



HAL
open science

Élaboration de protéines fluorescentes ayant un fort potentiel en imagerie

Asma Fredj

► **To cite this version:**

Asma Fredj. Élaboration de protéines fluorescentes ayant un fort potentiel en imagerie. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112257 . tel-00785092

HAL Id: tel-00785092

<https://theses.hal.science/tel-00785092>

Submitted on 5 Feb 2013

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.

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 26/10/2012

par

Asma FREDJ

**ELABORATION DE PROTEINES FLUORESCENTES PRESENTANT UN
FORT POTENTIEL EN IMAGERIE**

Directeur de thèse : Hélène PASQUIER

Maître de conférences, Université Paris-Sud

Composition du jury :

Président du jury : Isabelle DEMACHY

Professeur, Université Paris-Sud

Rapporteurs : Robert PANSU

Directeur de recherche, ENS Cachan

Antoine ROYANT

Chargé de recherche, IBS Grenoble

Examineurs : Dominique BOURGEOIS

Directeur de recherche, IBS Grenoble

Serge PIN

Chargé de recherche, CEA Saclay

Résumé :

La Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) est un variant spectral de la Green Fluorescent Protein extraite de la méduse *Aequaria Victoria* (GFP_{av}). La ECFP, émettant dans le cyan, est un des donneurs les plus utilisées dans les études de transfert résonnant d'énergie d'excitation et est intégrée dans de nombreuses constructions de biosenseurs. Pourtant, elle souffre de nombreux inconvénients. Notamment elle présente des propriétés photophysiques complexes et une forte sensibilité environnementale qui sont des freins à une interprétation quantitative de ses signaux de fluorescence en imagerie cellulaire. Notre objectif vise à mettre au point, grâce à l'introduction d'un minimum de mutations, un dérivé de la ECFP présentant des propriétés d'émission simplifiées et performantes ainsi qu'une faible sensibilité environnementale.

Des mutations ont été introduites, par mutagenèse dirigée, à deux positions clés de la séquence peptidique de la ECFP ce qui a permis de générer des dérivés présentant des propriétés photophysiques et une sensibilité au pH modulées. En particulier, nous avons réussi à générer une protéine fluorescente, l'Aquamarine, aux propriétés photophysiques quasi-idéales caractérisées par un rendement quantique de l'ordre de 0,9 et des déclin d'émission de fluorescence quasi-monexponentiels. Elle présente également une sensibilité au pH fortement réduite avec un pH de demi-transition acide de 3,3.

Ce manuscrit présente l'étude détaillée des propriétés d'émission de fluorescence des diverses protéines générées. Plusieurs paramètres présentant un intérêt particulièrement important pour une utilisation adéquate en imagerie de fluorescence ont été évalués. Outre la sensibilité au pH établie sur une large gamme de pH (2,5-11), une attention particulière a été portée sur les performances photophysiques (monoexponentialité du déclin d'émission de fluorescence, durée de vie moyenne, rendement quantique, brillance,...) de ces dérivés. De plus, grâce à des expériences de dichroïsme circulaire, des informations sur les changements structuraux, dont ces dérivés sont le siège à pH très acide, ont été obtenues. Enfin, l'examen détaillé des données spectroscopiques stationnaires et résolues en temps a permis de mettre en lumière l'existence de plusieurs espèces émissives contribuant à la photophysique de ces protéines et à l'origine de leur transition acide. L'ensemble de ces résultats constitue une première approche pour une meilleure compréhension de la relation structure-photophysique-dynamique de la ECFP et de ces dérivés.

Summary :

The Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) is a variant of Green Fluorescent Protein extracted from the jellyfish *Aequaria Victoria* (GFPav). The ECFP, emitting in the cyan, is one of the most donors used in studies of resonant transfer excitation energy and is integrated in many constructions of biosensors. However, it suffers from several drawbacks. In particular, it presents a complex photophysical properties and high environmental sensitivity that are obstacles to its quantitative interpretation of fluorescence signals in cellular imaging. Our goal is to develop, through the introduction of minimum mutations, a derivative of the ECFP with simplified emission properties and low environmental sensitivity.

Mutations were introduced by site-directed mutagenesis, into two positions in the peptide sequence of ECFP which helped to generate derivatives with modulated photophysical properties and low pH sensitivity. In particular, we have managed to generate a fluorescent protein, Aquamarine, with almost ideal photophysical properties characterized by a quantum yield of about 0.9 and pure single exponential fluorescence decay. It also has a greatly reduced sensitivity to the pH with half transition point near 3.3.

This manuscript presents a detailed study of fluorescence properties of various proteins generated. Several parameters for proper use in fluorescence imaging were evaluated. In addition to the pH sensitivity based on a wide range of pH (2.5 to 11), particular attention was paid to the photophysical performance (simpler fluorescence emission decay, average lifetime, quantum yield, brightness, ...) of these derivatives. In addition, we studied structural changes on these derivatives at acidic pH by circular dichroism. Finally, a detailed examination of the steady state fluorescence and time-resolved fluorescence helped to highlight the existence of several emissive species contributing to the photophysics of these proteins and the origin of their acid transition. These results constitute a first approach to a better understanding of the structure-photophysical dynamics of ECFP-and these derivatives.

Remerciements

Je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse sans l'aide et l'encouragement d'un grand nombre de personnes à qui je tiens à exprimer mes vifs remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier Mehran Mostafavi, directeur du Laboratoire de Chimie Physique de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire pour effectuer mon travail de thèse.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Robert Pansu et Antoine Royant, d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail : Isabelle Demachy, Dominique Bourgeois et Serge Pin.

Je remercie sincèrement Fabienne Mérola de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche mais aussi pour son aide, ses conseils et pour les discussions très enrichissantes que j'ai pu avoir avec elle.

Mes remerciements les plus profondes sont adressés à Hélène Pasquier, ma directrice de thèse, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ce travail, pour toutes ses suggestions, son soutien, sa rigueur et sa disponibilité tout au long de cette thèse. Je lui suis profondément reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé surtout au cours de la rédaction de ce mémoire. Je la remercie aussi pour toutes ses qualités humaines surtout pour sa bonne humeur. Cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est sans elle. Qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance pour ces années de travail sous sa direction.

Je remercie chaleureusement Marie Erard pour son aide précieuse sur tous les aspects de biologie moléculaire et la purification des protéines, pour sa bonne humeur, sa fiabilité, sa disponibilité et pour ses conseils toujours avisés. Sa rigueur dans le travail est un des éléments majeurs du bon déroulement de cette thèse.

Je remercie de tout cœur Yasmina Bousmah pour son aide, son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie Valérie Derrien pour son aide et ses précieux conseils dans la partie biologie moléculaire.

Je remercie Franck Vien pour ses conseils indispensables au sujet du dichroïsme circulaire.

Je souhaiterais remercier tous le groupe de biophysique, en particulier Laura Baciou pour sa gentillesse et ses conseils, Florence Lederer, Tania Bizouarn, Christine Dubois et Chantal Houée-Levin.

A Hajer et Aymen merci de m'avoir soutenue et d'avoir supporté mes crises de joie et de colère.

Je remercie les anciens stagiaires Galia et Kathuicia qui ont beaucoup contribué à ce présent travail.

Un grand merci aux thésards et stagiaires du LCP (Myriam, Guilda, Priyanka, Mehdi, Karim, Iftikhar, Momo, Iyad, Youssef, Dahdjim, Gabriella, Fayçal, Anaïs, Rawand) pour leur amitié, leur gentillesse et pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer.

Encore un merci à Isabelle Demachy, Jacqueline Ridard, Bernard Lévy et Gabriella Jonasson du groupe de ThéoSim, pour toutes les discussions enrichissantes dans le cadre de l'axe transversal P3F.

Je souhaiterais également remercier Marie-Françoise Lecanu, Séverine Bourguignon, Abelfattah Halim et Joël François pour leur aide et pour avoir facilité toutes les démarches administratives.

Rien n'aurait été possible sans le soutien infailible de mes copains et ami(e)s en particulier Khaled avec qui j'ai pu partager les moments difficiles et les moments heureux pendant ma thèse.

Merci à mes parents et mes grands parents pour leur soutien inconditionnel dans toutes les étapes de ma vie, merci de m'avoir toujours laissé faire mes choix et les assumer. Merci à mon frère Wassim.

Je souhaite remercier spécialement Bilel pour son soutien et sa confiance en moi, sa patience tout au long de la thèse.

SOMMAIRE

Sommaire	I
Glossaire.....	VII
Introduction Générale.....	- 1 -
Partie A : La fluorescence moléculaire.....	- 5 -
Chapitre A.I L'émission de fluorescence moléculaire	- 7 -
A.I.1 Les voies de désactivation des états excités	- 7 -
A.I.1.1 La conversion interne.....	- 8 -
A.I.1.2 L'émission de fluorescence.....	- 9 -
A.I.1.3 Le croisement inter système et l'émission de phosphorescence.....	- 9 -
A.I.1.4 Autres processus non radiatifs à l'état excité.....	- 9 -
A.I.1.5 Constantes de vitesse des processus photophysiques élémentaires.	- 9 -
A.I.2 Les grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence	- 10 -
A.I.2.1 Rendement quantique d'émission de fluorescence	- 10 -
A.I.2.2 Durée de vie et déclin d'émission de fluorescence.....	- 11 -
A.I.3 Les processus intermoléculaires.....	- 12 -
A.I.3.1 Extinction de la fluorescence : les mécanismes. Quenching statique/ quenching dynamique.	- 12 -
A.I.3.2 Les hétérogénéités cinétiques	- 16 -
Chapitre A.II Mesure de l'intensité d'émission de fluorescence en mode stationnaire ou résolu en temps -	20 -
A.II.1 L'intensité d'émission et d'excitation de fluorescence en mode stationnaire-	20 -
A.II.1.1 Dépendance de l'intensité en fonction de la longueur d'onde d'émission.	21 -
A.II.1.2 Spectres d'émission et d'excitation de fluorescence	- 22 -
A.II.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence résolue en temps : déclin d'émission de fluorescence.....	- 22 -
A.II.1.3 La fluorimétrie de phase	- 23 -
A.II.1.4 La fluorimétrie Impulsionnelle	- 23 -

Chapitre A.III Application. Dépendance en pH de l'intensité d'émission de fluorescence : cas d'un équilibre acido-basique simple.	31 -
Partie B : Les protéines fluorescentes et les dérivées cyans de la GFPav.....	33 -
Chapitre B.I Les protéines fluorescentes homologues de la Green Fluorescent Protein -	36 -
B.I.1 Les protéines fluorescentes : Généralités	36 -
B.I.1.1 Phylogénie.....	36 -
B.I.1.2 Historique.....	37 -
B.I.1.3 Aspects structuraux.....	39 -
B.I.2 Les variants spectraux de la GFPav.	42 -
B.I.2.1 Propriétés photophysiques de la GFPav.	42 -
B.I.2.2 65 et 148 : deux positions clés pour la GFPav et ses dérivés.	47 -
Chapitre B.II La Cyan Fluorescent Protein et ses dérivées.....	51 -
B.II.1 La Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) : GFPav – F64L, S65T, Y66W, N146T, M153T, V163A.....	51 -
B.II.1.1 Aspects structuraux	51 -
B.II.1.2 Aspects photophysiques.....	54 -
B.II.2 La Cerulean et un sous-variant, la ECFP-H148D.	60 -
B.II.2.1 La stratégie de mutation.....	60 -
B.II.2.2 A pH physiologique, c'est un peu mieux que la ECFP.....	61 -
B.II.2.3 A pH acide, une isomérisation du chromophore se produit.....	61 -
B.II.2.4 H148D : la mutation clé de la Cerulean.....	63 -
B.II.3 Les mTurquoise et la mCerulean3.	66 -
B.II.4 La photostabilité des CFPs.....	68 -
Partie C : Résultats expérimentaux.....	71 -
Chapitre C.I Cahier des charges et stratégie de mutation	73 -
Chapitre C.II Protocoles expérimentaux, conditions opératoires.....	76 -
C.II.1 De la mutagenèse dirigée vers la purification de la protéine	76 -
C.II.1.1 Mutagenèse dirigée	76 -
C.II.1.2 Expression et purification de la protéine	77 -

C.II.2	Conditions opératoires utilisées : tampons et concentrations types en protéine. ...	79 -
C.II.3	Spectroscopies stationnaires (absorption et émission).....	81 -
C.II.4	Détermination du rendement quantique de fluorescence	81 -
C.II.5	Spectroscopie de fluorescence résolue en temps.....	82 -
C.II.6	Détermination du coefficient d'extinction molaire (test BCA).....	83 -
C.II.7	Détermination du pH de demi-transition acide ($pH_{1/2}$)	84 -
Chapitre C.III Propriétés photophysiques des mutants de la ECFP en position 65 et 148.- 85 -		
C.III.1	Caractérisations des principaux dérivés cyans de la littérature : ECFP, Cerulean et mTurquoise.	85 -
C.III.1.1	Les résultats expérimentaux :.....	85 -
C.III.1.2	Analyse des résultats.....	96 -
C.III.2	Influence de la nature du résidu en position 148.....	100 -
C.III.2.1	Propriétés photophysiques de la ECFP-H148R	101 -
C.III.2.2	Propriétés photophysiques de la ECFP-H148N.....	105 -
C.III.2.3	Les monomutants en position 148 présentant une photophysique simplifiée-	108 -
C.III.3	Introduction de la mutation T65S dans la ECFP : la ECFP-T65S.....	116 -
C.III.3.1	Propriétés photophysiques à pH neutre.....	116 -
C.III.3.2	Sensibilité au pH.....	118 -
C.III.3.3	Synthèse des résultats	120 -
C.III.4	Les doubles mutations T65S-H148X, X=G, S, E, et D. l'Aquamarine, une protéine cyan performante.....	121 -
C.III.4.1	La cerulean-T65S.....	121 -
C.III.4.2	L'aquamarine et les doubles mutations.....	125 -
C.III.5	Influence de mutations annexes sur les propriétés photophysiques, la sensibilité au pH et la maturation des dérivés de la ECFP.....	129 -
C.III.5.1	Rôles de quelques mutations sur les propriétés photophysiques et la sensibilité au pH des dérivés de la ECFP.....	129 -

C.III.5.2	Rôles de quelques mutations sur la maturation des dérivés de la ECFP-	134
-		
C.III.5.3	- 135 -
C.III.6	Effet de l'ATP sur les propriétés photophysiques de la ECFP, la Cerulean, la mTurquoise et l'Aquamarine.	- 140 -
C.III.7	L'espèce Em460 est-elle formée à pH acide dans la ECFP, la ECFP-H148R et la ECFP-H148N ?.....	- 143 -
C.III.7.1	la Cerulean.	- 144 -
C.III.7.2	La ECFP et la ECFP-H148R.....	- 146 -
C.III.7.3	La ECFP-H148N.....	- 148 -
Chapitre C.IV	Approche structurale par dichroïsme circulaire.	- 151 -
C.IV.1	Principe du dichroïsme circulaire.	- 152 -
C.IV.1.1	Historique	- 152 -
C.IV.1.2	Aspects théoriques	- 152 -
C.IV.1.3	Les mesures expérimentales de dichroïsme circulaire.....	- 156 -
C.IV.2	Aspects expérimentaux.....	- 158 -
C.IV.2.1	Conditions expérimentales.....	- 159 -
C.IV.2.2	Méthodes d'analyse des spectres de dichroïsme circulaire.	- 160 -
C.IV.3	Etude de la ECFP, de ses dérivés et de la EYFP par dichroïsme circulaire.	- 162 -
C.IV.3.1	Structure secondaire estimée à partir de la structure cristallographique.-	162
-		
C.IV.3.2	Spectre SRCD de la ECFP, de ses dérivés et de la EYFP à pH 7,4. Algorithmes d'analyse.....	- 163 -
C.IV.3.3	Influence de divers paramètres physicochimiques sur le contenu en structures secondaires de la ECFP, de ses dérivés et de la YFP.	- 169 -
Partie D	: Analyse des résultats et discussion.....	- 179 -
Chapitre D.I	La transition de dénaturation acide de la ECFP et de ces dérivés.....	- 181 -
D.I.1	L'espèce <i>Acide_{pH2,5}</i> : aspects spectroscopiques et structuraux.....	- 181 -
D.I.2	Les transitions en pH. La transition de dénaturation acide.	- 182 -

D.I.2.1	L'aquamarine et les mutants portant les mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E).....	- 182 -
D.I.2.2	La ECFP et tous les dérivés ne portant pas simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E).	- 186 -
D.I.2.3	Le pH de demi-dénaturation acide. Stabilité de la protéine.....	- 190 -
Chapitre D.II	Déjà dans la zone des pH neutres, plusieurs espèces coexistent.	- 192 -
D.II.1	Cas des dérivés portant la mutation T65S ou une mutation H148X, X=G, A, S, N, D ou E.....	- 194 -
D.II.2	Cas de la ECFP et de la ECFP-H148R.....	- 197 -
D.II.3	Synthèse. Espèces présentes dans la zone des pH neutres	- 198 -
Chapitre D.III	Le long de la transition acide, d'autres espèces apparaissent.	- 200 -
D.III.1	Le Groupe H148X et T65S : les dérivés de la ECFP portant la mutation T65S ou une mutation H148X, X=G, A, S, E non couplée avec la mutation T65S.....	- 200 -
D.III.2	Le groupe Cerulean : les dérivés de la ECFP portant une mutation H148X, X=D ou N, non couplée avec la mutation T65S.	- 205 -
D.III.2.1	La Cerulean.....	- 206 -
D.III.2.2	La ECFP-H148N.	- 209 -
D.III.3	Le groupe ECFP : la ECFP et la ECFP-H148R.....	- 210 -
D.III.4	Réflexion autour des espèces rouges.....	- 211 -
	Synthèse générale et perspectives	- 213 -
	BIBLIOGRAPHIE	- 219 -

GLOSSAIRE

Aquamarine : ECFP-T65S, H148G

GFP_{av} : forme sauvage de la Green Fluorescent Protein issue de la méduse *Aequoria Victoria*

GFP_{uv} : GFP_{av}-F99S, M153T, V163A

ECFP : GFP_{av}-F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A

EYFP : GFP_{av} – F64L, S65G, V68L, S72A, T203Y

Cerulean : ECFP-S72A, Y145A, H148D

mCerulean2 : ECFP- S72A, Y145A, S147H, H148G, K166G, I167L, R168N, H169C, A206K

mCerulean3 : ECFP- T65S, S72A, Y145A, S147H, H148G, K166G, I167L, R168N, H169C, A206K

mTurquoise : ECFP-T65S, S72A, H148D, S175G, A206K

mTurquoise 2 : ECFP-T65S, S72A, I146F, H148D, S175G, A206K

SCFP3A : ECFP-S72A, H148D, S175G, A206K

W1B : GFP_{av}- F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A

W2 : GFP_{av}- Y66W, I123V, Y145H, H148R, M153T, V163A, N212K

W7 : GFP_{av}- Y66W, N146I, M153T, V163A, N212K

PFs : protéines fluorescentes

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la découverte de la Green Fluorescent Protein dans la méduse *Aequoria victoria* (GFP_{av}), les domaines d'utilisation des protéines fluorescentes ne cessent de se diversifier. A ce jour, les biologistes ont à disposition une large gamme de mutants synthétisés à partir de la GFP_{av} ou d'autres protéines fluorescentes homologues avec des propriétés d'émission, physico-chimiques et biochimiques multiples. Entre autres, un vaste choix de protéines fluorescentes existe dont les propriétés d'émission permettent de couvrir le spectre du visible dans sa totalité. Ces protéines sont les seuls marqueurs fluorescents codés génétiquement, ce qui est à la base de leur succès en facilitant leurs utilisations en biologie cellulaire. Elles rendent visibles les processus à l'œuvre à l'intérieur des cellules apportant ainsi des informations importantes sur les stades du développement cellulaire. Elles permettent également de suivre l'expression, la localisation et la dynamique des protéines en milieu cellulaire. Outre ces applications, certaines protéines fluorescentes peuvent être utilisées comme bio-senseurs dans les organites intracellulaires pour la mesure du pH intracellulaire, de la concentration en ions, de l'activité enzymatique, ... (1-3).

La compréhension des systèmes biologiques de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme entier que l'utilisation et le développement des protéines fluorescentes rend accessible repose sur l'exploitation de leurs signaux de fluorescence. L'interprétation de ces signaux en vue d'une conclusion sur le système biologique étudié n'a de sens que si l'expérimentateur possède une parfaite connaissance des propriétés intrinsèques de ces sondes fluorescentes, en l'occurrence de leurs propriétés photophysiques et de leur sensibilité environnementale. C'est encore mieux si les protéines fluorescentes choisies présentent des propriétés parfaitement adaptées au processus biologique étudié ce qui peut impliquer en amont tout un volet d'ingénierie des protéines pour mettre au point des protéines fluorescentes avec des propriétés spécifiques et maîtrisées.

Sauf si c'est ce qu'il veut exploiter, la sensibilité environnementale des protéines fluorescentes est un des fléaux de l'expérimentateur parce qu'elle va moduler les signaux de fluorescence indépendamment du processus biologique étudié rendant difficile leur quantification et leur exploitation. Le pH est un des paramètres intracellulaires pouvant conduire à de telles difficultés. Sa valeur peut varier entre 5,5 et 8 suivant les compartiments intracellulaires (4), intervalle dans lequel tombe le pK_a de la plupart des protéines fluorescentes les plus utilisées, dérivées de la GFP_{av} (5-7). D'autres propriétés des protéines

fluorescentes vont également être des facteurs déterminant le succès de l'interprétation de leurs signaux de fluorescence : leur brillance, la simplicité de leurs propriétés photophysiques, leur photostabilité, leur vitesse de maturation, leur tendance à s'oligomériser, etc.

Malgré un panel très large de protéines fluorescentes disponibles, peu présentent des propriétés optimales. A l'inverse, bien que de performances médiocres, beaucoup restent encore très utilisées. C'est notamment le cas de la enhanced Cyan Fluorescent Protein, ECFP, un variant de la GFP_{av} émettant dans le cyan, très utilisée comme donneur dans de nombreux biosenseurs basés sur la technique de transfert d'énergie de type Förster (FRET). Divers travaux, menés entre autres par l'équipe de Photobiologie du LCP, ont révélé que ce variant présente des propriétés d'émission de fluorescence fortement hétérogènes, avec des cinétiques de décroissance de la fluorescence non monoexponentielles, et une forte sensibilité environnementale, notamment vis-à-vis du pH (8-11). A titre d'exemple, la ECFP perd 50 % et 30% respectivement de son intensité de fluorescence et de sa durée de vie moyenne entre pH 7,4 et pH 5,5(8, 10). L'hétérogénéité et la sensibilité au pH des propriétés d'émission de fluorescence de la ECFP constituent un frein à une interprétation quantitative de ses signaux de fluorescence en imagerie. Ceci souligne l'impératif besoin de mettre au point un dérivé de la ECFP aux propriétés photophysiques simplifiées et performantes ainsi qu'une sensibilité environnementale réduite.

Ceci constitue l'objectif de ce travail au cours duquel nous avons visé à la fois l'amélioration des propriétés d'émission et la réduction de la sensibilité vis-à-vis du pH de la ECFP. Afin d'améliorer rapidement et aisément les systèmes biologiques existants basés sur la ECFP, notamment les biosenseurs basés sur le FRET, il est aussi important de veiller à n'introduire que le nombre minimum de mutations pour produire une protéine performante. Notre objectif a donc été de rendre performante la ECFP en peu de mutations, deux au maximum. Ceci se dénote des travaux de deux laboratoires concurrents qui, en parallèle à ce travail, ont proposés trois dérivés de la ECFP (mTurquoise, mTurquoise2 et mCerulean3) avec des propriétés très performantes mais présentant au minimum cinq mutations par rapport à la ECFP (12-14).

Ce manuscrit sera subdivisé en quatre parties. En premier lieu, nous présenterons les principes théoriques de bases de la spectroscopie de fluorescence moléculaire. La seconde partie consistera en une revue bibliographique largement dédiée à la description des protéines fluorescentes, en particulier de la GFP_{av}. Nous présenterons l'état de l'art concernant ses dérivés cyan, les connaissances actuelles sur leurs propriétés photophysiques et structurales.

La présentation de la stratégie de mutations suivie au cours de ces travaux et des résultats expérimentaux obtenus sur les divers mutants de la ECFP générés fera l'objet de la troisième partie. Nous nous focaliserons tout particulièrement sur l'exposé de leurs propriétés photophysiques et de leur sensibilité vis-à-vis du pH. Une approche structurale par dichroïsme circulaire sera également détaillée nous permettant d'extraire des informations sur la structure secondaire et tertiaire de ces protéines à pH très acide ou en fonction de la température. Finalement, la quatrième partie sera consacrée à l'analyse des résultats expérimentaux et à leur discussion. Trois zones de pH seront particulièrement intéressantes à discuter : la zone incluant la transition de dénaturation acide des protéines, la zone des pH neutres et une zone intermédiaire. Nous nous attacherons à caractériser les processus à l'origine des changements spectraux et cinétiques induits par le pH.

PARTIE A : LA FLUORESCENCE MOLECULAIRE

Chapitre A.I L'EMISSION DE FLUORESCENCE MOLECULAIRE

Une fois portée à l'état excité par absorption d'un photon, une molécule revient spontanément dans son état fondamental selon des voies très diverses (Figure 1). Dans le cas où ces dernières se produisent à une échelle de temps comparable au temps moyen de séjour de la molécule à l'état excité, il peut avoir compétition entre le processus d'émission de fluorescence et ces diverses voies de désactivation qui peut induire des modifications au niveau de ses propriétés émissives (spectre, rendement quantique et durée de vie).

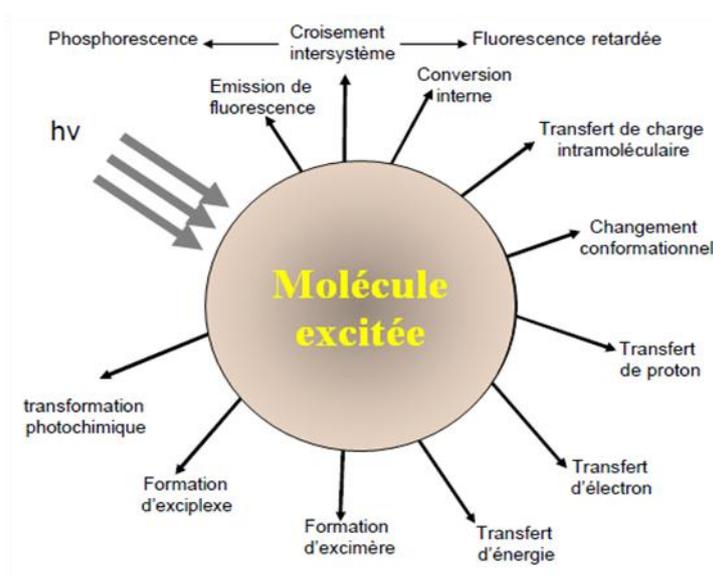


Figure 1 : Panel des processus photophysiques susceptibles de se produire suite à l'excitation d'une molécule. Source B. Valeur (15)

Ces processus ont généralement pour origine des modifications de paramètres physico-chimiques liés à l'environnement du fluorophore (pH, viscosité, T, ...). De fait, une analyse rigoureuse des propriétés émissives de la molécule peut apporter des informations pertinentes sur son environnement et sur les changements structuraux pouvant impliquer cet environnement.

