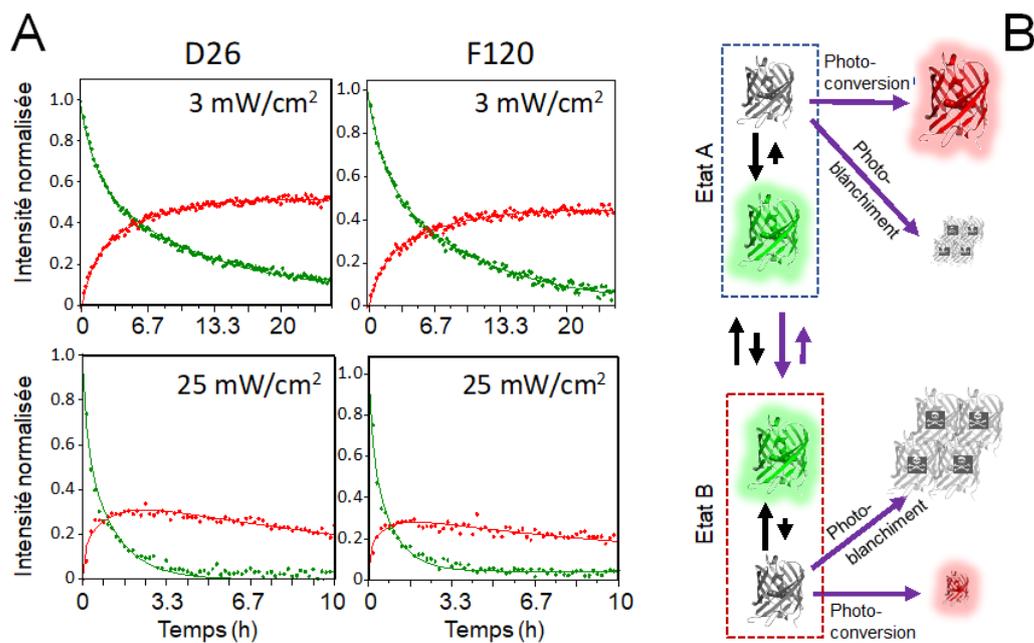


Figure 54 – Données de photoconversion RMN enregistrées en temps réel sous illumination continu à 405 nm à 3 mW/cm² (ligne du haut) ou 25 mW/cm² (ligne du bas) et représentées avec l'exemple des courbes de décroissance de l'état vert et d'accumulation de l'état rouge de deux acides aminés : D26 et F120. (B) Modèle de photoconversion prenant en compte les données de cinétique RMN. Le photoblanchiment fait référence à des altérations photochimiques irréversibles du chromophore.

Ainsi, nos données montrent qu'il existe une hétérogénéité entre deux états (A et B) dans l'état vert de mEos4b. Cette hétérogénéité a des conséquences sur les efficacités de photocommutation et de photoconversion de la protéine puisque l'état A présente une commutation plus rapide et un meilleur contraste que l'état B. De façon similaire, l'état A montre de bien meilleures photoconversion et photorésistance que l'état B. Photoconversion et photocommutation semblent donc entrelacés mais le fait que le mutant E212Q soit capable de photocommuter très efficacement mais abolisse la photoconversion démontre qu'un acide aminé protoné de façon stable (tel que la glutamine) est nécessaire pour permettre l'isomérisation mais qu'un acide aminé avec un proton labile (tel que le glutamate) est nécessaire pour initier la photoconversion. Ces données permettent d'envisager à l'avenir des mutations de l'environnement des acides aminés aux positions 62 et 212 afin de jouer sur la stabilité de leur état de protonation et favoriser une photoréaction ou l'autre.



5

Applications

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. **V. Adam***, H. Mizuno, A. Grichine, J. Hotta, Y. Yamagata, B. Moeyaert, G.U. Nienhaus, A. Miyawaki, D. Bourgeois & J. Hofkens, “*Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins*”, *Journal of Biotechnology* (2010) **149**(4): 289-298
02. M. Jacq, **V. Adam***, D. Bourgeois, C. Moriscot, A.-M. Di Guilmi, T. Vernet & C. Morlot* “*Remodeling of the Z-ring nanostructure during Streptococcus pneumoniae cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy*”, *mBio* (2015) **6**(4): e01108-15
03. M. Jessop[#], C. Liesche[#], J. Felix[#], A. Desfosses, M. Baulard, **V. Adam**, A. Fraudeau, K. Huard, G. Effantin, J. P. Kleman, M. Bacia-Verloop, D. Bourgeois and I. Gutsche* “*Supramolecular assembly of the E. coli LdcI upon acid stress*” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2021) **118**(2): e201438118

Page précédente : illustration de l'utilisation des protéines fluorescentes comme d'un outil permettant d'éclairer des échantillons

1. Introduction

Ces dernières années, j'ai pu franchir un cap important en passant de l'expertise purement fondamentale sur la photophysique des protéines fluorescentes vers l'application biologique des mutants de marqueurs que je conçois. Si ces applications peuvent être très diverses et couvrent également des thématiques impliquant des cellules eucaryotes, je me suis essentiellement concentré sur le challenge que représentait la cartographie super-résolue des protéines d'intérêt bactériennes, en particulier dans des bactéries comme l'étude du système de division de *S. pneumoniae* en collaboration avec le Dr. Cécile Morlot, - un accomplissement de mon projet de candidature au CNRS - ou la plus récente étude sur la lysine décarboxylase de *E. coli* en collaboration avec le Dr. Irina Gutsche, qui m'a rapproché de la microscopie électronique à laquelle je souhaite plus avoir recours pour le projet que j'aimerais développer ces prochaines années.

2. Les PTFPs comme stockage de données

Les PTFPs, qu'elles soient photoactivables, photoconvertibles ou photocommutables peuvent être vues comme des molécules capables d'émettre des signaux binaires. En effet, les états allumés et éteints ou bien les états verts et rouges de ces protéines sont autant de signaux binaires suffisants pour un codage optique irréversible (photoconversion) ou réversible (photocommutation). C'est sur cette idée que j'ai émis l'idée dès ma thèse de les utiliser comme des outils biotechnologiques en tant que support de stockage de masse d'information, à l'instar des DVD.

2.1. Stockage bidimensionnel irréversible et réversible

Bien qu'il y ait des limitations évidentes à l'utilisation de matériel biologique en tant que supports de stockage, nous avons tenté pour la première fois de fournir une preuve expérimentale à cette utilisation [24]. En utilisant plusieurs PTFPs : des RSFPs comme Dronpa [23], des PCFPs comme d1EosFP, mEosFP [71] ou Kaede [22] et des protéines fluorescentes biphotochromiques comme IrisFP [66] ou NijiFP [70], nous avons démontré qu'il était possible de réaliser un stockage irréversible ou réversible en 2D sur une surface avec un microscope confocal. Nous avons par exemple pu dessiner sur une surface recouverte d'une monocouche de la PCFP Kaede en photoconvertissant du vert au rouge. En observant le canal rouge, nous obtenons une image avec

un fort contraste en rouge sur fond noir. Nous avons également démontré l'utilisation de stockage d'information réversible sur la surface d'un cristal de RSFP ou sur une surface recouverte d'une monocouche de Dronpa (Figure 55A). Cette première preuve de concept a précédé d'un an celle du laboratoire de Stefan Hell [33] démontrant l'utilité de la RSFP Dreiklang [33] pour un stockage réversible d'information avec un grand nombre de cycles écriture/effacement (Figure 55B).

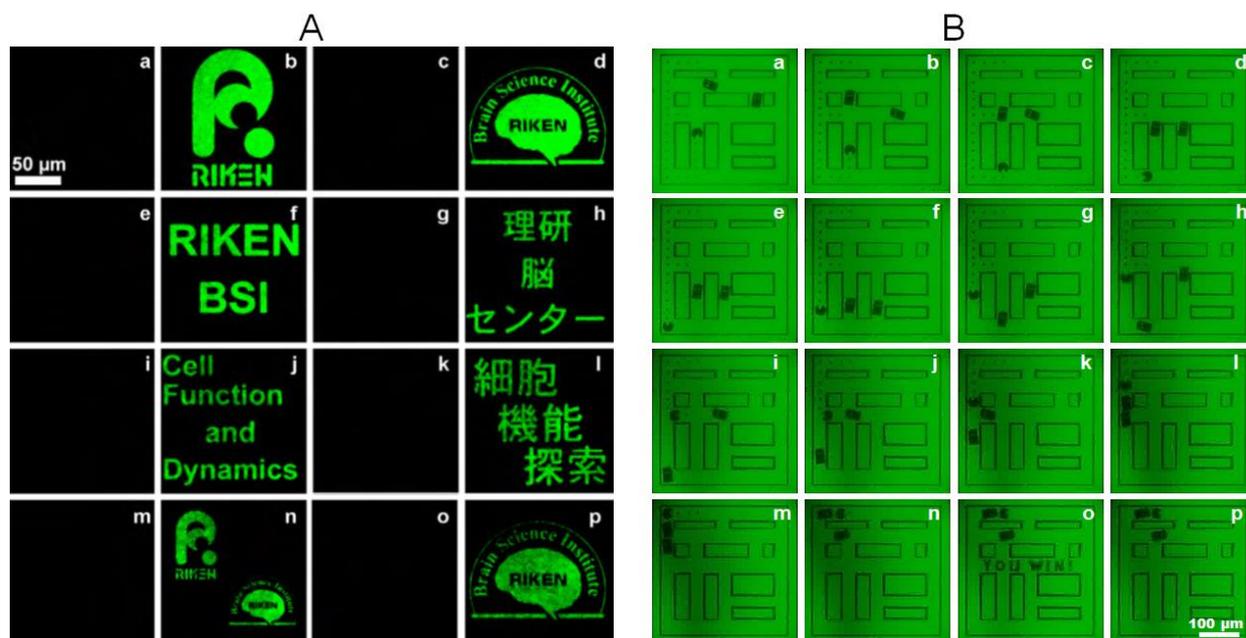


Figure 55 – Stockage réversible de données en 2D avec des RSFPs par microscopie confocale. (A) La protéine fluorescente photochromique Dronpa a été fixée sur une surface recouverte de poly-L-lysine. La totalité du champ de cette surface a ensuite été éclairée par une lumière laser de 488 nm ($5,5 \text{ kW/cm}^2$, temps d'arrêt de $10 \mu\text{s/pixel}$, cinq passages) pour faire passer la protéine à son état non fluorescent (colonnes 1 et 3) et par une faible lumière laser de 405 nm (332 W/cm^2 , temps d'arrêt de $10 \mu\text{s/pixel}$, deux passages) pour faire revenir la protéine à son état fluorescent, dessinant des motifs définis (colonnes 2 et 4). Les logos et textes du RIKEN (Institut des sciences du cerveau et laboratoire de fonction et dynamique cellulaires), en anglais et en japonais, ont été successivement écrits et effacés sur la même surface. Les images ont été obtenues en balayant la surface avec une lumière de 488 nm (113 W/cm^2). Le contraste entre les molécules claires et sombres est excellent bien qu'après plusieurs cycles, une certaine photofatigue de la protéine puisse être remarquée comme on peut le voir en comparant les images d et p ; publié par Adam et al. 2010 [24]. (B) La protéine Dreiklang a été intégrée dans un film de polyacrylamide et une succession d'images a été réalisée pour représenter une partie du jeu "Pac-Man". Toutes les molécules sont d'abord commutées vers leur état fluorescent (360 nm , $0,1 \text{ W/cm}^2$, 5s) puis les éléments du jeu sont dessinés en commutant les molécules vers leur état non-fluorescent (405 nm , $4,3 \text{ MW/cm}^2$) et les images sont réalisées par excitation verte (515 nm , $2,4 \text{ kW/cm}^2$) ; publié par Brakemann et al. 2011 [33].

2.2. Stockage tridimensionnel

Afin de tenter de ne pas se limiter au stockage 2D, nous avons tenté de démontrer qu'il était possible d'encoder des informations à l'échelle microscopique en trois dimensions avec des PCFPs. Pour cela, nous avons utilisé des cristaux de protéines parce qu'il était facile d'en obtenir et parce qu'il s'agit de la matrice 3D la plus dense et organisée possible.

Alors que l'utilisation d'un microscope confocal avec une excitation autour de 400 nm mène à la photoconversion vert à rouge, la marque laissée dans une matrice 3D a la forme d'un sablier, correspondant au point focal et aux zones convergente d'entrée et divergente de sortie de la lumière (Figure 56A, a,b). A l'inverse, en utilisant une excitation à deux photons de longueur d'onde deux fois plus grande (autour de 800 nm), la probabilité que deux photons excitent simultanément un chromophore est si faible qu'elle ne survient qu'autour du point focal où la densité de photon est la plus importante et les couches en amont et en aval de ce point focal ne sont pas altérées (Figure 56A, c,d). Nous avons utilisé un cristal de la protéine fluorescente biphotochromique IrisFP dans lequel nous avons stocké des données sur des couches à différentes profondeurs (Figure 56B, a). Les plans en dehors de ces couches restant intacts, il est possible d'extraire les informations stockées en 3D (Figure 56B, b).

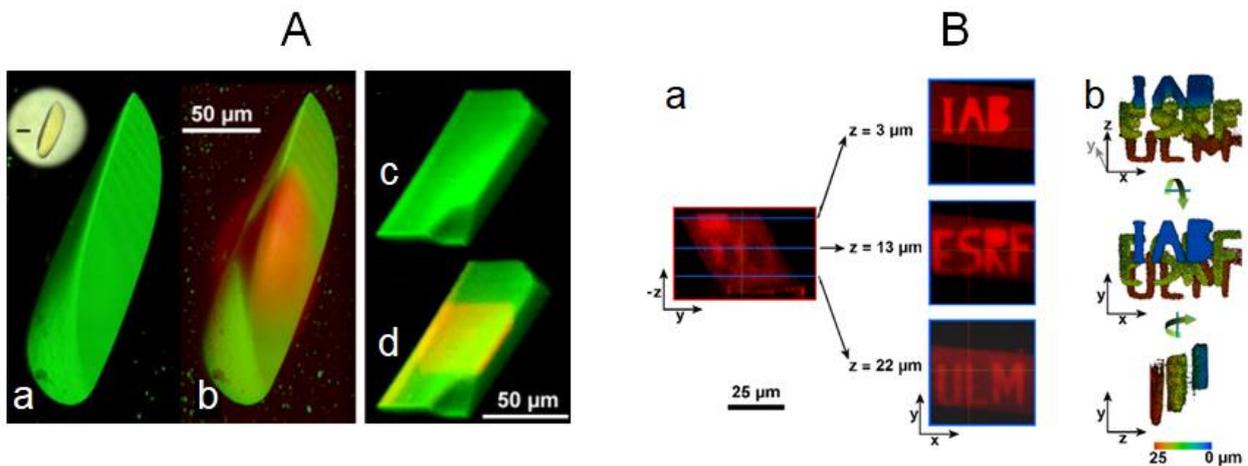


Figure 56 – Stockage de données 3D avec des PCFPs par microscopie confocale. (A) Des cristaux de d1EosFP (a,b) et de mEosFP (c,d) ont été imagés à 488 nm (140 W/cm^2) pour le canal vert et à 543 nm (619 W/cm^2) pour le canal rouge, avant (a,c) et après (b,d) photoconversion du vert au rouge. d1EosFP a été photoconverti par une irradiation à un photon et mEosFP a été photoconverti par une irradiation à deux photons. Lorsqu'un cristal a été converti par excitation à un photon, la forme typique en sablier de la lumière de 405 nm entrant et sortant de la structure tridimensionnelle a pu être observée (b) - encart : image en champ clair d'un cristal d1EosFP. Lorsqu'un cristal a été converti par excitation à deux photons, une fine tranche ($<4 \mu\text{m}$) photoconvertie a pu être formée au sein du cristal sans altérer les plans voisins hors focus (d). (B) En utilisant une excitation à deux photons il a été possible de photoconvertir IrisFP du vert au rouge sur trois plans de profondeurs dans un seul cristal (a), sur chacun des plans ($<5 \mu\text{m}$ d'épaisseur) les mots "IAB", "ESRF" et "ULM", signifiant respectivement Institut pour l'Avancée des Biosciences, European Synchrotron Radiation Facility et Université d'Ulm ont été écrits. Une vue tridimensionnelle de ces trois mots est rendue par un code couleur en fonction de la profondeur dans le cristal (b). Les photoconversions vert-rouge ont été réalisées à un photon (370 nm, $0,8 \text{ W/cm}^2$, 5 s) ou à deux photons à 800 nm ($2,6 \text{ MW/cm}^2$ temps d'arrêt de $1,6 \mu\text{s/pixel}$, quatre passages).

De manière surprenante, avec un cristal de protéine fluorescente biphotochromique, alors que la photoconversion du vert au rouge était particulièrement efficace lorsque le cristal était séché, la principale photoréaction à la même longueur d'onde d'excitation en utilisant des cristaux frais et humides a révélé une commutation on/off réversible plutôt qu'une simple photoconversion, ce

qui suggère que l'utilisation de PCFPs est à privilégier pour le stockage 3D irréversible dans une matrice déshydratée et que l'utilisation de RSFPs est à privilégier pour le stockage 3D réversible dans une matrice hydratée.

2.3. Stockage quaternaire

Puisque j'avais introduit peu de temps avant mon postdoc le concept des protéines fluorescentes biphotochromiques, nous sommes allés plus loin en proposant de combiner les propriétés de photoconversion et de photocommutation présentes chez IrisFP afin d'encoder des informations en 2-bits (4 couleurs).

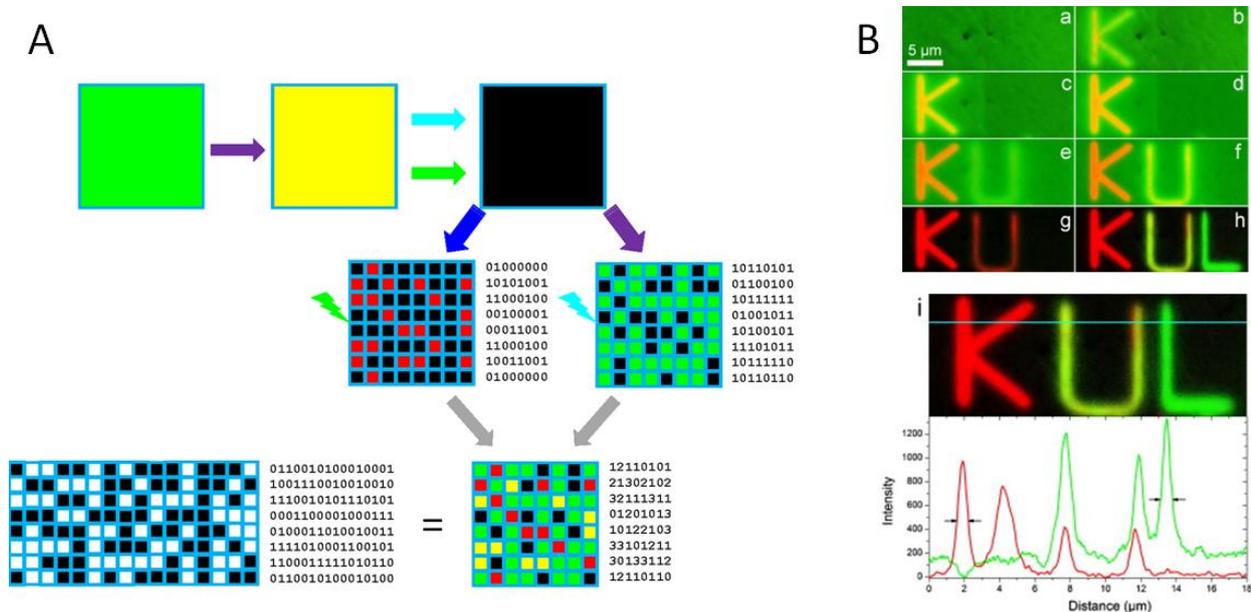


Figure 57 – Les protéines fluorescentes biphotochromiques comme stockage de données quaternaire. (A) Une irradiation à 405 nm permet la photoconversion partielle du vert au rouge d'une surface revêtue de manière homogène de PTFP biphotochromique. Les molécules vertes et rouges formant une surface jaune résultante peuvent en outre être commutées dans un état noir. La fluorescence verte et rouge peut être activée dans les zones souhaitées par des irradiations à des longueurs d'onde adéquates. La superposition des zones vertes et rouges avec des zones laissées à l'état sombre produit un codage quaternaire en vert (vert + noir), rouge (rouge + noir), jaune (vert + rouge) et noir (noir + noir). Ce procédé permet un codage deux fois plus dense que son équivalent binaire. (B) Image microscopique démontrant une première preuve de principe pour cette méthode. Les lettres K, U et L (pour "Katholieke Universiteit Leuven") sont écrites par microscopie confocale sur une seule couche de la protéine fluorescente biphotochromique IrisFP d'abord par photoconversion de la lettre "K" (a-f) et photoconversion partielle de la lettre "U" (e-f), photocommutation vers le noir du fond (g) et retour vers le vert de la lettre "L" (h). L'image résultante (i) permet de distinguer les quatre types de signaux (vert, rouge, vert+rouge et noir).

La résolution spatiale dans un échantillon fortement concentré étant loin de permettre la visualisation de molécules individuelles, il est possible d'imager des zones éteintes (noires), fluorescentes à l'état initial (vertes), photoconverties (rouges) et partiellement photoconverties (vert+rouge=jaune). Ce stockage d'information non plus binaire [0,1] mais quaternaire [0,1,2,3]

grâce à sa capacité d’extinction de fluorescence [noir=0], de fluorescence initiale [vert=1], de fluorescence irréversiblement photoconvertie [rouge=2] et de la combinaison à résolution limitée par la diffraction des signaux vert et rouge [1+2=3, jaune] permet de stocker deux fois plus d’information sur la même surface (Figure 57).

