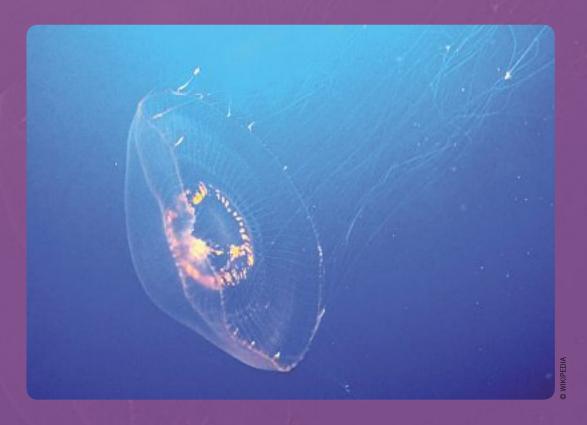


FABIENNE MÉROLA*, HÉLÈNE PASQUIER*,**, MARIE ERARD*, AGATHE ESPAGNE*, BERNARD LEVY*, JACQUELINE RIDARD*, ISABELLE DEMACHY*

*Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay (UMR 8000, UPS/CNRS) UFR Sciences **Département Mesures Physiques IUT d'Orsay

Tout s'éclaire!



Pour les cruciverbistes, en trois lettres: une protéine fluo empruntée par la science à une méduse? Réponse: la GFP pour *Green fluorescent protein*. Une mine d'or pour développer de nouveaux outils d'observation du vivant.

Photo: Méduse Aequorea victoria

es protéines fluorescentes* (la Green Fluorescent Protein de Aequorea victoria (AvGFP) et ses homologues naturels ou obtenus par mutagenèse artificielle) sont devenues des outils incontournables pour l'exploration du vivant grâce aux techniques d'imagerie de fluorescence. En permettant d'étudier les protéines directement dans leur environnement naturel, la cellule vivante, elles ouvrent la voie à des méthodes radicalement nouvelles de diagnostic. Pour guider de façon rationnelle la conception de nouvelles GFPs, il faut essayer de comprendre les relations entre la structure à l'échelle atomique de cette protéine et ses propriétés optiques, une démarche qu'a entreprise depuis quelques années notre groupe d'expérimentateurs et de théoriciens au Laboratoire de Chimie Physique, et qui met en jeu des études de biochimie, spectroscopie, des simulations numériques et des calculs de chimie quantique.

Une découverte lumineuse

En Octobre 2008, le prix Nobel de Chimie était décerné conjointement à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien, pour la découverte et les nombreuses applications en biologie et en médecine de la Green Fluorescent Protein (GFP, ou protéine à fluorescence verte). Dans la nature, cette petite protéine, capable d'émettre une intense lumière de fluorescence sous irradiation UV (encadré 1), est responsable des propriétés de bioluminescence de divers organismes marins (méduses, coraux, anémones de mer). Après sa première purification, par Osamu Shimomura en 1961, à partir de la méduse Aequorea victoria, elle est longtemps restée une simple curiosité de laboratoire. Le véritable tournant s'opère au début des années 1990, lorsque Douglas Prasher et Martin Chalfie réussissent l'isolement de son gène, puis son incorporation dans divers organismes, auxquels elle confère alors sa brillante fluorescence verte. Ces travaux, qui font en 1994 la couverture de la revue Science, donnent le signal d'une véritable révolution : une dizaine d'années suffiront pour que la GFP et ses variants s'introduisent dans tous les laboratoires (encadré 2).

Grâce à la mutagenèse naturelle ou artificielle, la structure de la GFP peut être modifiée à volonté, ouvrant un champ de possibles quasi-illimité à la conception de nouvelles sondes. Dès la découverte du potentiel de la GFP en imagerie, de nombreux laboratoires se sont lancés dans son amélioration génétique et dans la recherche de variants naturels, en s'intéressant particulièrement à l'augmentation de sa brillance et à l'obtention de nouvelles couleurs. Des méthodes de criblage haut débit très sophistiquées, comme l'évolution dirigée*, sont utilisées pour faire émerger de nouvelles formes à partir d'un grand nombre de mutations réalisées au hasard. La palette de couleurs des mutants connus de la GFP recouvre aujourd'hui l'ensemble du domaine des

rayonnements visibles, de l'ultra-violet à l'infrarouge (les GFPs ne sont donc plus forcément vertes, même si l'on utilise encore cet acronyme pour désigner l'ensemble de la famille).