A.I.1 LES VOIES DE DESACTIVATION DES ETATS EXCITES

A température ambiante, la majorité des molécules se trouvent dans l'état vibrationnel de plus basse énergie du niveau électronique fondamental S_0 . Lorsqu'une telle molécule absorbe un photon, elle peut passer de son état électronique fondamental S_0 à son premier état excité S_1 , ou encore à un état excité supérieur S_n . Le phénomène de

fluorescence se caractérise par l'émission d'un photon lorsque la molécule revient à son état fondamental. Il est dit radiatif. Comme résumé sur le diagramme de Perrin-Jablonski ci-dessous, plusieurs autres voies de désactivation de l'état excité sont susceptibles de se produire en compétition avec l'émission de fluorescence (Figure 2), en l'occurrence, la conversion interne, le croisement intersystème ou encore d'autres processus non radiatifs.

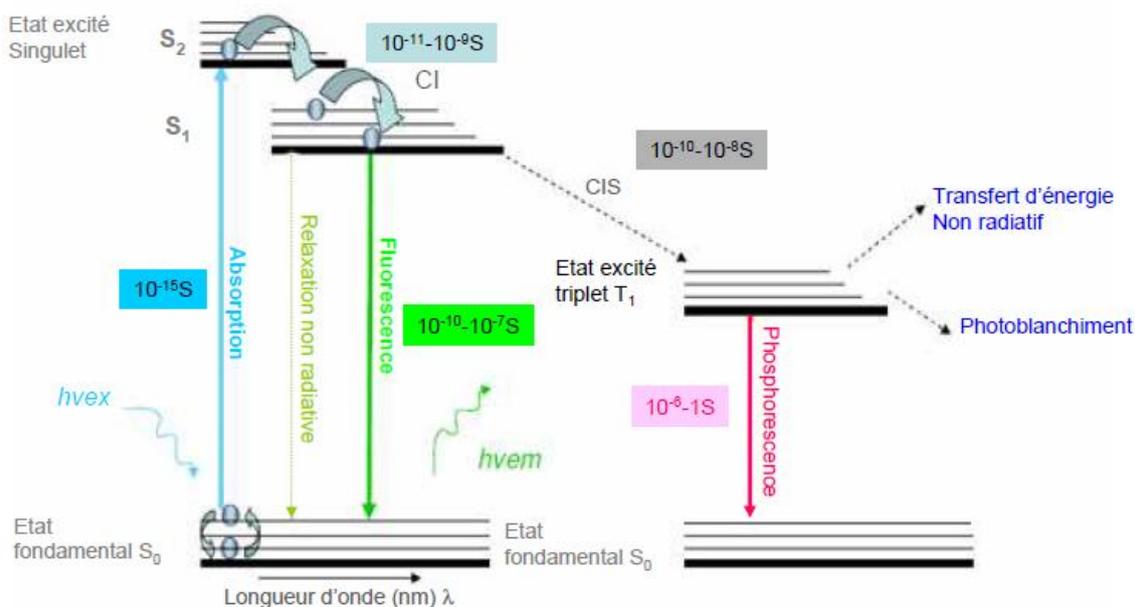


Figure 2 : Diagramme de Perrin-Jablonsky mettant en évidence les diverses voies de désactivation radiatives et non radiatives d'une molécule portée dans un état électronique excité suite à l'absorption d'un photon. Les états électroniques singulet sont notés S₀, S₁, S₂, ... et les états triplets T₁, ..., l'indice 0 faisant référence à l'état fondamental. (Source Valeur B. 2006(15)).

A.I.1.1 LA CONVERSION INTERNE

Il s'agit d'une transition non radiative isoénergétique entre deux niveaux électroniques de même multiplicité de spin. En solution, ce processus est suivi d'une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique final. L'excès d'énergie vibrationnelle peut en effet être transféré au solvant lors des collisions de la molécule excitée avec les molécules de solvant. Quand l'énergie du photon absorbé est suffisante pour permettre la transition d'absorption vers l'état excité S₂, la conversion interne est suivie, en solution, d'une relaxation vibrationnelle très rapide (vitesse de l'ordre de 10⁻¹¹-10⁻¹³ s) (16) conduisant au niveau d'énergie vibrationnel le plus bas du premier état excité S₁. La conversion interne de S₁ vers S₀ est possible mais elle est moins efficace que de S₂ à S₁ en raison de la différence d'énergie plus grande entre S₁ et S₀.

A.I.1.2 L'ÉMISSION DE FLUORESCENCE

L'émission de photon qui accompagne la transition du niveau d'énergie S_1 ($v=0$), au niveau d'énergie S_0 (v), est appelée émission de fluorescence. Par conséquent, considérant qu'une seule espèce à l'état fondamental soit excitée, les caractéristiques d'émission ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation. Compte tenu de la perte d'énergie suite aux diverses relaxations vibrationnelles décrites précédemment, le processus d'émission s'effectue à des longueurs d'onde supérieures à celles du processus d'absorption.

A.I.1.3 LE CROISEMENT INTER SYSTEME ET L'ÉMISSION DE PHOSPHORESCENCE

Une autre voie de désexcitation est possible à partir de l'état singulet S_1 . Il s'agit du croisement intersystème qui est une transition isoénergétique non radiative, entre deux états électroniques de multiplicité de spin différente à savoir entre un état singulet et un état triplet. Il s'en suit une relaxation vibrationnelle qui mènera la molécule au niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité triplet, suivie d'une désactivation radiative vers le niveau électronique fondamental S_0 . Ce dernier processus désigne *l'émission de phosphorescence*. A l'instar de l'émission de fluorescence, du fait de la perte d'énergie qui accompagne la relaxation vibrationnelle, l'émission de phosphorescence se produit à des longueurs d'onde plus grandes que celles associées à l'émission de fluorescence.

A.I.1.4 AUTRES PROCESSUS NON RADIATIFS A L'ÉTAT EXCITÉ

En raison de la présence de molécules spécifiques (quencher) dans le solvant ou de la nature même du solvant (polarité, ...), divers processus photoinduits autre que les processus intrinsèques décrits précédemment peuvent se produire et conduire à une désactivation non radiative de l'état singulet S_1 (Figure 1). La photoisomérisation, les transferts de charges inter- ou intra-moléculaires, le transfert d'énergie d'excitation sont quelques exemples de processus susceptibles d'avoir lieu à l'état excité en supplément des voies de désactivation intrinsèques à la molécule décrites précédemment.

A.I.1.5 CONSTANTES DE VITESSE DES PROCESSUS PHOTOPHYSIQUES ELEMENTAIRES.

Les constantes de vitesse des processus photophysiques dont une molécule dans son état excité $^1M^*$ est le siège suite à l'absorption d'un photon sont rassemblées dans le schéma cinétique suivant :

$M + h\nu \rightarrow {}^1M^*$	Absorption d'un photon
${}^1M^* \rightarrow M + h\nu$	Emission de fluorescence, constante de vitesse k_r
${}^1M^* \rightarrow M$	Conversion interne (CI), constante de vitesse : k_{CI}
${}^1M^* \rightarrow {}^3M^*$	Conversion inter système (CIS), constante de vitesse: k_{ISC}
${}^1M^* (+ \text{Quencher}) \rightarrow M + (\text{Produit})$	Autres processus de désactivation non radiatif, constante de vitesse: k_q

A.I.2 LES GRANDEURS CARACTERISTIQUES DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE

Dans ce qui suit, il est considéré un fluorophore (M) où seules ses voies de désactivation intrinsèques à l'état excité (fluorescence, CI et CIS) se produisent (absence d'interaction intermoléculaires, ...). Dans ces conditions, la constante de vitesse associée à l'ensemble des processus non radiatifs est définie selon $k_{nr}=k_{CI}+ k_{ISC}$.

A.I.2.1 RENDEMENT QUANTIQUE D'EMISSION DE FLUORESCENCE

En raison de la compétition cinétique entre les différentes voies de désactivation radiatives et non radiatives de l'état excité S_1 , l'émission d'un photon de fluorescence après excitation n'est qu'une possibilité parmi d'autres. L'efficacité relative du processus d'émission de fluorescence est quantifiée par le rendement quantique d'émission de fluorescence (Φ_F). Cette grandeur représente la probabilité d'émission d'un photon de fluorescence suite à l'absorption d'un photon et peut être estimée comme le rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence ($N_{émis}$) et le nombre de photons absorbés (N_{abs}), soit :

$$\Phi_F = \frac{N_{émis}}{N_{abs}} \quad \text{Équation 1}$$

Le rendement quantique d'émission de fluorescence peut également s'exprimer en fonction des constantes de vitesse des divers processus de désactivation radiatifs k_r et non radiatifs k_{nr} de l'état excité S_1 selon :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Équation 2}$$

Ou encore

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{CI} + k_{ISC}} \quad \text{Équation 3}$$

A.I.2.2 DUREE DE VIE ET DECLIN D'EMISSION DE FLUORESCENCE

Suite à l'interaction d'une solution homogène de M avec une impulsion lumineuse ultrabrève, une population de molécules M passe dans l'état excité $^1M^*$ par absorption de photons. La désactivation de l'état excité s'effectue avec une vitesse donnée par l'expression :

$$-\frac{d[^1M^*]}{dt} = \{k_r + k_{nr}\} \cdot [^1M^*] \quad \text{Équation 4}$$

De fait, la concentration en molécule à l'état excité à un instant t après l'impulsion, compte tenu de la condition initiale $[^1M^*](t=0) = [^1M^*]_0$, a pour expression :

$$[^1M^*](t) = [^1M^*]_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Équation 5}$$

où τ désigne la durée de vie d'émission de fluorescence et s'exprime selon :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Équation 6}$$

Généralement, dans le cas de molécules en solution homogène sans interaction intermoléculaire, τ ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation et varie de quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes.

En pratique, la valeur de la durée de vie d'émission est issue de l'analyse du déclin d'émission de fluorescence qui correspond à la décroissance au cours du temps de l'intensité d'émission de fluorescence. Cette dernière représente le nombre de photons émis (en mol) par unité de temps (s) et de volume (L) et est donc proportionnelle à la probabilité que les molécules dans leur état excité se désactivent via le processus radiatif d'émission de fluorescence selon

$$I_F(t) = k_r \cdot [^1M^*](t) = k_r \cdot [^1M^*]_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Équation 7}$$

Le déclin d'émission de fluorescence d'une solution homogène de molécule M sans interaction décroît selon une loi monoexponentielle.

La durée de vie d'émission de fluorescence en absence de processus de désactivation non radiatif, τ_F , est appelée durée de vie de fluorescence radiative et a pour expression :

$$\tau_F = \frac{1}{k_r} \quad \text{Équation 8}$$

La constante de vitesse du processus de désactivation radiatif k_r peut être estimée expérimentalement à partir de la mesure, dans les mêmes conditions expérimentales, du rendement quantique (ϕ_F) et de la durée de vie d'émission de fluorescence (τ) selon :

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau} \quad \text{Équation 9}$$

ou encore à partir des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence selon la relation de Strickler et Berg :

$$k_r = \frac{1}{\tau_F} = 2,88 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \frac{\int F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) \cdot d\bar{\nu}_F}{\int \bar{\nu}_F^{-3} F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) \cdot d\bar{\nu}_F} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}_A) \cdot d\bar{\nu}_A}{\bar{\nu}_A} \quad \text{Équation 10}$$

Où n désigne l'indice de réfraction du milieu, $F(\bar{\nu})$ l'intensité de fluorescence émise au nombre d'onde $\bar{\nu}_F$ et $\varepsilon(\bar{\nu}_A)$ le coefficient d'absorption molaire au nombre d'onde $\bar{\nu}_A$.

A.I.3 LES PROCESSUS INTERMOLECULAIRES.

A.I.3.1 EXTINCTION DE LA FLUORESCENCE : LES MECANISMES. QUENCHING STATIQUE/ QUENCHING DYNAMIQUE.

A.I.3.1.a Généralités sur les mécanismes d'extinction de la fluorescence.

Des perturbations spectrales et cinétiques peuvent être causées par le solvant ou la présence de molécule dans le solvant. Le passage à l'état excité d'une molécule M peut alors induire divers processus photoinduits, autres que l'émission de fluorescence, et qui ont été résumés Figure 1. Globalement, ces processus photoinduits peuvent être considérés comme résultant de l'interaction d'un fluorophore excité $^1M^*$ avec une molécule Q (proton, molécule, ions, électron, ...). Ces processus constituent une voie de désactivation supplémentaire de l'état excité. Quelque soit la nature du processus photophysique intermoléculaire, la perte d'intensité de fluorescence due à la présence de Q est appelée extinction ou inhibition de la fluorescence ou encore quenching de la fluorescence.

L'efficacité de l'extinction d'un fluorophore $^1M^*$ par une molécule Q dépend du mécanisme d'interaction entre $^1M^*$ et Q et de la concentration de Q . Concernant le mécanisme d'interaction, en première approximation, il est possible de distinguer deux cas de figures, suivant la distance relative et la vitesse de diffusion relative entre $^1M^*$ et Q :

- 1- La molécule Q se trouve, au moment de l'excitation, dans un volume actif tel que l'extinction est instantanée. Il n'y a pas besoin de diffusion d'une molécule vers l'autre pendant la durée de vie de $^1M^*$ pour que l'inhibition se produise. Dans ces conditions, l'extinction de la fluorescence ne dépend pas de la viscosité, et il s'agit d'un quenching statique.
- 2- Dans le cas où aucune molécule Q ne se trouve au moment de l'excitation dans le volume actif, l'extinction ne pourra se faire que suite à la diffusion de Q pendant la durée de vie de $^1M^*$ pour pénétrer dans ce volume actif. L'efficacité de l'extinction de la fluorescence va alors dépendre de la vitesse de diffusion relative entre $^1M^*$ et Q et donc de la viscosité. Dans ce cas, il s'agit d'un quenching dynamique ou encore collisionnel.

A.I.3.1.b Quenching dynamique

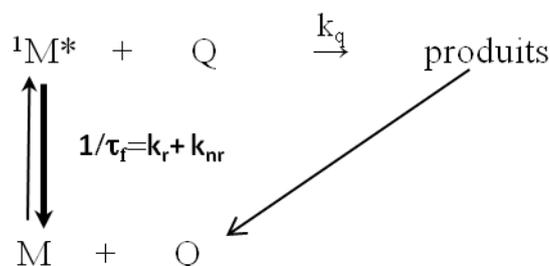


Figure 3 : Schéma cinétique décrivant les processus photophysiques se produisant à l'état fondamental et à l'état excité d'un fluorophore en présence d'un quencher, dans le cas d'un quenching dynamique.

Dans le cas d'un processus de quenching dynamique (Figure 3), la vitesse de disparition de l'état excité s'écrit

$$-\frac{d[^1M^*]}{dt} = \{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [Q]\} \cdot [^1M^*] \quad \text{Équation 11}$$

Soit, en tenant compte de la condition initiale $[^1M^*](t=0) = [^1M^*]_0$

$$[^1M^*](t) = [^1M^*]_0 \cdot e^{-\left(\frac{1}{\tau} + k_q \cdot [Q]\right) \cdot t} \quad \text{Équation 12}$$

L'intensité de fluorescence a alors pour expression :

$$i(t) = k_r \cdot [^1M^*](t) = k_r \cdot [^1M^*]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau^Q}} \quad \text{Équation 13}$$

De fait, le déclin d'émission de fluorescence lors d'une inhibition dynamique reste monoexponentiel mais la valeur de la durée de vie dont l'expression est donnée ci-dessous est réduite:

$$\tau^Q = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_q \cdot [Q]} \quad \text{Équation 14}$$

D'où :

$$\frac{\tau}{\tau^Q} = 1 + k_q \cdot \tau \cdot [Q] \quad \text{Équation 15}$$

Le rendement quantique d'émission de fluorescence en présence de quencher est plus faible que celui obtenu en absence de quencher et est donné par :

$$\Phi^Q = \frac{k_r}{1/\tau + k_q \cdot [Q]} \quad \text{Équation 16}$$

En combinant les expressions des rendements quantiques en absence et en présence du quencher, on obtient la relation de Stern Volmer :

$$\frac{\Phi}{\Phi^Q} = 1 + k_q \cdot \tau \cdot [Q] = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Équation 17}$$

Avec K_{SV} , la constante de Stern Volmer exprimée en $L \cdot mol^{-1}$.

Deux cas peuvent être distingués :

- Le processus intermoléculaire n'est pas limité par la diffusion entre $^1M^*$ et Q mais par le processus de quenching en lui-même. De fait, la constante de vitesse de quenching k_q est inférieure à la constante de vitesse diffusionnelle (k_{diff}). Dans ces conditions, la réaction n'a pas lieu à chaque rencontre et la constante de vitesse peut s'exprimer selon $k_q = p \cdot k_{diff}$ où p représente la probabilité de formation de l'interaction entre $^1M^*$ et Q pendant la durée de vie de $^1M^*$.
- Le processus est limité par la diffusion. Dans ce cas, la constante de vitesse observée pour le quenching est égale à k_{diff} . Il est possible de montrer que k_q dépend de la distance de contact (somme des rayons des deux partenaires) et du coefficient de diffusion mutuelle (somme des coefficients de diffusion des deux partenaires) et donc de la température et de la viscosité du milieu.

A.I.3.1.c Quenching statique

Un processus de quenching statique implique ou l'existence d'une sphère d'inhibition effective ou la formation d'un complexe non fluorescent entre M et Q à l'état fondamental.

Dans le cas de l'existence d'une sphère d'inhibition de volume V_q , une inhibition avec une probabilité de 1 se produit dès lors qu'un inhibiteur Q est situé à l'intérieur de la sphère. La fluorescence de M ne sera pas observée. Si en revanche, l'inhibiteur se trouve en dehors de ce volume, aucun quenching ne se produit. De fait, la fluorescence résiduelle observée va provenir de la fraction de fluorophores pour lesquels il n'y a pas de molécules de quencher dans le volume V_q . L'intensité de fluorescence décroît donc lors de l'addition de Q. En revanche, le déclin d'émission de fluorescence et la durée de vie seront inchangés puisque les fluorophores émissifs ne subissent pas d'interactions avec Q.

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la probabilité qu'aucune molécule de quencher ne se trouve dans le volume V_q , ce qui conduit à l'expression du rapport des intensités de fluorescence en absence (I) et en présence (I^Q) de quencher Q suivante :

$$\frac{I}{I^Q} = e^{-(V_q \cdot N_a \cdot [Q])} \quad (15) \quad \text{Équation 18}$$

Contrairement à la relation de Stern Volmer, la relation précédente n'est pas linéaire, hormis aux faibles concentrations.



Figure 4 : Illustration de l'inhibition statique dans le cas de la présence d'une sphère d'inhibition effective de volume V_q .

L'inhibition statique peut également intervenir dans le cas de la formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental selon le mécanisme suivant :

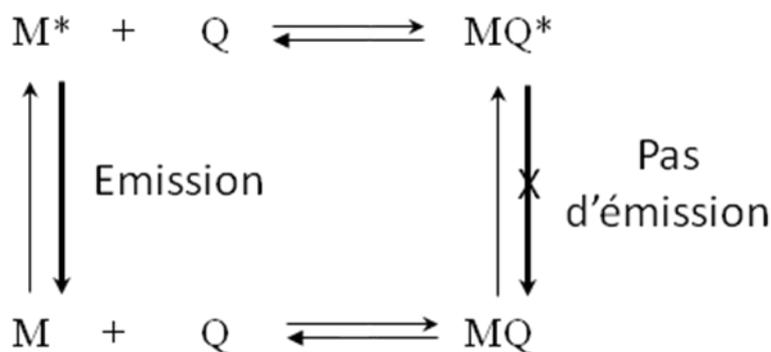


Figure 5 : Modèle cinétique dans le cas d'un quenching statique impliquant la formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental.

L'émission de fluorescence observée proviendra de la population de fluorophore M non impliqué dans un complexe MQ à l'état fondamental. De fait, l'intensité de fluorescence de l'échantillon va décroître avec l'augmentation de Q alors que la durée de vie reste inchangée.

A.I.3.1.d Distinctions entre quenching dynamique et quenching statique

Contrairement au processus de quenching dynamique qui conduit à une réduction à la fois de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence, le quenching statique n'induit que des variations de l'intensité de fluorescence. De fait, une bonne interprétation des phénomènes liés à une extinction de la fluorescence nécessite à la fois des mesures stationnaires et des mesures résolues en temps. Seul le quenching dynamique implique une modification de la durée de vie de fluorescence.

Par ailleurs, les fluorophores peuvent être quenchés selon les deux principaux mécanismes de quenching à savoir par collision et par formation d'un complexe avec le même quencher : l'inhibition statique et l'inhibition dynamique peuvent avoir lieu simultanément. Dans ces conditions, la fraction d'émission de fluorescence restante sera donnée par le produit

- de la fraction de fluorophores non complexés (ceux complexés ne fluorescent pas)
- de la fraction de fluorophores non quenchés par collision.

A.I.3.2 LES HETEROGENEITES CINETIQUES

Les protéines que nous allons étudier présentent pour la plupart des déclin d'émission de fluorescence très complexes laissant supposer que ces protéines présentent une photophysique loin du cas idéal d'un ensemble de fluorophores identiques en solution homogène, ne présentant pas de réactions à l'état excité, décrit précédemment (voir A.I.2.2). En effet, dans ce cas, le déclin d'émission de fluorescence est monoexponentiel et indépendant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Plusieurs processus photophysiques peuvent être à l'origine d'hétérogénéités cinétiques mais également spectrales et conduire à l'obtention de déclin d'émission de fluorescence complexes (15, 17, 18). C'est le cas par exemple lors de l'existence dès l'état fondamental de formes moléculaires distinctes (différentes conformations, diverses espèces ioniques ou de complexation), ou encore de l'existence de processus photophysiques à l'état excité, processus photoinduits tels que par exemple les transferts de charge (proton, electron). Des hétérogénéités cinétiques et spectrales peuvent également être la conséquence de la relaxation dynamique de l'environnement du chromophore due à la présence du solvant, de processus complexes à l'état excité présentant des phénomènes transitoires ou des constantes de vitesse dépendante du temps. Dans la suite

de cette partie, nous présenterons brièvement quelques-uns de ces processus, sans toutefois être exhaustif, dans le but notamment de montrer toute la diversité d'interprétation et donc la difficulté d'interprétation d'un déclin d'émission.

A.I.3.2.a Préambule : vitesse relative des processus

Tout processus se produisant à une échelle de temps beaucoup plus courte que la durée de vie de fluorescence du fluorophore sera terminé avant l'émission de ce dernier. Dans ce cas, une population non fluorescente de molécules, sera présente dans la solution, le nombre de photons émis par l'échantillon sera faible et le déclin enregistré sera celui de la population restante de fluorophores. On obtient alors un déclin identique à celui obtenu en absence de processus de désactivation avec une durée de vie inchangée. Dans le cas contraire où le processus de désactivation se produit à une échelle de temps beaucoup plus longue que la durée de vie de fluorescence, les propriétés d'émission du fluorophore seront inchangées. Enfin, si le processus de désactivation se produit à une échelle de temps du même ordre de grandeur que la durée de vie d'émission de fluorescence, alors un déclin complexe pourra être observé.

A.I.3.2.b Mélange d'espèces indépendantes (mélange statique)

Un mélange d'espèces indépendantes non impliquées dans des réactions à l'état excité est susceptible de présenter un spectre d'émission dépendant de la longueur d'onde d'excitation. Le déclin d'émission, quant à lui, devient multiexponentiel avec autant de termes exponentiels que d'espèces émissives excitées à l'état fondamental. Dans ces conditions, les facteurs préexponentiels α_i sont reliés aux fractions molaires x_i de chaque espèce selon la relation établie par F. Merola (18) :

$$\alpha_i = \frac{x_i \cdot \varepsilon_i \cdot f_i \cdot k_{ri}}{\sum_i (x_i \cdot \varepsilon_i \cdot f_i \cdot k_{ri})} \quad \text{Équation 19}$$

Où ε_i : le coefficient d'absorption molaire de l'espèce i ,

k_{ri} : la constante de vitesse de désactivation radiative de l'espèce i

f_i : la fraction d'intensité émise par cette espèce à la longueur d'onde de détection¹.

A.I.3.2.c Mélange d'espèces en équilibre et réaction à l'état excité.

Dans le cas d'un mélange d'espèces en équilibre ou encore présentant des réactions à l'état excité, il est possible de montrer que le déclin d'émission résultant est assimilable à une

¹ $\int_{\text{spectre}} f_i(\lambda) \cdot d\lambda = 1$

fonction multiexponentielle dont le nombre d'exponentielles dépend du nombre d'espèces en échange mais également de la valeur relative des vitesses d'échange par rapport aux durées de vie de fluorescence de ces espèces.

Pour appréhender ces aspects, nous pouvons raisonner sur un cas simple, à savoir l'échange entre deux espèces A et B dont la constante d'équilibre à l'état fondamental est K et à l'état excité est égale au rapport des constantes de vitesse respectivement de disparition k_1 et de formation k_2 de A* à l'état excité (Figure 6).

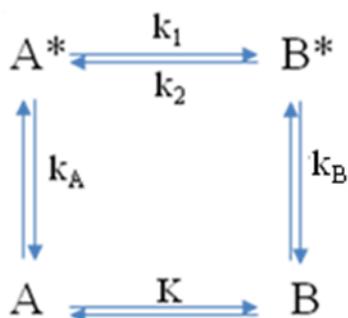


Figure 6 : Schéma cinétique décrivant les divers processus élémentaires dont sont le siège A et B à l'état fondamental et à l'état excité. K désigne la constante d'équilibre à l'état fondamental. k_1 et k_2 sont les constantes de vitesse d'échange entre A* et B* à l'état excité, respectivement de disparition et de formation de A*.