3. Etudes de la morphogénèse de *S. pneumoniae*

La bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae*, est un agent majeur de morbidité humaine et une souche devenant résistante à des nombreux antibiotiques. Un angle d’attaque contre la prolifération de cet ovocoque est celui du désassemblage de son système de division. Chez ces bactéries, la cytokinèse, la septation et l’élongation sont gérés en un même locus : en position équatoriale, au niveau de l’anneau de division formé par la protéine FtsZ (homologue de la tubuline), aussi appelé anneau Z et qui sert probablement de plateforme d’assemblage. Une analyse de la structure fine de cet anneau Z au cours de la division devrait permettre d’en apprendre plus sur les mécanismes impliqués lors de la prolifération. Malheureusement, cette bactérie est de taille extrêmement réduite (~800 nm dans le grand axe) et représente un défi pour obtenir des détails en microscopie optique. Nous avons donc souhaité relever ce défi en tentant de mettre au point des méthodes permettant d’étudier à résolution nanométrique la structure fine de l’anneau Z au cours de la division, en cellules vivantes.

Cette étude a d’abord visé à concevoir une version de la protéine fluorescente photoconvertible Dendra2 adaptée à l’expression chez *S. pneumoniae* (spDendra2) et à établir une lignée stable de *S. pneumoniae* exprimant la protéine chimérique FtsZ:spDendra2. Ce travail nous a permis d’observer à super-résolution PALM les structures annulaires formées par la protéine essentielle FtsZ, analogue bactérien de la tubuline et à analyser sa structure fine, en particulier en termes quantitatifs et de publier un article dans mBio [110].

Nos données montrent qu’entre la phase précoce de division (stade I) et la phase tardive (stade II), l’anneau Z (anneau formé par FtsZ) subit un élargissement de 32 nm en moyenne. En outre, les images mettent en évidence une fraction des cellules qui possèdent un double anneau Z. Le faible nombre de ces cellules laisse supposer un phénomène rapide et qui est totalement invisible à résolution optique conventionnelle (Figure 58). La taille des cellules comportant ces doubles

anneaux concorde avec des cellules en phase pré-divisionnelle et nous pouvons donc proposer que ce double anneau corresponde à un état intermédiaire de division jusque-là inconnu et situé entre les stades I et II.

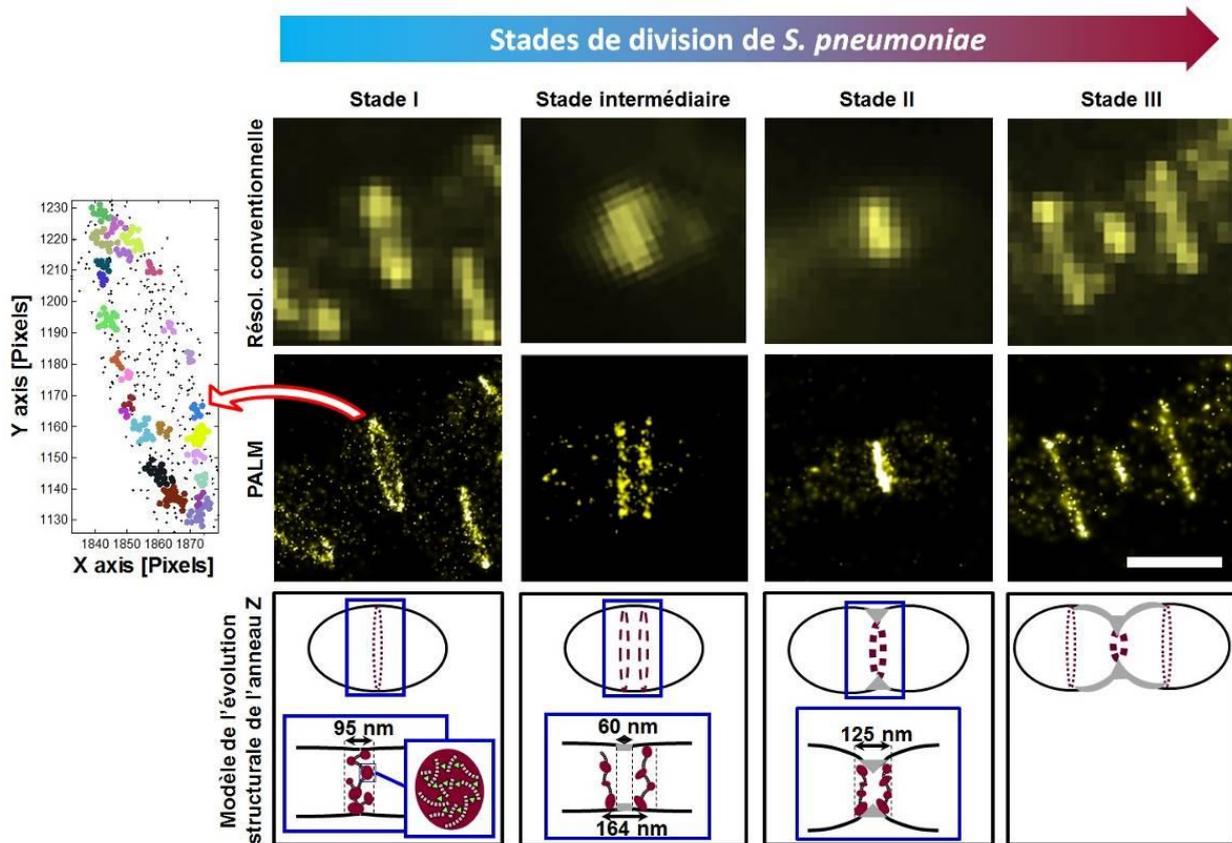


Figure 58 – Etude de la morphogénèse de *S. pneumoniae* par PALM – La protéine fluorescente spDendra2 fusionnée à la protéine FtsZ permet l’obtention d’images de fluorescence conventionnelle (première ligne) et à super-résolution PALM (seconde ligne), permettant la proposition d’un modèle d’évolution structurale de l’anneau Z (troisième ligne) au cours des différents stades de division de *S. pneumoniae* (colonnes). Le modèle décrit l’évolution de la structure en collier de perles observé en PALM et correspondant à des clusters de protéines (bordeaux) formés de molécules de FtsZ (rose) et de partenaires protéiques restant à déterminer (vert). Ces clusters s’assemblent en une structure annulaire (anneau Z) dont l’épaisseur au cours du cycle de division est indiquée. Une analyse de clusters sur anneaux inclinés de stade I en utilisant l’algorithme DBSCAN est montrée sur la gauche de la figure. Différentes couleurs sont utilisées pour visualiser chaque cluster (i.e. groupe de molécules de taille >37 nm). Les molécules non groupées sont représentées par des points noirs. L’analyse montre que chaque anneau contient en moyenne entre 10 et 30 clusters imagés, formés de 10 à 30 molécules. Barre d’échelle = 1 µm

Un modèle de l’évolution de la nanostructure de l’anneau Z au cours de la division de *S. pneumoniae* est donc possible à établir : en stade I de la division, FtsZ polymérise en filaments s’assemblant en clusters qui forment une structure annulaire (anneau Z) de 95 nm d’épaisseur. Cet anneau se divise par la suite en un double anneau formant une structure de 164 nm d’épaisseur, les deux anneaux étant moins denses qu’au stade I et séparés de 60 nm. Cette structure, que nous attribuons à un état intermédiaire de division est probablement provoqué par

la néosynthèse de peptidoglycane (représenté en gris sur la Figure 58). Ces différents états sont totalement impossibles à observer en microscopie optique conventionnelle puisque cette dernière a une résolution maximale (environ 250 nm) qui est limitée par la diffraction de la lumière. Par la suite, la constriction de la membrane se poursuivant, les deux anneaux se rapprochent à nouveau, apparaissant comme un seul anneau plus dense (même en PALM) et d'une épaisseur de 127 nm. Le dernier stade de la division (stade III) correspond à la relocalisation des molécules de FtsZ depuis le site de division original totalement densifié vers de nouveaux anneaux aux sites de division des cellules filles.

4. Etude du complexe LdcI-RavA d'*E. coli*

En collaboration avec le groupe d'Irina Gutschke à l'IBS et dans le cadre de la thématique émergente de notre nouveau groupe I2SR (Integrating Imaging of Stress Response), j'ai participé à un projet visant à observer en PALM un complexe bactérien massif de décarboxylase et d'ATPase (3.3 MDa) formant une cage de 3000 nm³ dont le rôle est incertain mais supposé jouer un rôle de chaperonne lors de conditions de bas pH [111]. Ce complexe formé chez *Escherichia coli* qui fait partie, comme d'autres bactéries, du microbiome humain se forme en réponse aux conditions stressantes de l'environnement gastrique (bas pH, exposition à la nourriture, antibiotiques et médicaments...). Ce complexe est formé de deux protéines qui multimérisent : LdcI (décarboxylase à lysine de type I) qui forme deux paires de pentamères au centre et RavA (ATPase) qui forme cinq hexamères en périphérie. LdcI catalyse la décarboxylation des lysines en cadavérine en consommant des protons et en produisant du CO₂ qui vient tamponner le cytoplasme bactérien et le milieu extracellulaire lors de conditions de stress acide. Trois formes semblent coexister dans la cellule : une forme dimérique autour d'un pH 8, une forme décamerique (double pentamère) autour d'un pH 6.5 et une forme fibrillaire autour d'un pH 5.2. Cette dernière forme est permise par l'empilement de décamères et semble être la forme la plus active. La guanosine tétraphosphate : ppGpp (issue de la réaction entre ATP et GTP) semble jouer un rôle lors du stress acide en stabilisant la forme décamerique de LdcI dès un pH 6.5 [112]. Cette molécule alarmone est déjà connue pour jouer un rôle appelé "réponse stringente" dans une variété de cellules lors de conditions stressantes (choc thermique, privation de d'acides aminés, de fer, d'acides gras...).

Notre idée était donc de faire du PALM bicouleur avec des protéines fluorescentes phototransformables afin de pouvoir suivre dans les bactéries la localisation de LdcI et de RavA lors d'un stress acide. Un point important était qu'il fallait que les protéines soient assez brillantes à des pH assez bas. L'identification de protéines fluorescentes de fusion avec LdcI et RavA pour la recherche utilisant la microscopie de fluorescence (à super-résolution) m'a mené à proposer à l'équipe de I. Gutsche de travailler avec la protéine photoconvertible du vert au rouge que je venais de créer : Dendra2-T69A [92] et la protéine verte réversiblement photocommutable mGeos-M [103]. La raison étant que toutes les deux disposent d'un bon budget photonique et ont un pKa pour le chromophore assez bas (leur permettant de rester fluorescentes même à bas pH).

J'ai donc réalisé ces clonages mais les résultats des constructions entre LdcI et RavA avec Dendra2-T69A et mGeos-M ont montré que les fusions avec LdcI menaient à des bactéries fluorescentes mais avec des localisations différentes selon la fusion en Nter ou en Cter. Des reconstructions 3D des protéines de fusion effectuées par l'équipe de I. Gutsche à partir de clichés de particules isolées observées par microscopie électronique à coloration négative ont montré en particulier que les propriétés d'oligomérisation de mGeos-M, héritées des ancêtres de la famille des protéines Eos (dont l'ancêtre EosFP est un tétramère fort), menaient à des assemblages anormaux où des tétramères de mGeos-M forçaient les monomères de LdcI à s'arranger de façon à ne plus être fonctionnels (Figure 59, gauche). Avec Dendra2-T69A, les constructions étaient normales mais l'interaction avec RavA était devenue impossible comme c'était prévisible au vu de la compacité et de la complexité du méga-complexe LdcI-RavA. Les constructions Dendra2-T69A:RavA semblent quant à elles fonctionnelles et montrent une localisation périphérique de la protéine, ce qui suggère une interaction avec la membrane (Figure 59, droite).

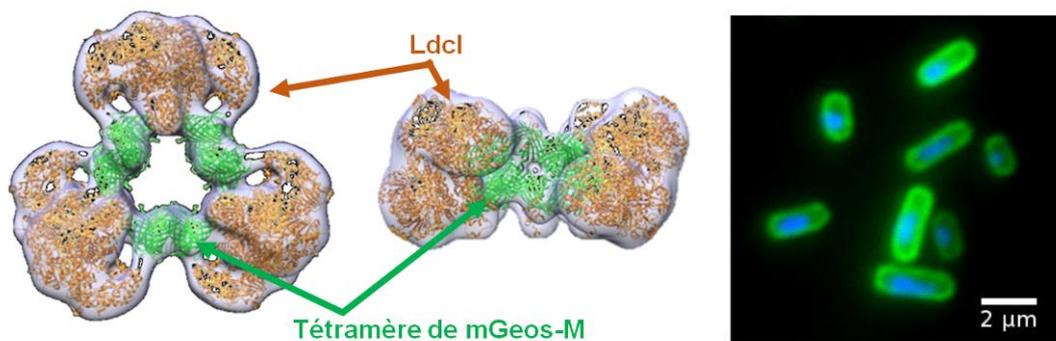


Figure 59 – Reconstruction par microscopie électronique du complexe de fusion mGeos-M:LdcI (gauche). Image de microscopie de fluorescence de bactéries *E. coli* exprimant la construction Dendra2-T69A:RavA en vert (droite) – bleu : Hoeschst marquant l'ADN

Ces résultats démontrent à quel point des protéines fluorescentes de fusion peuvent parfois affecter la stœchiométrie et l'état d'oligomérisation d'une protéine d'intérêt sans affecter la fluorescence (d'où l'importance de contrôle de fonctionnalité). Ils montrent également que les protéines fluorescentes fusionnées en N-ter de LdcI perturbent son assemblage et celles fusionnées en C-ter perturbent l'interaction avec RavA. Devant l'impossibilité de fusionner une protéine fluorescente sans affecter la fonction des protéines d'intérêt, nous nous sommes dirigés vers le marquage par une petite molécule fluorescente via un anticorps à domaine unique ou nanocorps (nanobody) pour limiter l'encombrement stérique du marqueur.

Nous avons commandé un nanocorps de lama contre LdcI auprès de la plateforme de génération de nanocorps du laboratoire de l'architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB) de Marseille. La reconstruction 3D du modèle du complexe LdcI-RavA-nanocorps montre que les nanocorps se sont fixés sur LdcI dans des "poches" ne perturbant pas l'interaction avec RavA (Figure 60A). La fixation se fait à un niveau proche de la boucle de LdcI comprise entre les acides aminés 501 et 506. Or, l'encombrement stérique d'une protéine fluorescente étant similaire à celui d'un nanocorps, il devrait être envisageable de fusionner une protéine fluorescente dans cette boucle (Figure 60B). La difficulté résiderait alors dans le fait que la protéine LdcI(début)-FP-LdcI(fin) devrait être capable de se replier correctement.

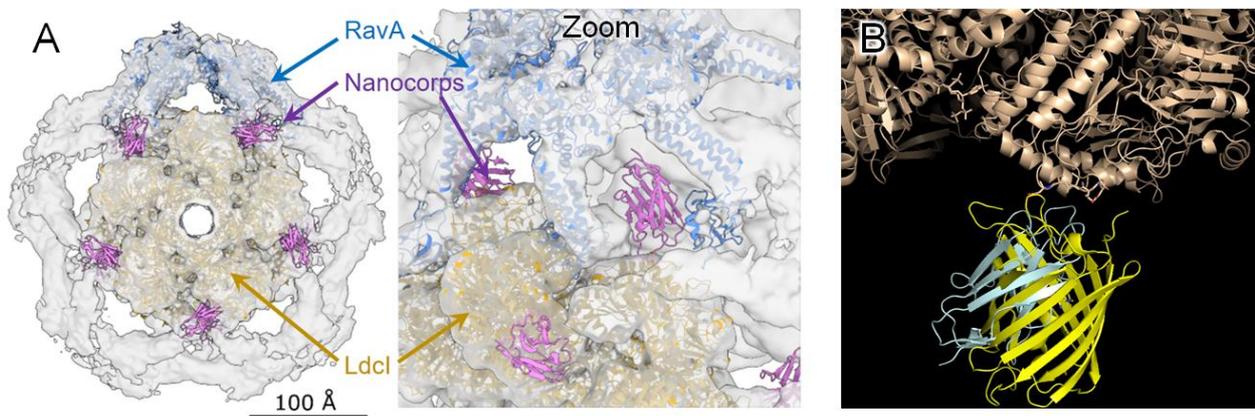


Figure 60 – Interaction du nanocorps sur LdcI. (A) Modèle du complexe LdcI-RavA-nanocorps représenté en enveloppe obtenue par microscopie électronique, contenant les modèles cristallographiques. Les nanocorps (violet) se logent dans des poches entre LdcI (cuivre) et RavA (bleu). (B) Superposition de protéine fluorescente (jaune) sur le nanocorps (cyan) près d'une boucle de LdcI (cuivre).

Environ 90 minutes après avoir été exposées à un stress acide (croissance à pH 4.6), les bactéries ont été chimiquement fixées au PFA et perméabilisées au Triton X-100 pour faire pénétrer les nanocorps couplés au fluorophore Alexa Fluor 647. Après excitation par un laser 643

nm à 3 kW/cm^2 et un laser 405 nm à 1 W/cm^2 le traitement des quelques 30 000 clichés obtenus sur microscope (Figure 61A) ont permis l'obtention de 25 000 localisations et une précision de localisation de $\sim 17 \text{ nm}$ et la reconstruction de jeux de données super-résolus 3D-STORM (Figure 61B). Nous avons pour cela équipé notre microscope équipé d'une lentille cylindrique placée dans le trajet de détection, ce qui déforme la PSF dans de façon astigmatique dans une direction ou l'autre de part et d'autre du plan focal. Les images super-résolues 3D montrent une répartition périphérique suivant une organisation ressemblant à une hélice. Cette répartition est souvent observée par des protéines du cytosquelette bactérien mais est également observée lors du marquage de certains éléments du peptidoglycane, ce qui peut suggérer une organisation de LdcI guidée par le peptidoglycane.

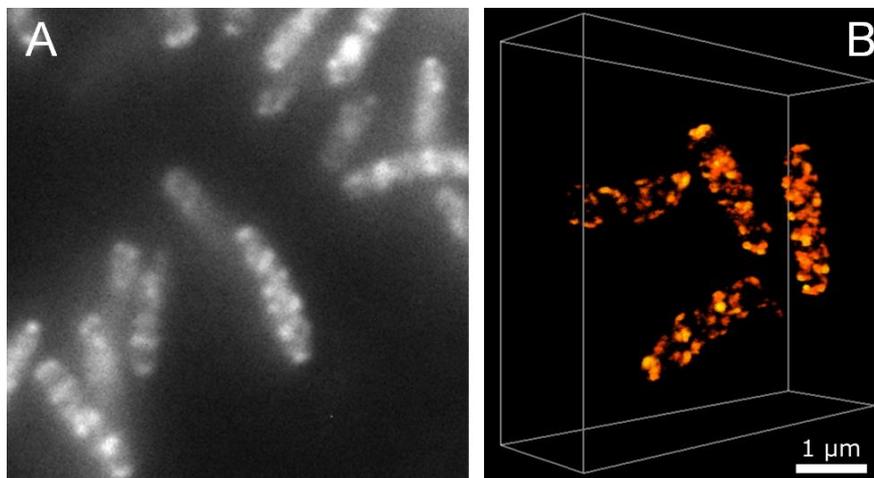


Figure 61 – Super-résolution 3D de la répartition de LdcI dans des bacilles stressés. (A) Zoom d'un cliché obtenu sur microscope optique à champ lointain lors de l'acquisition des données 3D-STORM et montrant des bactéries *E. coli* après stress acide, fixation, perméabilisation et marquage au nanocorps couplé à Alexa 647. (B) Reconstruction 3D-STORM montrant la répartition périphérique et pseudo-hélicoïdale de LdcI marqué. L'échelle est valide pour les deux images.

Dans une certaine mesure, cette étude, publiée dans PNAS [113] représente un échec pour le marquage par protéines fluorescentes mais paradoxalement, il a mis à jour un défaut important de ces dernières quant à leur propension à forcer ou empêcher les interactions entre protéines d'intérêt. Si nous n'avions pas vérifié la structure des protéines de fusion par microscopie électronique, nous aurions pu tirer des conclusions erronées sur leur localisation cellulaire. En outre, l'utilisation de nanocorps a permis de révéler les localisations permettant un marquage sans altérer les interactions de ce grand complexe.

Je souhaiterais poursuivre ce projet que je trouve à la fois ardu et stimulant, en tentant désormais la fusion de protéine fluorescente dans la boucle de LdcI où le nanocorps s'est fixé. Cet

emplacement n'est pas impliqué dans les contacts entre LdcI et RavA et devrait permettre la formation du complexe total. Si nous réussissons, non seulement cela ouvrira la voie au PALM bicouleur sur cellules vivantes lors d'un stress acide mais cela démontrera également à la fois l'apport des marquages par les nanocorps pour permettre des fusions fonctionnelles avec des protéines fluorescentes et l'apport de la microscopie électronique dans ces marquages.



Perspectives

Publications personnelles associées à ce chapitre

01. A. Regis Faro, **V. Adam**, P. Carpentier, C. Darnault, D. Bourgeois* & E. de Rosny*
“*Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins*”
Photochemical & Photobiological Sciences (2010) **9**(2): 254-262
02. A. Mantovanelli#, O. Glushonkov#, **V. Adam**#, J. Wulffélé, D. Thédié, M. Byrdin, I. Gregor, O. Nevskiy, J. Enderlein & D. Bourgeois*
“*Photophysical studies at cryogenic temperature reveal a novel photoswitching mechanism of rsEGFP2*”
Journal of the American Chemical Society (2023) **145**(27):14636-14646

Illustration de chapitre : utilisation de protéines fluorescentes par microscopie à très basse température

1. CryoPALM, futur ou utopie ?

Nous nous sommes intéressés à la photocommutation des RSFPs à températures cryogéniques ($\sim 100\text{K}$) depuis plus de dix ans. Le but de ces études était de savoir si une RSFP était capable de photocommuter à froid et de comprendre selon quel mécanisme afin, à terme, de pouvoir développer des protéines adaptées à l'imagerie de molécules uniques à températures cryogéniques (cryo-PALM). En effet, développer le cryo-PALM permettrait, à l'instar de la cryo-microscopie électronique, d'étudier des échantillons à l'échelle de la molécule unique tout en les préservant par vitrification au lieu d'utiliser des fixateurs chimiques qui peuvent potentiellement modifier. De plus, la majorité des espèces réactives de l'oxygène, très délétères pour les chromophores des protéines fluorescentes, ne diffusent pas à ces températures, ce qui devrait augmenter la photorésistance et le nombre de photons collectés par cycle de commutation (et donc la résolution optique) également. A très basse température, les protéines photoconvertibles du vert au rouge comme mEos4b ne sont pas utilisables puisque la photoconversion est abolie en dessous de la température de transition vitreuse ($\sim 180\text{K}$). La question de l'utilisation des RSFPs et de la compréhension du mécanisme se déroulant se pose donc.