Un outil incontournable mais perfectible

L'un des apports majeurs des GFPs a consisté dans le développement de nouveau «capteurs biologiques» ou biosenseurs, permettant la détection par fluorescence d'activités moléculaires spécifiques. Des biosenseurs basés sur les GFPs ont été mis au point pour pratiquement tous les intermédiaires de la signalisation cellulaire, dont les anomalies sont sous-jacentes à la plupart des pathologies humaines. Ces capteurs jouent maintenant un rôle grandissant dans la recherche biomédicale, pour l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques, le criblage de nouveaux médicaments, ou le diagnostic et le suivi de protocoles thérapeutiques.

Dans le cas des biosenseurs, l'objectif est de visualiser et de quantifier des processus biochimiques très spécifiques au sein de milieux complexes, comme des cellules, des tissus, des organismes, ou dans des fluides et des extraits biologiques. Le développement de tels capteurs va impliquer une amélioration significative et une parfaite compréhension des propriétés de fluorescence des GFPs. En effet, nous avons montré, avec d'autres équipes, que le signal de fluorescence des GFPs peut répondre intrinsèquement (et simultanément) à de nombreux paramètres physiques et chimiques, tels que la température, l'indice de réfraction, la densité lumineuse d'irradiation, le pH, la présence de certains ions et métabolites, ou la production de radicaux dans le milieu. Ces réponses environnementales, qui varient fortement d'un variant GFP à l'autre, doivent être parfaitement comprises et contrôlées, pour permettre la mise au point de senseurs vraiment spécifiques. Par exemple, dans le cas des biosenseurs de calcium utilisant des variants spectraux de la GFP, la CFP (Cyan Fluorescent Protein) et la YFP (Yellow Fluorescent Protein), la difficulté majeure rencontrée lors de leurs premières utilisations a été la perturbation des mesures par les variations du pH intracellulaire local. Il a été reconnu rapidement que ce problème était dû en partie à des modifications du signal de fluorescence de la YFP en fonction du pH, et un nouveau variant moins sensible au pH, la Citrine, a été mis au point. Néanmoins, nous avons montré récemment que la CFP elle aussi, comme son variant «amélioré» la Cerulean, présentait de fortes variations de ses propriétés de fluorescence en fonction du pH.

Nous savons encore très peu de choses sur les sensibilités environnementales de la plupart des GFPs utilisées en imagerie: l'obtention de nouveaux variants, comme par exemple de nouvelles couleurs, s'accompagne très souvent d'une modification des caractéris1

La GFP est une petite protéine dont la structure tridimensionnelle à l'échelle atomique a été révélée par cristallographie aux rayons X* (Figure Aa): sa chaîne peptidique* unique de 238 acides aminés se replie pour former un «tonneau» très compact, traversé en son centre par une hélice au milieu de laquelle on trouve l'élément responsable de sa fluorescence: son «chromophore» (Figure Ab, c, d). Ce chromophore est formé à partir d'une petite séquence de trois acides aminés seulement, auxquels la protéine, en se repliant, impose une configuration très particulière: à cet endroit, la chaîne peptidique forme une sorte d'épingle à cheveux très serrée qui se referme sur elle même. La structure finale obtenue est composée au minimum de deux cycles aromatiques coplanaires (dans la GFP verte, un groupement phénol d'une part, et un groupe imidazolinone d'autre part), reliés par un « pont ». Cet ensemble est dit «conjugué», c'est à dire porteur d'électrons délocalisés, qui vont conférer au chromophore ses propriétés optiques: la capacité d'absorber la lumière et d'émettre une fluorescence en retour. Une fois la protéine repliée, il ne faut que quelques dizaines de minutes, en présence de

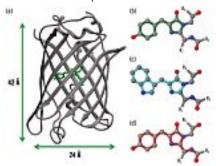
dioxygène, pour développer spontanément cette fluorescence.