La résolution du système d'équations différentielles décrivant l'évolution en fonction du temps de chaque espèce suite à une excitation pulsée conduit à une expression du déclin d'émission de fluorescence global collecté à une longueur d'onde donnée faisant apparaître deux termes exponentiels. Les constantes de temps sont des fonctions des diverses constantes de vitesse du système (k_1 , k_2 et les deux durées de vie des deux espèces en équilibre $1/k_A$ et $1/k_B$). Quant aux facteurs préexponentiels, ce sont des fonctions qui dépendent également des diverses constantes de vitesse du système mais également de la fraction molaire de chaque espèce à l'état fondamental et des caractéristiques spectrales des deux espèces.

Trois situations peuvent être globalement envisagées suivant la vitesse relative des vitesses d'échange avec les durées de vie des deux espèces. Les travaux de F. Merola (18), puis de H. Pasquier (19) montrent que :

- (i) lorsque les vitesses d'échange sont très lentes, le système se comporte comme un mélange d'espèces indépendantes. Le déclin présente alors des constantes de temps égales aux durées de vie de fluorescence pure de chaque espèce et des facteurs exponentiels égaux aux fractions molaires des espèces à l'état fondamental.
- (ii) lorsque les vitesses d'échange augmentent, la constante de temps la plus longue évolue vers une position intermédiaire entre les durées de vie de fluorescence des deux espèces

alors que la constante de temps la plus courte voit sa contribution au signal rapidement diminuer.

(iii) pour des vitesses d'échange très rapide, une seule exponentielle sera observée.

Ainsi, il ressort que pour un mélange d'espèces en échange même lorsqu'elles ne sont pas présentes à l'état fondamental, le nombre d'exponentielles qui composera le déclin sera au maximum égal au nombre d'espèces émissives et les valeurs des durées de vie apparentes pourront fortement diverger des valeurs des durées de vie de fluorescence de chaque espèce.

A.I.3.2.d Autres processus complexes.

La description précédente des déclinés par une multi-exponentielle n'est valable que si les constantes de vitesse à l'état excité ne varient pas pendant la durée de l'émission. Dans le cas contraire, des déclinés plus complexes, non exponentiel, peuvent être attendus, comme c'est le cas, notamment, pour le processus de relaxation dynamique de l'environnement d'un chromophore. D'autres processus à l'état excité, mettant en jeu des phénomènes transitoires tels que les processus de quenching contrôlés par la diffusion dans un milieu visqueux conduisent également à des déclinés non exponentiels(15, 17).

Chapitre A.II MESURE DE L'INTENSITE D'EMISSION DE FLUORESCENCE EN MODE STATIONNAIRE OU RESOLU EN TEMPS

A.II.1 L'INTENSITE D'EMISSION ET D'EXCITATION DE FLUORESCENCE EN MODE STATIONNAIRE

Lorsqu'un échantillon de fluorophores, de concentration $[M]$ et de volume V , est exposé pendant un temps t , à une source lumineuse émettant un nombre constant N_0 de photons, une fraction de la lumière sera absorbée : αN_0 représente le nombre de photons absorbés par unité de volume pendant ce temps.

En mode stationnaire (i.e. illumination continue), le flux de photons traversant l'échantillon est constant au cours du temps, la concentration des molécules M à l'état excité $^1M^*$ est constante et se trouve dans un état stationnaire. Ceci se traduit par l'équation suivante, où k_a est la constante de vitesse du processus d'absorption :

$$\frac{d[^1M^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r + k_{nr}) [^1M^*] \quad \text{Équation 20}$$

Le premier terme de cette équation représente le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume et peut être aussi exprimé en fonction de l'intensité de lumière incidente I_0 selon l'équation :

$$\alpha \cdot k_a N_0 = \alpha I_0 \quad \text{Équation 21}$$

D'où

$$[^1M^*] = \frac{\alpha \cdot I_0}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Équation 22}$$

Ceci permet alors d'exprimer le nombre total de photons émis par unité de volume et de temps et, qui n'est autre que l'intensité de fluorescence, par :

$$I_F = k_r [^1M^*] = k_r \cdot \frac{\alpha I_0}{k_r + k_{nr}} = \alpha I_0 \cdot \Phi \quad \text{Équation 23}$$

L'intensité de fluorescence peut aussi être exprimée en fonction du rendement quantique d'émission de fluorescence, ϕ .

A.II.1.1 DEPENDANCE DE L'INTENSITE EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EMISSION.

Le rendement quantique ϕ représente la probabilité d'émission d'un photon quelque soit la longueur d'onde d'émission suite à une excitation à une longueur d'onde λ_{ex} et peut être exprimé selon :

$$\Phi = \frac{I_F}{\alpha I_0} = \int_0^{\infty} P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot d\lambda_{em} \quad \text{Équation 24}$$

où $P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ désigne la probabilité d'émission d'un photon à une longueur d'onde λ_{em} suite à une excitation à λ_{ex} .

$$P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \frac{I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})}{I_A(\lambda_{ex})} \quad \text{Équation 25}$$

$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ et $I_A(\lambda_{ex})$ désignent respectivement l'intensité de fluorescence émise à λ_{em} et l'intensité du faisceau incident absorbée à λ_{ex} . En exprimant I_F en fonction des intensités incidente I_0 et transmise I_T on obtient :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot (I_0(\lambda_{ex}) - I_T(\lambda_{ex})) \quad \text{Équation 26}$$

Soit

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot (1 - 10^{-A}) \quad \text{Équation 27}$$

avec A l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde λ_{ex} .

Pour de faibles valeurs d'absorbance, l'expression $1 - 10^{-A}$ admet pour développement limité :

$$1 - 10^{-A} = 2,3 \cdot A - \frac{1}{2!} \cdot (2,3 \cdot A)^2 + \dots \quad \text{Équation 28}$$

Ainsi, pour des solutions très diluées telles que $A < 0,05$, les termes d'ordre supérieur à un deviennent négligeables. Dés lors, $I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ peut s'écrire :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = 2,3 \cdot P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot A \quad \text{Équation 29}$$

ou encore, d'après la loi de Beer-Lambert,

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = 2,3 \cdot P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot \varepsilon(\lambda_{ex}) \cdot C \cdot \ell \quad \text{Équation 30}$$

Où $\varepsilon(\lambda_{ex})$ désigne le coefficient d'extinction molaire du fluorophore à la longueur d'onde λ_{ex} , ℓ la longueur du trajet optique et C la concentration en fluorophore.

Dans la pratique, l'intensité de fluorescence mesurée n'est pas strictement égale à $I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$, mais un facteur correctif doit être introduit pour tenir compte de divers paramètres instrumentaux qui en altérant cette intensité peuvent conduire à une distorsion du spectre (modification dépendante de la longueur d'onde). Ces facteurs instrumentaux sont par exemple l'efficacité de transmission des monochromateurs, la largeur des fentes, les pertes de la radiation lumineuse par réflexion sur les diverses interfaces et notamment de la cuve, la réponse différentielle du photomultiplicateur en fonction de la longueur d'onde, la dérive de la source ou de l'électronique, etc.

A.II.1.2 SPECTRES D'EMISSION ET D'EXCITATION DE FLUORESCENCE

Le spectre d'émission reflète les variations de l'intensité de fluorescence émise en fonction de la longueur d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixe. En d'autres termes, le spectre d'émission décrit la variation de la probabilité d'émission, $P_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ en fonction de λ_{em} . Pour une population homogène de fluorophores, le spectre d'émission ne doit pas dépendre de la longueur d'onde d'excitation.

Le spectre d'excitation, quant à lui, reflète les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} pour une longueur d'onde d'émission fixe. Ces variations traduisent l'évolution du produit $I_0(\lambda_{ex}) \cdot A(\lambda_{ex})$. Supposons l'intensité du faisceau incident indépendante de λ_{ex} . Si une seule espèce est présente à l'état fondamental, alors le spectre d'excitation sera de même allure que le spectre d'absorption. En revanche, dans le cas d'un mélange hétérogènes ou lorsque l'espèce présente à l'état fondamental se trouve sous différentes formes (agrégats, complexes, formes tautomères...), les spectres d'absorption et d'excitation ne sont pas superposables. La comparaison entre les spectres d'absorption et d'excitation sera alors une source d'informations précieuses.

A.II.2 SPECTROSCOPIE D'EMISSION DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS : DECLIN D'EMISSION DE FLUORESCENCE

L'excitation en mode pulsé est une excitation très brève permettant l'obtention du déclin d'émission de fluorescence dont l'analyse conduit à l'estimation de la durée de vie d'émission de fluorescence de l'espèce étudiée et peut être porteuse d'informations précieuses sur les processus se produisant à l'état excité.

Il existe globalement deux grandes méthodes pour déterminer la durée de vie : la fluorimétrie de phase basée sur des mesures dans l'espace des fréquences et la fluorimétrie impulsionnelle

basée sur des mesures dans l'espace des temps. Dans cette partie nous présenterons brièvement la fluorimétrie de phase puis nous détaillerons le principe de base de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps, une des techniques les plus utilisées en fluorimétrie impulsionnelle. C'est cette technique que nous avons utilisée au cours de ces travaux.

A.II.1.3 LA FLUORIMETRIE DE PHASE

La fluorimétrie de phase est basée sur des mesures dans l'espace des fréquences, l'échantillon étant soumis à une excitation par une lumière modulée sinusoïdalement, de fréquence angulaire ω . La désactivation de l'état excité conduit à une émission de fluorescence avec la même fréquence mais déphasée (déphasage Φ) et démodulée par rapport à l'excitation (rapport de modulation M). On peut montrer que ces deux grandeurs sont reliées à la ou les durées de vie de fluorescence des espèces émissives de l'échantillon. Dans le cas d'un déclin monoexponentiel de durée de vie τ , le déphasage et le rapport de modulation sont donnés par

$$\tan \Phi = \omega \cdot \tau \quad \text{et} \quad M = \left(\frac{1}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \right)^{1/2} \quad \text{Équation 31}$$

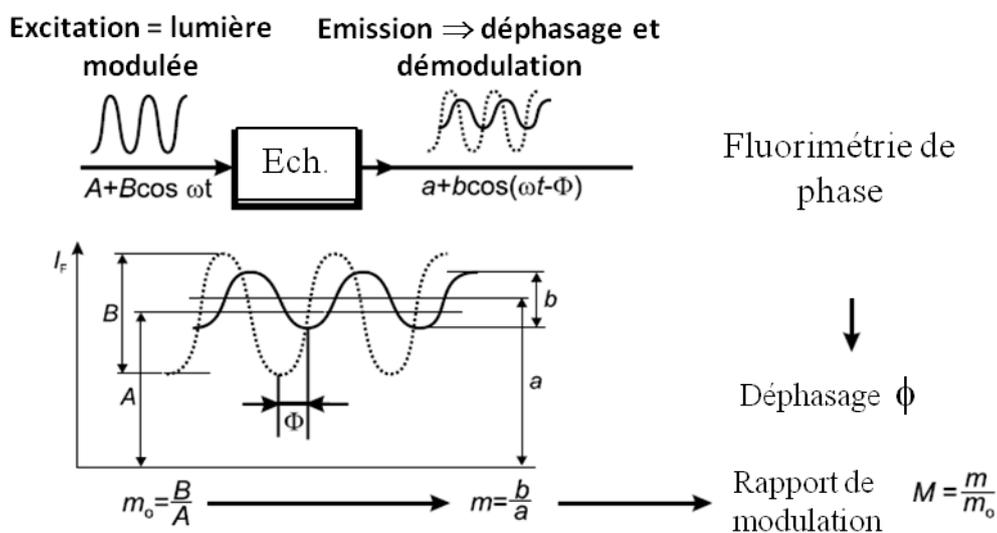


Figure 7 : Principe de la fluorimétrie de phase. Source B. Valeur 2006, (15)

A.II.1.4 LA FLUORIMETRIE IMPULSIONNELLE

A.II.1.4.a Principe du comptage de photons uniques corrélés en temps (TCSPC)

Cette technique repose sur le fait que la probabilité de détecter un seul photon à un temps t , après une impulsion excitatrice, est proportionnelle à l'intensité d'émission de fluorescence à ce temps donné. Elle consiste à irradier périodiquement un échantillon et de mesurer par la

suite l'intervalle de temps entre l'impulsion excitatrice et le premier photon de fluorescence détecté. Cette procédure est répétée un grand nombre de fois de façon à reconstruire photon par photon la courbe de déclin de l'intensité de fluorescence. La figure suivante décrit le dispositif expérimental (LOLITA) que nous avons utilisé pour la mesure des déclins d'émission de fluorescence de la ECFP et de ses dérivés (Figure 8).

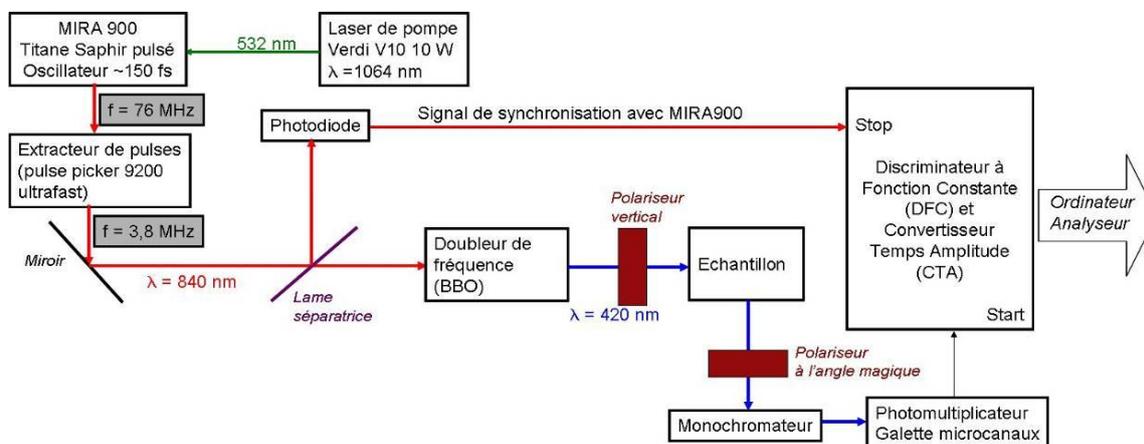


Figure 8 : Schéma du montage de LOLITA (Luminescence Observation by Laser Induced Transient Analysis) permettant la mesure de déclins d'émission de fluorescence par comptage de photons uniques corrélés en temps.

Le montage comporte comme source de lumière pulsée, un laser (MIRA900) ayant une fréquence d'impulsion de 76 MHz. Celle-ci est réduite à 3,8 MHz à l'aide d'un pulse picker (cristal SiO₂, APE, Berlin, Germany). Pour toutes nos expériences, nous avons travaillé à une longueur d'excitation égale à 420 nm qui est obtenue après le pulse picker par le cristal doubleur BBO (BaB₂O₄) à partir du rayonnement laser à 840 nm.

Le faisceau d'excitation généré est ensuite scindé en deux parties. La partie principale est envoyée sur l'échantillon tandis que l'autre est envoyée sur une photodiode qui génère une impulsion électrique envoyée sur l'entrée START d'un convertisseur temps-amplitude TAC. Ce dernier joue le rôle de chronomètre et la réception de ce signal démarre la charge d'un condensateur en définissant le temps 0. L'échantillon excité par l'impulsion émet des photons de fluorescence détectés par une galette de microcanaux. En effet, la détection du photon de fluorescence au niveau de la galette génère un signal électrique qui sera ensuite envoyé sur l'entrée du STOP du TAC et va provoquer la décharge du condensateur. Le TAC génère une impulsion dont l'amplitude est proportionnelle à l'intervalle de temps entre les deux signaux START et STOP c'est à dire au décalage temporel δt entre l'excitation et l'émission de photons. Cet évènement est alors stocké dans un analyseur multicanaux (MCA) qui va ranger chaque photon émis dans un canal correspondant au temps auquel il a été émis. En répétant un

grand nombre de fois la mesure de cet intervalle de temps, on obtient un histogramme représentant la distribution temporelle des photons de fluorescence, ou encore le déclin d'émission de fluorescence (Figure 9). Afin d'obtenir une bonne statistique, un minimum de vingt millions de photons est enregistré.

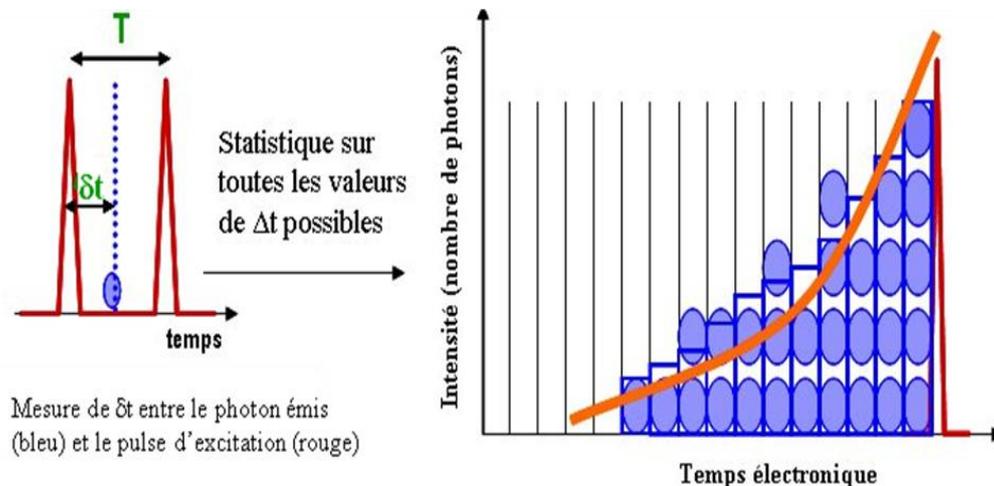


Figure 9 : Schéma explicatif de la constitution de l'histogramme qui reflète la distribution temporelle de l'émission de fluorescence.

Ce mode de fonctionnement dit « direct » perturbe le signal enregistré, car la fréquence du laser est bien plus élevée que celle de fonctionnement du CTA (il faut environ $1 \mu\text{s}$ pour que le CTA soit à nouveau opérationnel). Comme le signal de synchronisation déclenche ici la charge du condensateur, des perturbations électroniques surviennent. Pour régler ces problèmes, il est possible de travailler en mode « inverse » (Figure 10). Dans ce mode, le CTA se déclenche lors de l'arrivée d'un photon tandis que l'arrêt est provoqué par l'impulsion laser suivante. Ainsi le CTA ne se déclenche seulement lorsqu'il y a émission d'un photon. Les photons arrivent sur le détecteur à une fréquence inférieure à quelques dizaines de kilohertz et sont donc en moyenne séparés par des intervalles de temps supérieurs à quelques dizaines de microsecondes. Ce mode évite donc de générer inutilement des temps morts dus notamment au délai de charge du CTA. De plus, l'impulsion laser suivante survient environ 250 ns après le photon émis, le condensateur dispose d'un temps plus important pour créer une tension de valeur plus élevée. Le signal enregistré gagne en justesse et en précision.

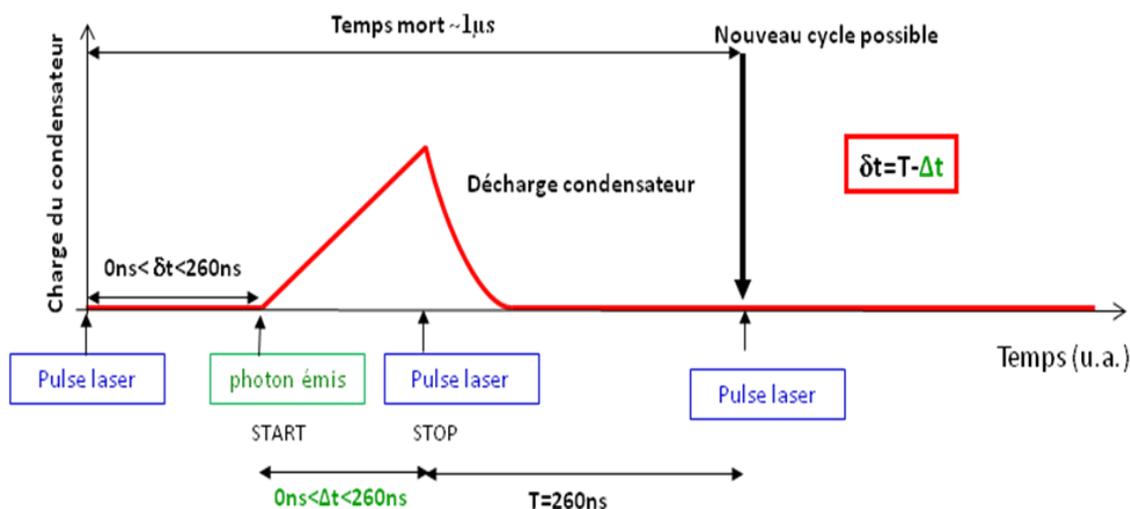


Figure 10 : fonctionnement en mode inverse du CTA.

Il est à noter que le temps caractéristique n'est pas mesuré directement mais par une différence entre la période du laser (période des pulses de synchronisation) et le temps de charge du condensateur. Le signal obtenu ou distribution temporelle d'émission de fluorescence, assimilé à une fonction $I_{\text{exp}}(t)$ est le reflet du déclin d'émission de fluorescence mais aussi des défauts liés au système optique et électronique. Ces défauts peuvent être dus aux dérives et instabilités de la source d'excitation et de la synchronisation, à la dispersion et la variation des trajets optiques dans les monochromateurs, aux retards induits par la traversée de filtres atténuateurs, de polariseurs, au positionnement non reproductible du porte échantillon, à la longueur et à la dispersion des trajets optiques dans la cuve de l'échantillon dépendantes de la géométrie, de la densité optique, de la turbidité et des réflexions internes, aux réflexions parasites sur tous les dioptrés, aux réponses du photomultiplicateur dépendantes de la longueur d'onde, aux dérives et instabilités de l'électronique, ...

Certaines de ces perturbations sont en principe prises en compte dans la fonction d'appareil appelée $g(t)$ qui est obtenue en mesurant la lumière diffusée par une solution diffusante et non fluorescente (solution de ludox) dans des conditions les plus proches possibles de la mesure des déclins. Cette fonction va représenter le profil de l'impulsion d'excitation distordue par toute l'électronique du système.

A.II.1.4.b Du signal mesuré à la durée de vie moyenne

A.II.2.1.a.i Description formelle du signal et principes d'ajustement du modèle

Le signal mesuré $I_{\text{exp}}(t)$ est la convolution de la fonction d'appareil $g(t)$ et de la loi d'émission de fluorescence $I(t)$ consécutive à une excitation infiniment brève, soit :

$$I_{\text{exp}}(t) = g(t) \otimes I(t)$$

Équation 32

Pour retrouver $I(t)$, il est donc nécessaire de connaître tout d'abord la fonction d'appareil, $g(t)$ puis de déconvoluer $I_{\text{exp}}(t)$ par la fonction $g(t)$. En réalité, un modèle théorique connu (fonction mathématique mono-, bi-, tri- exponentielle, ...) $I_{\text{th}}(t)$ est convolué avec la fonction d'appareil, et le résultat de cette opération, $I_{\text{calculé}}(t)$, est comparé aux données expérimentales $I_{\text{exp}}(t)$. La qualité de l'ajustement par ces modèles est contrôlée via l'écart quadratique moyen ou χ^2 qui évalue le différentiel moyen entre le signal mesuré $I_{\text{exp}}(t)$ et le signal $I_{\text{calculé}}(t)$.

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_i \left[\frac{I_{\text{calculé}}(t_i) - I_{\text{exp}}(t_i)}{\sqrt{I_{\text{exp}}(t_i)}} \right]^2$$

Équation 33

où N désigne le nombre de point de la courbe expérimentale sur lequel ce différentiel est évalué. Si la courbe théorique décrit correctement l'expérience, c'est à dire si $I_{\text{calculé}}(t)$ est aussi proche que possible de $I_{\text{exp}}(t)$, ce χ^2 normalisé est minimum et sa valeur attendue doit être proche de 1. La qualité des ajustements est en parallèle vérifiée par la visualisation de la courbe des résidus

$$\text{Residu}(t_i) = \frac{I_{\text{calc}}(t_i) - I_{\text{exp}}(t_i)}{\sqrt{I_{\text{exp}}(t_i)}}$$

Équation 34

A.II.2.1.a.ii Choix du modèle $I_{\text{th}}(t)$

Le modèle mathématique utilisé doit correspondre aux divers processus qui gouvernent la photophysique d'un fluorophore. Généralement, en se basant sur les lois de la photophysique, une fonction monoexponentielle pour décrire un chromophore simple en milieu homogène est à utiliser. Un modèle multiexponentiel sera employé pour décrire un mélange d'espèces indépendantes ou en échange. Enfin, il pourra être nécessaire de faire appel à des fonctions mathématiques plus complexes (exponentielle étirée, ...) lorsque, par exemple, la probabilité des diverses voies de désactivation de l'état excité varie à l'échelle de temps de la durée de vie de fluorescence. Dans le cas où le modèle cinétique régissant la photophysique d'un échantillon n'est pas connu, ce qui est notamment le cas de la ECFP et de ses dérivés, il peut être préférable d'utiliser un modèle mathématique pour permettre juste une description du déclin, sans chercher à tirer un sens physique à ce modèle. Dans ces conditions, il est préférable d'utiliser des méthodes d'ajustement qui sont sans a priori sur le nombre de paramètres à ajuster, la méthode du maximum d'entropie MEM, par exemple.

A.II.2.1.a.iii Optimisation du modèle par la méthode du maximum d'entropie (MEM)

Une fois réalisé le choix de la forme analytique de la fonction I_{th} , de nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour en optimiser les paramètres libres. Dans le cas de la ECFP et de ses dérivés, compte tenu de la complexité des propriétés photophysiques de ces protéines, nous avons choisi d'analyser tous les déclinés avec un modèle multi-exponentiel et en employant le programme MEM, ce dernier offrant la possibilité de ne pas faire d'hypothèses a priori quant aux nombres d'exponentielles à employer pour décrire le déclin. Cela revêt son importance notamment lorsque l'on souhaite suivre la persistance ou non de composantes de temps sur des séries d'expériences se différenciant par la modification d'un paramètre physico-chimique ou suite à une mutation. Cette description des déclinés permet également de faire ressortir, s'il y a lieu, des tendances d'évolution générale des signaux comme, par exemple, une balance entre des composantes de temps courts et longs suite à la modification d'un paramètre physico-chimique (pH, température, longueur d'onde d'émission, ...) et d'extraire des grandeurs possédant un sens physique indépendamment du modèle mathématique utilisé telle que la durée de vie moyenne d'émission de fluorescence.