Afin d'étudier ce mécanisme, nous avons comparé les propriétés photochromiques de plusieurs protéines fluorescentes, à la fois conventionnelles (EYFP) et réversiblement photocommutables (Dronpa, IrisFP), à température cryogénique où il est improbable que de larges mouvements structuraux, comme ceux associés à l'isomérisation du chromophore, puissent avoir lieu. Le choix de EYFP a été guidé par des résultats antérieurs [114] montrant que cette protéine pouvait subir à très basse température une transformation réversible photoinduite entre un état neutre A (absorbance max : $\sim 380\text{ nm}$) et un état anionique B (absorbance max : 520 nm), en passant par un état intermédiaire I (absorbance max : $\sim 460\text{ nm}$).

A température ambiante, la différence entre des RSFPs comme Dronpa (RSFP lente) ou IrisFP (RSFP rapide) et EYFP est observable immédiatement. En effet, à des densités de puissance comparables, IrisFP commute très rapidement et efficacement entre des états allumés et éteints (Figure 62A), Dronpa plus lentement (Figure 62B) mais alors que le signal de fluorescence d'EYFP s'éteint sous illumination 514 nm , il ne revient pas du tout sous illumination 405 nm (Figure 62C), ce qui est en contradiction avec des expériences de molécules uniques [115] et suggère qu'une très faible fraction des molécules sont effectivement capables de revenir vers un état fluorescent. Néanmoins, ces résultats sont en accord avec d'autres travaux démontrant qu'une

fraction limitée de la protéine (~25%) peut revenir à l'état fluorescent mais en utilisant une longueur d'onde plus courte (330-390 nm) [116]. En utilisant une forte illumination d'un laser 355 nm, il est en effet possible d'effectuer des cycles *on-off* (Figure 62D).

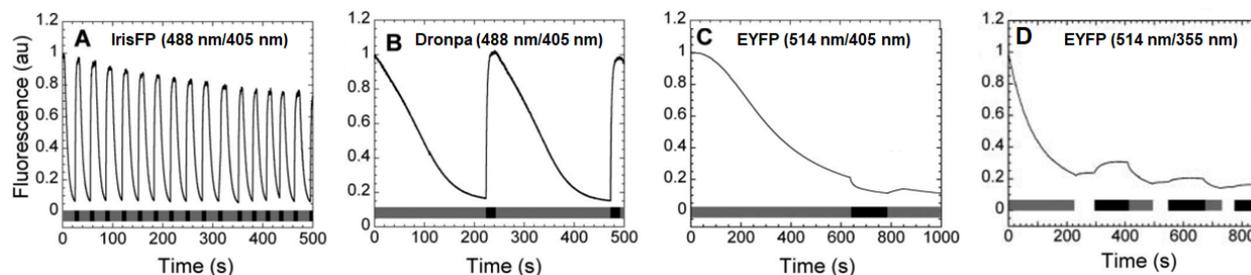


Figure 62 – Photocommutation à température ambiante de IrisFP (A, 488 nm : 0.3 W/cm² - 405 nm : 0.3 W/cm²), Dronpa (B, 488 nm : 0.4 W/cm² - 405 nm : 0.3 W/cm²), EYFP avec réactivation à 405 nm (C, 514 nm : 0.2 W/cm² - 405 nm : 0.45 W/cm²) et EYFP avec réactivation à 355 nm (D, 355 nm : 40 W/cm²)

A température cryogénique, le comportement de EYFP est tout autre qu'à température ambiante puisque des cycles répétés *on-off* peuvent être réalisés avec des illuminations à 514 nm et 405 nm (Figure 63A). Bien qu'il absorbe dans la même gamme de longueur d'onde (350-400 nm), l'état *off* formé à température cryogénique est différent de l'état *off* formé lorsque le chromophore se protone lors de l'acidification de la protéine (A1) ou lors de son illumination à température ambiante (A2) [117, 118]. Nous le notons « A3 » afin de le distinguer des deux autres et avons vérifié que les formes A1, A2 et A3 étaient spectralement différentes (Figure 63B) et que l'excitation de la forme A3 (commutée à température cryogénique), contrairement à celle de la forme A1 (acide) ramenait la protéine sous sa forme B (anionique) à température cryogénique (Figure 63C).

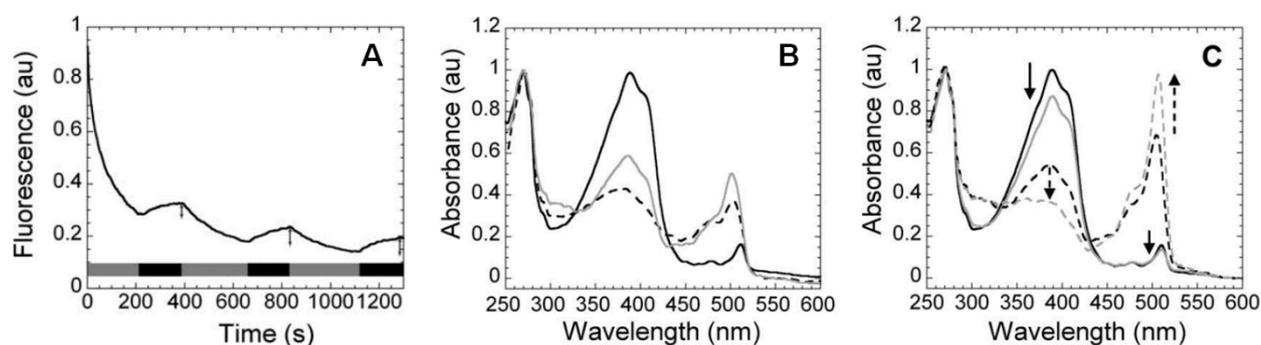


Figure 63 – (A) Photocommutation à température cryogénique de EYFP (514 nm : 300 W/cm² - 405 nm : 60 W/cm²), (B) Spectres d'absorbance de EYFP sous forme acide (forme A1, ligne noire), sous forme commutée à température ambiante (forme A2, tirets) et sous forme commutée à basse température (forme A3, ligne grise). (C) Après commutation, l'illumination à 405 nm permet le recouvrement vers la forme fluorescente de la forme A3 mais pas de la forme A1.

En comparant la commutation de EYFP avec celle de Dronpa et IrisFP, nous voyons que bien que d'amplitude bien moindre, les changements spectroscopiques observés lors de l'excitation de ces protéines à température cryogénique ont été similaires à ceux observés à température ambiante (Figure 64), suggérant que tout comme à température ambiante la photoprotonation réversible du chromophore à basse température en est responsable.

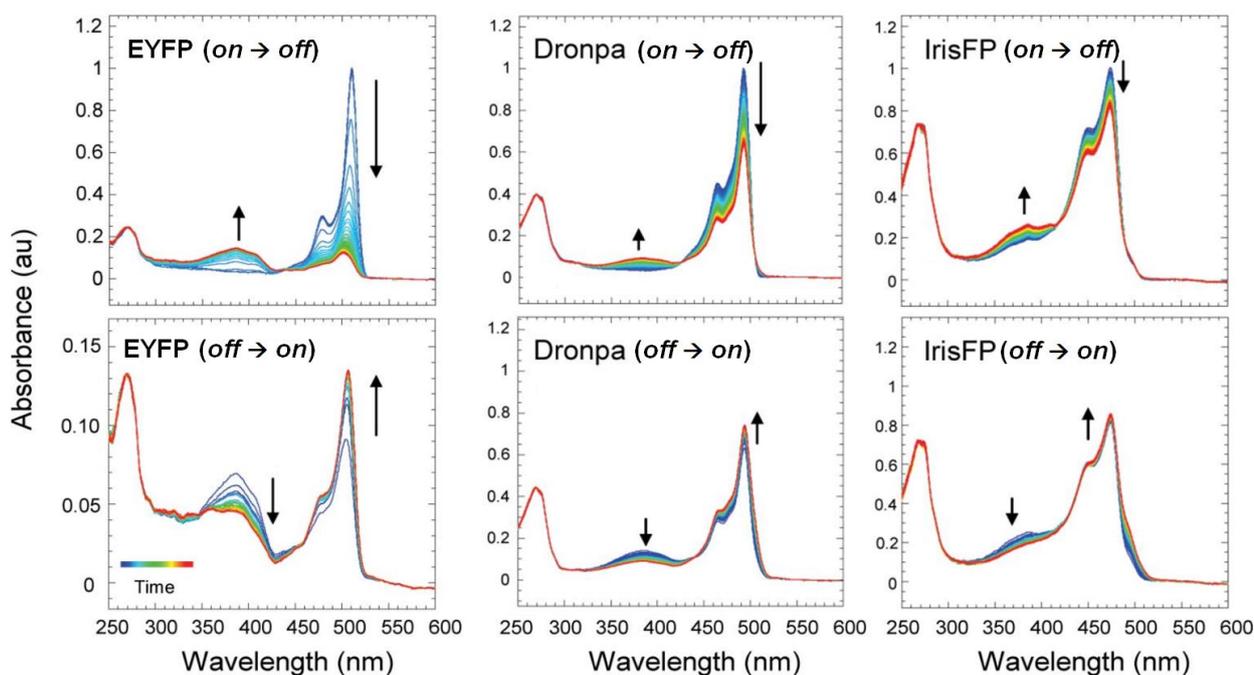


Figure 64 – Comparaison de l'évolution des spectres d'absorbance lors de la commutation *on-off* (ligne du haut) et de la commutation *off-on* (ligne de bas) à température cryogénique pour EYFP, Dronpa et IrisFP.

Cette première étude, publiée dans *Photochemical & Photobiological Sciences* [119] a été suivie par quelques autres où, de façon intéressante et surprenante, nous avons observé une isomérisation $E \rightarrow Z$ du chromophore de la RSFP positive Padron à température cryogénique [20, 120]. Ce changement structural est probablement dû à l'instabilité du chromophore dans cette protéine. Ce premier état intermédiaire est suivi par la formation d'un second ne se formant qu'au-delà de 120K et de transformant en l'état final (mix d'états protoné et anionique) de Padron au-delà de la transition vitreuse ($>180K$). La dépendance en température de cet intermédiaire montre que l'état de protonation du chromophore est déterminé par son interaction avec son environnement et la capacité de la structure d'être dynamique.

Suite à ces travaux, nous avons été très pris par différentes études sur la photophysique des protéines fluorescentes à température ambiante et avons délaissé un temps la thématique des transformations à température cryogénique. Les résultats récents et impressionnants de cryo-CLEM super-résolu sur cellules eucaryotes avec différentes protéines fluorescentes commutant à température cryogénique [121] ainsi que la confirmation du fait que toutes les protéines fluorescentes commutaient de manière similaire à température ambiante quelles que soient leur efficacité et leur mécanisme à température ambiante [122] nous ont poussé à poursuivre cette thématique et à construire en collaboration avec l'équipe de Jörg Enderlein à Göttingen (Allemagne) un microscope cryo-PALM et à étudier plus en détail la photophysique des photocommutations de protéines fluorescentes à température cryogénique. Nous avons utilisé rsEGFP2 en tant que RFP modèle pour nos études de photocommutation à température cryogénique et nous nous sommes rapidement rendus compte de particularités par rapport à nos mesures à température ambiante. Alors qu'à température ambiante la commutation sous illumination d'un laser à 488 nm permettait une déplétion quasi-totale de la forme *on* (Figure 65A) et l'illumination d'un laser à 405 nm permettait son recouvrement quasi-total (Figure 65B), à température cryogénique la commutation *on*→*off* formait un état *off* dont la signature spectrale était décalée dans le bleu (Figure 65C) et la commutation *off*→*on* sous 405 nm était peu efficace parce qu'il restait une grande part de cet état *off* décalé (Figure 65D). A noter que sous cette illumination de l'état *off* à température cryogénique, une espèce absorbant à 520 nm apparaît.

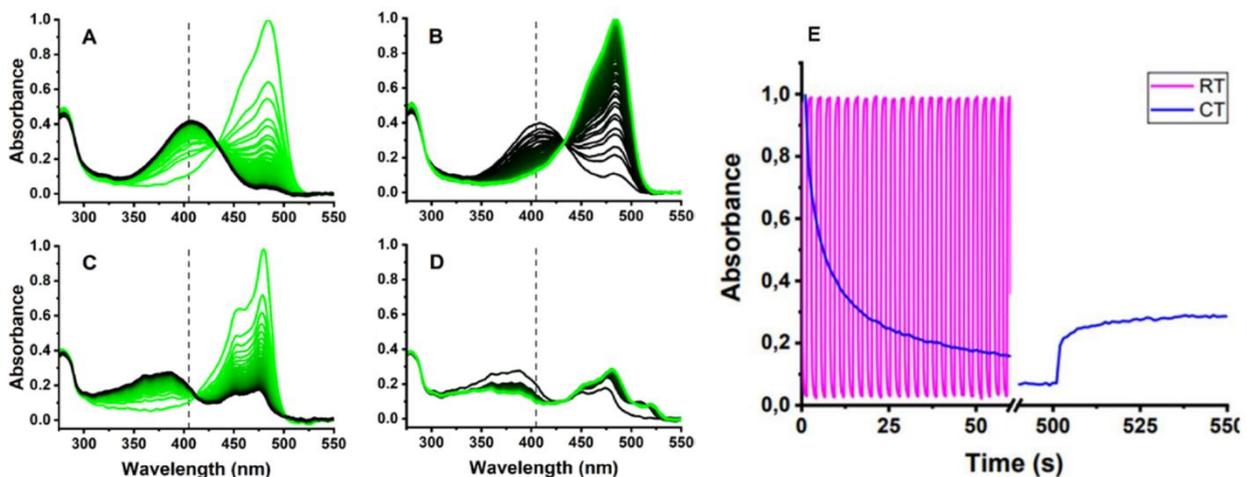


Figure 65 – (A-D) Spectres d'absorbance de rsEGFP2 à température ambiante (A,B) ou cryogénique (C,D) sous illumination à 488 nm de la forme *on* (A,C: vert à noir) ou à 405 nm de la forme *off* (B,D: noir à vert). Les densités de puissance utilisées sont de 80 W/cm² (488 nm) et de 4 W/cm² (405 nm) à température ambiante et de 400 W/cm² (488 nm) et 200 W/cm² (405 nm) à température cryogénique. Un décalage dans le bleu de la forme *off* à température cryogénique est visible grâce aux lignes verticales situées à 405 nm. (E) Comparaison des courbes de commutation à température ambiante (room temperature, RT) et à température cryogénique (cryogenic temperature, CT) sous illumination alternée 488 nm et 405 nm. Les densités de puissance sont comparables mais il faut 500 s pour faire une commutation *on*→*off* à CT là où il faut 1.4 s à RT.

Puisqu'il n'est pas possible de totalement dépléter l'état *on* ni l'état *off* à température cryogénique, nous nous attendons à un moindre contraste qu'à température ambiante et c'est effectivement ce que nous observons, en plus d'une vitesse de commutation extrêmement réduite à température cryogénique (Figure 65E). Si la protéine est commutée vers l'état *off* à température ambiante puis amenée à température cryogénique, la signature spectroscopique de l'état *off* formé reste identique à celui formé à température ambiante et si cet état est ensuite illuminé à 405 nm à température cryogénique, le spectre n'évolue que peu, suggérant que l'état *off* formé à température ambiante (isomère *E*) reste piégé à température cryogénique.

La conclusion la plus logique de ces expériences était que l'état *off* à température cryogénique est différent de celui formé à température ambiante et que pour le dépléter, nous avons besoin d'une source de plus courte longueur d'onde. Nous avons donc tenté un retour de l'état *off* sous illumination laser à 355 nm.

Lors de ces mesures, nous avons constaté qu'effectivement, les niveaux de fluorescence et d'absorbance étaient moins élevés après illumination à 405 nm (Figure 66A) qu'après illumination à 355 nm (Figure 66B).

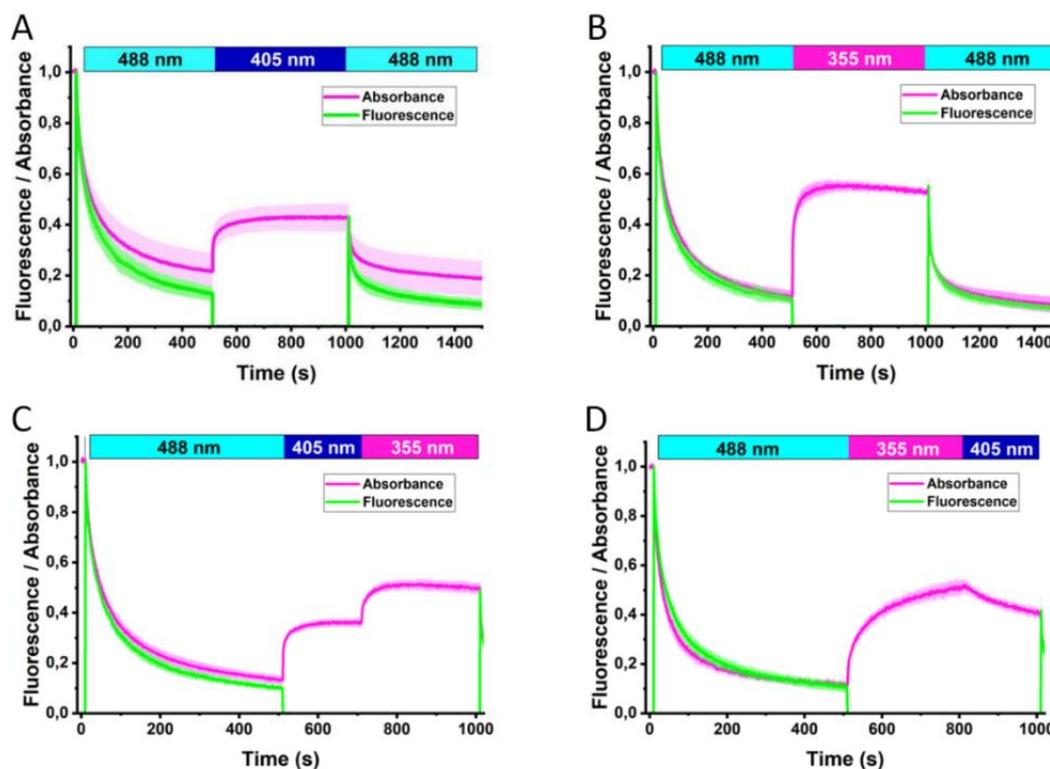


Figure 66 – Courbes de photocommutation à température cryogénique *on*→*off* (488 nm, 0.4 kW/cm²) et *off*→*on*, en utilisant soit une illumination à 405 nm (0.3 kW/cm²) (A, C, D) soit à 355 nm (0.03 kW/cm²) (B, C, D). Le niveau d'absorbance au pic anionique (vert) et le niveau de fluorescence (magenta) sont représentés. La fluorescence n'est mesurée que pendant les phases d'illumination/excitation à 488 nm.

Une illumination à 355 nm faisant suite à une illumination à 405 nm permettait de dépléter la population *off* qui ne l'avait pas été par le laser 405 nm (Figure 66C), à l'inverse, une illumination à 405 nm faisant suite à une illumination 355 nm (Figure 66D) ne permettait pas d'augmenter la population *on* mais plutôt de la photoblanchir. Ces résultats démontrent que l'illumination à 355 nm est suffisante pour dépeupler tout l'état *off* formé à température cryogénique mais également que l'inverse n'est pas vrai, suggérant qu'il existe deux populations d'états *off* formées à température cryogénique et non pas une seule comme à température ambiante.

Nous avons ensuite collecté des données de diffraction aux rayons X au synchrotron européen (ESRF). Pour cela, des cristaux de rsEGFP2 ont soit été congelés après avoir effectué des illuminations dans les cristaux sur notre microspectrophotomètre maison ($\text{Ca}(\text{ai})^2$ doscope) et avoir suivi l'évolution spectroscopique. Soit directement après photocommutation à température cryogénique vers l'état *off*, soit après photocommutation à température ambiante vers l'état *off* puis retour vers l'état *on* à température cryogénique.

Lors de la photocommutation à température cryogénique vers l'état *off* la structure obtenue montre un chromophore dans la même conformation *Z* que la protéine habituellement non photocommutée (Figure 67).