Le chromophore de la GFP serait donc, au final, une assez petite entité chimique, de taille beaucoup plus modeste que la protéine qui lui a donné naissance. Il a été possible de synthétiser cette molécule en laboratoire, pour l'étudier isolément. Surprise: dans pratiquement tous les solvants et à température ambiante, elle n'est pas fluorescente! Pour un chimiste averti, la raison en est simple: le chromophore de la GFP n'est pas complètement rigide, et peut se « tordre » autour de son pont central (Figure Ba). On sait même, par l'étude de molécules porteuses de motifs analogues, et par des calculs théoriques, qu'il aura tendance à préférer une configuration perpendiculaire de ses deux cycles aromatiques, lorsqu'il sera excité par la lumière. Cette torsion est incompatible avec une émission de fluorescence, car elle interrompt la circulation des électrons entre les deux moitiés de la molécule. Ainsi, tout le travail de la protéine GFP vat-il consister à bloquer cette torsion interne de son chromophore, afin de garantir une émission de fluorescence la plus intense possible.

Pour compliquer un peu les choses, le chromophore dans sa forme plane fluorescente peut présenter différentes orientations relatives de ses deux cycles, et son groupement phénol peut fixer ou perdre un proton (Figure Bb et c), chacune de ces configurations correspondant à des propriétés optiques différentes. La déprotonation du phénol notamment conduit à changer complètement la couleur de l'absorption, qui passe de l'UV au bleu-vert (Figure Bc). Cependant, alors qu'en solution, c'est le pH du solvant qui va décider de l'état de protonation du chromophore, on observe que, pour un même pH, certaines GFPs favorisent plutot la forme déprotonée, alors que d'autres sont porteuses d'une forme protonée. Dans les GFPs, c'est donc le réseau interne de liaisons et de contacts protéine-chromophore, qui contrôle non seulement l'intensité de fluorescence, mais également les couleurs qui seront absorbées et réémises. De plus, la stabilité de ce réseau dépend de l'ensemble de la structure protéique: il s'est avéré impossible de réduire significativement la taille de la chaîne peptidique nécessaire au maintien des propriétés optiques de la GFP.

• FIGURE A

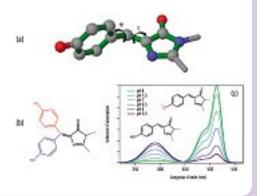
Représentation schématique des GFPs et structure chimique de leurs chromophores. (a) Structure en tonneau de la GFP montrant le chromophore (en vert); (b) chromophore des GFPs homologes de AvGFP, porteur d'un phénol, et émettant **généralement** dans le vert, et **parfois** dans le jaune (cas de la YFP); (c) chromophore de la CFP, porteur d'un indole, et émettant dans le cyan; (d) chromophore de la DsRed, porteur d'une extension sur la chaîne peptidique, et émettant dans le rouge. R1 représente la chaîne latérale de l'acide aminé 65 (très variable suivant les GFPs), tandis que R2 et R3 représentent la chaîne peptidique de la protéine dans les directions C-terminale et N-terminale respectivement.



♥ FIGURE B

Propriétés physico-chimiques du chromophore de la GFP.

(a) Flexibilité du pont séparant les groupes phénol et imidazolinone, (b) isomères « cis» (en bleu) et « trans» (en rouge) du chromophore plan, (c) états de protonation du chromophore et changements associés des spectres d'absorption dans la YFP.



tiques sur d'autres plans, et notamment de réponses environnementales nouvelles. Les méthodes par criblage haut débit, basées sur un nombre restreint de critères de sélection, ne peuvent pas garantir que des performances optimum du fluorophore seront maintenues sur les autres fronts. On en est donc réduit, encore aujourd'hui, à une approche par essaierreur peu efficace, qui a donné naissance à plus d'un milliers de variants répertoriés dont très peu se sont avérés intéressants au final pour l'imagerie. Pour guider de façon rationnelle la conception de nouvelles GFPs, il faut d'abord comprendre les relations entre la structure à l'échelle atomique de cette protéine et ses propriétés optiques, une démarche que nous avons entreprise depuis quelques années au Laboratoire de Chimie Physique.