La méthode de maximum d'entropie (MEM) est basée sur le formalisme et les hypothèses suivantes :

a) Le déclin de fluorescence de l'échantillon est supposé être la somme d'un grand nombre de termes exponentiels (jusqu'à 150 dans notre cas, répartis de façon logarithmique entre 0,01 et 10 ns), chaque terme de durée de vie τ étant associé à une amplitude (ou facteur pré-exponentiel) $\alpha(\tau)$. Les paramètres à optimiser dans ce modèle sont donc les 150 valeurs $\alpha(\tau)$:

$$I_{th}(t) = I_0 \int_{\tau_{min}}^{\tau_{max}} \alpha(\tau) e^{-\frac{t}{\tau}} d\tau \quad \text{Équation 35}$$

Avec

$$\int_{\tau_{min}}^{\tau_{max}} \alpha(\tau) d\tau = 1 \quad \text{Équation 36}$$

b) Une fonction "entropie" $S(\alpha(\tau))$ caractérisant la distribution $\alpha(\tau)$ est définie comme suit :

$$S(\alpha(\tau)) = \int_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} \alpha(\tau) - m(\tau) - \alpha(\tau) \cdot \log\left(\frac{\alpha(\tau)}{m(\tau)}\right) \cdot d\tau \quad \text{Équation 37}$$

$m(\tau)$ est un "modèle" *a priori* : en absence d'information sur le système, ce modèle est égal à une distribution uniforme. A l'instant initial, $m(\tau)$ a une valeur constante quelque soit τ . Ainsi définie, la fonction entropie sera maximum (et nulle) si $\alpha(\tau) = m(\tau)$, et aura tendance à diminuer (soit augmenter en valeur absolue) si la fonction $\alpha(\tau)$ s'écarte de $m(\tau)$, notamment lorsqu'elle va présenter plus de pentes et de variations locales. En d'autres termes, nous pouvons considérer que la fonction $S(\alpha(\tau))$ permet de quantifier le degré de "structure" de la fonction $\alpha(\tau)$, ou encore son contenu en information. L'entropie (ou plutôt son contraire, la négentropie) est, au sens de Shannon, la somme des informations qui permettent de décrire totalement un système observable.

c) Le principe central de la méthode du maximum d'entropie pose que, parmi les solutions possibles $\alpha(\tau)$ décrivant de façon satisfaisante les données (c'est à dire donnant le χ^2 minimum), celle pour laquelle la valeur de l'entropie est maximale (c'est à dire celle dont le contenu en information est minimal) est la meilleure solution au problème. Maximiser l'entropie du modèle $\alpha(\tau)$ revient donc à minimiser le nombre d'hypothèses utilisées pour décrire le signal mesuré.

d) En pratique, l'algorithme d'optimisation du logiciel de MEM va consister, à chaque pas d'itération k , à sélectionner une nouvelle solution $\alpha_k(\tau)$ qui donnera à la fois une diminution maximum du χ^2 et une diminution minimum de $S(\alpha(\tau))$ par rapport au pas précédent. Nous nous approcherons ainsi de la meilleure solution possible au problème, en introduisant le moins d'information sur la structure possible dans le modèle $\alpha(\tau)$. Les paramètres critiques de cet algorithme sont la manière dont nous allons pondérer, l'un par rapport à l'autre, les deux critères χ^2 et S et le critère « d'arrêt » de l'optimisation, qui va décider quand la "meilleure" solution possible est atteinte. Ces paramètres sont actuellement déterminés de façon empirique.

A.II.2.1.a.iv Exploitation des résultats d'analyse

L'analyse par MEM du déclin expérimental d'émission de fluorescence conduit à une distribution de durées de vie constituées de 150 valeurs possibles de τ ayant chacune une amplitude $\alpha(\tau)$. De cette distribution il est possible de faire ressortir le nombre de

composantes en temps séparables (= nombre de pics dans $\alpha(\tau)$), et leur poids relatif (= surface totale de chaque pic considéré).

Quantitativement, chaque pic séparable, c'est à dire délimité par deux minima successifs, peut être caractérisé par une durée de vie de fluorescence (= le barycentre du pic) :

$$\tau_i = \frac{\sum_j \alpha_j \cdot \tau_j}{\sum_j \alpha_j} \quad \text{Équation 38}$$

et une amplitude (= la surface relative du pic)

$$a_i = \frac{\sum_j \alpha_j}{\sum_j \alpha_j} \quad \text{Équation 39}$$

La durée de vie moyenne de fluorescence de l'échantillon est la somme pondérée de chacune de ces composantes :

$$\langle \tau \rangle = \sum_i a_i \cdot \tau_i \quad \text{Équation 40}$$

ou bien peut-être calculée directement comme le barycentre de la distribution complète $\alpha(\tau)$:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} a_i \cdot \tau_i \quad \text{Équation 41}$$

Cette durée de vie moyenne est proportionnelle à l'intégrale du déclin de fluorescence, et donc à l'intensité de fluorescence stationnaire qui serait mesurée dans les mêmes conditions et au rendement quantique moyen de l'échantillon.

Chapitre A.III APPLICATION. DEPENDANCE EN pH DE L'INTENSITE D'EMISSION DE FLUORESCENCE : CAS D'UN EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE SIMPLE.

Les propriétés acido-basiques d'une molécule peuvent être à l'origine de perturbations spectrales et cinétiques induites par le pH. Ces propriétés peuvent également différer à l'état fondamental et à l'état excité, caractérisés par des valeurs de constantes d'acidité, K_a , distinctes. Dans ce cas, un transfert de charge à l'état excité est susceptible de se produire, et d'être à l'origine de cinétiques de déclin d'émission de fluorescence complexes (réactions à l'état excité, voir partie A.I.3.2.c) (15).

Dans le cas présent, nous souhaitons établir la relation reliant, avec le pH, l'intensité d'émission de fluorescence totale d'un mélange de deux espèces en équilibre acido-basique. Il sera supposé que les formes acide AH et basique A^- sont en équilibre à l'état excité et que le transfert de proton est lent par rapport à la durée de vie de fluorescence de chacune des deux espèces.

Ce mélange est régi par l'équilibre acido-basique selon :



Les deux formes acido-basiques du fluorophore vont contribuer à l'intensité d'émission de fluorescence totale du mélange, I_{total} . Dans ces conditions, l'intensité totale d'émission de fluorescence à la longueur d'onde λ_{em} suite à une excitation à λ_{ex} , $I_{total}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$, a pour expression :

$$I_{total}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = I_{AH}^{pH}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + I_{A^-}^{pH}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \quad \text{Équation 42}$$

Nous avons précédemment montré que sous certaines conditions d'absorption ($A < 0,05$), l'intensité d'émission de fluorescence suit une loi linéaire avec la concentration en espèce émissive (voir partie Chapitre A.II). De fait, l'expression de l'intensité totale devient :

$$I_{total}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = (P_{AH}(\lambda_{em}) \cdot \varepsilon_{AH}(\lambda_{ex}) \cdot (1 - \alpha) + P_{A^-}(\lambda_{em}) \cdot \varepsilon_{A^-}(\lambda_{ex}) \cdot \alpha) C_0 \cdot \ell \cdot I_0 \cdot \ln 10 \quad \text{Équation 43}$$

où P_i représente la probabilité pour l'espèce i qu'un photon soit émis à la longueur d'onde λ_{em} , ε_i le coefficient d'extinction molaire de l'espèce i , ℓ la longueur du trajet optique, C_0 la concentration totale en espèce, I_0 l'intensité du faisceau incident et α le coefficient de dissociation de la forme acide défini par :

$$\alpha = \frac{[A^-]}{C_0} \quad \text{Équation 44}$$

Si I_{AH} et I_{A^-} désignent les intensités d'émission de fluorescence respectivement des formes acides et basiques pures, dont les expressions sont données par :

$$I_{AH}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = P_{AH}(\lambda_{em}) \cdot \varepsilon_{AH}(\lambda_{ex}) \cdot C_0 \cdot \ell \cdot I_0 \cdot \ln 10 \quad \text{Équation 45}$$

$$I_{A^-}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = P_{A^-}(\lambda_{em}) \cdot \varepsilon_{A^-}(\lambda_{ex}) \cdot C_0 \cdot \ell \cdot I_0 \cdot \ln 10 \quad \text{Équation 46}$$

alors,

$$I_{total}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = (1 - \alpha) \cdot I_{AH}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + \alpha \cdot I_{A^-}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \quad \text{Équation 47}$$

D'après la relation précédente et à partir de la relation de Henderson-Hasselblach suivante

$$pH = pKa - \log \frac{[AH]}{[A^-]} \quad \text{Équation 48}$$

on peut montrer que

$$pH = pKa - \log \left(\frac{I_{A^-}(\lambda) - I_{totale}(\lambda)}{I_{totale}(\lambda) - I_{AH}(\lambda)} \right) \quad \text{Équation 49}$$

ce qui conduit à

$$I_{totale}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \frac{I_{A^-}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + I_{AH}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot 10^{pKa - pH}}{1 + 10^{pKa - pH}} \quad \text{Équation 50}$$

De fait, dans le cas d'un simple équilibre acido-basique, la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH peut être ajustée par une fonction sigmoïde dont le point d'inflexion (perte de la moitié de l'intensité de fluorescence) donne la valeur de pKa.

Le cas des protéines est particulier dans la mesure où celles-ci constituent une matrice complexe constituée de nombreux sites ionisables pouvant être en interaction. De fait la courbe de titration peut fortement dévier de la loi sigmoïdale établie précédemment, et seule la valeur d'un pKa apparent pourra être estimée.

**PARTIE B : LES PROTEINES FLUORESCENTES ET
LES DERIVEES CYANS DE LA GFPAV**

Les protéines fluorescentes (PFs) homologues de la Green Fluorescent Protein (GFP_{av}) extraite de la méduse *Aequoria Victoria* appartiennent à une importante classe de protéines ayant des propriétés d'émission de fluorescence. La découverte de la GFP_{av} puis d'autres protéines fluorescentes de la même famille a révolutionné la recherche en sciences biomédicales depuis près d'une quinzaine d'années avec un panel d'applications de ces protéines très étendu. De très nombreuses revues sont disponibles concernant les propriétés et les applications des PFs(1, 5-7, 20-26). Typiquement, les PFs offrent la possibilité du suivi spatio-temporelle des partenaires moléculaires impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire, de la cellule, voire de l'organisme entier. Comme application de ces protéines, on peut citer, à titre d'exemple, le suivi de la localisation, de la dynamique ou encore des interactions entre protéines, l'étude de l'expression des gènes, de la division cellulaire, de la réplication et de l'organisation des chromosomes ... De nombreux biosenseurs(3, 27, 28) à base de PFs ont également été développés pour la mesure locale de paramètres physico-chimiques tels que le pH(29, 30), de l'état redox de la cellule(31), ..., pour le suivi des variations intracellulaires de nombreux seconds messagers (AMPc, ATP, ...) et métabolites (glucose, Ca²⁺, ...)(27, 32), ou pour la mesure d'activités enzymatiques (kinases, phosphatases, protéases, ...)(33). Enfin, la dernière décennie a vu l'émergence d'une nouvelle classe de protéines fluorescentes, les optical highlighters, pouvant être photoactivées, photoconverties ou encore photocommutées(6). Elles permettent le suivi de la dynamique de protéines, d'organelles voire de cellules ou encore d'imager de petits organites cellulaires, des protéines, ... avec une résolution dépassant la limite de diffraction optique conventionnelle grâce aux microscopies super-résolution(34).

Enfin, les PFs sont les seules marqueurs fluorescents codés génétiquement. Elles peuvent être exprimées seules ou fusionnées à d'autres protéines d'intérêt dans divers organismes exogènes dans lesquels elles deviennent spontanément fluorescentes sans nécessité de cofacteur hormis le dioxygène(35, 36). Ces propriétés intrinsèques sont à la base du succès des PFs.

Dans ce chapitre, nous rappellerons dans un premier temps quelques généralités, notamment structurales, sur les protéines fluorescentes dérivées de la GFP_{av}. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à l'exposé des connaissances et de la compréhension actuelle des propriétés photophysiques et structurales de la Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) et de ses principaux dérivés.

Chapitre B.I LES PROTEINES FLUORESCENTES HOMOLOGUES DE LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN

B.I.1 LES PROTEINES FLUORESCENTES : GENERALITES

B.I.1.1 PHYLOGENIE.

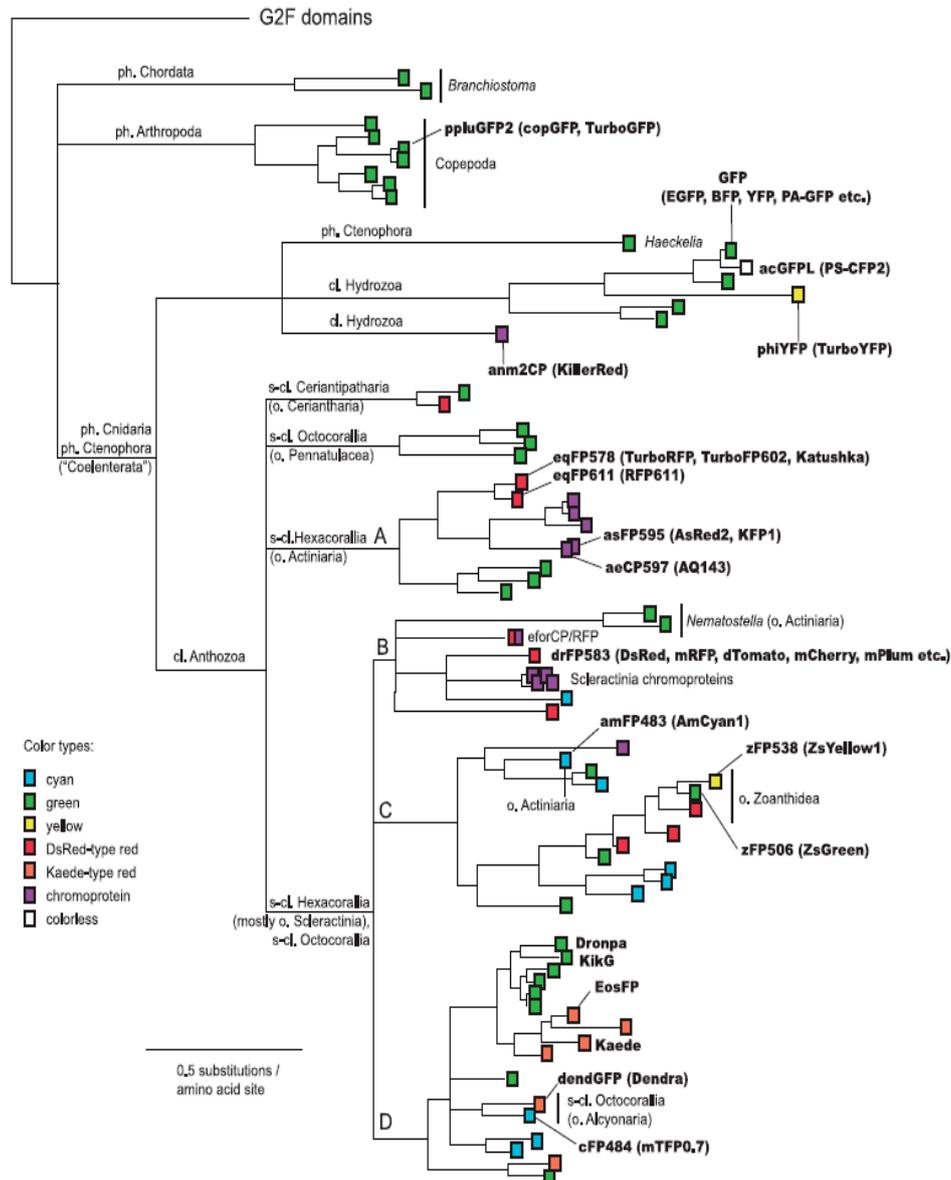


Figure 11 : Arbre phylogénique des principales protéines fluorescentes (Extrait de la référence (7)). Les couleurs des encadrés correspondent approximativement à la couleur de l'émission de ces protéines.

Les PFs homologues de la GFP_{av} sont issus d'animaux appartenant principalement à la branche des cnidaires. Cette branche est usuellement scindée en quatre grandes classes selon l'importante relative dans le cycle biologique de l'animal des stades (i) polype : forme

sédentaire, fixée à un substrat (roche, ...) et (ii) méduse : forme libre, flottante. Seules les deux sous-classes, hydrozoaires où la phase méduse est prépondérante (méduses, ...) et anthozoaires où la phase polype est prépondérante (coraux, anémones de mer, ...), semble renfermer des PFs (Figure 11)(7, 37). A noter que les PFs présentent une tendance plus ou moins forte à s'oligomériser. Alors que la GFP_{av} et ses dérivées ont une faible tendance à dimériser(38, 39), la plupart des PFs issues d'espèces anthozoaires forment des tétramères(6, 39).

B.I.1.2 HISTORIQUE.

La méduse *Aequorea Victoria* est un organisme bioluminescent, émettant une lumière de couleur verte. En 1961, Osamu Shimomura (40), cherchant à élucider le mécanisme de bioluminescence de cette méduse, réussit à extraire deux substances responsables de cette bioluminescence. Tout d'abord, l'Aequorin, une protéine bioluminescente émettant dans le bleu, activée par des ions Ca²⁺ et ne nécessitant aucun autre cofacteur pour émettre de la lumière. D'autre part, une protéine non bioluminescente présentant des propriétés d'émission dans le vert. Il s'agit de la Green Fluorescent Protein (GFP_{av}). En 1974, Shimomura et ses collaborateurs réussirent à élucider le mécanisme à l'origine de l'émission verte de la méduse *Aequoria Victoria* à savoir un transfert résonnant d'énergie de type Förster de l'Aequorin, le donneur, vers la GFP_{av}, l'accepteur(41).

Les travaux de Douglas Prasher suivis de ceux de Martin Chalfie ont constitué une véritable avancée dans le monde des FPs. En 1987, D. Prasher émit l'idée d'utiliser la GFP_{av} comme traceur de protéine, en fusionnant le gène de la GFP_{av} avec celui de la protéine d'intérêt. L'expression, dans la cellule, de ce gène modifié conduirait à la production de la protéine d'intérêt à laquelle serait attachée la GFP_{av} permettant alors de détecter et de suivre par fluorescence cette protéine d'intérêt en milieu cellulaire vivant. En 1992, il réussit à cloner le gène de la GFP_{av}(42). Sans financement, il ne pu poursuivre ses travaux. Martin Chalfie, qui eut la même idée en 1988, récupéra le gène cloné de la GFP_{av} et réussit à l'incorporer et à l'exprimer dans un organisme exogène, la bactérie *Escherichia Coli*. Il réussit également à fusionner le gène de la GFP_{av} à celui de la tubuline, une protéine abondante dans les neurones d'un autre organisme exogène, le vers *C. Elegans*, permettant ainsi de marquer spécifiquement ces cellules neuronales et de les suivre par imagerie de fluorescence(43). Ces résultats constituent le point de départ du succès des PFs en démontrant la faisabilité de l'utilisation, *in vivo* et dans n'importe quel organisme vivant, de la GFP_{av} comme marqueur fluorescent codé génétiquement. Dès lors, le développement de la GFP_{av}, la découverte et le

développement d'autres protéines fluorescentes homologues s'effectuent en synergie avec le développement de très nombreuses techniques d'imagerie.

Un des acteurs principaux du développement des PFs et notamment de la GFP_{av} est Roger Tsien. Il proposa un mécanisme de formation du chromophore, impliquant la présence de dioxygène, responsable de l'émission de fluorescence de la GFP_{av}(35). Il est l'instigateur du développement des protéines fluorescentes avec la génération de mutants présentant de nouvelles propriétés spectrales, physico-chimiques et biochimiques, en ayant recours à la mutagenèse dirigée et/ou aléatoire d'un ou de plusieurs résidus de la séquence primaire de la GFP_{av} ou d'autres PFs découvertes ultérieurement. En particulier, la mutation de certains résidus proches ou appartenant au chromophore a permis de mettre au point les variants spectraux de la GFP_{av}(35) puis ceux de la mRFP1 (les mFruits)(44) offrant aux expérimentateurs un panel de PFs dont les propriétés spectrales permettent de couvrir la totalité du domaine du visible (Figure 12). R. Tsien et ses collaborateurs se sont également investit dans d'autres avancées telles que la réduction de la tendance des PFs à s'oligomériser (38), l'amélioration du repliement, de la vitesse de maturation, de la brillance, de la photostabilité, ... ou encore la mise au point de biosenseurs à bases de PFs (45).

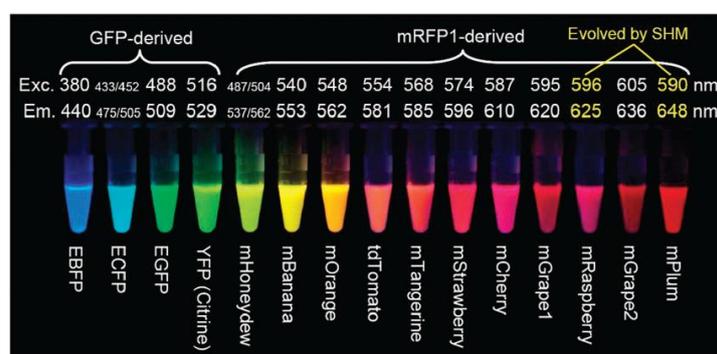


Figure 12 : La palette de couleur des protéines fluorescentes dérivées de la GFP_{av} et de la mRFP1 (Extrait de la référence (1)).

Les trois chercheurs, Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien ont vu leurs travaux couronnés par le prix Nobel de Chimie 2008(21, 46-48).

En parallèle à leur développement, de nombreux efforts ont été et sont encore entrepris afin de mettre au point des PFs émettant dans le rouge voire l'infra-rouge. Cette course vers le rouge trouve son intérêt, en particulier, dans l'imagerie de tissus voire d'organismes entiers. En effet, les rayonnements de telles longueurs d'onde sont peu absorbés, l'autofluorescence cellulaire est significativement réduite, et pénètrent profondément. Jusqu'en 1999, la Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), un variant spectral de la GFP_{av}, a été le

variant présentant des propriétés spectrales les plus déplacées vers le rouge (Emission vers 520 nm). En effet, en 1999, la DsRed, une des premières PFs issues d'organismes anthozoaires, a été extraite d'une anémone de mer *D. Striata*, et présente des propriétés d'émission vers 580 nm(49). Depuis, les mfruits, les variants spectraux de la forme monomérique de la DsRed à savoir la mRFP1 ainsi que la découverte d'autres PFs issues d'espèces anthozoaires présentant des propriétés d'émission vers le rouge permettent d'étendre le domaine spectral accessible par les PFs vers les grandes longueurs d'onde (Figure 13). En 2008, un dérivé de la GFP_{av} présentant des propriétés d'émission dans le rouge (vers 580 nm) mais également, suivant la longueur d'onde d'excitation, dans le vert (maximum à 508 nm) a été obtenu par mutagenèse(50).

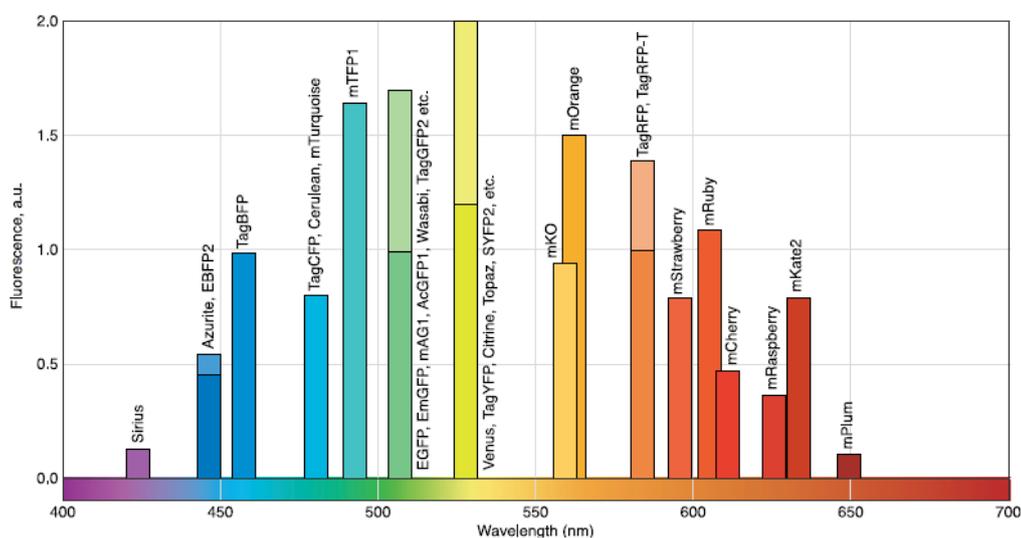


Figure 13 : Diversité spectrale des PFs monomériques (Extrait de la référence(7)). Brillance relative des principales PFs dont la position en longueur d'onde du spectre d'émission est indiquée en abscisse.

B.I.1.3 ASPECTS STRUCTURAUX.

B.I.1.3.a La structure tridimensionnelle.

La séquence peptidique de la GFP_{av} et de ses dérivés comportent 238 résidus. De façon plus générale, les protéines fluorescentes homologues de la GFP_{av} possèdent entre 220 et 240 acides aminés et ont une masse moléculaire comprise entre 25 et 30 kD. L'homologie de séquence entre la GFP_{av} et les autres PFs, notamment celles issues d'espèces anthozoaires, est relativement faible, inférieure à 25%. Seuls quatre résidus restent conservés dans toutes les formes sauvages des PFs découvertes jusqu'à présent. Il s'agit des résidus tyrosine 66 (Tyr66) et glycine 67 (Gly67) qui font partie de la structure chimique du chromophore et des résidus arginine 96 (Arg96) et glutamate 222 (Glu222) qui jouent un rôle crucial dans le mécanisme

de formation du chromophore(35). Pour autant, et malgré des propriétés spectrales très diverses, toutes les PFs présentent une structure tridimensionnelle similaire à celle de la GFP_{av} qui a été résolue en 1996(51, 52).

La GFP_{av} présente une structure en forme de tonneau de 42 Å de long et de 24 Å de diamètre, constitué de 11 brins β anti parallèles (Figure 14). Une hélice α coaxiale soutient le chromophore responsable des propriétés d'émission. Celui-ci se trouve ainsi protégé du solvant, enfoui au centre du tonneau au sein d'une cavité constituée de plusieurs résidus polaires tels que Gln69, Arg96, Gln94, His148, Thr203, Ser205 et Glu222 et renfermant des molécules d'eau qui établissent un réseau dense de liaisons hydrogène autour du chromophore. Ce réseau de liaisons H a pour vocation de maintenir rigide le chromophore et d'inhiber les rotations qui pourraient se produire sur les deux liaisons séparant les deux groupes aromatiques du chromophore (Figure 14). Plusieurs résultats expérimentaux soulignent l'importance de ce réseau et de la présence de la matrice protéique autour du chromophore dans l'établissement de l'émission de fluorescence. En effet, le chromophore synthétisé est non fluorescent à température ambiante et retrouve ses propriétés d'émission lorsqu'il est solubilisé dans de l'éthanol à 77K(53). La dénaturation de la protéine conduit également à la perte de l'émission de fluorescence qui peut être réactivée, au moins partiellement, par renaturation de la protéine (36, 54).