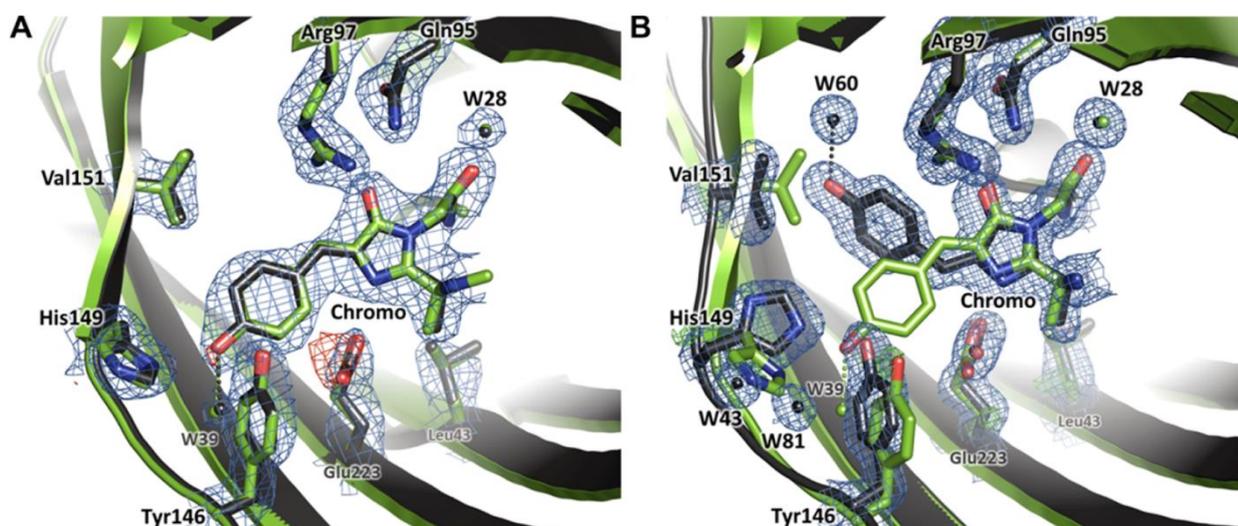


Figure 67 – Superposition des structures de rsEGFP2 avant (vert) et après photocommutation (noir). (A) La photocommutation à température cryogénique (488 nm, 700 s, 50 W/cm^2) montre un chromophore et son environnement en conformation *Z* (PDB : 8AHA). (B) La photocommutation à température ambiante (488 nm, 45 s, 15 mW/cm^2) montre un chromophore et son environnement en conformation *E*. La densité électronique (bleu) $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ contourée à 1σ ainsi que les densités électroniques différences $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ contourées à $+3\sigma$ (vert) et -3σ (rouge) sont montrées.

Il n'y a donc pas d'isomérisation visible dans la structure à température cryogénique. La structure de la protéine photocommutée à température ambiante puis illuminée vers l'état *on* montre à l'inverse un chromophore dans la conformation *E*, démontrant, là encore, que l'isomérisation ne se produit pas à basse température. Ces résultats ne sont pas étonnants puisqu'il est improbable d'observer des déplacements atomiques majeurs à basse température où seuls les changements d'états d'oxydation (déplacement d'électrons) et de protonation (déplacement d'hydrogène) sont généralement observés.

Nous ne savons pas si l'hétérogénéité de l'état *off* correspondait à un seul état *on* (ou deux états *on* s'échangeant rapidement) ou bien à deux états *on* distincts. Dans la première hypothèse, puisque seul *off*₂ est sensible à l'illumination à 405 nm, des cycles répétés 488 nm/405 nm devraient avoir comme conséquence un très rapide peuplement de l'état *off*₁ (non sensible au 405 nm) puisqu'à chaque cycle, l'illumination à 488 nm envoie une fraction des protéines dans chacun des états *off*. Dans la seconde hypothèse, l'effet de cycle répétés 488 nm/405 nm est de provoquer des allers-retours entre *on*₂ et *off*₂ et nous devrions donc observer une perte plus lente que dans la première hypothèse due à la photofatigue de l'état *on*₂. Dans tous les cas, les deux états *off* étant sensibles au 355 nm, l'illumination à cette longueur d'onde devrait mener à un meilleur contraste lors de cycle répétés 488 nm/355 nm. Les simulations des deux hypothèses ont été réalisées par Jip Wulffélé (Figure 68A,B) ainsi que la mesure de cycles répétés 488 nm/405 nm et 488 nm/355 nm (Figure 68C). Les résultats montrent que le modèle correspondant à deux états *on* distincts est le plus en accord avec les données, suggérant que l'hétérogénéité de l'état *off* prend sa source dans une hétérogénéité de l'état initial dont la nature reste à déterminer.

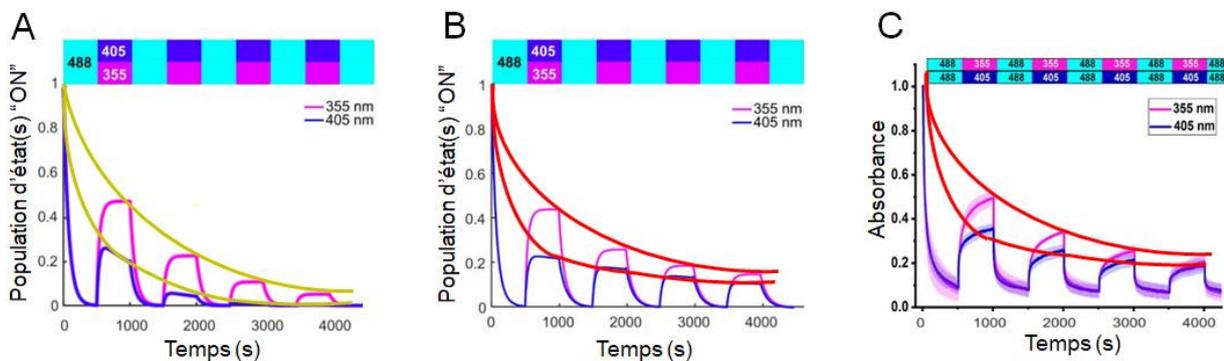


Figure 68 – Photofatigue de rsEGFP2 par des cycles répétés 488 nm/405 nm ou 488 nm/355 nm selon deux modèles où deux états *off* sont présents dont un seul est sensible au 405 nm et les deux au 355 nm – (A) Simulation selon un modèle photophysique présentant un seul état *on*. (B) Simulation selon un modèle photophysique présentant deux états *on* ne communiants pas. (C) Données des photofatigues. Les cinétiques de photofatigue du second modèle (courbes rouges) sont plus en accord avec les données que celles du premier modèle (courbes or).

En combinant cristallographie aux rayons X et microspectrophotométrie UV/Vis contrôlée en température, nous avons donc démontré un nouveau mécanisme de photocommutation, à température cryogénique, menant à la formation sous la forme éteinte, de deux états *off* dont l'un est sensible à la lumière 405 nm et dont les deux sont sensibles à la lumière 355 nm. Les états rencontrés à température cryogéniques sont si différents de l'isomérisation *Z-E* observée à température ambiante avec les RSFPs qu'il semble improbable que ce mécanisme se limite à elles. Nous proposons que la forme allumée de rsEGFP2 adopte deux conformations (*on₁* et *on₂*) qui sont en échange rapide à température ambiante mais qui ne s'échangent plus à température cryogénique. Ils mènent respectivement aux états éteints *off₁* et *off₂*. Chacun des états est bien entendu toujours susceptible de photoblanchir (Figure 69A). Nous proposons également (dans le bas du modèle) la possibilité qu'une très faible fraction des molécules aient pu isomériser de *Z* à *E* et se seraient déprotonnées sous 405 nm, menant lieu à une très faible fraction anionique isomérisée *E*, à laquelle nous attribuons l'absorbance à 520 nm que nous voyons en Figure 65D. Cette interprétation vient à la fois de la région d'absorbance (correspondant à une forme anionique) mais aussi de l'observation que rsEGFP2 dont le chromophore a subi une isomérisation *Z*→*E* à température ambiante puis est illuminée à 405 nm à température cryogénique voit son chromophore incapable d'isomériser à nouveau en *Z* (Figure 69B) mais accumule beaucoup de cette forme absorbante à 520 nm (Figure 69C).

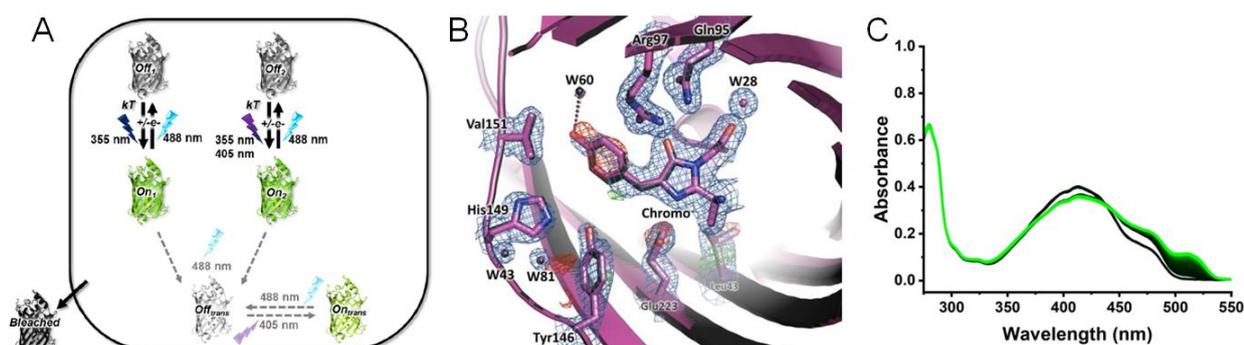


Figure 69 – (A) Modèle photophysique proposé pour la photocommutation de rsEGFP2 à température cryogénique. La sensibilité à des longueurs d'onde particulière est indiquée. kT : activation thermique. Les flèches pointillées indiquent l'implication résiduelle de conformation *E* du chromophore lors de la commutation à température cryogénique. (B) Structures 3D du chromophore de rsEGFP2 ayant été isomérisé en *E* par illumination à 488 nm à température ambiante (violet) puis illuminé à 405 nm à température cryogénique (noir). (C) Spectres d'absorption correspondant à l'illumination à 405 nm à température cryogénique de rsEGFP2 préilluminée à 488 nm à température ambiante.

Cette étude, publiée dans le Journal of the American Chemical Society [123], suggère également que pour des expériences de cryo-PALM et de cryo-CLEM [124] utilisant rsEGFP2 et

possiblement d'autres protéines fluorescentes peut-être plus prometteuses (telles que nos variants rsEGFP2-V151A et V151L qui semblent supprimer l'hétérogénéité des états *off* (voir chapitre 4 page 33) ou mEmerald qui semble donner des résultats intéressants à température cryogénique) il semble préférable d'utiliser une illumination à 355 nm plutôt qu'à 405 nm pour améliorer l'efficacité de marquage grâce à un retour plus complet vers l'état *on*. Très récemment, une étude rapporte l'utilisation de la PCFP mApple sous la même modulation *on-off* afin de l'utiliser en cryo-PALM [125].

2. Objectifs concernant mes projets de recherche

J'ai pris en charge en 2023 la responsabilité du microspectrophotomètre Cal(ai)²doscope permettant les mesures d'absorbance et de fluorescence en solution ou dans les cristaux à températures ambiante ou cryogénique. J'ai également pris en charge la responsabilité de plusieurs projets photophysiques comme l'amélioration de l'efficacité de maturation de mEos4b ou le projet d'ingénierie des PTFPs pour le cryo-PALM pour lequel j'étudie la photophysique de la protéine fluorescente mEmerald dont le succès déterminera probablement notre poursuite ou non de notre activité cryo-PALM. A l'étude de mEmerald se rajoute une collaboration avec le Dr. Antoine Royant (IBS/ESRF) que je viens d'initier afin d'étudier également la protéine mCerulean qui présente un phénomène de photoconversion réversible du cyan au vert à température cryogénique.

En dehors des études photophysiques des PTFPs et de leur ingénierie pour leur utilisation en microscopie de fluorescence avancée (qui reste mon cœur d'expertise et mon intérêt majeur), j'ai initié il y a quelques années une collaboration avec le Dr. Audrey Dussutour (CRCA Toulouse) sur l'étude du cytosquelette du myxomycète *Physarum polycephalum*. Cet eucaryote très médiatisé ces dernières années sous le surnom de « blob » ne fait pas partie des règnes animal, végétal ou fongique et vit dans les sous-bois à l'abri de la lumière, de la sécheresse et du sel et se nourrit de champignons et de bactéries. Cette activité trouverait donc sa pleine place dans les activités de notre nouveau groupe (I2SR : Integrative Imaging of Stress Response) dont la thématique est l'imagerie intégrée de la réponse au stress.

P. polycephalum est un organisme unicellulaire grandissant sans division membranaire alors que son patrimoine génétique est dupliqué tous les jours, ce qui résulte en un syncytium contenant

des millions de noyaux et pouvant être gigantesque (jusqu'à 10 m²). Il se déplace de 1 à 4 cm/h pour chercher de la nourriture et s'avère capable de résoudre des problèmes d'ordre algorithmique ou de prise de décisions. Il est en outre capable de survivre à de nombreuses situations comme des doses normalement mortelles de nickel ou de manganèse et semble immortel puisqu'une fois desséché et réhydraté, il ne présente plus aucun signe de sénescence.

Il représente donc un modèle intéressant à plusieurs égards se révélant un modèle cellulaire pour des études :

- sur la mortalité cellulaire, l'apoptose, le vieillissement et le cancer
- pour développer des solutions biotechnologiques de dépollution des sols
- pour l'éthologie et la compréhension de l'émergence de l'intelligence
- sur l'adaptation cellulaire au stress environnemental
- sur l'organisation et la dynamique rapide du cytosquelette

Si Audrey Dussutour est une éthologue qui étudie le blob essentiellement pour son comportement et sa capacité à résoudre des problèmes, notre collaboration a pour but de s'intéresser aux deux derniers points. L'adaptation cellulaire au stress environnemental représente en effet le cœur de l'activité de notre nouveau groupe I2SR et la microscopie super-résolution de fluorescence est une méthode de choix pour visualiser les réorganisations fines du cytosquelette, en particulier dans des structures formées par des analogues de l'actine et ressemblant à des veines qui aident au transport de nutriments d'un bout à l'autre de la cellule sous sa forme plasmode (cellule géante). L'étudiante d'Audrey Dussutour, Julie Delescluse, est venue au pendant le mois de juillet 2019 pour travailler avec moi sur ce projet et me transmettre ses savoir-faires sur la maîtrise des différentes formes de *P. polycephalum*, et en particulier le microplasmode beaucoup plus simple à cultiver en liquide et à transformer par un plasmide. J'ai invité Audrey Dussutour à donner un séminaire à l'IBS en septembre 2019 qui a été extrêmement bien perçu et nous avons tenté en 2021 le premier dépôt d'un projet ANR (qui n'a pas été retenu) dont j'étais porteur.

J'ai commencé à travailler sur ces problématiques par imagerie d'immunofluorescence de l'actine grâce à un marquage par la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488 en collaboration avec le Dr. Jean-Philippe Kleman. J'ai d'abord la faisabilité de ces expériences par mesure d'un spectre 2D du macroplasmode. En effet, le plasmode étant jaune, je craignais qu'une autofluorescence

limite nos mesures, mais la fluorescence des pigments (chrysophysarine A et physarochrome A) est heureusement limitée dans des zones situées hors des fenêtres des fluophores verts ou rouges typiques que nous utilisons (Figure 70A, Cf. cercles vert et rouge).

Le très beau réseau visualisé par microscopie confocale (Figure 70B) permet d'affirmer que l'actine est assez proche structuralement de l'actine humaine et j'envisage désormais le marquage par PTFPs ce réseau d'actine afin de réaliser les premières images super-résolues du cytosquelette de cet organisme particulièrement dynamique. Pour ce faire, j'ai extrait de son génome la région promotrice de l'actine de *P. polycephalum* et commandé le gène de la séquence codante de cette actine.

J'ai également initié une analyse lipidomique, en collaboration avec le Dr. Anne Martel et le Dr. Krishna Batchu de l'ILL, qui a révélé des lipides particulièrement longs et insaturés (> 5 insaturations) dans la membrane, comme des phosphatidylcholines (Figure 70C). Ces lipides habituellement rencontrés dans les cellules eucaryotes supérieures permettent d'expliquer les extraordinaires propriétés de résistance mécanique ainsi que de fluidité de *P. polycephalum*. De nombreux lipides à simple chaîne carbonée (céramides, acide lysophosphatidique...) ont également été détectés et indiquent fortement un rôle important de la voie de signalisation lipidique possiblement en lien avec la rapide adaptation aux stress environnementaux (habituation).

Enfin, j'ai initié une collaboration avec le Dr. Ambroise Desfosses, chercheur à l'IBS et son étudiante en thèse Eymeline Pageot sur un travail d'analyse par microscopie électronique de particules isolées extraites de lysat de macroplasmodes. Ce travail a permis de résoudre la structure d'une série de protéines de *P. polycephalum*. En particulier, la structure du ribosome permettant d'évaluer un niveau évolutif entre la levure et les eucaryotes supérieurs, une structure massive en cage dont le rôle est encore inconnu (mais probablement un cargo) ou encore la structure d'un filament d'actine. Cette dernière structure permet de faire le lien avec les modifications sondées par microscopie optique discutées ci-avant, montre qu'un modèle AlphaFold [126] du protomère d'actine de *P. polycephalum* rentre très bien dans les densités (Figure 70D) et permet déjà de noter des différences structurales avec l'actine mammifère. Ces études nécessiteront des structures à plus haute résolution, l'apport de l'intelligence artificielle dans la détermination de structures atomique et des spécialistes du cytosquelette mais la détermination

des structures de protéines spécifiques de *P. polycephalum* et la quantification (par spectrométrie de masse) de la modification du protéome en condition de stress est un axe important de compréhension de l'habituation de *Physarum polycephalum*.

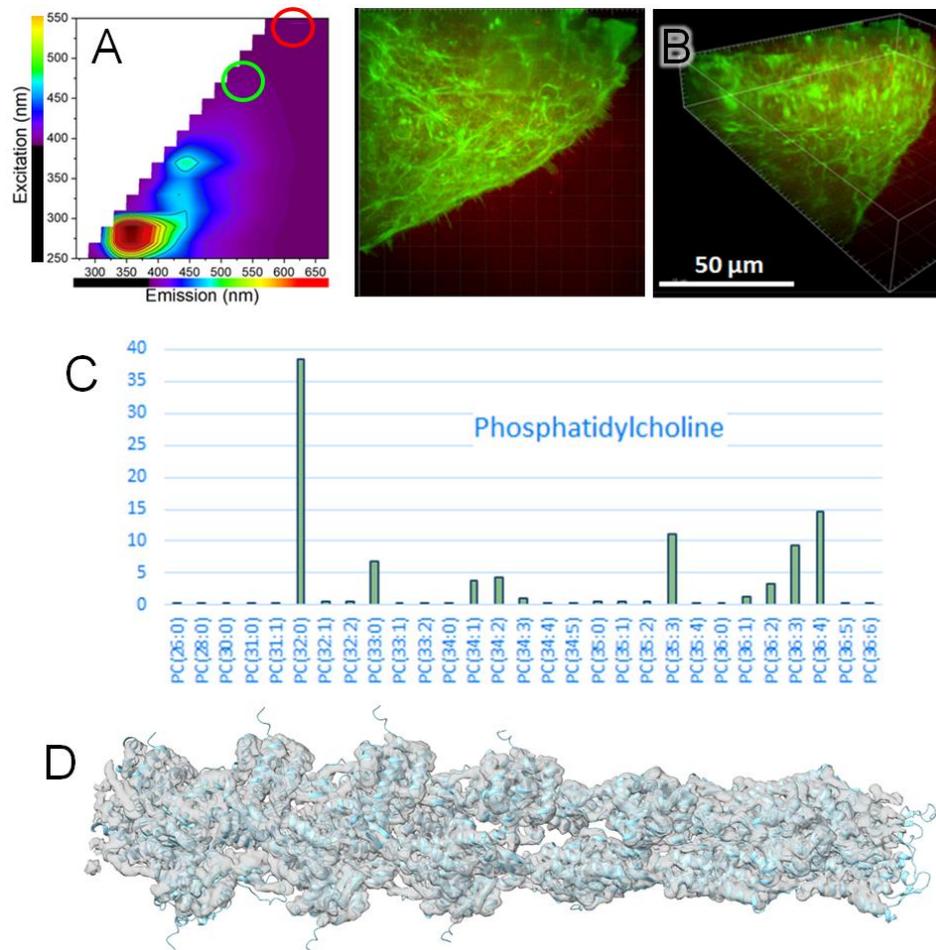


Figure 70 – Analyses structurales du macroplasmode de *P. polycephalum* - (A) Spectre bidimensionnel de fluorescence d'un macroplasmode. (B) Macroplasmode observé par microscopie confocale 2D et 3D après marquage immunofluorescent de l'actine (vert). (C) Analyse lipidomique par chromatographie liquide, avec l'exemple de la phosphatidylcholine. (D) Densité de microscopie électronique d'un filament d'actine avec un modèle obtenu par AlphaFold (cyan) ajusté à l'intérieur



Annexes et références

Page précédente : illustration d'une bibliothèque dédiée à la bibliographie scientifique sur les protéines fluorescentes (image générée par intelligence artificielle)

1. Curriculum vitae intégral

1.1. Expérience professionnelle

Octobre 2011 - Actuellement Grenoble, France	<p>Chercheur CNRS, Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble) – Équipe Pixel, Groupe I2SR (Integrated Imaging of Stress Response)</p> <p>Chargé de recherche dans la section 16 : Chimie et vivant.</p> <p>« <i>Ingénierie, caractérisation et application de nouvelles sondes génétiques photoactivables à l'imagerie cellulaire dynamique à super-résolution.</i> »</p>
Juillet 2009 - Août 2011 Leuven, Belgique	<p>Postdoc à la Katholieke Universiteit Leuven – Laboratoire de photochimie et de spectroscopie. Superviseur : Pr Johan Hofkens.</p> <p>Financements : Fondation flamande pour la recherche (FWO) et K.U. Leuven.</p> <p><i>Ingénierie de protéines fluorescentes photoactivables, microscopie à super résolution (PALM, STED), spectroscopie de molécules uniques</i></p>
Novembre 2008 - Février 2009 Grenoble, France	<p>Ingénieur de recherche au Commissariat à l'énergie atomique (CEA)</p> <p>Contrat intérimaire</p>
Novembre 2005 - Octobre 2008 Grenoble, France	<p>Doctorant dans le groupe cristallographie macromoléculaire (MX) à l'Installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF). Superviseurs : Dr Dominique Bourgeois et Dr Seán McSweeney.</p> <p>Financement : ESRF et land du Baden-Wurtemberg (Ulm, Allemagne)</p>
2001-2005 Grenoble, France	<p>Stagiaire à l'Installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF)</p> <p><i>Biochimie, chimie (synthèse), cristallisation et cristallographie. Études du mécanisme enzymatique de la réductase de superoxyde de <i>Desulfoarculus baarsii</i> et de la monooxygénase ActVA-ORF5 de <i>Streptomyces coelicolor</i> par cristallographie cinétique. Création du site web du laboratoire « Cryobench »</i></p>