Observer pour comprendre les mécanismes

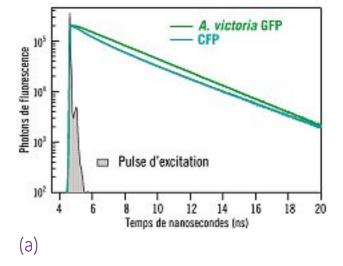
Notre travail a consisté tout d'abord à faire l'analyse spectroscopique détaillée de différentes GFPs purifiées en solution. Ces travaux ont apporté des informations à la fois d'ordre descriptif – quelle est leur brillance, à quels paramètres physico-chimiques sont-elles sensibles?- et mécanistique, concernant la nature des processus susceptibles de déterminer leur fluorescence. Des informations particulièrement précieuses ont été obtenues via l'analyse des durées de vie extraites des déclins d'émission de fluorescence (Figure 1a). Un déclin de fluorescence représente l'évolution en fonction du temps du

O FIGURE 1a. b. c. d

Analyse spectroscopique des protéines fluorescentes.

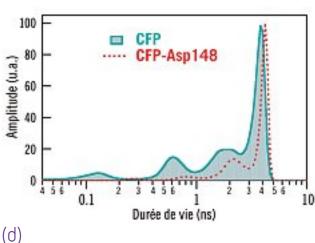
(a) mesure des déclins de fluorescence de la GFP et de la CFP purifiées en solution après une excitation très brève. Grâce au montage d'imagerie de durée de vie BIFLUOR développé au laboratoire (b), ces mesures peuvent être aussi réalisées sur les mêmes protéines exprimées en cellule vivante. Distributions des durées de vie de fluorescence à 20° C et pH neutre de la GFP (c), de la CFP (d, courbe cyan) et de la CFP mutée en position 148 (d, courbe rouge).

Les distributions de durée de vie sont obtenues en effectuant une transformée de Laplace inverse des déclins de fluorescence: une très grande précision des mesures est nécessaire (adapté d'après Villoing et al, 2008 Biochemistry).





100 A. victoria GFP 80 Amplitude (u.a.) 60 40 20 0 | 0.1 Durée de vie (ns)



69

(c)

nombre de photons émis par l'échantillon suite à son excitation très brève. Dans le cas d'un ensemble de fluorophores identiques, ce déclin suit une loi de décroissance exponentielle, avec un temps caractéristique, la durée de vie de fluorescence, qui est directement proportionnel au rendement quantique de fluorescence, et qui est en général de l'ordre de la nanoseconde (1 ns = 10^{-9} s, soit un millième de millionième de seconde). Dans des situations plus complexes, où les fluorophores peuvent exister dans différents états chimiques ou physiques, la cinétique de déclin devient multi-exponentielle ou non exponentielle. D'une façon générale, la multiplicité des durées de vie de fluorescence extraites d'un déclin renseigne sur la multiplicité des états fluorescents accessibles, un aspect qui s'est avéré être en lien direct avec les performances et la sensibilité environnementale de la GFP considérée. En effet, ces distributions de durées de vie mettent d'une part en évidence les sous-populations associées à de faibles rendements quantiques de fluorescence, et donc une faible brillance, et renseignent d'autre part sur les «bascules» entre ces différents états fluorescents. Ce sont précisément ces bascules, différemment favorisées par les conditions physico-chimiques, qui vont conduire à une modification des propriétés de fluorescence moyenne de la GFP en fonction de l'environnement. Il est à noter que les durées de vie de fluorescence peuvent être aujourd'hui mesurées et imagées sous microscope, grâce aux techniques de FLIM* (Figure 1b), ce qui ouvre la voie à de nouveaux modes d'analyse biochimique en cellule vivante qui restent encore largement à explorer.