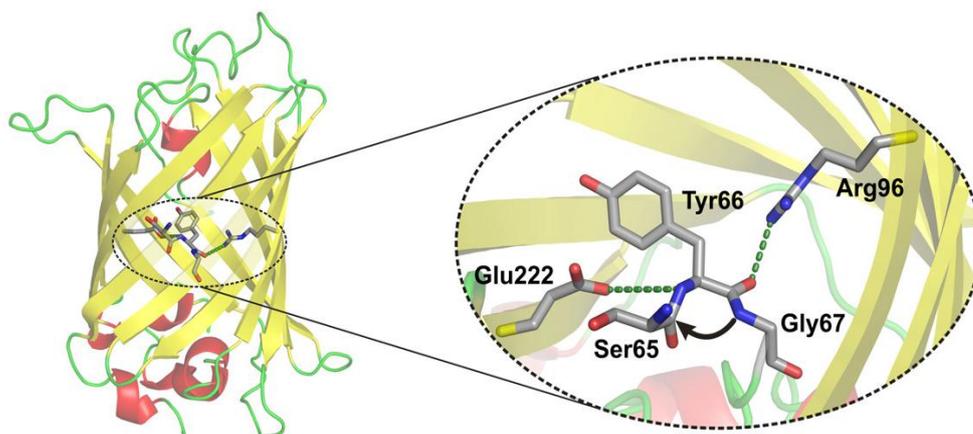


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la GFP_{av}. Position spatiale des résidus impliqués dans l'étape de cyclisation du chromophore. Extrait de Pakhomov *et al.* (55)

Enfin, cette structure en forme de tonneau est à l'origine de la très forte stabilité de ces protéines vis-à-vis des dénaturants, des protéases ou encore des températures élevées (55).

B.I.1.3.b Mécanisme de formation du chromophore.

Dans le cas de la GFP_{av}, le chromophore (p-hydroxybenzylidène-imidazolinone) se forme par cyclisation autocatalytique des trois résidus adjacents Ser65-Tyr66-Gly67(35, 56-58). Le

mécanisme de formation proposé implique trois étapes majeures ayant comme préalable le repliement de la protéine en forme de tonneau. Les contraintes géométriques imposées par ce repliement sur l'hélice α co-axiale favorisent le rapprochement spatial des deux résidus 65 et 67, dont les orientations respectives sont propices à l'attaque nucléophile de l'azote de l'amide de la glycine 67 sur le carbone électrophile du carbonyle de la sérine 65. Cette attaque serait favorisée par la présence à la fois de la charge positive de la chaîne latérale de l'arginine 96 et du caractère basique du glutamate 222, résidus hautement conservés dans toutes les PFs, qui faciliterait la déprotonation de l'azote de Gly 67 (Figure 14)(57, 59). Cette première étape de cyclisation conduit à la formation d'un cycle imidazolone. Une déshydratation au niveau de ce cycle donne naissance au groupe imidazolinone. Enfin, l'oxydation de la liaison carbone α – carbone β de la tyrosine 66 par une molécule de dioxygène permet d'étendre la conjugaison électronique de l'imidazolinone au groupe phénol de la tyrosine 66 (Figure 15). Cette étape d'oxydation est l'étape cinétiquement limitante (35) et ce n'est qu'à ce stade que le chromophore acquiert ses propriétés de fluorescence. Un mécanisme alternatif a été proposé par Zang *et al.* dans lequel l'oxydation précède la déshydratation (60).

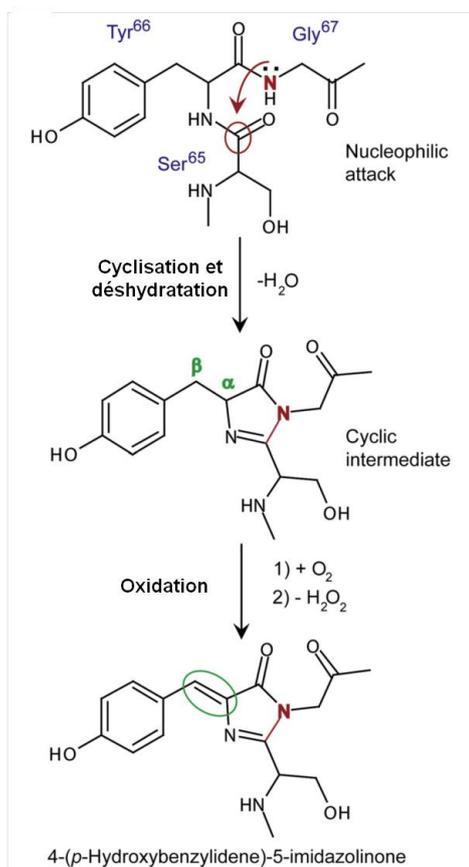


Figure 15 : Mécanisme de formation du chromophore de la GFP_{av}. Extrait de la référence (61).

La présence de O₂ dans le milieu est essentielle pour le développement du chromophore et plus précisément pour l'obtention des propriétés d'absorption et d'émission de la

protéine(36). En effet, des expériences permettant d'exprimer le gène de la GFP_{av} dans *E. Coli* en absence de dioxygène ont montré que dans ces conditions d'anaérobie la GFP_{av} ne présente pas de propriétés de fluorescence. Suite à l'introduction progressive de O₂, la fluorescence de la protéine apparaît graduellement(35).

B.I.2 LES VARIANTS SPECTRAUX DE LA GFP_{AV}.

La prédisposition des PFs à présenter des propriétés d'émission est liée à la présence au niveau du chromophore d'un résidu aromatique, la tyrosine 66. Sa mutation par d'autres résidus aromatiques tels que le tryptophane, la phénylalanine ou encore l'histidine conduit à une modification de la structure chimique du chromophore (Figure 16). Ceci a permis de générer des variants de la GFP_{av} aux propriétés spectrales modifiées(20). La Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP), portant la mutation Y66W et que nous présenterons plus en détail dans la suite, a été obtenue grâce à cette approche. La modification de la nature du résidu en position 65 ou des résidus entourant le chromophore peut également conduire à des changements au niveau des propriétés spectrales. Ainsi, d'autres variants spectraux de la GFP_{av} ont été obtenus en mutant la serine 65 du chromophore ou encore certains résidus se situant à proximité du chromophore. Typiquement, la EYFP résulte de la mutation de la thréonine en position 203 appartenant à la cavité entourant le chromophore.

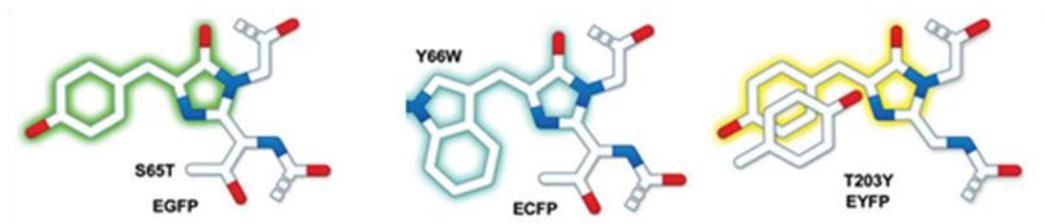


Figure 16: structures chimiques des chromophores de la EGFP, ECFP et EYFP (6)

B.I.2.1 PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE LA GFP_{AV}.

Notre objectif ici n'est pas de décrire de façon exhaustive les propriétés photophysiques de la GFP_{av} et sa sensibilité environnementale, mais de donner quelques éléments qui permettront une meilleure compréhension de nos propos dans la suite. Parmi les nombreuses revues et les articles traitant de ce sujet, la revue de F. Merola offre une bonne introduction(26).

B.I.2.1.a Le modèle à trois états.

A pH neutre, le spectre d'absorption de la GFP_{av} est constitué de deux bandes larges, non structurées, une prédominante notée A, centrée à 395 nm, et une seconde, minoritaire, notée B, située à 475 nm (Figure 17) (20). Le spectre d'émission, quant à lui, ne présente qu'une seule bande dont le maximum dépend de la longueur d'onde d'excitation. Une excitation à 395 nm conduit à l'obtention d'un spectre d'émission constitué d'une bande d'émission d'intensité faible, non structurée, située entre 420 et 470 nm et d'une bande intense centrée à 508 nm. Suite à une excitation dans la bande à 475 nm, seule la bande intense est observée dont le maximum d'émission est très légèrement déplacé vers le bleu et positionné à 503 nm. La dépendance en pH de la GFP_{av} se traduit par une interconversion réversible des deux bandes d'absorption A et B caractérisée par l'obtention d'un point isobestique vers 425 nm (Figure 17). Pour des pH inférieurs à 6, cette interconversion est associée à une perte de l'intensité de fluorescence alors que pour des pH basiques compris entre 10 et 12, l'intensité de fluorescence augmente. Pour des pH compris entre 6 et 9, les spectres d'absorption ou d'émission sont peu perturbés (62). Enfin, au-delà de pH 12, l'intensité chute de façon abrupte due à la dénaturation de la protéine (Figure 17)(63).

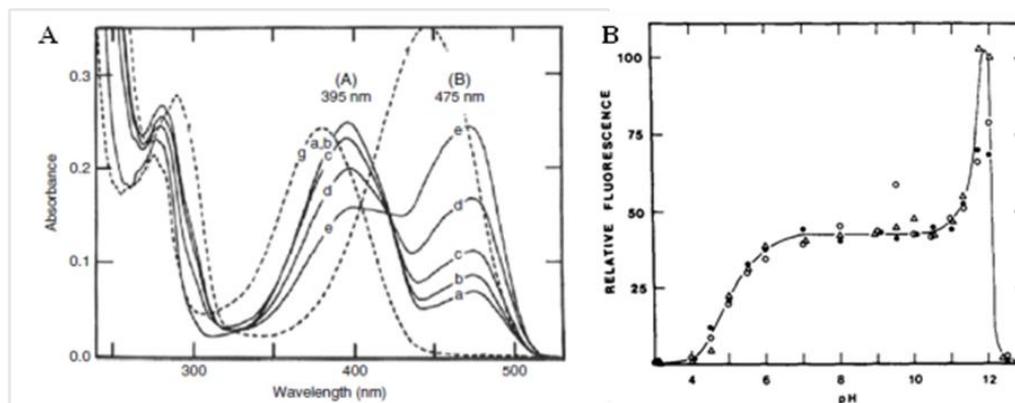


Figure 17 : Dépendance en pH de la GFP_{av}. (A) Spectres d'absorption en fonction du pH : (a) 5,46 (b) 8,08, (c) 10,22 (d) 11,07 (e) 11,55 (f) 13,0 (g) 1,0. Extrait de F. Merola *et al.* (26) (B) Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH. Extrait de Bokman *et al.* (63)

De nombreux travaux de spectroscopies ultrarapides ont conduit à proposer un modèle photophysique pour la GFP_{av}(64-67). Ce modèle implique l'existence, à l'état fondamental, de trois formes correspondant à des états de protonation du chromophore différents (Figure 18). La forme A, attribuée à la forme neutre, phénol, du chromophore, est associée à la bande d'absorption à 395 nm et est à l'origine de l'émission de faible intensité entre 420 nm et 470 nm. Suite à son excitation, un transfert de proton à l'état excité vers une forme dite intermédiaire I* se produit sur une échelle de temps de quelques ps. Cet intermédiaire est

responsable de l'émission intense à 508 nm et présente une bande d'absorption du côté rouge du spectre à 495 nm à température ambiante. La bande d'absorption à 475 nm est associée à la forme anionique du chromophore (forme phénolate), forme B. Son spectre d'émission se trouve très légèrement déplacé vers le bleu par rapport à celui de la forme I, vers 490 nm expliquant le léger déplacement vers le bleu du spectre d'émission suite à l'excitation dans cette bande. La forme I est usuellement attribuée à une forme anionique insérée dans une matrice protéique non relaxée correspondant à l'environnement protéique du chromophore de la forme A. La relaxation de l'environnement du chromophore conduisant de la forme I à la forme B est un processus lent se produisant sur une échelle de temps plus longue que la durée de vie de l'état excité I* soit au minimum quelques ns(26). Ce processus pourrait impliquer des réarrangements conformationnels conséquents comme la réorientation de certains résidus de la cavité du chromophore favorisant la stabilisation de la forme anionique du chromophore de la GFP_{av}(26, 51).

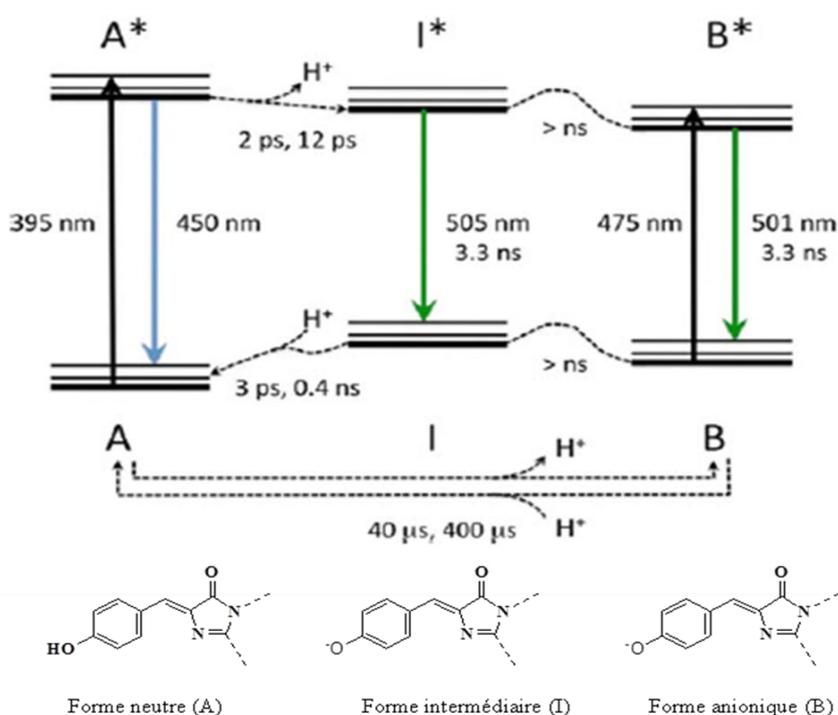


Figure 18 : Modèle photophysique montrant les relations entre les différentes formes du chromophore à l'état fondamental et à l'état excité. Extrait de F. Merola *et al.* (26).

B.I.2.1.b Photoconversion.

Les propriétés spectrales de la GFP_{av} subissent des modifications importantes suite à une exposition de la protéine à la lumière. Ainsi, l'irradiation de la GFP_{av} dans l'UV ou dans la bande d'absorption de la forme neutre A vers 400 nm et de façon moins efficace dans la bande vers 480 nm conduit à l'augmentation de la bande vers 480 nm au détriment de celle

vers 400 nm (Figure 19)(62, 68, 69). Par des études de FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), Van Thor *et al.* montrent que cette photoconversion est associée à un changement d'état de protonation du chromophore avec une stabilisation de la forme anionique du chromophore(69). De plus, des études de spectroscopie de masse indiquant une perte de 44g/mol et de diffraction des RX révélant l'absence de densité électronique au niveau du CO₂ de l'acide glutamique 222 suite à une irradiation à 254 nm ont conduit Van Thor *et al.* à proposer un mécanisme irréversible en deux étapes pour la photoconversion de la GFPav : une décarboxylation du glutamate 222 se produit suivi d'un réarrangement structural des résidus Thr203 et His148 (Figure 19) (70).

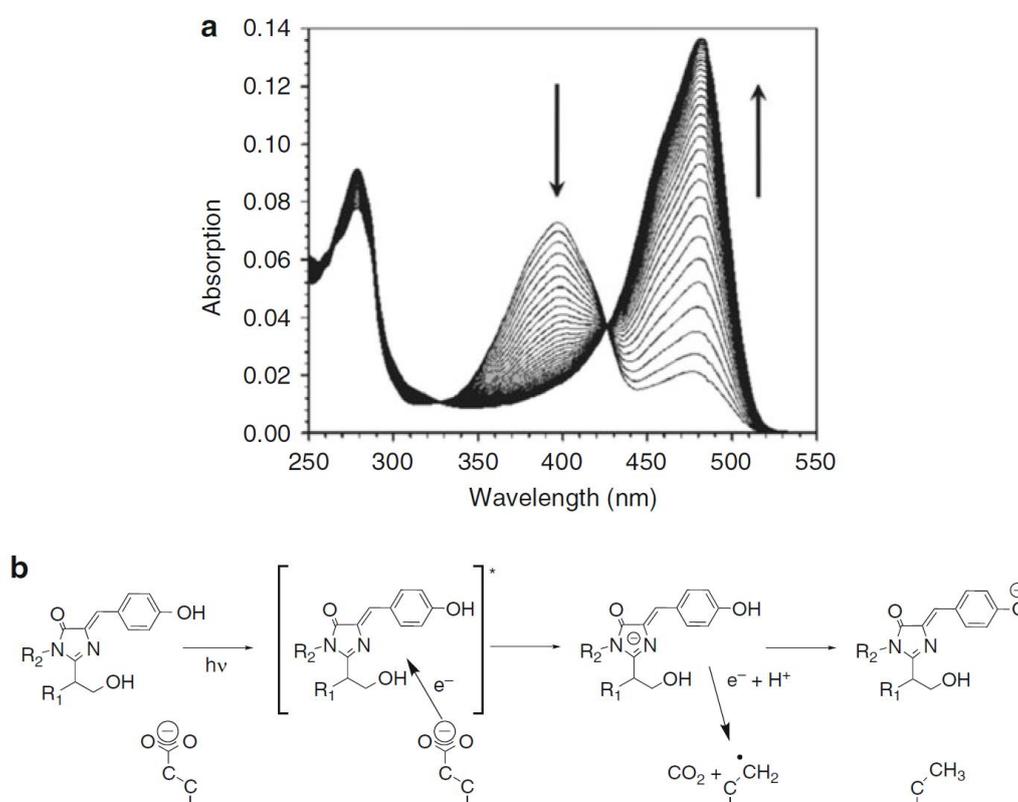


Figure 19 : Photoconversion de la GFPav : (a) Modification du spectre d'absorption de la GFPav suite à une irradiation par une lumière UV ($\lambda = 254$ nm, 100 sec, 12,9 mW) à 25°C et pH 8. (b) Mécanisme de décarboxylation du chromophore la GFPav proposé par Van Thor *et al.*(70). Extrait de Merola *et al.* (26).

B.I.2.1.c Processus non radiatif : torsion du chromophore.

Comme précédemment indiqué, le chromophore synthétique en solution perd totalement sa fluorescence qu'une augmentation de la viscosité permet de retrouver(53, 71). Alors que la durée de vie d'émission de fluorescence du chromophore est de quelques ps en solvant(71, 72), elle est de l'ordre de 3,3 ns dans la protéine(8). La matrice protéique défavorise donc des processus de désactivation non radiatif de l'état excité dont l'origine est une torsion au niveau des liaisons du pont reliant les deux cycles du chromophore (Figure 20).

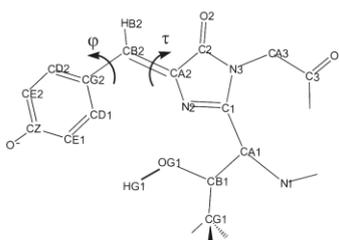


Figure 20 : Structure chimique de la forme anionique du variant GFP_{av}-S65T. Représentation des angles de torsion φ et τ .

Par des études théoriques de chimie quantique dans le vide, effectuées sur le chromophore dans sa forme anionique, il a été montré que dans son état fondamental, celui-ci adopte une géométrie plane ($\varphi=\tau=0^\circ$) (73-75). En revanche, à l'état excité, les théoriciens du LCP ont montré que les états les plus stables correspondent à une géométrie « twistée » dans laquelle les deux cycles aromatiques sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre ($\varphi=90^\circ$ ou $\tau=90^\circ$) (Figure 21)(76). Dans ces états twistés, le chromophore n'est plus fluoresçant.

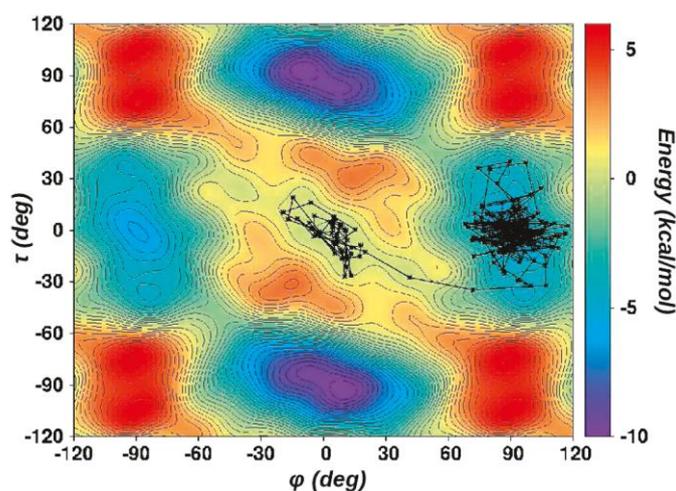


Figure 21 : Surface d'énergie potentielle à l'état excité du chromophore anionique dans le vide. Extrait de Jonasson et al. (76).

Dans la protéine, cette rotation est gênée par la matrice protéique et, grâce à des simulations de dynamique moléculaire à l'état excité, certains résidus de la cavité ont été identifiés comme jouant un rôle crucial dans l'inhibition de la rotation du phénolate. Il s'agit notamment des résidus Thr203 et Thr62 mais également de certaines molécules d'eau se trouvant dans la cavité du chromophore (Figure 22)(77, 78).

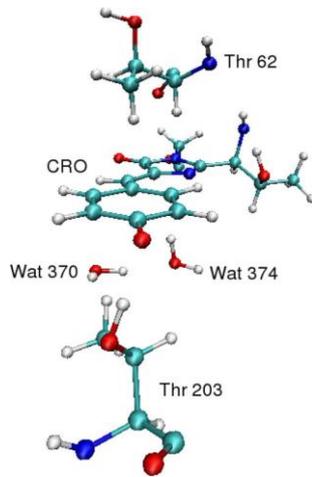


Figure 22 : Vue tridimensionnelle du chromophore de la GFP-T65S et des résidus et molécules d'eau de la cavité exerçant un couple important sur le phénolate. Extrait de Vallverdu *et al.* (77).

De plus, il a été également montré que le passage vers l'état twisté nécessitant le volume le plus petit, soit $\varphi = 90^\circ$, se produit sur une échelle de temps du même ordre de grandeur que la durée de vie de fluorescence de la protéine ($\sim 3,3$ ns), l'autre torsion ($\tau = 90^\circ$) nécessitant un volume plus grand n'ayant pas été observée au cours de dynamiques d'une durée minimum de 15 ns. Le temps moyen de premier passage à la géométrie $\varphi = 90^\circ$ a été estimé à 4,0 ns (76, 77). Ce mécanisme de torsion représente donc une voie de désactivation non radiative du chromophore en compétition avec l'émission de fluorescence et est susceptible de modifier l'allure du déclin d'émission de fluorescence. Aussi, le degré de liberté de torsion du chromophore gouverné à la fois par la flexibilité et par le volume de la cavité l'entourant va directement influencer sur le rendement quantique ou la durée de vie d'émission des protéines fluorescentes. Cet aspect est à prendre en considération en vue de l'ingénierie de protéines fluorescences brillantes.

B.I.2.2 65 ET 148 : DEUX POSITIONS CLES POUR LA GFP_{AV} ET SES DERIVES.

De très nombreuses mutations sont proposées afin d'améliorer la brillance, les propriétés spectrales, la vitesse de maturation, ou encore de réduire la tendance à dimériser, ... de la GFP_{av} et de ses dérivés. A titre d'exemple, la mutation A206K permet de réduire la tendance des dérivés de la GFP_{av} à dimériser (38) et cette mutation est systématiquement incorporée dans les nouveaux dérivés. La nature du résidu à certaines positions de la chaîne peptidique de la protéine et en particulier celles participant à la cavité du chromophore peut profondément influencer les propriétés photophysiques et biochimiques de la protéine. La position 148 en face du chromophore et la position 65 située au sein du chromophore sont deux positions particulièrement intéressantes.

B.I.2.2.a Les mutations en position 65.

L'inconvénient majeur de la GFP_{av} pour une utilisation en imagerie réside dans le caractère complexe de son spectre d'absorption avec deux bandes (situées à 395 nm et 475 nm). Divers efforts ont été entrepris afin de simplifier ce spectre en conservant la bande d'absorption à 475 nm, puisque, entre autres avantages, une excitation dans cette bande conduit à une meilleure photostabilité de la protéine. La substitution du premier résidu du chromophore, la sérine 65, par une glycine, une alanine, une cystéine, une valine, ou une thréonine favorise la forme anionique du chromophore et conduit à une simplification de l'allure du spectre d'absorption(79, 80). Celui-ci devient monomodal suite à la suppression de la bande vers 400 nm et la position de son maximum varie entre 471 et 489 nm selon la mutation (Figure 23)(79, 81). De plus, l'amplitude de cette bande est accrue d'un facteur 4 à 6 (Figure 23). En revanche, la mutation de Ser65 par Arg, Asn, Asp, Phe ou encore Trp réduit voire supprime la fluorescence de la protéine(79).

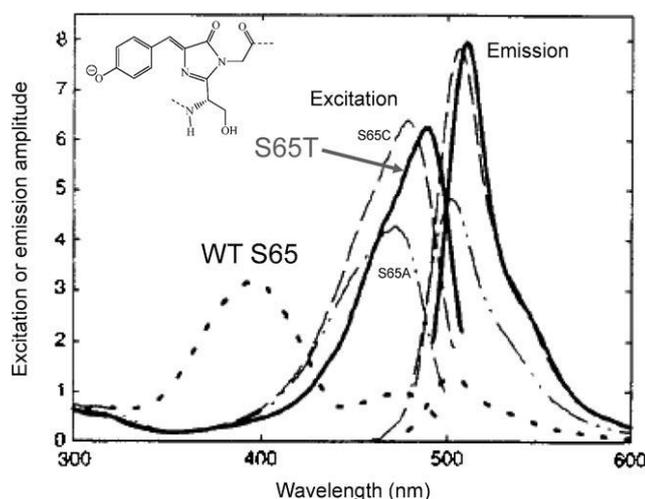


Figure 23 : Spectres d'excitation et d'émission de la GFP_{av} et de plusieurs dérivés mutés en position 65.
Extrait de Heim *et al.* (79)

La plus populaire, la mutation S65T a été choisie par Heim *et al.* (79) parce qu'elle présentait plusieurs avantages. Outre la simplification du spectre d'absorption et l'obtention de propriétés spectrales les plus déplacées vers les grandes longueurs d'onde, elle présente également l'intérêt d'augmenter la vitesse d'oxydation du chromophore d'un facteur 4 par rapport à la GFP_{av}(79) et d'être plus photostable(81). C'est sans doute ces deux dernières propriétés qui ont été considérées lorsqu'elle a été introduite dans la séquence peptidique de la ECFP (voir ci-dessous). Pourtant, introduite dans la GFP_{av} la mutation S65T conduit à une réduction du rendement quantique d'environ 20% (20, 62).