1.2. Formation

2009	<p>Thèse de doctorat en Biologie Structurale et Nanobiologie; Université Joseph Fourier, Grenoble. “<i>Études mécanistiques des protéines fluorescentes photoactivables: une approche combinée par cristallographie et spectroscopie</i>”.</p>
2005	<p>Master en Biologie Structurale et Nanobiologie, avec mention; UJF, Grenoble</p>
2004	<p>Maîtrise en Biologie Structurale et Nanobiologie, avec mention; UJF, Grenoble</p>
2003	<p>Licence en Chimie-Biologie (spécialité mathématiques/informatique); UJF, Grenoble</p>

1.3. Distinctions scientifiques

2015-2019	Prime d'encadrement doctoral et de recherche (PEDR) du CNRS
Décembre 2010	Prix jeune chercheur "Dina-Surdin" 2009 de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM), Strasbourg
Décembre 2009	Prix de la meilleure thèse de l'Association Française de Cristallographie (AFC), Paris
Juin 2007	Prix de la meilleure présentation de l'école doctorale de chimie et sciences de la vie, Grenoble
Octobre 2006	Prix du meilleur poster à la "Journée des étudiants de la division expérimentale de l'ESRF", Grenoble
Juillet 2003	Prix du meilleur poster au Congrès de l'Association Française de Cristallographie, Caen

1.4. Enseignement, production et diffusion de la culture scientifique

1.4.1. Expérience d'enseignement

2016-2021 – Grenoble	Enseignant Bilan de Compétences Expérimentales (BCE, BIO 243, L2) puis Projet Expérimental en Biologie (PEB, BIO404 / BIO434, L2) - ~ 40 h/an Integrative Structural Cell Biology (ISB, M2), Université Grenoble Alpes - Cours, tutorats, TP, examens - ~ 8 h/an
Mars 2018 – Les Houches	Enseignant à l'École de physique des Houches
2013-2017 – Grenoble	Enseignant en microscopie avancée dans le cadre de la série de cours de doctorat " <i>Introduction aux méthodes émergentes de biologie structurale cellulaire intégrée</i> " à l'IBS
Juin 2013 – Grenoble	Membre de jury du Master 2 EVE (Exploration du Vivant et de l'Environnement), Département de physique
2010- 2014	Qualifications à la profession enseignante du Conseil National des Universités (CNU). Qualifié aux quatre nominations tentées, en physique (sections 28 et 30), chimie (section 31) et biologie (section 64)
Avril-mai 2006 – Grenoble	Responsable de TP et membre de jury d'un module de Master I : " <i>Ingénierie des protéines</i> " (BIO-472) à l'Université Joseph Fourier (8 heures TD et 2 jours TP/visites, 10.5 h équivalents TD)
8 mars 2006	Responsable d'un TP "HERCULES" (Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems) pour les doctorants: " <i>Studies of intermediate states in protein crystals</i> " (Cryobench), 5 h

Avril 2005	Responsable des TP et des visites dans le cadre d'un module master : <i>"Ingénierie des protéines"</i> (BIO-472) à l'UJF de Grenoble (2 jours, 10.5 h)
Mars 2005	Co-responsable d'un TP "HERCULES" (Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems) pour les doctorants : <i>"Spectroscopie sur échantillons biologiques"</i> , 5 h

1.4.2. Communication/organisation de réunions

Septembre-mai 2017 - Grenoble	Participation à l'organisation de la journée "Fluo Day" (20 juin) : Rencontre des utilisateurs de microscopie de fluorescence avancée
17 novembre 2015 – Saint- Martin-d'Uriage	Conférence publique : <i>"Pleins feux sur le prix Nobel de chimie 2014 ! Voir la vie cellulaire en haute résolution grâce à la fluorescence super-résolue"</i>
Janvier-juin 2015 – Grenoble	Participation à l'organisation de l'exposition <i>"La vie en lumière, lumière sur la vie"</i> dans le cadre de l'Année internationale de la lumière
2015 – Grenoble	Participation à l'organisation de la journée <i>"FluoDay"</i> (18 juin) : Rencontre des utilisateurs de microscopie de fluorescence avancée
2014-2017	Participation chaque année à la fête de la science de l'IBS et à une activité de sensibilisation à la recherche scientifique pour les élèves de CM2 de l'école primaire
23 octobre 2013 – Grenoble	Table ronde avec les journalistes scientifiques de l'Union Européenne des Associations de Journalistes Scientifiques (EUSJA)
02 juillet 2008 – Grenoble	Explications sur la cristallographie macromoléculaire et les visites des lignes de lumière de l'ESRF pour les étudiantes lituaniennes gagnantes du concours <i>"EPO + EIROforum European Union Young Scientist Contest 2007"</i>
15-19 juillet 2006 – Munich	Participation au <i>"Euroscience Open Forum (ESOF2006)"</i>
20-22 juin 2006 – Grenoble	Participation à des ateliers sur le journalisme scientifique, Univ. Joseph Fourier
17 avril 2006 – Grenoble	Explications données sur la cristallographie macromoléculaire et visites de lignes de lumière de l'ESRF pour les élèves gagnantes des Jeux Olympiques de Physique France et leur professeur de physique (Versailles)
2005-2008 – Grenoble	Plusieurs visites, démonstrations et explications faites à l'ESRF, chaque année aux visiteurs et aux étudiants. Participation chaque année à l'animation du stand ESRF lors de la fête de la science et des journées portes ouvertes de l'ESRF

1.4.3. Conférences et séminaires

1.4.3.1. Conférences internationales

Mars 2018 Les Houches, France	Ecole d'hiver de physique des Houches: Fluorescence markers for advanced microscopy: From photophysics to biology, (invité) – <i>"A practical guide to the characterization of fluorescent proteins"</i>
-------------------------------------	--

Septembre 2015 Aveiro, Portugal	16 ^{ème} Congrès de la Société Européenne de Photobiologie (ESP 2015), (invité en tant que keynote speaker) - <i>“2015 : a light odyssey - From GFP to smart highlighters”</i>
Août 2015 Bordeaux, France	5 th Single Molecule Localization Microscopy Symposium (SMLMS), (invité) <i>“rsFolder-GFP: an ultra-stable photoswitchable fluorescent protein for super-resolution imaging of the bacterial periplasm”</i>
30 août 2013 Francfort, Allemagne	3 ^{ème} “Single Molecule Localization Microscopy Symposium (SMLMS)”, (invité) <i>“Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein”</i>
31 août 2012 Lausanne, Suisse	2 ^{ème} “Single Molecule Localization Microscopy Symposium (SMLMS)” à l’EPFL <i>“Understanding and engineering improved phototransformable fluorescent proteins for advanced fluorescence microscopy”</i>
26 août 2009 Bielefeld, Allemagne	4 ^{ème} Symposium “CeBiTec BioImaging 2009” (invité) <i>“IrisFP: a promising new type of photoactivatable fluorescent biomarker for nanoscopy”</i>

1.4.3.2. Conférences nationales

21 novembre 2012 Grenoble, France	Congrès SFBBM & SFB “Mécanismes moléculaires et processus vitaux intégrés” <i>“Understanding and engineering improved phototransformable fluorescent proteins for advanced fluorescence microscopy”</i>
16 décembre 2010 Strasbourg, France	37 ^{ème} Forum des jeunes chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, SFBBM (invité) <i>“Les protéines fluorescentes photoactivables : nouveaux outils pour la biologie cellulaire”</i>
10 décembre 2009 Paris, France	Congrès du groupe thématique de biocristallographie “GTBio 2009” (invité) <i>“Etudes mécanistiques des protéines fluorescentes photoactivables : une approche combinée par cristallographie et spectroscopie”</i>
18 septembre 2009 Louvain-la-Neuve, Belgique	Congrès “Groupe de contact FNRS sur les interactions électroniques dans les systèmes supramoléculaires et nanomatériaux” (invité) <i>“IrisFP: a promising new type of photoactivatable fluorescent biomarker for nanoscopy”</i>
08 July 2008 Rennes, France	Congrès de l’Association Française de Cristallographie (AFC 2008) <i>“Caractérisations spectroscopiques et cristallographiques des phototransformations lentes et rapides de IrisFP, une nouvelle protéine fluorescente photoconvertible”</i>
Juin 2004 Lyon, France	Congrès du groupe thématique de biocristallographie “GTBio 2004” <i>“Structure de la superoxyde réductase liée au ferrocyanure et expansion du site actif induite par photo-réduction”</i>

1.4.3.3. Conférences et ateliers locaux

18 juin 2015 Grenoble, France	Journée “FluoDay”, (invité) - <i>“Developments in super-resolution techniques and probes”</i>
8 octobre 2014 Toulouse, France	Journée “Autour de l’imagerie” de l’Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV) et du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) (invité) <i>“Understanding the structure & photophysics of phototransformable fluorescent proteins to engineer better performing biomarkers”</i>
17 avril 2014 Grenoble, France	“Fluorescence en Biologie” (invité) <i>“Super-resolution imaging and fluorescent proteins engineering”</i>
25 mai 2010 Orsay, France	10 ^{èmes} journées de l’Ecole Doctorale “Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l’Appliqué” (invité) - <i>“Développement de nouvelles protéines fluorescentes photoactivables en vue de leur utilisation en imagerie”</i>
21 octobre 2008 Grenoble, France	Atelier “Biological Physics at Large Facilities” <i>“Coupling of X-ray crystallography and spectroscopy in crystals to characterize a new photochromic fluorescent protein”</i>
01 Octobre 2007 Aussois, France	Séminaire “ESRF Students and Science Days 2007” <i>“Coupled crystallographic and spectroscopic studies of new fluorescent biomarkers”</i>
12 juin 2007 Grenoble, France	Présentation à la journée de l’Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant <i>“Etudes structurales de protéines fluorescentes photoconvertibles : une nouvelle génération de protéines naturellement émettrices de lumière colorée”</i>
27 mars 2006 Grenoble, France	Center for Integrated Structural Biology (CISB) Science Day <i>“Coupled spectroscopic/crystallographic studies of Eos fluorescent protein”</i>

1.4.3.4. Séminaires

28 novembre 2014 St Paul-lez-Durance, France	Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (LBC), CEA Cadarache, France (invité par le Dr. P. Arnoux) - <i>“Comprendre la structure et la photophysique des protéines fluorescentes phototransformables pour concevoir des biomarqueurs plus performants”</i>
14 novembre 2013 Lyon, France	Laboratoire Joliot-Curie, Ecole Normale Supérieure, ENS (invité par le Dr K. Monier) <i>“Phototransformable fluorescent proteins : new tools for cell biology”</i>
12 mars 2012 Genève, Suisse	Groupe de physique avancée, GAP – biophotonique, Université de Genève (invité par le Pr. J.P. Wolf) - <i>“Les protéines fluorescentes phototransformables”</i>
26 mars 2010 Gif/Yvette, France	Laboratoire d’enzymologie et biochimie structurale, LEBS (invité par le Dr J. Cherfils) <i>“Études structurales et spectroscopiques de protéines fluorescentes photoactivables”</i>
23 février 2009 Leuven, Belgique	Département de chimie de l’Université de Louvain (invité par le Pr J. Hofkens) <i>“Structural studies of phototransformations observed in photoactivatable fluorescent proteins”</i>

12 août 2005 | Département de biophysique de l'Université d'Ulm (invité par le Pr U. Nienhaus)
 Ulm, Allemagne | *"Kinetic crystallography: tools to study proteins dynamics in crystals"*

1.4.3.5. Posters

12-16 août 2007 | 9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2007)
 Manchester, GB | *"The Cryobench: a tool for in crystallo spectroscopy"*

20 octobre 2006 | Conférence "ESRF Experiments Division Students Day 2006"
 Grenoble, France | *"New fluorescent proteins photoconvertible from a colour to another: the example of EosFP"*

10-13 juillet 2006 | Congrès de l'Association Française de Cristallographie (AFC 2006)
 Toulouse, France | *"EosFP : une protéine fluorescente photoconvertible du vert au rouge"*

26-28 mai 2004 | Conférence "ESRF Science Days 2004"
 Aussois, France | *"Study of the catalytic mechanism of superoxide reductase by kinetic protein crystallography"*

20 octobre 2003 | Conférence "ESRF Experiments Division Students Day 2003"
 Grenoble, France | *"Towards a structural study of the catalytic mechanism of D. baarsii superoxide reductase"*

07-10 juillet 2003 | Congrès de l'Association Française de Cristallographie (AFC 2003)"
 Caen, France | *"Vers une étude structurale du mécanisme catalytique de la superoxyde réductase (SOR) de Desulfoarculus baarsii"*

1.4.4. Encadrement, animation et management de la recherche

1.4.4.1. Supervision d'étudiants

Doctorat	<p>Membre du jury de comité de suivi de thèse de Rory Munro (2021-2024), doctorant sous la co-supervision de J.P. Colletier et B. Brutscher)</p> <p>Co-direction (directeur : D. Bourgeois) de thèse de Romain Berardozzi (2013-2016) <i>"Etude photophysique des protéines fluorescentes photoconvertibles utilisées en microscopie de super-résolution"</i></p> <p>Co-supervision au jour le jour (directeur : J.P. Colletier) de Mariam El Khatib (2013-2016) - <i>"Implication des porines dans la genèse et le développement des biofilms de Providencia stuartii"</i></p>
Master	<p>Maxime Killer (22/02/18 - 11/06-18) – Master 2 <i>"Etudes cristallographiques d'états intermédiaires de rsEGFP2 en conditions cryogéniques"</i></p> <p>Sylvain Gervason (29/03/16 – 17/05/16 et 03/01/17 – 30/06/17) – Master 1 & 2 <i>"Développement et caractérisation d'un mutant de protéine fluorescente par microscopie super-résolution PALM"</i></p>

	<p>Apolline Walenczak (07/01/13 – 30/06/13) – Master 2 <i>“Preuve de principe de FRET quantitatif avec une unique protéine fluorescente par conception et caractérisation d’un tandem-dimère de NijiFP”</i></p>
	<p>Romain Berardozi (24/09/12 – 30/06/13) – Master 2 <i>“Ingénierie et caractérisation d’une nouvelle protéine fluorescente aux propriétés améliorées par microscopie de fluorescence”</i></p>
	<p>Rémy Flores-Flores (01/03/12 – 30/06/12) – Master 2 <i>“Caractérisation par nanoscopie du système de réparation de dommages ADN UV-photoinduit de Deinococcus radiodurans”</i></p>
	<p>Benjamien Moeyaert (25/09/09 – 31/05/10) – Master 1 & 2 <i>“Ingénierie de protéines fluorescentes phototransformables”</i></p>
	<p>Cyril Piat (01/02/08 – 15/06/08) – Master 2 <i>“Etudes des propriétés photophysiques d’une protéine fluorescente irréversiblement photoconvertible et réversiblement photoblanchissable en solution et en cristaux”</i></p>
	<p>Guillaume Desfonds (02/04/07 - 31/08/07) – Master 1 <i>“Cristallisation, biochimie et caractérisation de la protéine fluorescente IrisFP”</i></p>
Licence	<p>Veerle Van Meervelt (23/02/10 - 30/04/10) <i>“Caractérisation spectroscopique de nouvelles protéines fluorescentes”</i></p>

1.4.5. Financements

1.4.5.1. Financements personnels

2016	<p>Coordinateur d’un financement CNRS (DEFI instrumentation aux limites) <i>“MicroReflec : Nanosubstrats pour une détection améliorée de protéines fluorescentes à l’échelle de la molécule unique”</i>. Partenariat entre l’IBS et le Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN, CNRS Marcoussis, UPR 20) – 23 k€, 12 mois</p>
2015-2016	<p>Coordinateur d’un financement Alpes Grenoble Innovation Recherche (AGIR-POLE 2015) <i>“NanOxyd : Ingénierie de protéines fluorescentes phototransformables pour sonder les compartiments cellulaires oxydants à l’échelle nanoscopique”</i> – 20 k€, 24 mois</p>

1.4.5.2. Participation à des contrats de recherche ANR

2023-2027	<p>Participation à l’ANR PRC “Photoswitch-NMR” (ANR-22-CE11-0011): <i>“Photoswitching mechanisms and environmental dependencies of fluorescent protein markers”</i>. Partenariat entre l’IBS et le département de chimie de l’ENS (Paris) – 576 k€, 48 mois, coordination : B. Brutscher</p>
2021-2025	<p>Participation à l’ANR PRC “STABLE-FP” (ANR-20-CE11-0013): <i>“Next generation of ultrastable fluorescent proteins for quantitative super-resolution microscopy”</i>. Partenariat entre l’IBS et l’Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences (IINS, Bordeaux) – 549 k€, 48 mois, coordination : D. Bourgeois</p>
2017-2020	<p>Participation à l’ANR PRCI “CRYO PALM” (ANR-17-CE11-0047-01): <i>“Microscopie Super résolution par la localisation de molécules unique à température cryogénique”</i>.</p>

2016-2020	Partenariat entre l'IBS et l'Université de Göttingen (Allemagne) – 257 k€, 36 mois, coordination : D. Bourgeois
2015-2019	Participation à l'ANR PRC "DIVinHD" (ANR-16-CE11-0016): " <i>Division in High Definition</i> ": Partenariat entre l'IBS et le laboratoire Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB, CNRS Lyon, UMR 5086) – 358 k€, 48 mois, coordination : C. Morlot
2011-2014	Participation à l'ANR blanche "NOBLEACH" (ANR-11-BSV5-0012): " <i>Controlling photobleaching of fluorescent proteins for super-resolution microscopy</i> " – 503 k€, 36 mois, coordination: D. Bourgeois

1.5. Production scientifique

1.5.1. Publications scientifiques

1.5.1.1. Revues internationales à comité de lecture

: contributions égales, *: auteur(s) correspondant(s), IF_{xxxx}= facteur d'impact de l'année xxxx
h-index=25, citations totales >1800

Publications depuis mon recrutement (24):

- 24) A. Maity, J. Wulffélé, I. Ayala, A. Favier, **V. Adam**, D. Bourgeois* & B. Brutscher*
"Structural heterogeneity in a phototransformable fluorescent proteins impacts its photochemical properties"
 En revision à Advanced Science (2023) – IF₂₀₂₁=17.521
- 23) A. Mantovanelli#, O. Glushonkov#, **V. Adam**#, J. Wulffélé, D. Thédié, M. Byrdin, I. Gregor, O. Nevskiy, J. Enderlein & D. Bourgeois*
"Photophysical studies at cryogenic temperature reveal a novel photoswitching mechanism of rsEGFP2"
 Journal of the American Chemical Society (2023) **145**(27):14636-14646 – IF₂₀₂₁=16.383
- 22) **V. Adam**#, K. Hadjidemetriou#, N. Jensen#, R.L. Shoeman#, J. Woodhouse#, A. Aquila, A-S. Banneville, T.R.M. Barends, V. Bezchastnov, S. Boutet, M. Byrdin, M. Cammarata, S. Carbajo, N.E. Christou, N. Coquelle, E. De la Mora, M. El Khatib, T. Moreno Chicano, R. B. Doak, F. Fieschi, L. Foucar, O. Glushonkov, A. Gorel, M.L. Grünbein, M. Hilpert, M. Hunter, M. Kloos, J. E. Koglin, T.J. Lane, M. Liang, A. Mantovanelli, K. Nass, G. Nass Kovacs, S. Owada, C.M. Roome, G. Schirò, M. Seaberg, M. Stricker, M. Thépaut, K. Tono, K. Ueda, L.M. Uriarte, D. You, N. Zala, T. Domratcheva*, S. Jakobs, M. Sliwa, I. Schlichting, J-P. Colletier, D. Bourgeois* & M. Weik*
"Rational control of off-state heterogeneity in a photoswitchable fluorescent protein provides switching contrast enhancement"
 ChemPhysChem (2022) **23**(19):e202200192 – IF₂₀₂₁=3.520