La nature semble avoir particulièrement optimisé certaines protéines fluorescentes naturelles: ainsi, la GFP verte d'Aequorea victoria présente un rendement quantique de fluorescence qui dépasse 80 %, et une durée de vie de fluorescence unique (Figure 1c). Ceci montre que le chromophore existe dans cette protéine sous une forme fluorescente unique et très stable. A contrario, la CFP est certainement, parmi les GFPs étudiées à ce jour, la lauréate du prix de la complexité, avec une distribution de durées de vie très étendue (Figure 1d). Nous avons aussi constaté que cette protéine, de rendement quantique assez faible («seulement» 40 %), présente une forte sensibilité environnementale, et notamment comme nous l'avons vu, au pH, aux radicaux et à la température. L'analyse spectroscopique et structurale combinée de la CFP suggère que ces propriétés peuvent être notablement améliorées par des mutations bien choisies. Ainsi, en remplaçant l'histidine 148 à proximité du chromophore par un résidu aspartique, nous avons généré un variant plus fluorescent (noté CFP-Asp148), aux propriétés de fluorescence plus homogènes (Figure 1d, courbe rouge). De même, lors de l'oxydation radiolytique de la CFP par des radicaux, nous avons montré par spectrométrie de masse que les perturbations de fluorescence induites résultaient de la modification chimique d'un très petit nombre de résidus. Notre hypothèse actuelle est que les durées de vie multiples de la CFP reflètent un certain degré de flexibilité locale, qui peut être augmenté (cas de la radiolyse), ou diminué (cas de CFP-Asp148) par certaines mutations ou modifications chimiques très ciblées. Pour améliorer les performances de fluorescence de la CFP, il faut donc identifier les résidus clé qui vont permettre de contrôler cette flexibilité. Ceci passe notamment par l'étude détaillée de la dynamique interne de la protéine.

Simuler pour aller plus loin : le dialogue théorie-expérience

La dynamique interne d'une molécule résulte d'un petit nombre de modes d'interaction en principe bien connus sur le plan théorique: mécaniques, électrostatiques, de polarisation, qui vont se traduire par des attractions, des répulsions ou des chocs entre ses atomes, et avec ceux du solvant. A partir de ces interactions, il est donc en principe possible de prédire les déformations détaillées de la molécule au cours du temps. Cependant, les protéines sont des milieux très particuliers faits d'un assemblage compact de quelques milliers d'atomes, où les interactions s'organisent dans l'espace et le temps de façon anisotrope et fortement interdépendante (toute modification ou mutation peut engendrer des réorganisations à distance ou rompre un réseau d'interactions complexe). Les modèles théoriques généraux développés pour des milieux homogènes (état de transition, diffusion...), ou l'étude de chromophores isolés en phase gaz ou en solution, ne permettront pas de rendre compte de ces relations complexes.

Pour essayer d'y voir clair, nous avons eu recours à des simulations numériques, appelées «dynamique moléculaire », qui consistent à recalculer pas à pas de façon la plus réaliste possible l'ensemble des interactions existantes, pour reconstituer leurs fluctuations. Dans le cas des protéines, ces simulations doivent incorporer toutes les interactions internes à la protéine elle même, mais également celles de la protéine avec les molécules d'eau, dont on a montré qu'elles avaient une influence décisive sur la dynamique. En raison de la taille et de la complexité de ces calculs (environ 30 000 atomes doivent être représentés pour la GFP solvatée), une simulation de quelques semaines d'ordinateur permet au mieux de visualiser quelques dizaines de nanosecondes d'évolution du système. Ces simulations peuvent être comprises comme des expériences numériques: on utilise très peu d'hypothèses (contrairement aux modèles généraux) mais on n'a de résultats que pour un système à la fois. Cette restriction acceptée, elles sont tout à fait fascinantes: on peut faire une animation où on voit les atomes de la protéine bouger comme dans la «réalité». On peut ensuite en extraire une représentation significative du «paysage énergétique» dans lequel évolue le système.