B.I.2.2.b Les mutations en position 148.

L'histidine en position 148 participe à la stabilisation de la forme anionique, fluorescente, du chromophore de la GFP_{av} et de ses dérivés. En effet, dans le cas de la GFP_{av} l'oxygène du phénolate est impliqué dans trois liaisons hydrogène stables avec les acides aminés Thr203 et His148 et avec une molécule d'eau(78). Dans le cas de la EYFP, l'oxygène du phénolate est maintenant impliqué dans deux liaisons hydrogène stables avec l'histidine 148 et avec une molécule d'eau(82). Une modification de la nature du résidu en position 148 peut jouer sur l'équilibre acido-basique impliquant le chromophore. Ceci a été mis à profit pour générer des biosenseurs de pH. Par exemple, l'introduction d'une glycine en position 148 de la EYFP ou encore de la EGFP-T65S conduit à une augmentation de la valeur du pKa. Proche de 7, dans la EYFP, il a été estimé à 8 dans la EYFP-H148G(83). Concernant la EGFP-T65S, la mutation H148G induit un déplacement du pKa de près d'une unité pH, passant de 6,1 à 7(84). Des études par cristallographie portant sur la EYFP et le mutant EYFP-H148G ont permis de constater que la mutation de l'histidine 148 par une glycine ouvrait un canal permettant au solvant d'accéder au chromophore(82). D'autres mutations en position 148 ont été testées et conduisent également à une modification de la valeur du pKa (Tableau 1). Certaines, en particulier la mutation H148Q dans la EYFP, sont également à l'origine du développement de biosenseurs de chlore (85).

Protéine	pKa	Protéine	pKa
EYFP	7(83)	EGFP-T65S	5,95(83)
EYFP-H148Q	7,58(83)	EGFP-T65S-H148D	7,95(83)
EYFP-H148G	8,02(83)	EGFP-T65S-H148G	7(84)

Tableau 1 : Valeur du pKa de divers mutants de la EYFP et de la EGFP-T65S, mutés en position 148.

Enfin, l'introduction de la mutation H148V dans la séquence peptidique de la EYFP a donné lieu à la génération d'une nouvelle protéine présentant des propriétés d'émission de fluorescence significativement réduite. Le couplage des mutations H148V et Y145W permet d'éteindre totalement la fluorescence de la protéine alors que les propriétés d'absorption sont conservées : il s'agit de la Reach2 (Resonance Energy-Accepting Chromoprotein) (86).

Chapitre B.II LA CYAN FLUORESCENT PROTEIN ET SES DERIVEES

Diverses protéines fluorescentes émettant dans le cyan et présentant des propriétés potentiellement intéressantes pour une utilisation en imagerie sont disponibles. Certaines sont issues d'espèces anthozoaires telle que la mTFP1, une protéine fluorescente monomérique, présentant une forte brillance (1,6 fois plus élevée que la eGFP), une faible sensibilité au pH (pH $\frac{1}{2}$ =4,3) et une photostabilité intéressante (temps nécessaire pour réduire d'un facteur deux l'intensité de fluorescence initiale, toutes conditions expérimentales étant par ailleurs équivalentes : mTFP1= 110 s, EGFP= 174s, ECFP= 64 s) (87). D'autres sont dérivées de la GFP_{av}. Alors que les protéines issues d'espèces anthozoaires possèdent une tyrosine au niveau du chromophore, les variants spectraux cyan de la GFP_{av} résultent principalement de la substitution, par un tryptophane, de la tyrosine en position 66 du chromophore(35). La plus connue et la plus utilisée en imagerie reste encore la Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) malgré de nombreux inconvénients qui seront rappelés dans ce chapitre. De multiples tentatives ont été menées afin d'améliorer les performances de la ECFP. La Cerulean fut un des premiers dérivés à être proposé(88). Très récemment de nouveaux dérivés très performants de la ECFP ont vu le jour, il s'agit des mTurquoise(12) et de la mCerulean3 (14). Ce chapitre a pour but de préciser l'état de l'art sur la caractérisation et la compréhension des aspects photophysiques et dynamiques de la ECFP et ses principaux dérivés.

B.II.1 LA ENHANCED CYAN FLUORESCENT PROTEIN (ECFP) : GFP_{AV} – F64L, S65T, Y66W, N146T, M153T, V163A

B.II.1.1 ASPECTS STRUCTURAUX

Comme indiqué précédemment, la *Enhanced Cyan Fluorescent Protein* (ECFP) résulte principalement de la substitution, au niveau de la séquence peptidique de la GFP_{av}, du résidu tyrosine en position 66 par un tryptophane (Y66W)(35) (Figure 24). Ceci conduit à la formation au niveau du chromophore d'un groupe indole et à des changements profonds au niveau des propriétés spectrales de la protéine avec, entre autres, un déplacement vers le bleu. L'accroissement du volume du chromophore avec la formation du groupe indole est à l'origine d'une perte conséquente de l'intensité de fluorescence(35) qui a été en partie restaurée grâce à l'introduction de mutations permettant de réduire la taille de la chaîne latérale de certains résidus situés dans l'environnement proche du chromophore(89). Il s'agit tout particulièrement de la mutation N146T(90) mais également des mutations M153T, V163A(89). Notons que, de

façon générale, ces deux dernières mutations sont introduites pour améliorer le repliement des dérivées de la GFP_{av} à 37°C. Dans le cas de la ECFP, d'autres mutations supplémentaires, S65T et F64L, ont été incorporée là encore dans le but d'accroître l'efficacité du repliement et de la vitesse de maturation de la protéine(20, 91). Enfin, le plasmide codant pour la ECFP, proposé par Clontech et avec lequel nous avons travaillé, pECFP-N1, possède en supplément la mutation H231L qui semble être silencieuse.

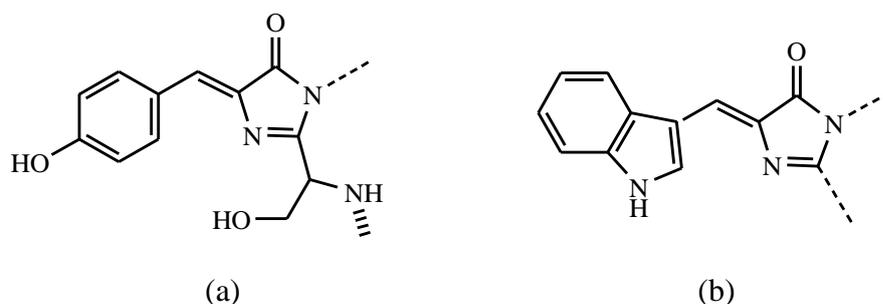


Figure 24 : Structure chimique du chromophore de la GFP_{av} (a) et de la CFP (b)

Plusieurs informations structurales ont été obtenues grâce à des études en résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie. Tout d'abord, par RMN du ¹⁹F, Seifert et ses collaborateurs ont montré l'existence d'un processus d'échange entre deux états caractérisés par des environnements distincts au niveau du chromophore(92). A température ambiante, ce processus se produit sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde ce qui est lent par rapport à la durée de vie de fluorescence moyenne de la ECFP, 2,5 ns.

Des travaux complémentaires étudiant, par diffraction des RX, la structure cristallographique de la ECFP (93) ont révélé la présence autour du chromophore de la ECFP de deux conformations distinctes au niveau des résidus Tyrosine 145 (Tyr145) et Histidine 148 (His148). Ces deux conformations, dénommées A' et B', se distinguent par une orientation différente, vis-à-vis du chromophore, de ces deux résidus. Dans la conformation majoritaire A', la chaîne latérale du résidu tyrosine est enfouie dans le tonneau et pointe vers le chromophore alors que celle de l'histidine est orientée à l'extérieur du tonneau et est exposée au solvant (Figure 25). Par contre, dans la conformation minoritaire B', la chaîne latérale de la tyrosine 145 se trouve dans le solvant avec une orientation plutôt parallèle au tonneau La chaîne latérale de l'histidine 148 adopte une orientation à peu près similaire et se trouve à l'interface du tonneau et du solvant (Figure 25). A noter que la valeur du pH auquel Bae *et al.* ont travaillé pour obtenir cette structure n'est pas clairement définie dans leur article^{II}. De nombreux auteurs associent ces deux conformations cristallographiques aux deux

^{II} Des indices indiquent qu'il ne s'agit pas de pH physiologique

conformations observées par RMN, aux deux composantes de temps employées pour décrire ses déclins d'émission en milieu cellulaire et aux deux "bosses" constituant les spectres d'absorption et d'émission de la ECFP (93).

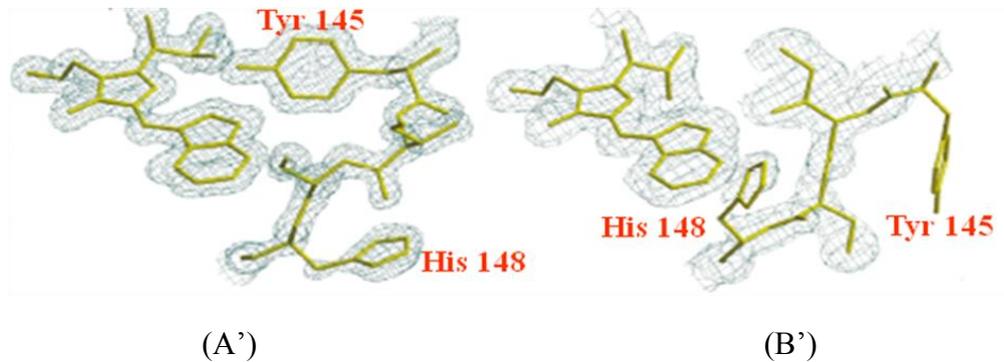


Figure 25 : Structures tridimensionnelles des deux conformations de la ECFP. Les résidus Tyr145 et His148 sont représentés suivant la conformation respectivement A' et B'. Extrait de Bae *et al.* (93).

En 2009, Lelimousin *et al.* (94) ont de nouveau examiné la structure cristallographique de la ECFP, à pH physiologique. Ces études révèlent la présence de principalement deux conformations qui, d'après des simulations de dynamique moléculaire, s'échange sur une échelle de temps de l'ordre de la nanoseconde. Alors qu'une de ces conformations, *ecfp*, est similaire à la conformation A' déterminée par Bae *et al.* (93), la deuxième, *ecfp'*, diffère de la conformation B'. Les deux conformations, *ecfp* et *ecfp'*, diffèrent par une conformation distincte de la chaîne peptidique au niveau de l'asparagine 144 (Asn144) et de la tyrosine 145. Ces simulations font également apparaître de façon transitoire une troisième conformation, *ecfp''*, impliquant les résidus Asn144 et Ile146.

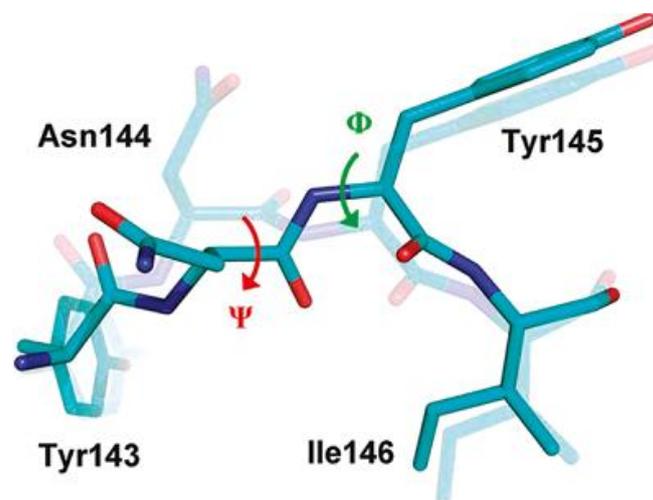


Figure 26 : Représentation des résidus 143-146 dans les deux conformations *ecfp* (trait plein) et *ecfp'* (trait transparent) dans la structure cristallographique de la ECFP à pH physiologique. Extrait de Lelimousin *et al.* (94).

Enfin, notons que la GFP_{av} et ses dérivées telles que la GFP_{av}-S65T ne présentent qu'une seule conformation où les deux résidus Tyr145 et His148 pointent vers le chromophore, l'histidine 148 interagissant par liaison H avec le groupe phénol du chromophore (95).

B.II.1.2 ASPECTS PHOTOPHYSIQUES

Les propriétés photophysiques de la ECFP ont été étudiées en détail par diverses équipes et plus particulièrement l'équipe de Photobiologie du LCP(8, 10, 96). Nous proposons une synthèse des principaux résultats(8).

B.II.1.2.a Propriétés à pH physiologique

Le spectre d'absorption de la ECFP est constitué de deux bandes (Figure 27). La première, centrée à 280 nm, résulte en partie de l'absorption des résidus aromatiques de la protéine, principalement du seul résidu tryptophane et des 10 résidus tyrosine que comporte la ECFP^{III} (97). L'autre contribution provient du chromophore lui-même, contribution mise en évidence par Visser *et al.* par des études de spectroscopie d'émission et d'anisotropie de fluorescence résolues en temps(98). Le chromophore est également à l'origine de la seconde bande du spectre d'absorption, située dans le visible, présentant un maximum à 430 nm et un épaulement vers 450 nm. Le spectre d'émission de fluorescence, obtenu en excitant dans la bande du chromophore, présente également un caractère bimodal avec un maximum à 474 nm et un épaulement à 503 nm (Figure 27). Le caractère bimodal des spectres de la ECFP, commun à la plupart de ses dérivés(12, 14, 88, 89), est considéré par de nombreux auteurs comme une marque d'hétérogénéité à l'état fondamental de la ECFP(88, 92, 93, 99). Néanmoins, plusieurs éléments expérimentaux ou théoriques attribuent ce caractère à la présence du groupe indole. En effet, la mutation du résidu tyrosine du chromophore de la mTFP1 par un tryptophane conduit à une structuration des spectres d'absorption et d'émission avec l'apparition d'un caractère bimodal similaire(100). Indépendamment, des études de dichroïsme circulaire aux longueurs d'onde d'absorption du chromophore donnent une origine vibronique à la structure fine du spectre d'absorption de la ECFP(101). Enfin, grâce à des calculs de chimie quantique effectués dans le groupe de Théorie et Simulation du LCP, il a été montré que les spectres d'absorption théoriques associées aux deux conformations cristallographiques A' et B' sont quasi-identiques excluant la corrélation entre les deux bosses du spectre d'absorption et ces deux conformations(102).

^{III} La phénylalanine présente une bande d'absorption centrée vers 250 nm et ne contribue pas de façon significative à l'absorbance à 280 nm

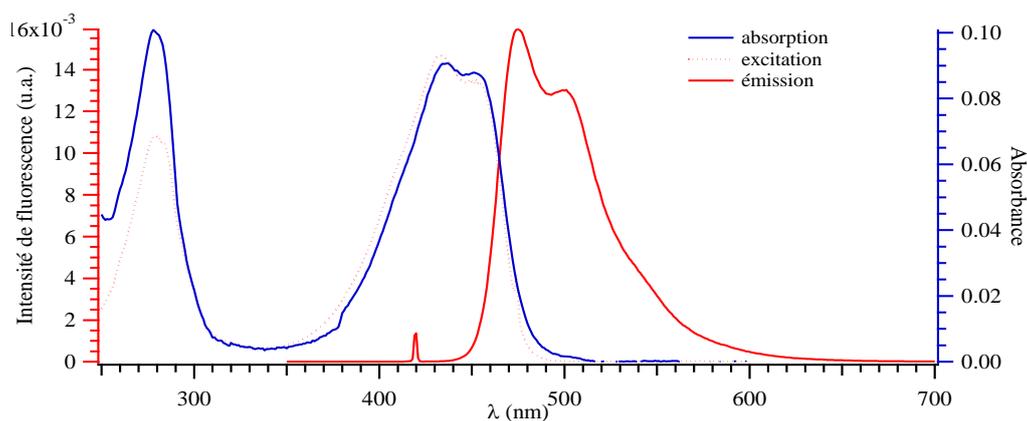


Figure 27 : Spectres d'absorption, d'excitation ($\lambda_{em}=474$ nm) et d'émission ($\lambda_{ex}=420$ nm) de fluorescence de la ECFP à pH physiologique.

Divers éléments expérimentaux mettent en lumière la complexité et l'hétérogénéité des propriétés photophysiques de la ECFP. Tout d'abord, l'équipe de photobiologie du LCP a mis en évidence une dépendance de l'allure du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation suggérant l'existence de plusieurs espèces absorbantes et émissives(96). Cette dépendance se traduit par un déplacement vers le rouge du spectre d'émission associé à une perte de sa structure fine pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 470 nm alors qu'aucune modification du spectre n'est observée pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures (Figure 28).

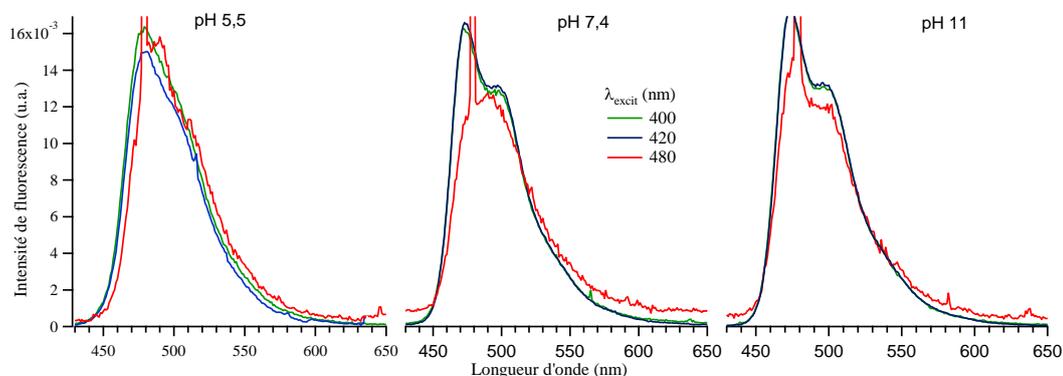


Figure 28 : Spectres d'émission de fluorescence normalisés à la même aire de la ECFP à pH 7,4, T=20°C obtenus pour diverses longueurs d'onde d'excitation.

La ECFP se caractérise également par une cinétique de décroissance de l'émission de fluorescence complexe. Le déclin de la ECFP exprimée en milieu cellulaire est usuellement décrit par une somme de deux exponentielles(103-106), en partie dû à une faible statistique de comptage ($\leq 10^4$ coups à $t=0$). Néanmoins, l'analyse par la méthode de maximum d'entropie (MEM) de ces déclin *in vivo* avait permis à l'équipe de photobiologie de mettre en évidence une composante supplémentaire(8). Un tel degré de complexité supplémentaire des déclin de la

ECFP (soit trois composantes exponentielles) avait aussi été rapporté par Habuchi *et al.* lors d'études sur des solutions de protéine purifiée(107). Le montage LOLITA développé par l'équipe de Photobiologie permet d'obtenir des déclin d'émission de fluorescence de très haute qualité statistique ($\geq 10^6$ coups à $t=0$, ≥ 20 millions de coups au total sur un déclin) et de haute résolution temporelle. L'analyse par MEM de déclin de la ECFP purifiée à pH 7,4, obtenus sur ce montage, conduit à l'obtention d'une distribution de durée de vie constituée de quatre composantes (Figure 29, Figure 30) (8). D'autres méthodes d'ajustement, l'analyse globale des données basées sur la théorie de Bayes et d'autres modèles mathématiques, somme d'exponentielles ou somme d'exponentielles étirées, ont également été testées par P. Pernot et l'équipe de photobiologie du LCP afin de décrire les déclin de la ECFP. Il a été montré que les deux approches, analyse globale utilisant une somme d'exponentielle et MEM, sont en accord. En effet, l'analyse globale révèle qu'également quatre composantes s'avèrent nécessaires pour décrire le déclin de la ECFP (Figure 29). L'emploi d'un modèle composé d'un nombre d'exponentielles supérieur à quatre conduit à l'obtention de paramètres interdépendants, non déterminés de façon univoque. D'un autre côté, l'emploi d'une somme de deux exponentielles étirées conduit également à de bons ajustements (8, 19, 108). L'ensemble de ces résultats indique que les modèles multiexponentiel ou somme d'exponentielles étirées sont compatibles avec les données et permettre de les décrire. En revanche, en l'absence d'informations concernant les processus photophysiques susceptibles de se produire dans la ECFP à l'état excité, il n'est pas possible de privilégier un de ces deux modèles d'ajustement, ni d'associer à chaque composante de temps une forme physico-chimique définie de la ECFP, ni même de justifier le choix d'un modèle plus complexe qu'un autre. De fait, l'utilisation du programme MEM qui offre la possibilité de ne pas faire d'hypothèses a priori quant aux nombres d'exponentielles à employer pour décrire le déclin est ici préférable. Au minimum, cette approche permet d'extraire des grandeurs possédant un sens physique indépendamment du modèle mathématique utilisé telle que la durée de vie moyenne d'émission de fluorescence. C'est cette approche qui sera utilisée dans la suite de ces travaux.

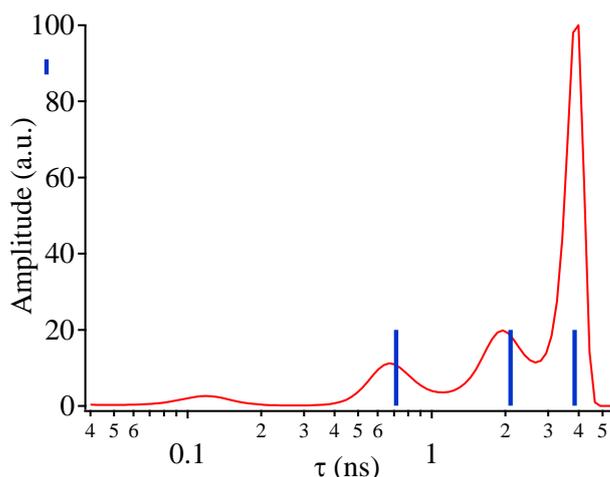


Figure 29 : Comparaison des solutions résultantes (i) de l'analyse par MEM (distribution en rouge) du déclin d'émission de fluorescence de la ECFP à pH 7,4 et à $\lambda_{em}=474$ nm (distribution moyenne résultant de l'analyse séparée de 6 déclins obtenus dans les mêmes conditions opératoires, notamment de pH et de température) et (ii) de l'analyse globale (en bleu) d'une série de déclins de la ECFP à pH 7,4 enregistrés à différentes longueurs d'onde du spectre d'émission. Pour ces dernières, seule la valeur des durées de vie est indiquée. (8, 19)

Enfin, l'hétérogénéité et la complexité de la photophysique de la ECFP se traduit par une dépendance de sa durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission révélant l'existence d'une ou plusieurs espèces de durée de vie courte et émettant du côté des grandes longueurs d'onde du spectre d'émission de la ECFP (Figure 31). Grâce à l'étude d'un dérivé de la ECFP portant l'unique mutation H148D, la fraction molaire de cette ou ces espèces a été estimée à plus de 25% (8).

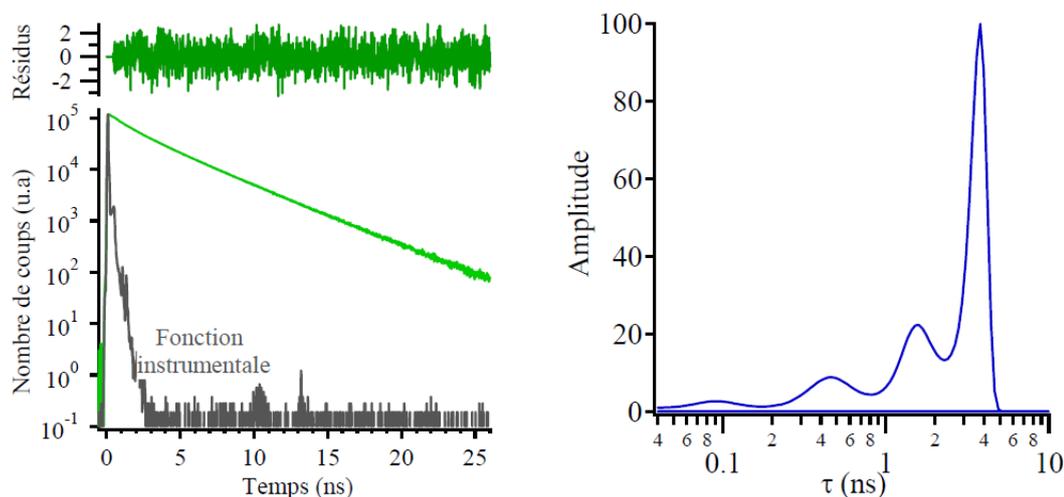


Figure 30 : Déclin d'émission de fluorescence (en vert clair) de la ECFP à pH 7,4 et T= 20°C. La distribution de durées de vie de fluorescence (en bleu) et les résidus (en vert foncé) correspondants obtenus par analyse MEM sont indiqués.

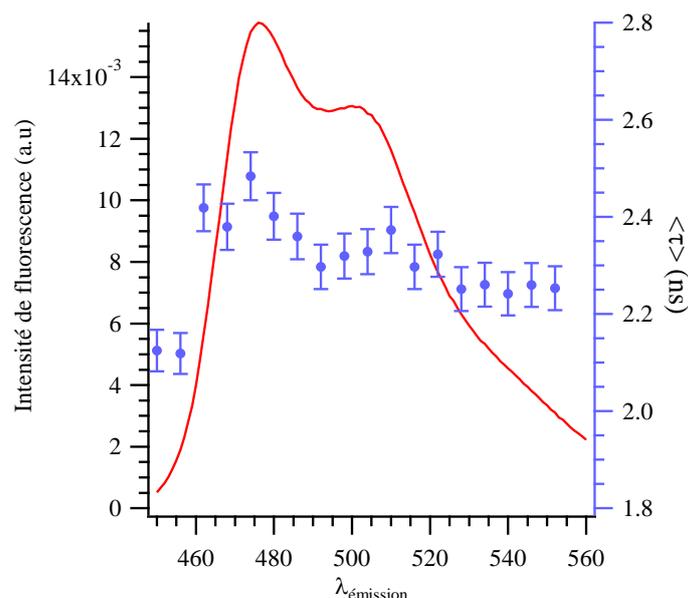


Figure 31 : Dépendance, à pH 7,4, de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{ex}}=420$ nm). L'allure du spectre d'émission à ce pH est indiquée.