- 21) N.E. Christou, K. Giandoreggio, I. Ayala, O. Glushonkov, **V. Adam**, D. Bourgeois & B. Brutscher*
“Disentangling chromophore states in a reversibly switchable green fluorescent protein: mechanistic insights from NMR spectroscopy”
 Journal of the American Chemical Society (2021) **143**(19):7521-7530 – IF₂₀₂₁=16.383
- 20) M. Jessop[#], C. Liesche[#], J. Felix[#], A. Desfosses, M. Baulard, **V. Adam**, A. Fraudeau, K. Huard, G. Effantin, J. P. Kleman, M. Bacia-Verloop, D. Bourgeois & I. Gutsche*
“Supramolecular assembly of the E. coli LdcI upon acid stress”
 Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2021) **118**(2): e201438118 – IF₂₀₂₁=12.291
- 19) E. De Zitter, J. Ridard, D. Thédié, **V. Adam**, B. Lévy, M. Byrdin, G. Gotthard, L. Van Meervelt, P. Dedecker, I. Demachy & D. Bourgeois*
“Mechanistic investigations of green mEos4b reveal a dynamic long-lived dark state”
 Journal of the American Chemical Society (2020) **142**(25):10978-10988 – IF₂₀₂₀=15.419
- 18) J. Woodhouse, G. Nass Kovacs[#], N. Coquelle[#], L. Uriarte[#], **V. Adam**[#], T. Barends, M. Byrdin, E. De La Mora, R. Doak, M. Feliks, M. Field, F. Fieschi, V. Guillon, S. Jakobs, Y. Joti, P. Macheboeuf, K. Motomura, K. Nass, S. Owada, C. Roome, C. Ruckebusch, G. Schirò, R. Shoeman, M. Thepaut, T. Togashi, K. Tono, M. Yabashi, M. Cammarata, L. Foucar[#], D. Bourgeois, M. Sliwa*, J-P. Colletier & I. Schlichting*
“Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved serial femtosecond crystallography and transient absorption spectroscopy”
 Nature Communications (2020) **11**: 741– IF₂₀₂₀=14.919
- 17) N.E. Christou, I. Ayala, K. Giandoreggio-Barranco, M. Byrdin, **V. Adam**, D. Bourgeois & B. Brutscher*
“NMR reveals light-induced changes in the dynamics of a photoswitchable fluorescent protein”
 Biophysical Journal (2019) **117**(11):2087-2100– IF₂₀₁₉=3.854
- 16) E. De Zitter, D. Thédié, V. Monkemoller, S. Hugelier, J. Beaudouin, **V. Adam**, M. Byrdin, M. Van Meervelt, P. Dedecker* & D. Bourgeois*
“Mechanistic investigation of mEos4b reveals a strategy to reduce track interruptions in sptPALM”
 Nature Methods (2019) **16**:707-710 – IF₂₀₁₉=30.822
- 15) N. Coquelle[#], M. Sliwa[#], J. Woodhouse[#], G. Schirò[#], **V. Adam**[#], A. Aquila, T. Barends, S. Boutet, M. Byrdin, R. Doak, M. Feliks, F. Fieschi, L. Foucar, V. Guillon, M. Hilpert, M. Hunter, S. Jakobs, J. Koglin, G. Kovacsova, B. Lévy, M. Liang, K. Nass, J. Ridard, J. Robinson, C. Roome, C. Ruckebusch, M. Thepaut, M. Cammarata, I. Demachy, M. Field, R. Shoeman, D. Bourgeois, J.-P. Colletier*, I. Schlichting* & M. Weik*
“Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography”
 Nature Chemistry (2018) **10**(1):31-37 – IF₂₀₁₈=23.193
- 14) D. Thédié, R. Berardozi, **V. Adam** & D. Bourgeois*
“Photoswitching of green mEos2 by intense 561-nm light perturbs efficient green-to-red photoconversion in localization microscopy”
 The Journal of Physical Chemistry Letters (2017) **8**(18):4424-4430 – IF₂₀₁₇=8.709
- 13) J.-P. Colletier*, M. Sliwa*, F.-X. Gallat, M. Sugahara, V. Guillon, G. Schirò, N. Coquelle, J. Woodhouse, L. Roux, G. Gotthard, A. Royant, L. Martinez, C. Ruckebusch, Y. Joti, M. Byrdin, E. Mizohata, E. Nango, T. Tanaka, K. Tono, M. Yabashi, **V. Adam**, M. Cammarata, I. Schlichting, D. Bourgeois & M. Weik*
“Serial femtosecond crystallography and ultrafast absorption spectroscopy of the photoswitchable fluorescent protein IrisFP”
 The Journal of Physical Chemistry Letters (2016) **7**(5):882-887 – IF₂₀₁₆=9.353

- 12) R. Berardozzi, **V. Adam***, A. Martins & D. Bourgeois*
“Arginine 66 controls dark-state formation in green-to-red photoconvertible fluorescent proteins”
 Journal of the American Chemical Society (2016) **138**(2):558-565 – IF₂₀₁₆=13.858
- 11) M. El Khatib, A. Martins, D. Bourgeois, J.-P. Colletier* & **V. Adam***
“Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm”
 Scientific Reports (2016) **6**:18459 – IF₂₀₁₆=4.259
- 10) M. Jacq, **V. Adam***, D. Bourgeois, C. Moriscot, A.-M. Di Guilmi, T. Vernet & C. Morlot*
“Remodeling of the Z-ring nanostructure during Streptococcus pneumoniae cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy”
 mBio (2015) **6**(4): e01108-15 – IF₂₀₁₅=6.975
- 09) C. Duan, M. Byrdin, M. El Khatib, **V. Adam*** & D. Bourgeois*
“Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein”
 Methods and Applications in Fluorescence (2015) **3**: 014004 – IF₂₀₁₅=2.429
- 08) **V. Adam***, R. Berardozzi, M. Byrdin & D. Bourgeois*
“Phototransformable fluorescent proteins: future challenges”
 Current Opinion in Chemical Biology (2014) **20**: 92-102 – IF₂₀₁₄=6.813
- 07) **V. Adam***
“Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application?”
 Histochemistry and Cell Biology (2014) **142**(1): 19-41 – IF₂₀₁₄=3.054
- 06) S. Avilov, R. Berardozzi, M.S. Gunewardene, **V. Adam**, S.T. Hess* & D. Bourgeois*
“In cellulo evolution of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy”
 PLoS One (2014) **9**(6): e98362 – IF₂₀₁₄=3.234
- 05) E. Fron, M. Sliwa, **V. Adam**, J. Michiels, S. Rocha, P. Dedecker, J. Hofkens & H. Mizuno*
“Excited state dynamics of photoconvertible fluorescent protein Kaede revealed by ultrafast spectroscopy”
 Photochemical & Photobiological Sciences (2014) **13**(6): 867-874 – IF₂₀₁₄=2.267
- 04) C. Duan, **V. Adam**, M. Byrdin, J. Ridard, S. Kieffer-Jacquiod, C. Morlot, D. Arcizet, I. Demachy & D. Bourgeois*
“Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein”
 Journal of the American Chemical Society (2013) **135**(42): 15841-15850 – IF₂₀₁₃=11.444
- 03) E. Fron, M. Van der Auweraer, B. Moeyaert, J. Michiels, H. Mizuno, J. Hofkens & **V. Adam***
“Revealing the excited state dynamics in the fluorescent protein Dendra2”
 Journal of Physical Chemistry B (2013) **117**(8): 2300-2313 – IF₂₀₁₃=3.377
- 02) D. Bourgeois*, A. Regis-Faro & **V. Adam**
“Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins”
 Biochemical Society Transaction (2012) **40**(3): 531-538 – IF₂₀₁₂=2.587
- 01) D. Bourgeois* & **V. Adam**
“Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view”
 IUBMB Life (2012) **64**(6): 482-492 – IF₂₀₁₂=2.789

Publications pendant mon post-doctorat (5):

- 05) A. Roy, M.J. Field*, **V. Adam** & D. Bourgeois
“The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein”
 Journal of the American Chemical Society (2011) **133**(46): 18586-18589 – IF₂₀₁₁=9.907
- 04) **V. Adam***, B. Moeyaert, C.C. David, H. Mizuno, M. Lelimosin, P. Dedecker, R. Ando, A. Miyawaki, J. Michiels, Y. Engelborghs & J. Hofkens
“Rational design of photoconvertible and bi-photochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications”
 Chemistry & Biology (2011) **18**(10): 1241-1251– IF₂₀₁₁=5.829
- 03) J. Wiedenmann, S. Gayda, **V. Adam**, F. Oswald, K. Nienhaus, D. Bourgeois & G.U. Nienhaus*
“From EosFP to mIrisFP: structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family”
 Journal of Biophotonics (2011) **4**(6): 377-390 – IF₂₀₁₁=4.343
- 02) **V. Adam***, H. Mizuno, A. Grichine, J. Hotta, Y. Yamagata, B. Moeyaert, G.U. Nienhaus, A. Miyawaki, D. Bourgeois & J. Hofkens
“Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins”
 Journal of Biotechnology (2010) **149**(4): 289-298 – IF₂₀₁₀=2.970
- 01) A. Regis Faro, **V. Adam**, P. Carpentier, C. Darnault, D. Bourgeois* & E. de Rosny*
“Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins”
 Photochemical & Photobiological Sciences (2010) **9**(2): 254-262 – IF₂₀₁₀=2.558

Publications pendant mon doctorat (7):

- 07) **V. Adam**, P. Carpentier, S. Violot, M. Lelimosin, C. Darnault, G.U. Nienhaus & D. Bourgeois*
“Structural basis of X-ray induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein”
 Journal of the American Chemical Society (2009) **131**(50): 18063-18065 – IF₂₀₀₉=8.580
- 06) M. Lelimosin, **V. Adam**, G.U. Nienhaus, D. Bourgeois & M. Field*
“Photoconversion of the fluorescent protein EosFP: a hybrid potential simulation study reveals intersystem crossings”
 Journal of the American Chemical Society (2009) **131**(46): 16814-16823 – IF₂₀₀₉=8.580
- 05) **V. Adam**, K. Nienhaus, D. Bourgeois & G.U. Nienhaus*
“Structural basis of enhanced photoconversion yield in GFP-like protein Dendra2”
 Biochemistry (2009) **48**(22): 4905-4915 – IF₂₀₀₉=3.226
- 04) A.R. Howard-Jones*, **V. Adam**, A. Cowley, J.E. Baldwin & D. Bourgeois
“Cryophotolysis of a caged oxygen compound for use in low temperature biological studies”
 Photochemical & Photobiological Sciences (2009) **8**(8): 1150-1156 – IF₂₀₀₉=2.708
- 03) **V. Adam**, M. Lelimosin, S. Boehme, G. Desfonds, K. Nienhaus, M.J. Field, J. Wiedenmann, S. McSweeney, G.U. Nienhaus* & D. Bourgeois*
“Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations”
 Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2008) **105**(47): 18343-18348 – IF₂₀₀₈=9.380
- 02) A. Royant*, P. Carpentier, J. Ohana, J. McGeehan, B. Paetzold, M. Noirclerc-Savoye, X. Vernède, **V. Adam** & D. Bourgeois

“Advances in spectroscopic methods for biological crystals Part I: fluorescence lifetime measurements”

Journal of Applied Crystallography (2007) **40**: 1105-1112 – IF₂₀₀₇=3.629

- 01) G. Katona, P. Carpentier, V. Nivière, P. Amara, **V. Adam**, J. Ohana, N. Tsanov & D. Bourgeois*
“Raman-assisted crystallography reveals End-on peroxide intermediates in a non-heme iron enzyme”
Science (2007) **316**(5823): 449-453 – IF₂₀₀₇=26.372

Publications avant mon doctorat (4):

- 04) F.P. Molina-Heredia, C. Houée-Levin, C. Berthomieu, D. Touati, E. Tremey, V. Favaudon, **V. Adam** & V. Nivière*
“Detoxification of superoxide without production of H₂O₂. Antioxidant activity of superoxide reductase complexed with ferrocyanide”
Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2006) **103**(40): 14750-14755 – IF₂₀₀₆=9.643
- 03) E. Fioravanti, **V. Adam**, H. Munier-Lehmann & D. Bourgeois*
“The crystal structure of Mycobacterium tuberculosis thymidylate kinase in complex with 3'-azidodeoxythymidine monophosphate suggests a mechanism for competitive inhibition”
Biochemistry (2005) **44**(1): 130-137 – IF₂₀₀₅=3.848
- 02) **V. Adam**, A. Royant, V. Nivière, F.P. Molina-Heredia & D. Bourgeois*
“Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray induced photo-reduction”
Structure (2004) **12**(9): 1729-1740 – IF₂₀₀₄=5.185
- 01) D. Bourgeois*, X. Vernède, **V. Adam**, E. Fioravanti & T. Ursby
“A microspectrophotometer for UV-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals”
Journal of Applied Crystallography (2002) **35**: 319-332 – IF₂₀₀₂=1.871

1.5.1.2. Vulgarisation scientifique (4)

- 04) D. Bourgeois & **V. Adam**
“La microscopie de fluorescence à super-résolution : un outil révolutionnaire pour imager le vivant à l'échelle nanométrique”, Photoniques (2015) n°74, 34-39
- 03) D. Arcizet, **V. Adam**, P. Carpentier, A. Faro & D. Bourgeois
“Combiner cristallographie cinétique et spectroscopie optique”
L'actualité Chimique (2011) n°356-357, 78-83 <https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/2011-356-357-oct.-nov.-p78-Bourgeois-HD.pdf>
- 02) **V. Adam**
“Des protéines pour visualiser des détails de quelques nanomètres”
Regard sur la Biochimie (2010) **12**: 8-9 <https://docplayer.fr/65901462-Regard-sur-la-biochimie.html>
- 01) **V. Adam**
“Les protéines fluorescentes : lumières du vivant”, Le Gluon (2007) **36**, 1-3

1.5.1.3. Chapitres de livres (2)

- 02) C. Duan, V. Adam, M. Byrdin & D. Bourgeois
 “Structural basis of photoswitching in fluorescent proteins”
 Photoswitching proteins in *Methods in Molecular Biology* Vol. 1148 (2014) XVI, 177-202
- 01) D. Bourgeois, A. Regis-Faro & V. Adam
 “Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins”
 Frontiers in Biological Catalysis - Biochemical Society Symposium 79 (2012) n°356-357, 73-86

1.5.2. Structures tridimensionnelles

#	Code	Description	Res. (Å)
1	729932	Oxygène cagé (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)] nitrate (HPBC)	
2	1VZG	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , variant E47A, complexée au ferrocyanure	1.69
3	1VZH	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , variant E47A, complexée au ferrocyanure, expansion du site actif sous l'effet de la photoréduction	1.69
4	1VZI	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , variant E47A, complexée au chlore	1.15
5	1W2G	Thimidylate kinase (TMPK) de <i>M. tuberculosis</i> , complexée à la deoxythimidine	2.10
6	1W2H	Thimidylate kinase (TMPK) de <i>M. tuberculosis</i> , complexée à l'azidothymidine monophosphate	2.00
7	2JI1	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , sauvage	1.70
8	2JI2	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , variant E114A	1.70
9	2JI3	Superoxyde réductase (SOR) de <i>D. baarsii</i> , variant E114A, intermédiaire fer-peroxo	1.95
10	2VVH	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , forme verte, conformation Z	1.80
11	2VVI	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , forme verte, conformation E	2.00
12	2VVJ	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , forme rouge, conformation Z	2.00
13	2VZX	Protéine fluorescente Dendra2 de <i>Dendronophthya</i> sp.	2.00
14	3P8U	Protéine fluorescente mEosFP de <i>L. hemprichii</i>	2.25
15	3TMR	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , chromophore natif	2.00
16	3TMT	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , chromophore après clignotement	2.00
17	4LJB	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , blanchie en conditions anaérobiques	1.90
18	4LJC	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , blanchie par les rayons X	1.86
19	4LJD	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , blanchie en conditions aérobiques	2.50
20	4R6B	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , variant M159A, photostable	2.00
21	5DTL	Protéine fluorescente mEos2 de <i>L. hemprichii</i> , variant A69T, faiblement clignotant	2.70
22	5DTX	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , conformation Z	1.45
23	5DTY	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , conformation E	1.50
24	5DTZ	Protéine fluorescente rsFolder de <i>A. victoria</i> , conformation Z	1.50
25	5DU0	Protéine fluorescente rsFolder de <i>A. victoria</i> , conformation E	2.35
26	5FVF	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , XFEL dans la graisse à temp. ambiante	2.40
27	5FVG	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , synchrotron sans graisse à 100K	1.90
28	5FVI	Protéine fluorescente IrisFP de <i>L. hemprichii</i> , synchrotron dans la graisse à 100K	2.40
29	5O8A	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL, conformation E	1.70
30	5O8B	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL, état excité 1 ps affiné	1.70
31	5O8C	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL, état excité 1 ps composite	1.70
32	5O89	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL, conformation Z	1.70

33	6GOY	Protéine fluorescente mEos4b de <i>L. hemprichii</i> , forme verte, état fluorescent	1.65
34	6GOZ	Protéine fluorescente mEos4b de <i>L. hemprichii</i> , forme verte, état sombre long	2.40
35	6GP0	Protéine fluorescente mEos4b de <i>L. hemprichii</i> , forme rouge, état fluorescent	1.50
36	6GP1	Protéine fluorescente mEos4b de <i>L. hemprichii</i> , forme rouge, état sombre long	1.50
37	6T39	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL depuis état off, conform. <i>E</i>	1.60
38	6T3A	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL, état excité off +10 ns 400 nm	1.85
39	6YN5	Lysine decarboxylase (LdcI) de <i>E. coli</i> , pH 7.0, carte de microscopie électronique	2.70
40	6YN6	Lysine decarboxylase (LdcI) de <i>E. coli</i> , pH 5.2, carte de microscopie électronique	3.28
41	7AMB	Protéine fluorescente rsFolder2 de <i>A. victoria</i> , forme fluorescente	1.63
42	7AMF	Protéine fluorescente rsFolder2 de <i>A. victoria</i> , forme non fluorescente	1.63
43	7O7C	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151A de <i>A. victoria</i> , forme non fluorescente	1.55
44	7O7D	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151A de <i>A. victoria</i> , forme fluorescente	1.40
45	7O7E	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151L de <i>A. victoria</i> , forme fluorescente	1.80
46	7O7H	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151L de <i>A. victoria</i> , forme non-fluorescente	1.70
47	7O7U	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , XFEL depuis état on, conform. <i>E</i>	1.70
48	7O7V	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151A de <i>A. victoria</i> , XFEL, état fluorescent	1.90
49	7O7W	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151L de <i>A. victoria</i> , XFEL, état non fluorescent	2.10
50	7O7X	Protéine fluorescente rsEGFP2 V151A de <i>A. victoria</i> , XFEL, état non fluorescent	1.95
51	8AHA	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , état non fluorescent formé à 100K	2.38
52	8AHB	Protéine fluorescente rsEGFP2 de <i>A. victoria</i> , état fluorescent formé à 100K après formation de l'état non fluorescent à température ambiante	1.79

2. Vaincre la limite de résolution optique

La microscopie optique de super-résolution a révolutionné l'imagerie cellulaire, comme en atteste la remise du Prix Nobel de Chimie 2014 pour ses inventeurs : William E. Moerner, Eric Betzig et Stefan Hell. J'ai déjà décrit tout cela dans ma thèse de doctorat [1] ainsi que dans un article de vulgarisation [30] mais un résumé s'impose. Je ne mentionnerai ici que la microscopie de super-résolution par localisation de molécules uniques en lien avec les protéines fluorescentes phototransformables et ne parlerai pas de la méthode STED développée par S. Hell et qui repose sur des concepts différents.

2.1. Diffraction de la lumière et limite de résolution

A l'échelle de la molécule unique, même si elle ne mesure que quelques nanomètres, son image en microscopie de fluorescence subit, en microscopie à champ lointain (microscope à épifluorescence ou confocal), un phénomène de diffraction de la lumière. Il en résulte que l' d'une source ponctuelle (molécule) n'est pas un point mais un disque entouré par des cercles concentriques de moins en moins brillants, appelé disque ou tâche d'Airy (Figure 71A). Une autre

façon de décrire ce phénomène est de considérer la réponse lumineuse comme une fonction appelée fonction d'étalement du point (Point Spread Function, PSF) produite par le signal ondulatoire provenant de l'interaction entre la lumière de fluorescence et le système optique (lentilles) du microscope. Cette PSF est définie par une fonction de Bessel, dont le premier zéro est situé à une distance $x=3.83$ du centre et dont la division par π (puisque'il s'agit d'un signal circulaire) donne 1.2191268... soit environ 1.22. Le signal central a donc un diamètre mesurant environ $1.22 \frac{\lambda}{NA}$, où λ est la longueur d'onde émise par la source ponctuelle et NA est l'ouverture numérique de l'objectif de collecte.

En pratique, pour les systèmes optiques et les protéines fluorescentes typiquement utilisés, $\lambda=520$ nm, $NA=1.49$ et donc le diamètre du disque d'Airy est d'environ 425 nm. Il est alors possible d'ajuster une fonction gaussienne sur ce signal numérisé pour approximer la localisation de la molécule correspondant au sommet de la gaussienne (Figure 71B).

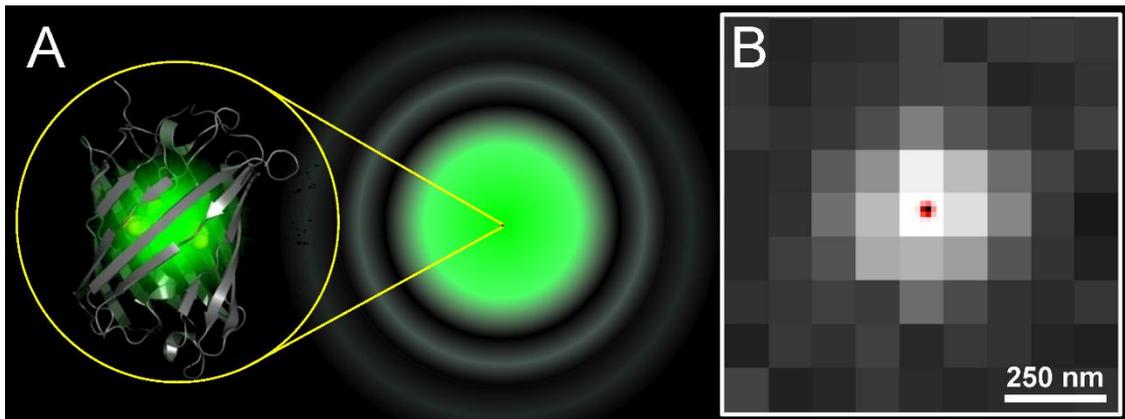


Figure 71 – (A) Une protéine fluorescente mesurant environ 5 nanomètres est en réalité visualisée en microscopie de fluorescence à champ lointain comme un disque d'Airy d'environ 500 nm de diamètre. (B) La visualisation de la molécule par une caméra hypersensible (pixels gris) permet, après ajustement d'une fonction gaussienne, de localiser très précisément le barycentre de la molécule (point rouge).

A cause du signal/bruit limité, la numérisation du signal par un détecteur constitué de pixels ne permet que d'enregistrer le plus fort du signal central et pas les cercles secondaires. Selon le nombre de photons collectés, la localisation sera plus ou moins précise et peut atteindre l'ordre du nanomètre, il convient donc d'adapter l'objectif afin de collecter suffisamment de photons par pixel mais également d'avoir assez de pixels pour permettre l'ajustement d'une courbe gaussienne, ce qui correspond à une taille typique de pixel autour de 100 nm.