Même si ces méthodes sont bien établies dans leurs principes, réaliser la simulation des propriétés pho-

La GFP est la seule source de fluorescence visible connue actuellement qui soit entièrement codée génétiquement. Parce qu'elle est très fluorescente, elle peut être utilisée en microscopie ou endoscopie pour imager sans dommages des cellules et des tissus vivants. Parce qu'elle est une protéine, construite à partir d'un gène suivant un code universel, elle peut être incorporée dans les cellules de n'importe quel organisme, de la bactérie aux mammifères en passant par les virus, et sa fluorescence pourra être transmise à leur descendance, révélant par exemple la filiation d'une cellule au sein d'une tumeur ou d'un embryon. Grâce aux techniques de fusion de gènes, la GFP permet également de suivre des protéines parfaitement identifiées, ou des micro-compartiments membranaires hautement spécialisés dans la cellule vivante (Figure A). Ces dernières années, un vaste arsenal de nouvelles sondes dérivées des GFPs, regroupées sous l'appellation générique de «biosenseurs», a été développé. Ces biosenseurs codés génétiquement combinent la mesure de paramètres physico-chimiques bien définis avec

toutes les possibilités de marquage spécifique et d'imagerie *in situ* associées aux protéines fluorescentes.

La plupart de ces biosenseurs fonctionnent grâçe au phénomène de transfert résonant d'énergie de fluorescence, ou FRET. Ce transfert d'énergie s'établit entre deux molécules fluorescentes de couleur différente, lorsque celles-ci se trouvent placées à une distance très proche l'une de l'autre (typiquement inférieure à 100 Å). Le FRET se manifeste alors par des perturbations caractéristiques des signaux de fluorescence, qui vont à leur tour révéler la proximité spatiale des deux partenaires. L'application première du FRET est donc la détection des attractions entre molécules, conduisant à la formation de complexes. Des variants spectraux de la GFP (comme le couple CFP / YFP, respectivement pour «Cyan-» et «Yellow» Fluorescent Protein) ont été développés très tôt dans le but d'imager par ces techniques les interactions spécifiques entre protéines dans la cellule vivante. Mais on peut aller plus loin encore en liant un module protéique capable de changer

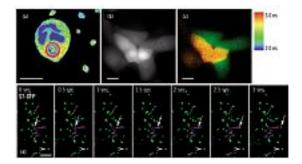
de conformation dans certaines conditions physico-chimiques ou en présence de ligands avec deux variants de la GFP. On obtient ainsi des senseurs dont la fluorescence peut répondre spécifiquement à la variation d'une activité moléculaire précise, comme la concentration locale en calcium (Figure B), mais aussi à l'activation de récepteurs et de protéines G, à des neurotransmetteurs, seconds messagers et métabolites, ou à des activités kinase, phosphatase, protéase...

Jusqu'à l'avènement des GFPs, la microscopie électronique et l'immunofluorescence*, nécessitant la plupart du temps une fixation ou une congélation des échantillons, étaient les seules techniques capables d'analyser l'organisation cellulaire à un tel niveau de détail moléculaire, et restaient quasiment muettes sur ses aspects dynamiques. En révélant la dynamique cellulaire, le trafic, la connectivité et le permanent recyclage des composants cellulaires, ainsi que leurs remarquables capacités d'auto-organisation, les GFPs ont, en quelques années, profondément transformé notre conception du vivant.

O FIGURE A

Imagerie en cellule vivante avec des GFPs.

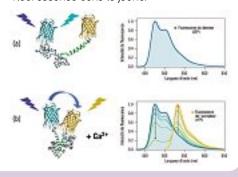
(a) Cellule modèle de neutrophile (PLB985) après phagocytose: localisation de la protéine p67phox-Citrine autour du phagosome (cercle rouge). Crédit: S. Dupré, A. Tlili & O. Nusse, INSERM UMR-S 757, Orsay. (b,c) Imagerie FRET-FLIM avec le couple CFP/YFP en cellule MDCK: (b) image d'intensité en CFP, (c) image révélant le FRET dans certaines cellules par une diminution de la durée de vie de la CFP. Crédit: M. Erard, F. Cordelières, LCP et Institut Curie, Orsay. (d) Imagerie dynamique de vésicules golgiennes marquées avec la GFP photoconvertible Kaede (vert) dans des cellules BY2 de tabac. Les trajectoires de quelques vésicules sont repérées en magenta. Crédit: S. Brown, S. Bolte, M.-N. Soler, B. Satiat-Jeunemaître, Imagif, CNRS Gif-sur-Yvette. Barres d'échelle 10 micromètres.



• FIGURE B

Principe de fonctionnement d'un biosenseur sensible au calcium basé sur le FRET.