B.II.1.2.b Sensibilité environnementale de la ECFP : influence du pH et de la température.

L'étude des propriétés photophysiques de la ECFP en fonction de divers paramètres physicochimiques a révélé la forte sensibilité environnementale de cette protéine, notamment vis-à-vis du pH ou encore de la température(8, 10, 96).

Les principales études de la sensibilité au pH de la ECFP rapportées dans la littérature, notamment celles concernant les variations des propriétés spectrales, ont été effectuées sur un domaine de pH variant de 4 à 11 (109-111). Sur ce domaine, la sensibilité au pH de la ECFP se traduit tout d'abord par un déplacement du spectre d'émission vers les grandes longueurs d'onde associé à une perte de sa structure fine et une réduction importante de l'intensité d'émission de fluorescence (réduction de 50% entre pH 7,4 et 5,5) suite à une acidification du milieu (Figure 32). L'influence du pH est nettement moins marqué sur les spectres d'absorption où seule une légère modification du rapport d'absorbance au maximum et à l'épaule peut être constatée (110, 111).

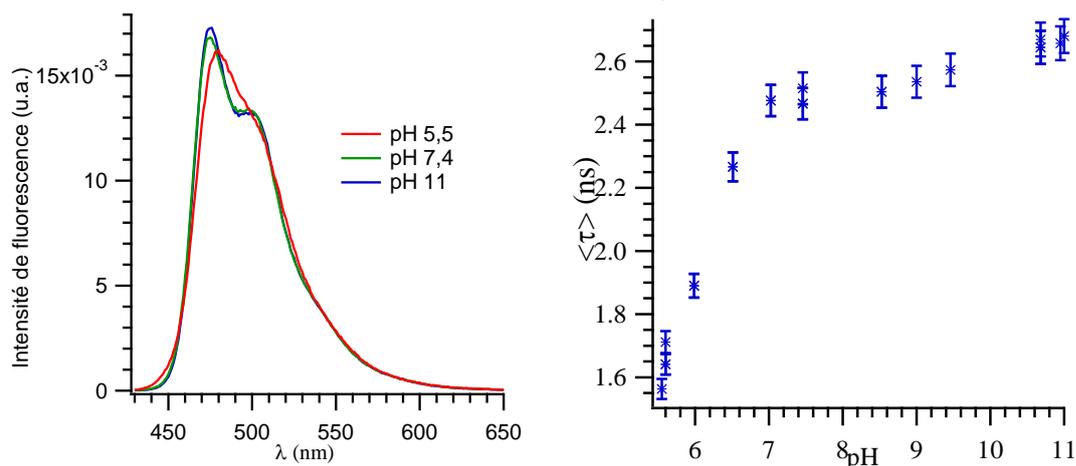


Figure 32 : Evolution de l'allure du spectre d'émission (à gauche) et de la durée de vie moyenne (à droite) de la ECFP avec le pH. Les spectres ont été normalisés à la même aire

La forte sensibilité au pH de la ECFP se traduit également par une perturbation des déclin d'émission avec l'augmentation de l'amplitude relative de l'ensemble des composantes de temps courts lors d'une diminution du pH conduisant à une diminution drastique de la durée de vie moyenne de la ECFP -réduction de 33% entre pH 7,4 et 5,5- (Figure 32)(8). Ces résultats expérimentaux indiquent qu'un milieu acide favorise une ou plusieurs espèces de durée de vie courte et de rendement quantique faible et dont le spectre d'émission est situé du côté rouge du spectre de la ECFP (8). Néanmoins, les facteurs structuraux (changements conformationnels, équilibres acido-basiques, dénaturation partielle ou globale de la protéine, ...) pouvant être à l'origine de la transition en pH de la ECFP ne sont actuellement pas identifiés.

En règle générale, l'intensité d'émission et la durée de vie de fluorescence de la plupart des chromophores sont susceptibles de diminuer suite à une augmentation de la température car les voies de désactivations non radiatives sont contrôlées par des barrières énergétiques. Dans le cas de la ECFP, l'influence de la température ne se réduit pas à une simple diminution de ces deux grandeurs, mais à une perturbation importante de l'allure des distributions de durée de vie alors que, sur un même intervalle de température, l'allure du spectre d'émission ne subit que de très légères modifications (Figure 33) (8, 10, 96).

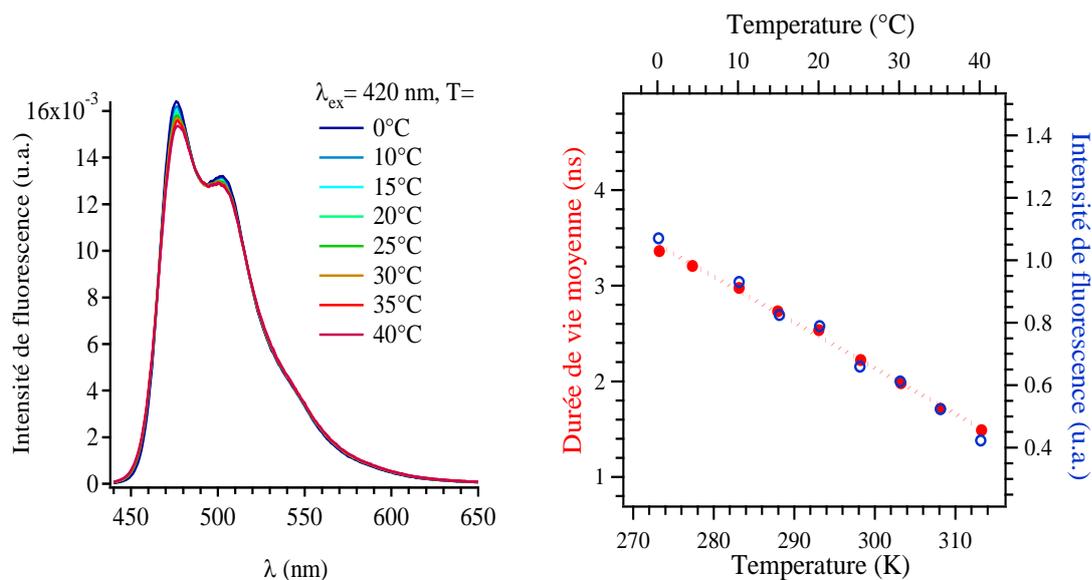


Figure 33 : Influence de la température sur l'allure du spectre d'émission, l'intensité de fluorescence et la durée de vie moyenne de la ECFP.

En première approximation, la température induit une balance entre l'amplitude relative de la composante de temps long et celle de l'ensemble des composantes de temps court, ces dernières étant favorisées à hautes températures. A partir de ces données résolues en temps, les constantes thermodynamiques décrivant l'équilibre entre les espèces associées aux deux principales durées de vie de la ECFP ont été estimées(8). Elles diffèrent fortement des constantes thermodynamiques décrivant l'équilibre conformationnel de la ECFP obtenues par RMN(92) excluant ainsi toute correspondance entre les deux conformations observées par RMN et les deux principales composantes de temps utilisées pour décrire le déclin de la ECFP.

B.II.2 LA CERULEAN ET UN SOUS-VARIANT, LA ECFP-H148D.

La Cerulean est un des premiers candidats proposé dans la littérature visant à améliorer les performances photophysiques de la ECFP (88).

B.II.2.1 LA STRATEGIE DE MUTATION

La Cerulean résulte de trois mutations au niveau de la séquence peptidique de la ECFP, à savoir S72A, Y145A et H148D. Supposant que la complexité du déclin d'émission de fluorescence provenait de la double conformation que possédait la ECFP, Rizzo *et al.* ont tout d'abord remplacé en position 148 l'histidine par un résidu hydrophile, l'acide aspartique, dans l'objectif de stabiliser la conformation majoritaire A', pour laquelle la chaîne latérale du résidu 148 pointe vers le solvant. La mutation de la tyrosine hydrophile en position 145 par une alanine, hydrophobe, Y145A, a été le fruit d'une mutagenèse aléatoire conduisant à

l'obtention du variant le plus brillant. Enfin, la mutation S72A a été introduite afin d'améliorer le repliement de la protéine à 37°C (91, 112).

B.II.2.2 A pH PHYSIOLOGIQUE, C'EST UN PEU MIEUX QUE LA ECFP.

Alors que les propriétés spectrales de la Cerulean sont similaires à celles de la ECFP présentant le même caractère bimodal, la Cerulean possède un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique améliorés (Tableau 2), avec une brillance accrue d'un facteur 2,5 par rapport à la ECFP(88). Néanmoins, le déclin d'émission de la Cerulean reste non monoexponentiel (88, 113-115) bien que l'ajustement du déclin par une monoexponentielle conduit, par rapport à la ECFP, à une valeur du paramètre statistique χ^2 plus proche de 1 (88).

L'hétérogénéité persistante des propriétés de la Cerulean ne se manifeste pas uniquement du point de vue photophysique mais également d'un point de vue structural. En 2009, Lelimousin *et al.* (94) ont réussi à obtenir la structure cristallographique de la Cerulean à pH physiologique. Celle-ci fait apparaître deux conformations dont une est identique à la conformation A' ou *ecfp* de la ECFP et l'autre, appelée *cerulean*, diffère de la conformation B' par l'orientation de la chaîne latérale du résidu Ile146 vis à vis du chromophore (Figure 34). Des simulations de dynamiques moléculaires suggèrent que la conformation *cerulean* est la plus stable des deux, cette conformation restant préservée après 39 ns de simulation, alors que la *ecfp* bascule vers la *cerulean* après 9 ns(94).

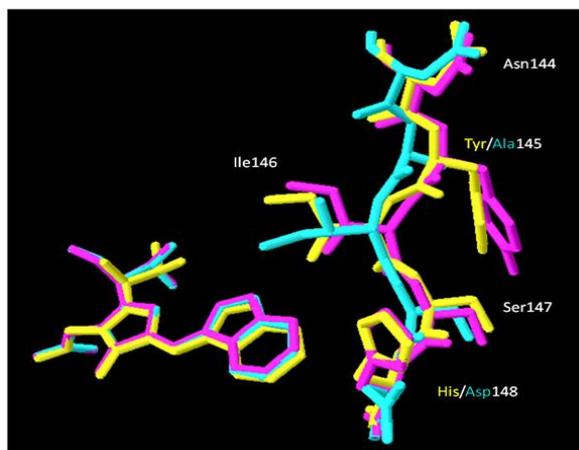


Figure 34 : Superposition des conformations *ecfp* (jaune, 1OXE), *ecfp'* (violet, 2WSN) et *cerulean* (bleu, 2WSO) au niveau des résidus 144-148 et du chromophore obtenues par diffraction des RX.

B.II.2.3 A pH ACIDE, UNE ISOMERISATION DU CHROMOPHORE SE PRODUIT.

Les conséquences d'une acidification du milieu, comme pour la ECFP, se caractérise par une perte importante de l'intensité de fluorescence de la Cerulean avec un pH de demi-transition

du même ordre de grandeur que celui de la ECFP à savoir 4,7 (Tableau 2) (88, 100). De profonds changements des propriétés spectrales, distincts de ceux observés pour la ECFP, sont constatés à pH 5 (Figure 35). Un déplacement réversible des spectres d'absorption et d'émission vers les petites longueurs d'onde est observé suite à un saut de pH de pH 8 à pH 5^{IV}(116).

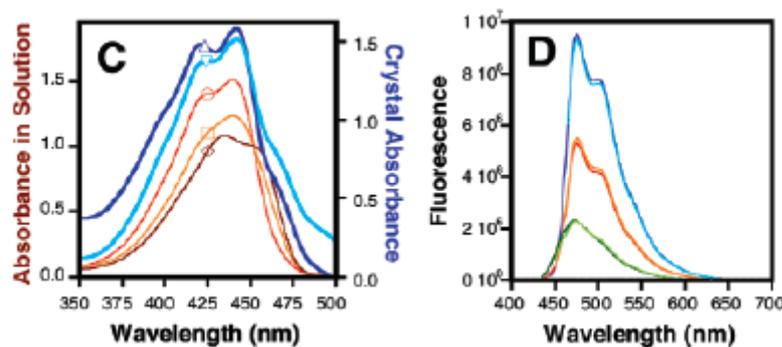


Figure 35 : Graphe C : Spectres d'absorption de la Cerulean en solution à différents pH, pH 7 (courbe marron, \diamond), pH 6 (courbe orange, \square) et pH 5 (courbe rouge, \circ) comparés au spectre d'absorption de la Cerulean obtenus sur des mono-cristaux en bleu foncé et clair. Graphe D : Spectres d'émission de la Cerulean à pH 8 (bleus), 5 min (orange) et 80 min (verts) après un saut de pH de pH 8 à pH 5. Pour chaque condition, sont superposés les spectres obtenus suite à une excitation aux deux longueurs d'onde correspondant au maximum du spectre d'absorption. Extrait de l'article Malo et al. (116).

Le processus impliqué dans cette transition induite par le pH est lent et se produit avec une constante de temps de 47 min. Ce processus lent, impliquant l'existence d'une barrière de potentiel élevée, est attribué à un changement conformationnel conséquent, associé à une isomérisation du chromophore observé sur la structure cristallographique de la Cerulean à pH 5 (Figure 36)(116). Des études théoriques de chimie quantique effectuées dans le groupe de Théorie et Simulation du LCP ont montré que l'isomérisation du chromophore induit un déplacement du spectre d'absorption vers les petites longueurs d'onde dont l'amplitude est similaire à celle observée expérimentalement(9, 78) renforçant l'hypothèse avancée par Malo et al.. Des études de dynamiques moléculaires ont de plus souligné le rôle crucial du résidu Asp148 dans la stabilisation de la forme isomérisée grâce à sa forte implication dans le réseau de liaisons H entourant le chromophore(9, 78). En effet, sous sa forme acide à pH 5, la chaîne latérale de l'acide aspartique présente une interaction stabilisante avec le cycle indole du chromophore dans sa forme isomérisée « cis » (Figure 37) (c₂CFP selon la notation de Voliani *et al.*, Figure 40, page - 70 -). En revanche, sous forme anionique donc fortement hydrophile à pH 8, l'acide aspartique s'oriente vers le solvant en formant des liaisons hydrogènes avec d'autres partenaires que le chromophore (résidus Asn149 et Lys166 et des molécules de

^{IV} Malo *et al.* considèrent dans leur article que l'allure du spectre d'émission est presque invariante, non affectée par le pH.

solvant). Ce dernier, alors non stabilisé, préférera adopter sa configuration classique, c1CFP selon la notation de Voliani *et al.*, (Figure 40, page - 70 -), non isomérisée car cette dernière lui permet de retrouver d'autres partenaires avec lesquels il peut former un réseau de liaisons hydrogène stables (Figure 37).

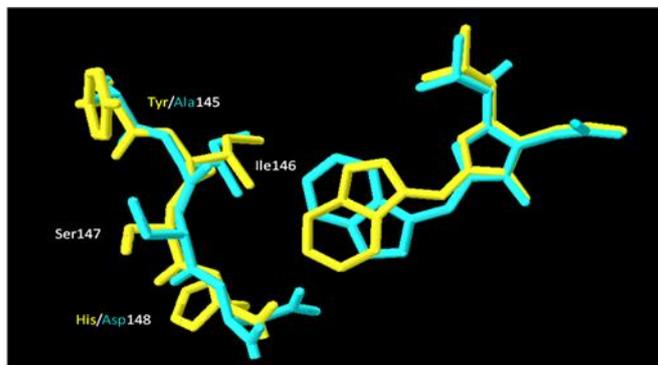


Figure 36 : Superposition, au niveau du chromophore et des résidus 145-148, des structures cristallographiques de la ECFP (jaune, 10XE) et de la Cerulean (bleu, 2Q57), cette dernière étant obtenue à pH 5.

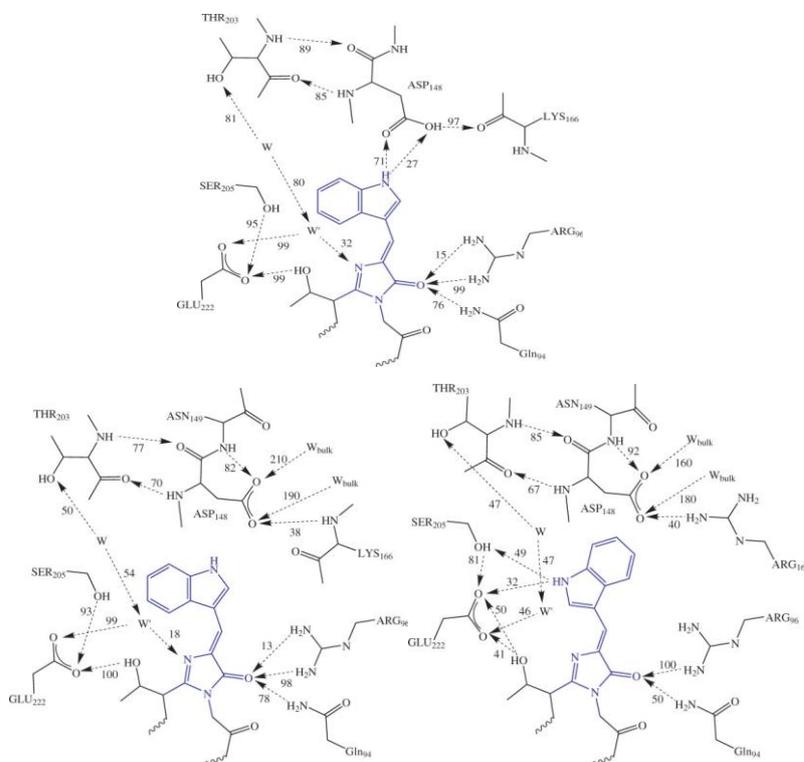


Figure 37 : Réseau de liaisons hydrogène autour du chromophore dans la Cerulean obtenue (figure du haut) à pH 5, dans la configuration isomérisée « cis » du chromophore (c2CFP, cf. Figure 40), (figure du bas, gauche) à pH 8, dans la configuration isomérisée « cis » et (figure du bas, droite) à pH 8, dans la configuration non isomérisée (c1CFP). Les nombres indiquent le pourcentage de temps pendant lequel la liaison hydrogène existe au cours de la dynamique moléculaire(9, 78).

B.II.2.4 H148D : LA MUTATION CLÉ DE LA CERULEAN.

D'après les premiers résultats rapportés par Rizzo *et al.* sur le précurseur de la Cerulean, à savoir ECFP-H148D(88), la mutation H148D semble être la mutation clé à l'origine des

principales améliorations constatées dans la Cerulean notamment l'augmentation du rendement quantique d'un facteur 1,7 par rapport à celui de la ECFP.

L'analyse détaillée des caractéristiques photophysiques du dérivé ECFP-H148D entrepris par l'équipe de Photobiologie du LCP indique qu'à pH physiologique, l'introduction de la mutation H148D induit principalement trois conséquences :

- Une augmentation de la monoexponentialité du déclin d'émission de fluorescence. Bien que l'allure générale de la distribution de durée de vie de la ECFP-H148D soit assez similaire à celle de la ECFP, l'amplitude relative de la composante de temps long est augmentée ($69\% \pm 5\%$ pour la ECFP-H148D contre $52 \pm 7\%$ pour la ECFP)
- La réduction d'un quenching dynamique se traduisant par une augmentation de la valeur de toutes les composantes de temps de la distribution.
- La réduction de la population voire l'élimination d'une espèce de durée de vie courte et présentant des propriétés d'émission situées du côté des grandes longueurs d'onde du spectre d'émission de la ECFP. En effet, contrairement à la ECFP, la durée de vie moyenne de la ECFP-H148D ne dépend que très faiblement de la longueur d'onde d'émission pour des longueurs d'onde supérieures à 470 nm (Figure 38).

L'ensemble de ces trois facteurs conduit à une augmentation significative de la durée de vie moyenne dont la valeur a été estimée à $3,32 \pm 0,04$ ns à pH 7,4 et $T^\circ=20^\circ\text{C}$, en accord avec l'augmentation du rendement quantique de la ECFP-H148D rapporté par Rizzo *et al.*(88)

Protéine	ϕ ($\lambda_{em}= 475$ nm)	τ_{moy} (ns)	Brillance	pKa
ECFP	0,37	3,26	1	4,7
ECFP-H148D	0,68	4,06	2	ND
Cerulean	0,62	3,66	2,5	4,7

Tableau 2 : Propriétés photophysiques et pKa de la ECFP-H148D et de la Cerulean. Valeurs rapportées par Rizzo *et al.* (88)

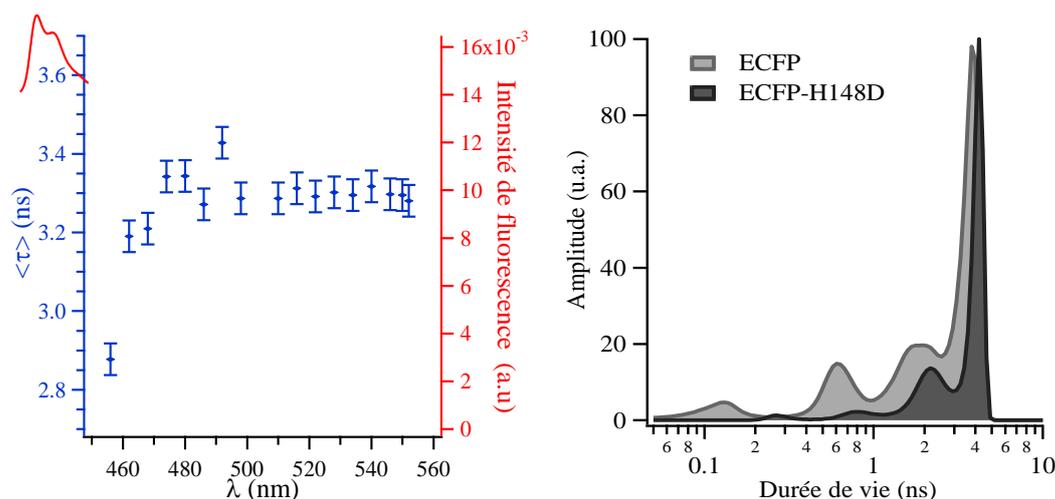


Figure 38 : (Graph de droite) Dépendance, à pH 7,4, de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{ex}}=420$ nm). L'allure du spectre d'émission à ce pH est indiquée. (Graph de gauche) Distribution de durées de vie de la ECFP-H148D et de la ECFP.

Par ailleurs, Borst *et al.* ont montré que la mutation H148D permet d'éliminer une sensibilité vis-à-vis de l'ATP propre à la ECFP et qui se traduit par une augmentation de la durée de vie moyenne de la ECFP suite à un accroissement de la concentration en ATP(117). Les auteurs ont émis trois hypothèses quant à l'origine structurale possible de la sensibilité à l'ATP de la ECFP impliquant l'histidine en position 148 : une interaction de type π - π entre le groupe aromatique de l'ATP et l'histidine, une interaction de type π -cation impliquant la charge positive de l'histidine et le groupe aromatique de l'ATP ou encore une interaction électrostatique entre l'ATP de charge négative et l'histidine chargée positivement.

La sensibilité au pH de la ECFP-H148D, notamment vis-à-vis des pH acides, est similaire voire légèrement plus importante que la ECFP, se traduisant par une réduction de la durée de vie moyenne de 40% entre pH 7,4 et 5,5 (33% pour la ECFP) (Figure 39). En revanche, les modifications spectrales induites par la transition acide diffèrent de celles constatées pour la ECFP. Elles sont caractérisées par l'absence d'un déplacement vers le rouge du spectre d'émission mais par un déplacement vers les petites longueurs d'onde des spectres d'absorption et d'émission similaire à celui rapporté pour la Cerulean suite à un saut de pH, de 8 à 5 (116). Suite à un saut de pH de 9 à 5, ces déplacements spectraux s'effectuent sur une échelle de temps du même ordre de grandeur que pour la Cerulean, à savoir plusieurs dizaines de minutes(118). L'existence d'un tel processus lent associé à des déplacements spectraux similaires à ceux rapportés pour la Cerulean(116) et considérant le rôle fondamental de l'Asp148 dans la stabilisation à pH acide de la forme isomérisée du chromophore de la

Cerulean mis en évidence par des simulations de dynamiques moléculaires (9) sont autant d'éléments suggérant l'existence d'une isomérisation du chromophore de la ECFP-H148D à pH acide. La structure cristallographique de ce mutant à pH acide n'est pas rapportée dans la littérature.

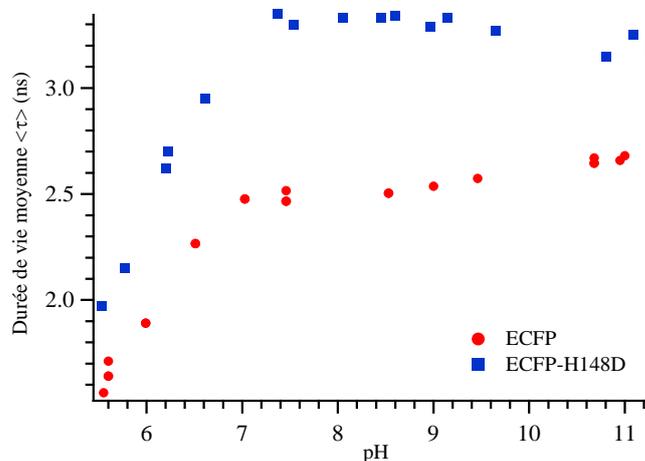


Figure 39 : Variation de la durée de vie moyenne de la CFP (en rouge) et de la CFP-H148D (en bleu) en fonction du pH.

B.II.3 LES mTURQUOISE ET LA mCERULEAN3.

Très récemment, plusieurs nouveaux mutants performants de la ECFP ont vu le jour.

Les mTurquoise : Afin d'améliorer l'efficacité et la vitesse de repliement de la ECFP à 37°C, et tenant compte des améliorations photophysiques constatées dans la Cerulean grâce à l'introduction de la mutation H148D, Kremers *et al.* ont mis au point une Super Cyan Fluorescent Protein, la SCFP3A, portant, outre la mutation H148D, les mutations S72A, S175G et A206K(113). Cette dernière mutation est introduite systématiquement dans toutes les dérivées de la GFP_{av} afin de réduire leur tendance à dimériser (38). Quant à la mutation S175G, elle est introduite afin de faciliter la maturation (119). Bien que plus performante que la ECFP, la SCFP3A présente un rendement quantique loin de l'optimum (0,56) et un déclin non monoexponentiel (113). En 2010, cette même équipe propose la mTurquoise aux propriétés fortement améliorées (brillance 2,5 fois plus élevée que la ECFP, rendement quantique =0,84, déclin monoexponentiel, Tableau 3), issue d'une mutagenèse aléatoire en position 65 à partir de la SCFP3A. Par rapport à cette dernière, la mTurquoise porte en plus la mutation T65S(12) et présente, d'après les auteurs, une dépendance au pH similaire à celle de la SCFP3A, avec un pH de demi transition de 4,5. Dernièrement, en mars 2012, grâce à une approche combinant l'analyse structurale par diffraction des RX et la mutagenèse aléatoire en

position 146, une version de la mTurquoise aux performances quasi-idéales (rendement quantique de 0,93), la mTurquoise2, a été proposée (Tableau 3) (13). Au cours de ces études, les auteurs rapportent la structure cristallographique à pH physiologique de la mTurquoise et de la mTurquoise 2.