Dans un échantillon biologique réel, la densité moléculaire est souvent très importante et les signaux enregistrés se recouvrent de sorte que la résolution optique n'est plus suffisante pour les distinguer les uns des autres. Dès le cas simple où deux molécules sont présentes, il deviendra difficile de distinguer l'origine spatiale de leur émission de fluorescence si elles sont situées à une distance plus petite que la distance du rayon du disque d'Airy, soit $0.61 \frac{\lambda}{NA}$, environ 213 nm : il s'agit du critère d'Abbe-Rayleigh [127, 128] basé sur la vision humaine. Avec un microscope, beaucoup plus sensible, il est toujours possible de déconvoluer ces deux signaux jusqu'à une limite de distance où la somme de deux signaux ne forme plus de creux permettant de les distinguer l'un de l'autre, soit vers 84% du critère de Abbe-Rayleigh et menant au critère de Sparrow, soit vers 179 nm avec les valeurs citées plus haut. Un autre critère pratique (et de valeur quasi identique) consiste à plutôt considérer la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la PSF, soit environ $0.51 \frac{\lambda}{NA}$. A noter qu'il devient impossible de distinguer les deux signaux quand tous les critères précédents sont dépassés, soit vers 77% du critère de Abbe-Rayleigh ($0.47 \frac{\lambda}{NA}$) soit vers un peu moins de 164 nm. Il s'agit alors de la limite absolue de résolution optique imposée par les lois physiques de diffraction de la lumière. Il est possible d'améliorer la résolution optique en jouant sur les différents paramètres de la formule de la résolution, à savoir la longueur d'onde λ ou l'ouverture numérique NA .

Concernant la longueur d'onde, en utilisant une longueur d'onde plus courte, la séparation des signaux provenant de plusieurs molécules proches se fera plus facilement mais cela n'est pas toujours possible, en particulier parce que des longueurs d'ondes plus courtes signifient généralement des observations moins profondes dans les échantillons et plus de cytotoxicité pour des échantillons biologiques.

Concernant l'ouverture numérique, une plus grande ouverture numérique signifie plus de photons collectés, en particulier parce que l'ouverture numérique est le produit de l'indice de réfraction n dans le milieu d'observation et du sinus du demi-angle d'ouverture a entre l'axe optique et le rayon lumineux pénétrant la lentille qui en est le plus écarté ($NA=n.\sin a$). Là encore, il est possible d'utiliser des milieux d'observation qui ont un indice de réfraction élevé correspondant à celui du verre des lamelles ou d'utiliser des objectifs avec de très grandes ouvertures numériques mais il existe des limites optiques.

2.2. Précision de localisation en SMLM

Les techniques d'imagerie de molécules uniques ont été développées dans les années 1980 grâce aux progrès technologiques de la microscopie électronique et de la spectroscopie laser. Elles ont permis de réaliser des avancées importantes dans la compréhension de la structure et du comportement des molécules individuelles par rapport aux comportements moléculaires moyennés dans les observations d'ensemble. Les équipes de William Esco Moerner et de Michel Orrit furent les premières dans les années 1990 à mesurer les signaux spectroscopiques (absorbance et fluorescence) à l'échelle de la molécule unique et à les imager dans des solides à très basses températures. Eric Betzig eu ensuite l'idée d'observer des molécules fluorescentes individuelles à température ambiante en les diluant de sorte que leurs signaux soient distinguables ou lorsque leur nombre était suffisamment réduit pour qu'elles soient séparées les unes des autres. Ce type d'observations de molécules uniques dans des échantillons biologiques est devenu possible au début des années 2000. Il nécessite un fluorophore suffisamment brillant pouvant émettre assez de photons et un détecteur suffisamment sensible pour pouvoir les collecter. Rapidement apparut une méthode nommée FIONA [129] pour Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy (imagerie de fluorescence avec précision d'un nanomètre) permettant le suivi précis et quantifié de molécules individuelles séparées spatialement avec une précision nanométrique, grâce à la détermination du centre de masse d'une fonction gaussienne ajustant le signal de la PSF correspondant à l'émission de la molécule unique. Même si, comme nous venons de le voir, le signal enregistré est un disque de plusieurs centaines de nanomètres, la précision de localisation σ d'une molécule individuelle est donnée par l'équation : $\sigma = \sqrt{\left(\frac{s_i^2}{N}\right) + \left(\frac{a^2/12}{N}\right) + \left(\frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}\right)}$, et ne dépend que de quatre paramètres (Figure 72) : la déviation standard de la fonction gaussienne ajustée sur le signal numérisé de la PSF (s_i), le nombre de photons collectés (N), la taille de pixel du détecteur (a) et le bruit de fond (b). Ainsi, pour une déviation standard de 100 nm (FWHM ~ 235 nm), 5 000 photons collectés et 10 photons de bruit de fond ainsi qu'une taille de pixels de 100 nm, on obtient une précision de localisation de 1.78 nm.

Comme on peut voir dans la Figure 72, la dépendance de la précision de localisation dépend de la faible valeur de la déviation standard de la gaussienne et du bruit de fond et de la grande valeur du nombre de photons collectés et de la taille de pixels du détecteur.

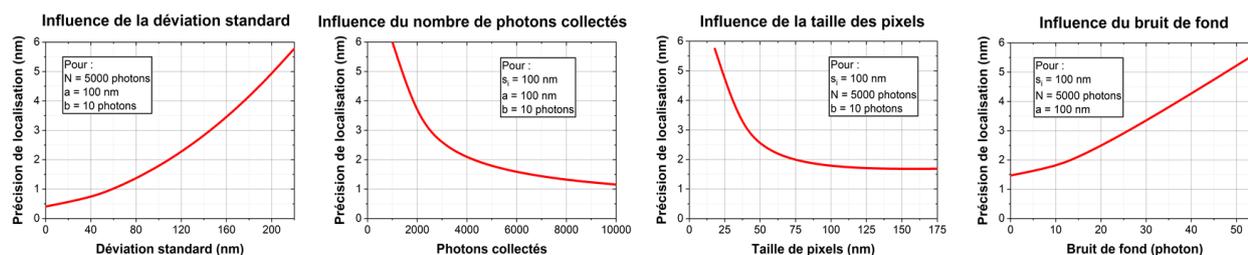


Figure 72 – Influence de la déviation standard, du nombre de photons collectés, de la taille des pixels et du bruit de fond sur la précision de localisation d'une molécule unique.

Cependant, pour la taille des pixels, on atteint rapidement un plateau qui ne permet pas de choisir une valeur optimale. Cette valeur peut être obtenue par le critère d'échantillonnage de Nyquist stipulant que pour qu'un signal analogique soit correctement représenté dans un espace digital, le signal doit être échantillonné au moins 2.3 fois. Ce qui signifie pour notre cas que la taille des pixels doit être au moins 2.3 fois plus petite que le disque d'Airy. En pratique, on considère un intervalle de taille de pixels 2.5 à 3 fois plus faible que le diamètre d'Airy. On peut donc parler de sous-échantillonnage (undersampling) si la taille des pixels est plus grande que 40% ($1/2.5$) du diamètre d'Airy et que l'on dispose donc de moins de 2.5×2.5 pixels pour ajuster la PSF (trop peu de pixels pour ajuster le signal) et de sur-échantillonnage (oversampling) si la taille des pixels est plus petite que 33% ($1/3$) du diamètre d'Airy et que l'on dispose donc de plus de 3×3 pixels pour ajuster la PSF (et on tend vers trop de pixels pour avoir un signal suffisant par pixel).

3. Nomenclature des isomères de chromophores

Les chromophores des protéines fluorescentes, fautiveusement dénommés « *cis* » et « *trans* » ont le même enchaînement d'atomes mais ne sont ni superposables, ni spéculaires (i.e. images l'un de l'autre dans un miroir = énantiomères), il s'agit donc de diastéréoisomères. Or, la nomenclature des diastéréoisomères suit les règles de priorité de Cahn-Ingold-Prelog (CIP), qui définissent les stéréoisomères *E* et *Z*.

Le chromophore le plus commun des protéines fluorescentes est le para-hydroxybenzylidene-1,2-diméthylimidazolinone (*p*-HBDI) qui peut exister sous la forme de deux diastéréoisomères où le groupe phénol est situé soit d'un côté (Figure 73A) soit de l'autre (Figure 73B) de la double liaison éthylénique le séparant du cycle imidazolinone.

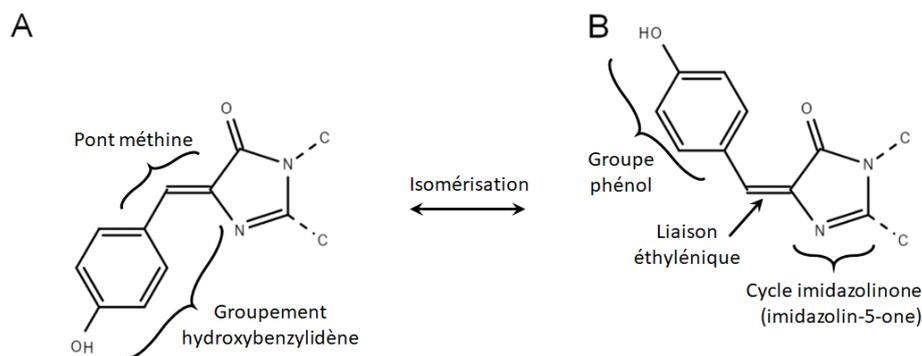


Figure 73 – Structure chimique du chromophore *p*-HBDI, commun aux protéines fluorescentes vertes, et dénominations des groupes le constituant. (A) isomère communément qualifié de *cis*, (B) isomère communément qualifié de *trans*.

3.1. Distinction entre les nomenclatures *cis/trans* et *Z/E*

Les nomenclatures *cis/trans* et *Z/E* sont régulièrement mal utilisées et confondues. Cette confusion depuis des années a mené à un abus de langage concernant les isomères des chromophores de protéines fluorescentes, qualifiés à tort de *cis* et *trans*, y compris par nous-mêmes.

Lorsqu'une molécule existe sous deux formes définies par leur isomérisation autour d'une double liaison entre deux carbones (liaison éthylénique), si chacun de ces deux atomes de carbone est substitué par un seul atome plus lourd qu'un atome d'hydrogène ($Z > 1$), alors c'est la nomenclature *cis/trans* qui doit être utilisée. Dans ce cas, si les deux atomes de numéro atomique $Z > 1$ sont du même côté de la ligne formée par la double liaison, l'isomère est *cis*, si au contraire ils sont de part et d'autre de cette ligne, l'isomère est *trans* (Figure 74).

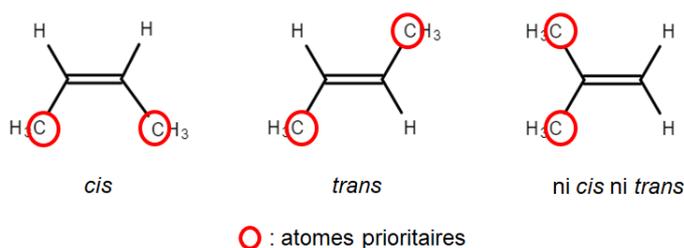


Figure 74 – Exemples d'isomérisation *cis/trans*. Les atomes prioritaires montrés en exemple pourraient tout aussi bien être d'autres atomes (plus lourds que l'hydrogène) ou groupements chimiques.

Au contraire, si au moins un des deux atomes de carbone est substitué par deux atomes plus lourds qu'un atome d'hydrogène, c'est la nomenclature *Z/E* qui doit être utilisée.

Dans ce cas, la priorité se fait dans l'ordre du numéro atomique des atomes substituants. Par exemple, un atome de chlore aura la priorité sur un atome d'azote, qui aura lui-même la priorité

sur un atome de carbone². Si les atomes prioritaires portés par chacun des atomes de carbone impliqués dans la double liaison sont situés du même côté de la ligne formée par la double liaison, l'isomère est *Z*-de l'allemand *Zusammen* : "ensemble"-, si au contraire ils sont situés de part et d'autre de cette ligne, l'isomère est *E*-de l'allemand *Entgegen* : "opposé"- (Figure 75).

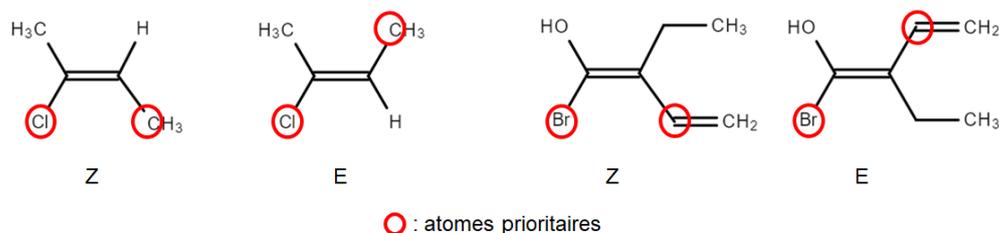


Figure 75 – Exemples d'isomérisation *Z/E*. Les atomes prioritaires montrés en exemple pourraient tout aussi bien être d'autres atomes (plus lourds que l'hydrogène) ou groupements chimiques.

3.2. Cas du chromophore des protéines fluorescentes

Puisque le chromophore des protéines fluorescentes possède une double liaison éthylénique dont l'un des atomes de carbone est substitué par deux atomes plus lourds que l'atome d'hydrogène, c'est la nomenclature *Z/E* qui doit être appliquée. D'ailleurs, plusieurs groupes travaillant sur les protéines fluorescentes utilisent correctement cette nomenclature [130-132].

Les règles de priorité CIP établissent que l'azote du cycle imidazolinone le plus proche de la double liaison est prioritaire sur le carbone (du carbonyle) qui lui est opposé et, de l'autre côté de la double liaison, le carbone gamma est prioritaire sur l'atome d'hydrogène. Lorsque ces deux atomes prioritaires sont du même côté, le chromophore est *Z* (Figure 76A), sinon il est *E* (Figure 76B).

Ces appellations sont également valables pour des atomes plus lourds que l'azote du cycle imidazolinone ici prioritaire, comme par exemple un atome d'oxygène (cycle oxazolidinone) ou un atome de soufre (cycle thiazolidinone), tels qu'on en trouve dans les molécules fluorogènes inspirées du *p*-HBDI synthétisées par l'équipe du Pr. Arnaud Gautier [133] sur lesquels nous travaillons depuis récemment. Pour des atomes plus légers que le carbone, en revanche, par exemple un atome de bore (cycle azaborolidinone), bien qu'avec une géométrie identique, l'atome

² Un atome de carbone ne se liant par ailleurs qu'à un seul atome plus lourd qu'un atome d'hydrogène (-C-, pont méthylène) sera moins prioritaire qu'un carbone portant une double liaison (-C=, groupe méthine) qui sera lui-même moins prioritaire qu'un carbone portant une triple liaison (-C≡ : groupe méthyldyne)

prioritaire deviendrait l'atome de carbone impliqué dans la fonction carbonyle et l'isomérisation *Z/E* de ce chromophore serait alors inversée.

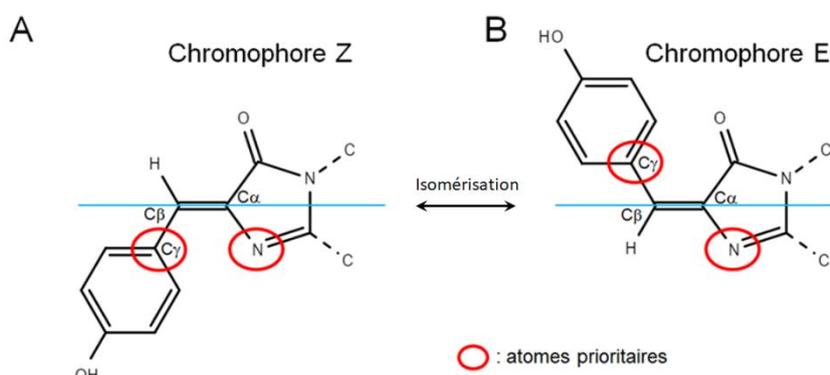


Figure 76 – Les deux isomères du chromophore *p*-HBDI des protéines fluorescentes. Lorsque le carbone gamma du groupe phénol est situé du même côté que l'azote du cycle imidazolinone le plus proche de la liaison éthylénique (A), l'isomère est *Z*, si ces atomes prioritaires sont situés de part et d'autre de la ligne formée par la double liaison (B), l'isomère est *E*

4. Maturation du chromophore

Durant le repliement de la protéine, la fonction carbonyle du premier acide aminé de la triade chromophorique (Ser65 pour l'EGFP mais variable selon la protéine fluorescente) et la fonction amide du troisième acide aminé (Gly67, strictement conservé dans les protéines fluorescentes) se rapprochent au point de provoquer une attaque nucléophile de l'azote de Gly67 sur le carbonyle de Ser65 et de former une liaison covalente. Cette attaque nucléophile est proposée comme étant favorisée par la présence de l'arginine 96, strictement conservée, qui la catalyserait en acidifiant l'amide de Gly67 et/ou du carbone α de Tyr66 [134, 135]. Cette étape, dite de cyclisation (Figure 77, flèches bleues), forme un premier intermédiaire avec un cycle imidazolidinone.

La suite des réactions consiste à former les liaisons doubles permettant la formation d'un système conjugué et constitue la maturation du chromophore à proprement parler. Deux étapes vont se succéder : une étape d'oxydation et une étape de déshydratation. Selon l'ordre entre ces deux étapes, deux modèles sont en concurrence.

Selon le premier modèle défendu entre autre par les équipes de Roger Tsien [136, 137], Elizabeth Getzoff [138], Sergei Pletnev [139, 140] ou Alexander Nemukhin [141, 142], l'étape de déshydratation arrive en premier et l'étape d'oxydation en second (Figure 77, flèches cyans). L'élimination sous forme d'eau d'une fonction hydroxyle et d'un atome d'hydrogène (atomes

marquées en rouge dans la Figure 77) ainsi que d'un autre atome d'hydrogène résulte en la formation d'une première double liaison formant un cycle imidazolinone, puis un intermédiaire énolate. L'attaque d'oxygène moléculaire sur une forme radicalaire du chromophore forme un intermédiaire (hydro)peroxy permettant l'élimination, sous forme de peroxyde d'hydrogène, d'un nouvel atome d'hydrogène et la formation d'une seconde double liaison et donc d'un système conjugué entre les groupes hydroxybenzylidène et imidazolinone.

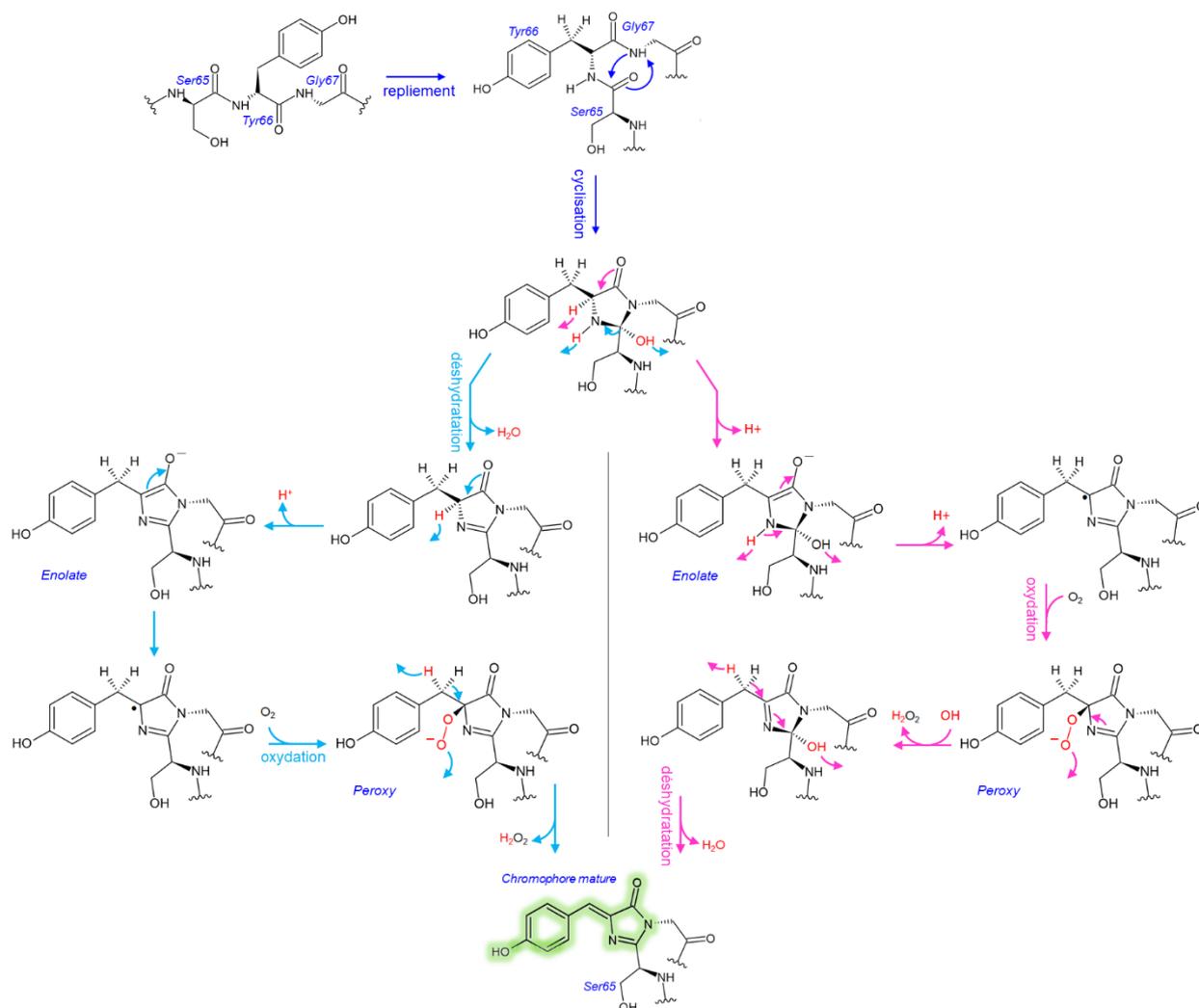


Figure 77 – Etapes de réactions chimiques permettant la maturation du chromophore de l'EGFP. Après l'étape de cyclisation (bleu), deux voies possibles font débat. Dans la première voie (cyan) une étape de déshydratation permet l'élimination d'un hydrogène et d'un hydroxyle sous forme d'eau puis une étape d'oxydation par oxygène moléculaire permet l'élimination de deux atomes d'hydrogène sous forme de peroxyde d'hydrogène. Dans la voie alternative (rose), ces étapes sont inversées. Ces deux étapes permettent la formation de doubles liaisons permettant la formation d'un système conjugué

Selon le second modèle défendu en particulier par les équipes de Rebekka Wachter [143, 144] et de Sean Smith [145], l'étape d'oxydation arrive en premier et l'étape de déshydratation en

second (Figure 77, flèches roses). L'élimination d'un premier atome d'hydrogène permet la formation d'un intermédiaire énolate puis d'un chromophore radicalaire par élimination d'un second atome d'hydrogène. L'attaque par l'oxygène moléculaire permet la formation d'un intermédiaire (hydro)peroxy puis, suite à l'élimination de peroxyde d'hydrogène la formation d'un nouvel intermédiaire dont la déshydratation mène au chromophore mature.