(a) dans la forme étendue du biosenseur, en absence de calcium, une excitation de la CFP produit principalement la fluorescence typique de cette protéine dans le cyan, (b) dans la forme repliée du biosenseur, liée au calcium (points rouges), l'excitation de la CFP entraîne, via le FRET, une excitation indirecte de la YFP, et le spectre d'émission présente une contribution croissante de sa fluorescence dans le jaune.

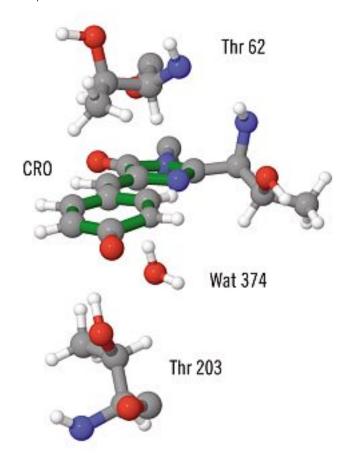


tophysiques d'une protéine fluorescente reste un défi, notamment à cause de l'implication de l'état excité du chromophore. La structure électronique des états excités des molécules a en effet la propriété d'être beaucoup plus flexible que celle de l'état fondamental, ce qui conduit à un paysage d'énergie beaucoup plus complexe. Pour avoir une représentation, ne serait-ce que qualitativement correcte de ce qui se passe, il est donc habituel de refaire le calcul quantique à chaque pas de la dynamique des noyaux. C'est une approche rigoureuse mais qui a un coût: il est actuellement pratiquement impossible de faire de cette façon des simulations de plus de quelques picosecondes, soit environ mille fois trop courtes par rapport à l'échelle de temps des processus de fluorescence... L'équipe de théoriciens du LCP a mis au point une autre approche qui consiste à explorer un échantillon de géométries du chromophore soigneusement prédéfini (ce qui évite de reconsidérer plusieurs fois des géométries très proches comme il est inévitable au cours d'une dynamique) et d'en déduire une interpolation du paysage d'énergie. Cette interpolation remplace le champ de force habituel sans être beaucoup plus complexe et permet des simulations de quelques

O FIGURE 2

Relations structure-dynamique-photophysique dans la GFP.

Mise en évidence des résidus et molécules d'eau structurales exercant une contrainte sur la torsion du phénol de son chromophore (adapté d'après Vallverdu et al, 2009 J. Mol. Struct. Theochem). Les atomes d'hydrogène (en blanc) sont représentés ici explicitement.



dizaines de nanosecondes. Cette démarche originale permet de modéliser des spectres d'absorption ou de fluorescence, et d'étudier la fréquence de certains événements susceptibles de diminuer l'émission de fluorescence, comme des torsions ou des transferts de charge.

Ainsi, dans le cas de la GFP, nous avons pu suivre le chemin de relaxation du chromophore à l'état excité et montrer pourquoi le temps caractéristique de la torsion du chromophore est de quelques nanosecondes au sein de la protéine, soit 1 000 fois plus grand que sa valeur pour le chromophore seul en solution. La torsion permettant la désexcitation sans radiation du chromophore reste bien le principal processus en compétition avec la fluorescence dans la protéine. Elle est néanmoins largement bloquée par les interactions du chromophore avec son environnement. Nos simulations ont pu montrer comment certains résidus de la protéine ainsi que des molécules d'eau dites «structurales» (c'est-àdire très fortement immobilisées dans la structure de la protéine) contrôlent plus particulièrement les mouvements du chromophore et l'empêchent de se déformer (Figure 2). Dans le cas de la CFP, nos calculs commencent à lever le voile sur la complexité de sa photophysique: ainsi, on a pu voir comment le pH influe simultanément, via les liaisons hydrogènes* protéine-chromophore, sur la dynamique globale de la protéine et sur les équilibres entre les différentes géométries du chromophore. Ceci va se traduire par des modifications caractéristiques de ses propriétés d'absorption et de fluorescence, qui correspondent bien aux observations expérimentales.

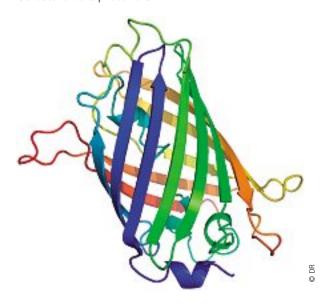
Au cours de nos calculs, il est apparu une coopération étroite entre la dynamique du chromophore et la dynamique d'ensemble de la protéine. De ce fait, c'est la protéine qui joue le rôle de force motrice de la transformation aboutissant à l'arrêt de la fluorescence, selon un chemin de réaction correspondant plutôt à une coordonnée globale de la protéine qu'à une déformation limitée au chromophore. Un tel type de chemin ressemble à ce qui est supposé pour les transferts de charge en solution (théorie de Marcus). Mais, comme on l'a vu, le milieu protéique est notablement différent d'un liquide et on ne peut simplement recopier les concepts de l'un à l'autre. On voit ainsi que le développement de ces nouvelles méthodes de simulation permet d'apporter une contribution directe à l'interprétation de données expérimentales (ordre de grandeur de la durée de vie fluorescence, origine de l'effet de pH, de la forme du spectre d'absorption, etc.). Mais elle conduit aussi à de nouvelles questions générales, en particulier sur le rôle des déformations globales de la protéine. Ces questions suggèrent de nouvelles stratégies expérimentales, par exemple pour définir les mutations utiles ou pour rechercher des systèmes modèles (projet de A. de la Lande) et de nouvelles stratégies théoriques pour représenter directement les déformations d'ensemble sans passer par une représentation détaillée.

Conclusions et perspectives

L'ensemble des données que nous avons recueillies sur les GFPs a déjà apporté des indications précieuses pour la compréhension des mécanismes qui contrôlent leur photophysique: il est clair en particulier que la flexibilité locale de la cage protéique autour du chromophore est un paramètre essentiel. Il reste néanmoins encore beaucoup de choses à comprendre dans ces architectures complexes, et dans ce but, nous poursuivons l'amélioration des outils de modélisation, ainsi que l'étude de variants porteurs de mutations ponctuelles. La problématique des relations structure-photophysique dans les GFPs est l'opportunité d'un dialogue particulièrement fructueux entre les techniques les plus sophistiquées de simulation moléculaire d'une part, et d'analyse spectrochimique et spectrocinétique d'autre part. Elle constitue donc un domaine de recherche très novateur en biophysique, qui pourrait déboucher non seulement sur la mise au point de nouvelles GFPs mieux adaptées aux besoins de l'imagerie, mais également sur de meilleurs outils conceptuels pour la compréhension des propriétés optiques et électroniques de systèmes moléculaires complexes.

C

Structure de la protéine GFP.



Glossaire

Chaîne peptidique:

Squelette formé par l'enchaînement linéaire des acides aminés d'une protéine, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les protéines fonctionnelles sont formées par le repliement dans l'espace de cette chaîne. La portion de l'acide aminé qui n'est pas engagée dans la liaison peptidique et qui demeure libre s'appelle un résidu.

Cristallographie aux rayons X:

Technique permettant la détermination d'une structure moléculaire complexe (protéines, polysaccharides...) en bombardant un cristal de cette molécule avec des rayons X. La diffraction de ces rayons que provoque le cristal est fonction de la structure de la molécule qu'on peut alors déduire.

Evolution dirigée :

Ensemble de technologies qui s'inspirent des mécanismes de base de l'évolution pour améliorer une protéine (ou un acide nucléique)

FLIM:

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, ensemble de techniques de microscopie de fluorescence appartenant à la famille des « F-techniques » (voir Trugnan et al, 2004), permettant d'analyser les variations spatio-temporelles de la durée de vie de fluorescence.

Fluorescence:

Émission de photons spontanée produite par des molécules initialement excitées à la suite de l'absorption d'un rayonnement.

Immunofluorescence:

Technique d'identification de substances (antigènes) par contact avec des anticorps spécifiques colorés par fluorescence, avec lesquels ils se combinent, le complexe formé étant visible au microscope.

Liaison hydrogène ou pont hydrogène:

Liaison physique non covalente qui s'établit entre un groupement donneur et un groupement accepteur d'un atome d'hydrogène. Les liaisons hydrogènes sont très nombreuses dans les macromolécules biologiques.