Quelle que soit la voie empruntée, ces étapes de maturation sont aidées par l'environnement du chromophore, en particulier les acides aminés strictement conservés Glu222 (en numérotation de FPs hydrozoaires, Glu212 en numérotation de FPs anthozoaires) et Arg96 (en numérotation de FPs hydrozoaires, Arg91 en numérotation de FPs anthozoaires) qui sont respectivement proposés comme donneur de proton et de base catalytique [146]. Elles nécessitent également la présence d'oxygène moléculaire pour l'étape d'oxydation (unaniment décrite comme l'étape limitante de la maturation et interdisant une maturation anaérobique) et produisent de l'eau oxygénée délétère pour l'environnement cellulaire. Le produit final est un chromophore conjugué capable d'absorber des photons et, si son environnement le stabilise suffisamment, d'en réémettre par fluorescence (Figure 77, molécule verte).

5. Références bibliographiques

1. Adam, V., *Mechanistic studies of photoactivatable fluorescent proteins: a combined approach by crystallography and spectroscopy*, in *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)2009*, Université Joseph Fourier: Grenoble, France. p. 325.
2. Shimomura, O., *Bioluminescence in the sea: photoprotein systems*. Symp Soc Exp Biol, 1985. **39**: p. 351-72.
3. Shimomura, O. and F.H. Johnson, *Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(4): p. 1546-9.
4. Morise, H., et al., *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*. Biochemistry, 1974. **13**(12): p. 2656-62.
5. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
6. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 1993. **32**(5): p. 1212-8.
7. Zimmer, M., *GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(10): p. 2823-32.
8. Labas, Y.A., et al., *Diversity and evolution of the green fluorescent protein family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4256-61.
9. Evdokimov, A.G., et al., *Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 1006-12.

10. Hunt, M.E., et al., *Very Bright Green Fluorescent Proteins from the Pontellid Copepod Pontella mimocerami*. Plos One, 2010. **5**(7).
11. Shimizu, A., et al., *Molecular evolution of versatile derivatives from a GFP-like protein in the marine copepod Chiridius poppei*. Plos One, 2017. **12**(7).
12. Suto, K., et al., *Structural basis for red-shifted emission of a GFP-like protein from the marine copepod Chiridius poppei*. Genes to Cells, 2009. **14**(6): p. 727-737.
13. Wilmann, P.G., et al., *The 1.7 Å crystal structure of Dronpa: a photoswitchable green fluorescent protein*. J Mol Biol, 2006. **364**(2): p. 213-24.
14. Baumann, D., et al., *A family of GFP-like proteins with different spectral properties in lancelet Branchiostoma floridae*. Biology Direct, 2008. **3**.
15. Bomati, E.K., et al., *Spectral and structural comparison between bright and dim green fluorescent proteins in Amphioxus*. Scientific Reports, 2014. **4**.
16. Pletnev, V.Z., et al., *Structure of the red fluorescent protein from a lancelet (Branchiostoma lanceolatum): a novel GYG chromophore covalently bound to a nearby tyrosine*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2013. **69**: p. 1850-1860.
17. Shaner, N.C., et al., *A bright monomeric green fluorescent protein derived from Branchiostoma lanceolatum*. Nat Methods, 2013. **10**(5): p. 407-9.
18. Adam, V., *Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application?* Histochem Cell Biol, 2014. **142**(1): p. 19-41.
19. Bourgeois, D., A. Regis Faro, and V. Adam, *Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins*, in *Frontiers in biological catalysis*, D. Leys, et al., Editors. 2012, Portland Press Ltd: London. p. 73.
20. Bourgeois, D., A. Regis-Faro, and V. Adam, *Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(3): p. 531-8.
21. Patterson, G.H. and J. Lippincott-Schwartz, *A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1873-7.
22. Ando, R., et al., *An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12651-6.
23. Ando, R., H. Mizuno, and A. Miyawaki, *Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1370-3.
24. Adam, V., et al., *Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins*. J Biotechnol, 2010. **149**(4): p. 289-98.
25. Betzig, E., et al., *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-5.
26. Hess, S.T., T.P. Girirajan, and M.D. Mason, *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*. Biophys J, 2006. **91**(11): p. 4258-72.
27. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 793-5.
28. Adam, V., et al., *Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges*. Curr Opin Chem Biol, 2014. **20**: p. 92-102.
29. Bourgeois, D. and V. Adam, *Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view*. IUBMB Life, 2012. **64**(6): p. 482-91.
30. Bourgeois, D. and V. Adam, *La microscopie de fluorescence à super-résolution : un outil révolutionnaire pour imager le vivant à l'échelle nanométrique*. Photoniques, 2015: p. 34-39.
31. Faro, A.R., et al., *Low-temperature chromophore isomerization reveals the photoswitching mechanism of the fluorescent protein Padron*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(41): p. 16362-5.
32. Andresen, M., et al., *Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(9): p. 1035-40.
33. Brakemann, T., et al., *A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(10): p. 942-7.

34. Grotjohann, T., et al., *Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 204-8.
35. Grotjohann, T., et al., *rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells*. eLife, 2012. **1**: p. e00248.
36. El Khatib, M., et al., *Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 18459.
37. Adam, V., et al., *Structural basis of X-ray-induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(50): p. 18063-5.
38. Pedelacq, J.D., et al., *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 79-88.
39. Dammeyer, T. and P. Tinnefeld, *Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm*. Comput Struct Biotechnol J, 2012. **3**: p. e201210013.
40. Dinh, T. and T.G. Bernhardt, *Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies*. J Bacteriol, 2011. **193**(18): p. 4984-7.
41. Christou, N.E., et al., *NMR Reveals Light-Induced Changes in the Dynamics of a Photoswitchable Fluorescent Protein*. Biophysical journal, 2019. **117**(11): p. 2087-2100.
42. Christou, N.E., et al., *Disentangling Chromophore States in a Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein: Mechanistic Insights from NMR Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2021. **143**(19): p. 7521-7530.
43. Boutet, S., et al., *High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography*. Science, 2012. **337**(6092): p. 362-4.
44. Spence, J.C., U. Weierstall, and H.N. Chapman, *X-ray lasers for structural and dynamic biology*. Reports on progress in physics. Physical Society, 2012. **75**(10): p. 102601.
45. Neutze, R. and K. Moffat, *Time-resolved structural studies at synchrotrons and X-ray free electron lasers: opportunities and challenges*. Current Opinion in Structural Biology, 2012. **22**(5): p. 651-659.
46. Neutze, R., *Opportunities and challenges for time-resolved studies of protein structural dynamics at X-ray free-electron lasers*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2014. **369**(1647): p. 20130318.
47. Colletier, J.P., et al., *Serial Femtosecond Crystallography and Ultrafast Absorption Spectroscopy of the Photoswitchable Fluorescent Protein IrisFP*. Journal of Physical Chemistry Letters, 2016. **7**(5): p. 882-7.
48. Fron, E., et al., *Excited state dynamics of the photoconvertible fluorescent protein Kaede revealed by ultrafast spectroscopy*. Photochem Photobiol Sci, 2014. **13**(6): p. 867-74.
49. Fron, E., et al., *Revealing the excited-state dynamics of the fluorescent protein Dendra2*. J Phys Chem B, 2013. **117**(8): p. 2300-13.
50. Yadav, D., et al., *Real-time monitoring of chromophore isomerization and deprotonation during the photoactivation of the fluorescent protein Dronpa*. J Phys Chem B, 2015. **119**(6): p. 2404-14.
51. Tenboer, J., et al., *Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein*. Science, 2014. **346**(6214): p. 1242-6.
52. Barends, T.R., et al., *Direct observation of ultrafast collective motions in CO myoglobin upon ligand dissociation*. Science, 2015. **350**(6259): p. 445-50.
53. Coquelle, N., et al., *Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography*. Nature Chemistry 2018. **10**(1): p. 31-37
54. Woodhouse, J., et al., *Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved crystallography and transient absorption spectroscopy*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 741.
55. Adam, V., et al., *Rational Control of Off-State Heterogeneity in a Photoswitchable Fluorescent Protein Provides Switching Contrast Enhancement*. Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, 2022. **23**(19): p. e202200192.
56. Wachter, R.M., J.L. Watkins, and H. Kim, *Mechanistic diversity of red fluorescence acquisition by GFP-like proteins*. Biochemistry, 2010. **49**(35): p. 7417-27.

57. Li, X., et al., *Competitive mechanistic pathways for green-to-red photoconversion in the fluorescent protein Kaede: a computational study*. J Phys Chem B, 2010. **114**(49): p. 16666-75.
58. Tsutsui, H., et al., *The E1 mechanism in photo-induced beta-elimination reactions for green-to-red conversion of fluorescent proteins*. Chem Biol, 2009. **16**(11): p. 1140-7.
59. Hayashi, I., et al., *Crystallographic evidence for water-assisted photo-induced peptide cleavage in the stony coral fluorescent protein Kaede*. J Mol Biol, 2007. **372**(4): p. 918-26.
60. Nienhaus, K., et al., *Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9156-9.
61. Mizuno, H., et al., *Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 1051-8.
62. Kim, H., et al., *A hinge migration mechanism unlocks the evolution of green-to-red photoconversion in GFP-like proteins*. Structure, 2015. **23**(1): p. 34-43.
63. Wachter, R.M., *Photoconvertible Fluorescent Proteins and the Role of Dynamics in Protein Evolution*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(8).
64. Lelimosin, M., et al., *Photoconversion of the fluorescent protein EosFP: a hybrid potential simulation study reveals intersystem crossings*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(46): p. 16814-23.
65. Adam, V., et al., *Structural basis of enhanced photoconversion yield in green fluorescent protein-like protein Dendra2*. Biochemistry, 2009. **48**(22): p. 4905-15.
66. Adam, V., et al., *Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18343-8.
67. Fuchs, J., et al., *A photoactivatable marker protein for pulse-chase imaging with superresolution*. Nat Methods, 2010. **7**(8): p. 627-30.
68. Wiedenmann, J., et al., *From EosFP to mIrisFP: structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family*. J Biophotonics, 2011. **4**(6): p. 377-90.
69. Gayda, S., *Development and Characterization of a Unique Photoactivatable Label*, in *Fakultät für Chemie und Biowissenschaften 2011*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich: Karlsruhe, Germany.
70. Adam, V., et al., *Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications*. Chem Biol, 2011. **18**(10): p. 1241-51.
71. Wiedenmann, J., et al., *EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15905-10.
72. Gurskaya, N.G., et al., *Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(4): p. 461-5.
73. Hoi, H., et al., *A monomeric photoconvertible fluorescent protein for imaging of dynamic protein localization*. J Mol Biol, 2010. **401**(5): p. 776-91.
74. Lukyanov, K.A., *Green-red flashers to accelerate biology*. Chem Biol, 2011. **18**(10): p. 1202-4.
75. Hosoi, H., et al., *Competition between energy and proton transfer in ultrafast excited-state dynamics of an oligomeric fluorescent protein red Kaede*. J Phys Chem B, 2006. **110**(45): p. 22853-60.
76. Cotlet, M., et al., *Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14398-403.
77. Malvezzi-Campeggi, F., et al., *Light-induced flickering of DsRed provides evidence for distinct and interconvertible fluorescent states*. Biophys J, 2001. **81**(3): p. 1776-85.
78. Bonsma, S., et al., *Light-induced conformational changes and energy transfer in red fluorescent protein*. J Lumin, 2004. **107**(1-4): p. 203-212.
79. Thedie, D., et al., *Photoswitching of Green mEos2 by Intense 561 nm Light Perturbs Efficient Green-to-Red Photoconversion in Localization Microscopy*. The journal of physical chemistry letters, 2017. **8**(18): p. 4424-4430.
80. Duan, C., et al., *Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein*. Methods Appl Fluoresc, 2015. **3**(014004).
81. Ori, A., et al., *Cell type-specific nuclear pores: a case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines*. Molecular systems biology, 2013. **9**: p. 648.

82. Hofmann, M., et al., *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17565-9.
83. Subach, F.V., et al., *Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET*. Chem Biol, 2010. **17**(7): p. 745-55.
84. Marriott, G., et al., *Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(46): p. 17789-94.
85. Dedecker, P., et al., *Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(27): p. 10909-14.
86. Moeyaert, B., et al., *Green-to-red photoconvertible Dronpa mutant for multimodal super-resolution fluorescence microscopy*. ACS Nano, 2014. **8**(2): p. 1664-73.
87. Avilov, S., et al., *In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98362.
88. Ono, M., et al., *Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 2001. **49**(3): p. 305-12.
89. Ren, H., et al., *Cysteine Sulfoxidation Increases the Photostability of Red Fluorescent Proteins*. ACS chemical biology, 2016. **11**(10): p. 2679-2684.
90. Pletnev, S., et al., *A crystallographic study of bright far-red fluorescent protein mKate reveals pH-induced cis-trans isomerization of the chromophore*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 28980-7.
91. Hirano, M., et al., *A highly photostable and bright green fluorescent protein*. Nature biotechnology, 2022. **40**(7): p. 1132-1142.
92. Berardozi, R., et al., *Arginine 66 Controls Dark-State Formation in Green-to-Red Photoconvertible Fluorescent Proteins*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(2): p. 558-65.
93. Annibale, P., et al., *Photoactivatable fluorescent protein mEos2 displays repeated photoactivation after a long-lived dark state in the red photoconverted form*. J Phys Chem Lett, 2010. **1**(9): p. 1506-1510.
94. Annibale, P., et al., *Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22678.
95. Lee, S.H., et al., *Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17436-41.
96. Lando, D., et al., *Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during G2 in fission yeast*. Open Biol, 2012. **2**(7): p. 120078.
97. Coltharp, C., R.P. Kessler, and J. Xiao, *Accurate construction of photoactivated localization microscopy (PALM) images for quantitative measurements*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51725.
98. Puchner, E.M., et al., *Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(40): p. 16015-20.
99. Hummer, G., F. Fricke, and M. Heilemann, *Model-independent counting of molecules in single-molecule localization microscopy*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(22): p. 3637-3644.
100. Roy, A., et al., *The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(46): p. 18586-9.
101. van de Linde, S., et al., *Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging*. Photochem Photobiol Sci, 2011. **10**(4): p. 499-506.
102. Bogdanov, A.M., et al., *Green fluorescent proteins are light-induced electron donors*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(7): p. 459-61.
103. Chang, H., et al., *A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(12): p. 4455-60.
104. Wulffele, J., et al., *mEos4b Photoconversion Efficiency Depends on Laser Illumination Conditions Used in PALM*. The journal of physical chemistry letters, 2022. **13**(22): p. 5075-5080.
105. De Zitter, E., et al., *Mechanistic investigation of mEos4b reveals a strategy to reduce track interruptions in sptPALM*. Nature methods, 2019. **16**(8): p. 707-710.

106. Duan, C., et al., *Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(42): p. 15841-50.
107. De Zitter, E., et al., *Mechanistic Investigations of Green mEos4b Reveal a Dynamic Long-Lived Dark State*. J Am Chem Soc, 2020. **142**(25): p. 10978-10988.
108. Nienhaus, G.U., et al., *Photoconvertible fluorescent protein EosFP: biophysical properties and cell biology applications*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(2): p. 351-8.
109. Zhang, X., et al., *Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(37): p. 10364-9.
110. Jacq, M., et al., *Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the Streptococcus pneumoniae Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy*. mBio, 2015. **6**(4).
111. Malet, H., et al., *Assembly principles of a unique cage formed by hexameric and decameric E. coli proteins*. eLife, 2014. **3**: p. e03653.
112. Kanjee, U., et al., *Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase*. The EMBO journal, 2011. **30**(5): p. 931-44.
113. Jessop, M., et al., *Supramolecular assembly of the Escherichia coli LdcI upon acid stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021. **118**(2).
114. Creemers, T.M.H., et al., *Red-shifted mutants of green fluorescent protein: reversible photoconversions studied by hole-burning and high-resolution spectroscopy*. Chem Phys, 2002. **275**(1-3): p. 109-121.
115. Biteen, J.S., et al., *Super-resolution imaging in live Caulobacter crescentus cells using photoswitchable EYFP*. Nat Methods, 2008. **5**(11): p. 947-9.
116. McAnaney, T.B., et al., *Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): a unifying mechanism*. Biochemistry, 2005. **44**(14): p. 5510-24.
117. Fron, E., et al., *Ultrafast excited-state dynamics of the photoswitchable protein Dronpa*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(16): p. 4870-1.
118. Creemers, T.M., et al., *Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 2974-8.
119. Faro, A.R., et al., *Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(2): p. 254-62.
120. Faro, A.R., et al., *Low-temperature chromophore isomerization reveals the photoswitching mechanism of the fluorescent protein Padron*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(41): p. 16362-5.
121. Hoffman, D.P., et al., *Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells*. Science, 2020. **367**(6475).
122. Tuijtel, M.W., et al., *Correlative cryo super-resolution light and electron microscopy on mammalian cells using fluorescent proteins*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1369.
123. Mantovanelli, A.M.R., et al., *Photophysical Studies at Cryogenic Temperature Reveal a Novel Photoswitching Mechanism of rsEGFP2*. Journal of the American Chemical Society, 2023. **145**(27): p. 14636-14646.
124. Chang, Y.W., et al., *Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography*. Nat Methods, 2014. **11**(7): p. 737-9.
125. Sartor, A.M., et al., *Characterization of mApple as a Red Fluorescent Protein for Cryogenic Single-Molecule Imaging with Turn-Off and Turn-On Active Control Mechanisms*. The journal of physical chemistry. B, 2023.
126. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
127. Abbe, E.K., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung* Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1873. **9**(1): p. 413-418.
128. Rayleigh, L., *On the theory of optical images, with special reference to the microscope*. Philosophical Magazine, 1896. **42**(5): p. 167-195.
129. Yildiz, A., et al., *Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2061-5.

130. Li, M.J., et al., *E-Z Isomerization Mechanism of the Green Fluorescent Protein Chromophore: Remote Regulation by Proton Dissociation of the Phenol Group*. The journal of physical chemistry. A, 2021. **125**(17): p. 3614-3621.
131. Esteves, C.I.C., et al., *Synthesis and luminescence properties of analogues of the green fluorescent protein chromophore*. Dyes and pigments, 2020. **177**: p. 108267.
132. Shen, Y., M.D. Wiens, and R.E. Campbell, *A photochromic and thermochromic fluorescent protein*. RSC Adv., 2014. **4**: p. 56762–56765.
133. Benaïssa, H., et al., *Engineering of a fluorescent chemogenetic reporter with tunable color for advanced live-cell imaging*. Nature communications, 2021. **12**(1): p. 6989.
134. Wood, T.I., et al., *Defining the role of arginine 96 in green fluorescent protein fluorophore biosynthesis*. Biochemistry, 2005. **44**(49): p. 16211-20.
135. Sniegowski, J.A., M.E. Phail, and R.M. Wachter, *Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **332**(3): p. 657-63.
136. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 448-55.
137. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
138. Barondeau, D.P., J.A. Tainer, and E.D. Getzoff, *Structural evidence for an enolate intermediate in GFP fluorophore biosynthesis*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(10): p. 3166-8.
139. Pletneva, N.V., et al., *Structural evidence for a dehydrated intermediate in green fluorescent protein chromophore biosynthesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 15978-84.
140. Pletneva, N.V., et al., *Amino acid residue at the 165th position tunes EYFP chromophore maturation. A structure-based design*. Computational and structural biotechnology journal, 2021. **19**: p. 2950-2959.
141. Grigorenko, B.L., A.I. Krylov, and A.V. Nemukhin, *Molecular Modeling Clarifies the Mechanism of Chromophore Maturation in the Green Fluorescent Protein*. Journal of the American Chemical Society, 2017. **139**(30): p. 10239-10249.
142. Auhim, H.S., et al., *Stalling chromophore synthesis of the fluorescent protein Venus reveals the molecular basis of the final oxidation step*. Chemical science, 2021. **12**(22): p. 7735-7745.
143. Rosenow, M.A., et al., *The crystal structure of the Y66L variant of green fluorescent protein supports a cyclization-oxidation-dehydration mechanism for chromophore maturation*. Biochemistry, 2004. **43**(15): p. 4464-72.
144. Zhang, L., et al., *Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(14): p. 4766-72.
145. Ma, Y., Q. Sun, and S.C. Smith, *The mechanism of oxidation in chromophore maturation of wild-type green fluorescent protein: a theoretical study*. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2017. **19**(20): p. 12942-12952.
146. Pouwels, L.J., et al., *Kinetic isotope effect studies on the de novo rate of chromophore formation in fast- and slow-maturing GFP variants*. Biochemistry, 2008. **47**(38): p. 10111-22.