La mTurquoise adopte une configuration unique au niveau du 7^{ème} brin (englobant les résidus 145 et 148) Curieusement, son parent la SCFP3A dont la mutation principale est H148D adopte également une configuration unique au niveau du 7^{ème} brin extrêmement proche à celle de la mTurquoise alors que la Cerulean, là encore basée sur la mutation H148D, présente une hétérogénéité structurale au niveau de ce même brin (94). Ces études par cristallographie suggèrent que les améliorations significatives des propriétés photophysiques dans la mTurquoise résultent d'une rigidification de l'environnement du chromophore devenant plus compacté, défavorisant les processus de désactivation non radiatifs. Cette rigidification s'effectue suite à l'introduction de la mutation T65S qui induit une cascade de petits déplacements locaux mettant en jeu divers résidus L220, E222, S205 et I146.

L'analyse de la structure cristallographique des protéines ECFP, Cerulean, SCFP3A et mTurquoise révèle que le résidu Ile 146 présente une grande variabilité de position et de conformation entre ces divers variants. Ce constat est à l'origine de la mutagenèse aléatoire en position 146 permettant de générer la mTurquoise2. La structure cristallographique de cette dernière est pratiquement identique à celle de la mTurquoise, hormis la position du 7^{ème} brin qui se trouve déplacé vers le solvant du fait du volume important de la phénylalanine nouvellement introduite en position 146. Cette dernière établit un ensemble de liaisons de type van der Waals avec le chromophore et les résidus Ile167 et Val61, augmentant la stabilisation de l'encrage du chromophore dans la protéine (13).

Protéine	Φ	ϵ ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
SCFP3A	0,56 (12)	30 (13)
mTurquoise	0,84 (13, 14)	30 (13), 34 (14)
mTurquoise2	0,93 (13)	30 (13)
mCerulean3	0,80 (12, 13), 0,87(14)	30 (13), 40 (14)

Tableau 3 : Valeurs du rendement quantique d'émission de fluorescence Φ et du coefficient d'absorption molaire ϵ de divers dérivés de la ECFP -SCFP3A, mTurquoise, mTurquoise2 et mCerulean3- rapportés dans la littérature.

La mCerulean 3 : En mars 2011, une nouvelle Cerulean est proposée(14). Cette protéine présente dix mutations supplémentaires par rapport à la ECFP. La première étape de la stratégie de mutation adoptée part de deux constats. D'une part, les brins 7 et 8 en face du

chromophore dans la Cerulean sont écartés, sans liaisons hydrogène (9, 94, 116). D'autre part, de nombreux biosenseurs sont construits en incorporant au niveau de ces brins un domaine biosensible dont l'interaction avec un analyte va permettre de modifier la conformation de ces brins et ainsi moduler les propriétés d'émission de la protéine (3, 120). Aussi, afin d'augmenter la brillance de la Cerulean, les auteurs ont entrepris d'optimiser, par mutagenèse aléatoire, les résidus impliqués correspondant aux positions 147, 148 et 166 à 169. Cette première étape a permis de générer la mCerulean2 dont le rendement quantique (0,60) est augmenté de 25 % par rapport à la Cerulean et qui présente, entre autres, les 6 mutations suivantes : S147H, D148G, K166G, I167L, R168N, H169C. Dans un second temps, la mutation T65S est introduite afin d'augmenter le rendement quantique comme cela est constaté dans les premiers précurseurs de la ECFP. En effet, les mutants W2 ou W7 portant une sérine en position 65 présentent un rendement quantique élevé, de l'ordre de 0,7 (35) alors que le mutant W1B, portant la mutation S65T, présente un rendement quantique de 0,4(112). La mCerulean 3 ainsi formée est caractérisée par un rendement quantique élevé de 0,87 (Tableau 3) et un déclin monoexponentiel avec une durée de vie de 4,10 ns. Les auteurs ont également incorporé la mutation A206K.

B.II.4 LA PHOTOSTABILITE DES CFPS.

La photostabilité des protéines fluorescentes est un paramètre important en imagerie qui conditionne, au même titre qu'une sensibilité environnementale, l'analyse quantitative des signaux de fluorescence en milieux cellulaires vivants. En effet, elle est à l'origine d'une instabilité de l'intensité de fluorescence voire des propriétés spectrales et temporelles de la protéine ce qui est un obstacle pour l'utilisation de ces protéines dans de nombreuses techniques d'imagerie. Aussi, une bonne maîtrise des réactions photoinduites dans les protéines fluorescentes s'avère essentielle.

Cette photostabilité et les processus moléculaires mis en jeu dépendent de la protéine mais également de la puissance incidente et du temps d'irradiation. Dans le cas de la ECFP, mais également de la EYFP et de la citrine, la photostabilité se manifeste au travers deux phénomènes (109) :

- un processus irréversible de photoblanchiment, commun à toutes les protéines fluorescentes, au cours duquel la protéine perd sa fluorescence de façon complète et irréversible.

- un processus réversible de photoconversion au cours duquel l'intensité de fluorescence est réduite et peut être réactivée sous certaines conditions.

Plus précisément, le processus réversible se produit sur les quelques premières secondes d'irradiation et se traduit par une diminution rapide de l'intensité de fluorescence. La récupération quasi totale (96%) du signal de fluorescence initial peut être obtenu (i) en maintenant l'échantillon dans le noir, (ii) et de façon accélérée suite à une illumination supplémentaire. La vitesse de retour dépend de la longueur d'onde et de la puissance d'irradiation. La photoconversion de la ECFP, à savoir la perte initiale de l'intensité de fluorescence, est plus prononcée à pH acide. Pour des temps d'irradiation plus long, au-delà des 10 premières secondes d'irradiation, le photoblanchiment irréversible se produit, conduisant à la perte totale de l'intensité de fluorescence (109).

Un des mécanismes proposé pour la photoconversion des protéines fluorescentes est l'isomérisation cis-trans photoinduite du chromophore (26). Voliani *et al.* ont examiné la photoisomérisation du chromophore de divers dérivés de la GFP_{av} et en particulier de la ECFP. Ils ont travaillé sur un analogue synthétique du chromophore (11). Les configurations cis et trans correspondent à une valeur de l'angle dièdre τ de 0° et 180°, respectivement. Ils ont menés des calculs théoriques dans le formalisme de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) afin d'évaluer la stabilité thermodynamique de chaque configuration stéréochimique dans différents milieux (phase gaz ou solvants polaires). Ces calculs indiquent que chacune des configurations cis et trans présentent deux minima d'énergie correspondant à des configurations quasi-planes du chromophore, notées c1CFP, c2CFP, t1CFP et t2CFP (Figure 40). Que ce soit en phase gaz ou en solvant (eau, méthanol), il apparaît que

- la configuration c1CFP est la plus stable et est présente à 73,5 % à température ambiante dans le méthanol.
- la configuration t2CFP est peu probable compte tenu des gênes stériques entre les groupes indole et imidazolinone et est peuplée à moins de 10⁻³ % dans le méthanol
- la configuration t1CFP (12,5 % dans le méthanol) est légèrement plus stable que la configuration c2CFP (14 % dans le méthanol).

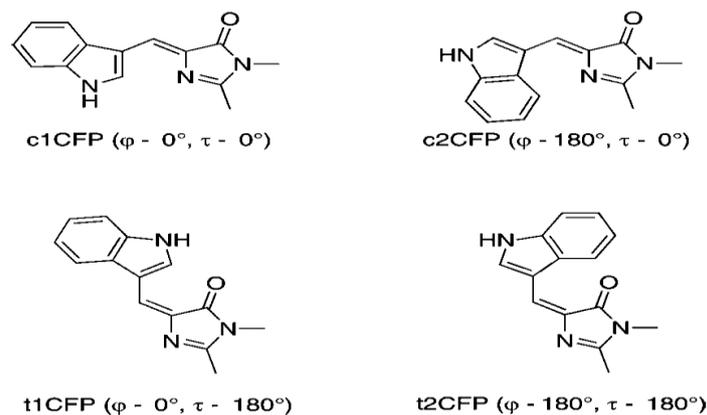


Figure 40 : Configurations stéréochimiques du chromophore de la ECFP. Extrait de l'article Voliani *et al.* (11)

Par ailleurs, l'irradiation de la forme cis conduit à la génération d'un photoproduit que les auteurs ont attribué à la forme trans de la ECFP grâce à l'analyse des spectres de RMN ¹H des solutions photoirradiées. Connaissant le spectre d'absorption de la forme cis pure, Voliani *et al.* ont réussi à déterminer le spectre d'absorption de la forme trans dans différents solvants. Ainsi, le processus de cis-trans photoisomérisation s'accompagne d'une réduction de l'absorbance mais également d'un déplacement vers le rouge de la bande d'absorption dans le visible, dont l'amplitude dépend de la nature du solvant (polarité et capacité à établir des liaisons hydrogènes). Le spectre d'absorption du chromophore synthétique, qu'il soit sous forme cis ou trans, présente une bande large peu voire non structurée dont le maximum dépend de la nature du solvant. Par exemple, son maximum se situe à 407 nm pour les deux formes cis et trans dans l'eau (Figure 41).

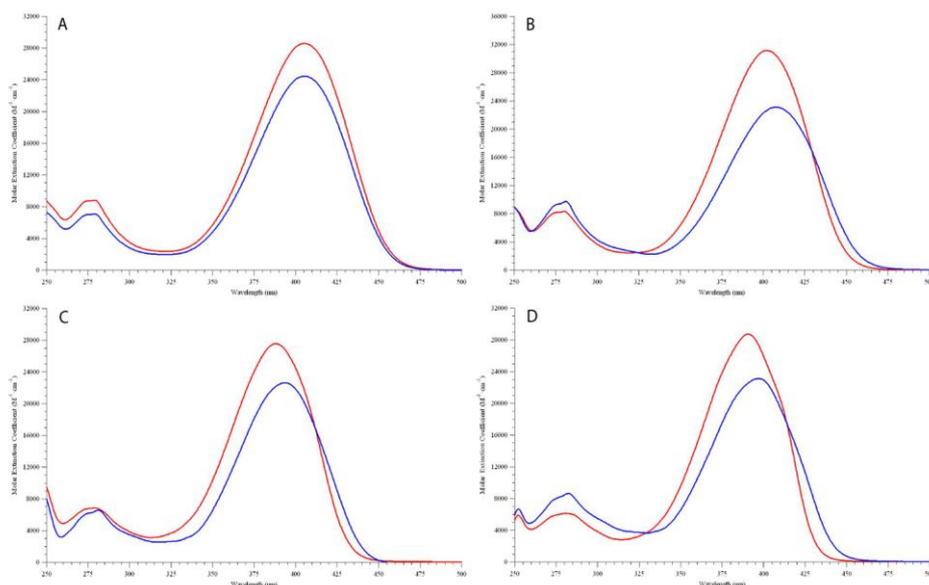


Figure 41 : Spectres d'absorption des isomères cis (rouge) et trans (bleu) de la CFP (A) dans l'eau, (B) dans le méthanol, (C) dans l'acetonitrile et (D) dans le dioxane. Extrait de l'article Voliani *et al.* (11)

PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre C.I CAHIER DES CHARGES ET STRATEGIE DE MUTATION

Notre objectif est la génération d'une protéine fluorescente dérivée de la ECFP présentant des performances permettant une approche quantitative des techniques d'imagerie. Dans ce cadre, cette protéine doit répondre au cahier de charge suivant, à savoir présenter :

- a) des caractéristiques spectrales similaires à celles de la ECFP.
- b) une brillance élevée avec un rendement quantique et une durée de vie améliorés par rapport à la ECFP.
- c) des propriétés d'émission simples et homogènes caractérisées par des déclin d'émission mono exponentiels et des spectres d'absorption et d'émission homogènes.
- d) une sensibilité vis à vis du pH fortement réduite voire absente.
- e) une sensibilité environnementale autre connue et maîtrisée.
- f) une photostabilité améliorée.
- g) des processus de photoconversion réversibles éliminés.
- h) une vitesse de maturation, à minima, non dégradée par rapport à la ECFP.

Dans ce travail, nous avons principalement porté notre attention sur les quatre premiers critères afin d'identifier les mutants les plus performants.

Divers éléments soulignent le rôle critique de la position 148 qui se situe dans l'environnement proche (en face) du chromophore (8, 9, 93) (Figure 42). En particulier, l'introduction de la mutation H148D dans la ECFP présente divers avantages vis à vis des propriétés photophysiques. En effet, elle est à l'origine :

- d'une augmentation du rendement quantique et de la durée de vie de fluorescence.
- de l'élimination d'une espèce de durée de vie courte émettant du côté rouge du spectre d'émission de la ECFP et donc de l'amélioration de l'homogénéité du spectre d'émission et de la monoexponentialité du déclin d'émission.
- de la réduction voire de l'élimination d'un quenching dynamique.

Ces avantages sont contrebalancés par la perturbation des spectres d'absorption et d'émission à pH plus acide (~ 5 - 6) suite à l'apparition d'une nouvelle espèce aux propriétés spectrales déplacées vers le bleu. Cette nouvelle espèce est assimilée à une forme isomérisée du chromophore, similaire à celle observée dans le cas de la Cerulean. Finalement, l'introduction de la mutation H148D conduit à une sensibilité au pH du même ordre voire un peu plus forte que celle obtenue pour la ECFP.

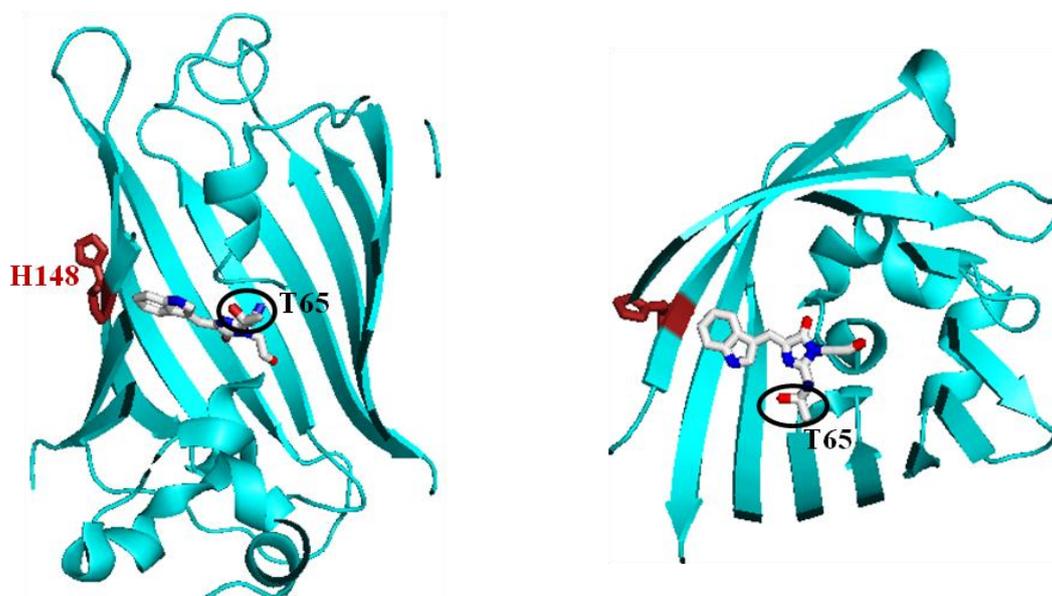


Figure 42 : Représentations partielles de la structure 3D de la ECFP et position des résidus 148 et 65 par rapport au chromophore de la ECFP.

Une première piste vers l'amélioration de la ECFP repose sur les conclusions tirées des études de dynamique moléculaire menées sur la Cerulean (9, 78) : à pH acide, l'acide aspartique nouvellement introduit en position 148 stabilise la forme isomérisée du chromophore. Afin de rompre cette interaction stabilisante, l'introduction de résidus ayant une chaîne latérale plus longue ou plus volumineuse que l'acide aspartique, tels que l'acide glutamique (E), l'arginine (R) ou encore l'asparagine (N) a été testée. Des résultats prometteurs obtenus sur la ECFP-H148E nous ont incité à tester des résidus, à l'inverse, plus courts tels que la glycine (G), l'alanine (A), la valine (V) et la sérine (S). En se basant sur les quatre premiers critères du cahier des charges, l'introduction d'une glycine en position 148 s'est avéré la plus performante. En effet, outre la conservation voire l'amélioration des performances à pH neutres constatée suite au remplacement de l'histidine en position 148 par l'acide aspartique, la mutation H148G semble empêcher la formation d'une forme isomérisée du chromophore à pH acide et réduit significativement la sensibilité au pH de la ECFP. Ces bénéfices ont également été constatés lors de l'introduction de la glycine en position 148 dans la Cerulean (mutant Cerulean-D148G).

En février 2010, un nouveau dérivé de la ECFP, la mTurquoise, est proposé dans la littérature (12). Il présente des performances en termes de brillance et de rendement quantique significativement améliorées et possède un déclin d'émission de fluorescence

monoexponentiel. Concernant la sensibilité au pH de la mTurquoise, peu d'informations sont données par les auteurs qui signalent néanmoins que le pH de demi-transition acide est de 4,5. La position 65 semble être une position stratégique puisque ce résidu fait partie intégrante du chromophore, bien que ne participant pas à la délocalisation des électrons.

Nous avons souhaité, dans un premier temps, cerner le rôle de la mutation T65S (seule). Pour ce faire, nous l'avons introduite dans la ECFP (ECFP-T65S). Dans cette étude, deux conclusions sont ressorties :

- 1- la mutation T65S joue un rôle majeur en augmentant le rendement quantique, la durée de vie de fluorescence et la monoexponentialité du déclin, en réduisant la sensibilité au pH et la photosensibilité de la protéine et enfin en supprimant les processus de photoconversion réversible. (Pour ces deux derniers points, travaux effectués par F.Mérola et M.Erard de l'équipe de photobiologie, non présentés dans ce manuscrit).
- 2- La mutation T65S seule n'est pas suffisante pour atteindre les performances de la mTurquoise.

Dans un second temps, nous avons associé la mutation T65S à la H148D dans la Cerulean (Cerulean-T65S) puis aux mutations H148X les plus performantes (X=G,A,S,D et E) en formant les doubles mutants ECFP-T65S,H148G, ECFP-T65S,H148D, ECFP-T65S,H148S, ECFP-T65S,H148S, ECFP-T65S,H148A et ECFP-T65S,H148E. Dans tous les cas, l'association des mutations T65S et H148X conduit à la génération de protéines fluorescentes cyans présentant des performances du même ordre voire, pour certaines, légèrement supérieures à celles de la mTurquoise. En particulier, l'Aquamarine (ECFP-T65S,H148G) est la protéine présentant la durée de vie de fluorescence la plus élevée (4,11 ns), un rendement quantique de 0,89 proche de celui de la mTurquoise 2 et un pH $\frac{1}{2}$ de 3,3. L'introduction en supplément des deux mutations S72A et A206K, mutations présentes dans la mTurquoise n'induit pas de changements profonds. Là encore, le dérivé Aquamarine-S72A, A206K portant une glycine en position 148 présente les propriétés les plus intéressantes et est caractérisé par un pH $\frac{1}{2}$ de 3,1.

Les propriétés photophysiques des dérivés de la ECFP générés au cours de ces travaux seront détaillées dans le chapitre C.III en nous focalisant principalement sur les quatre premiers critères du cahier de charges.

**Chapitre C.II PROCOLES EXPERIMENTAUX, CONDITIONS
OPERATOIRES.**

C.II.1 DE LA MUTAGENESE DIRIGEE VERS LA PURIFICATION DE LA PROTEINE

C.II.1.1 MUTAGENESE DIRIGEE

On dispose dans le laboratoire d'un vecteur (pPROEX-HTa, Invitrogen) qui permet l'expression de la ECFP avec une étiquette contenant 6 histidines en N-Terminal. Ce plasmide est nommé pHis-ECFP. Cette étiquette permet de faciliter la purification de la protéine recombinante obtenue sans affecter ses propriétés de fluorescence.

Les diverses mutations introduites dans la ECFP ont été réalisées par mutagenèse dirigée selon le kit « QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit » de Stratagène. Pour cela, des amorces spécifiques ont été désignées pour chaque mutation (voir Tableau 1).

Les conditions opératoires consistent à préparer un mélange constitué de : 39µL d'eau, 1µL de plasmide de concentration 10ng/µL codant pour la protéine fluorescente cyan à muter, 1.5µL de chaque amorce sens et antisens spécifique de la mutation à introduire (100 ng/µL), 1µL de dNTP mix à 10 mM, 5µL de tampon de réaction 10x, et 1µL d'ADN polymérase Pfu ultra HF (2,5U/µL).

La séquence nucléotidique mutée a été ensuite amplifiée selon une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dont les étapes sont sensibles aux variations de la température. Pour cela, le tube renfermant mélange préparé est introduit dans un thermocycleur et soumis aux conditions suivantes : Nous commençons par un cycle à 95 °C pendant 2 min ensuite 18 cycles dont chacun est constitué de:

- 30 secondes à 95°C
- 30 secondes à 58°C
- 10 minutes à 72°C

La PCR est ensuite achevée par un cycle de 10 minutes à 72°C. Enfin, le plasmide mère est digéré par DpnI (2.5U, 1heure à 37°C).

Mutation	Amorce sens	Amorce antisens
148G	CAACTACATCAGCGGCAACGTCTATATCACC	GGTGATATAGACGTTGCCGCTGATGTAGTTG
148S	CAACTACATCAGCTCCAACGTCTATATCACC	GGTGATATAGACGTTGGAGCTGATGTAGTTG
148A	CAACTACATCAGCGCCAACGTCTATATCACC	GGTGATATAGACGTTGGCGCTGATGTAGTTG
148D	CAACTACATCAGCG A CAACGTCTATATCACC	GGTGATATAGACGTTGT CGCTGATGTAGTTG
148R	CAACTACATCAGCCGCAACGTCTATAT CACC	GGTGATATAGACGTTGCGGCTGATGTAGTTG
148N	CAACTACATCAGCTCCAACGTCTATATCACC	GATATAGACGTTGTTGGAGATGTAGTTGTAC
148E	CAACTAC ATCAGCGAGA ACGTCTATATCACC	GGTGATATAG ACGTTCTCGCTGATGTAGTTG
148H	CAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACC	GGTGATATAGACGTTGTGGCTGATGTAGTTG
65S	CGTGACCACCCTGAGCTGGGGCGTGCAGTC	GCACTGCACGCCCCAGCTCAGGGTGGTCACG
72A	CGTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCAC	GTGGTCGGGGTAGCGGGCGAAGCACTGCAG
175G	CAACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCC	GGCGAGCTGCACGCCCGCCGT CCTCGATGTTG
206K	CCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGAC CCC	GGGGTCTTTGCTCAGCTTGGACTGGGTGCTC AGG
145A	GCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTC	GACGTTGTGCTGATGGCGTTGTACTCCAGC

Tableau 4 : Amorces des mutations introduites par mutagenèse dirigée dans la ECFP

La présence d'ADN dans le produit de PCR est vérifiée sur gel d'agarose. Le produit de la PCR est ensuite transformé dans des bactéries compétentes mises en culture en présence d'antibiotiques (pPROEX-HTa possède un gène de résistance à l'ampicilline). Le lendemain quelques clones sont sélectionnés, mis en culture et leur ADN extrait par « mini prep ». Les mutants réussis sont enfin identifiés par séquençage.

C.II.1.2 EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE

C.II.1.2.a Expression de la protéine

La ECFP et ses dérivés ont été produits en transformant des cellules compétentes TOP10 avec le vecteur d'intérêt codant pour la protéine fluorescente.

La mise en culture des bactéries s'effectue par ensemencement sur une boîte de Pétri. Au bout de 12 h, une colonie est mise en culture dans 50 mL de milieu Luria-Bertani (LB) additionné de 50 µL d'ampicilline (0,1 mg/mL final) pendant 16 h à 37 °C sous agitation. L'ampicilline est un antibiotique qui va permettre de sélectionner les bactéries possédant le plasmide qui contient le gène de résistance à l'antibiotique en plus de celui codant pour la ECFP. Une deuxième étape consiste à amplifier la quantité de bactéries. Pour cela, un volume préchauffé de 1.5 L de milieu Luria-Bertani (LB) contenant 100 µg/mL d'ampicilline a été inoculé avec les 50 mL de la culture de départ. Afin de suivre la croissance des bactéries, nous mesurons la turbidité du milieu par la mesure de l'absorbance toutes les 30 min à 562 nm. Cette croissance

est exponentielle. La quantité de bactéries est jugée optimale pour une absorbance de 0,6. Jusqu'à cette étape, les bactéries n'expriment pas la protéine, elles dupliquent seulement le plasmide. Afin d'induire la production de la protéine, 1% d'isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 1 mM) est ajouté à la culture qui est incubée à 30 °C pendant 18 h. Les cellules induites sont ensuite récoltées par centrifugation (10 min à 6000 rpm). Les culots sont congelés à -80 °C. Cette étape de congélation permet de stocker les bactéries mais aussi de fragiliser leur membrane.

C.II.1.2.b Purification de la protéine

Les bactéries sont sorties du congélateur et suspendues dans le tampon de lyse Tris HCl (50 mM Tris-HCl, 5 mM de 2-mercaptoéthanol, 1 mM PMSF et 0,02 mg/mL de DNase) à l'aide d'une tige en verre et d'un potter. Elles sont alors soniquées quatre fois deux minutes avec une minute de pause pour briser les parois. Le mélange est centrifugé (à 6 °C, 90 min à 40000 rpm) afin de séparer les protéines solubles des débris membranaires. Le surnageant contenant la protéine est collecté, filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 µm puis dilué (2 fois) avec un premier tampon phosphate de pH 7,5 nommé N1 (30 mM NaH₂PO₄, 700 mM NaCl, 30 mM imidazole). Cette solution est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne contenant 15 mL de gel d'agarose Ni-NTA (Sigma). Le dépôt dure 1h30 et la protéine fluorescente forme un complexe via ses histidines avec les ions Ni²⁺.

Cette colonne est fixée sur un collecteur AKTAprime (Amersham Biosciences) qui permet de programmer les changements de tampon et la collection des fractions à la sortie de la colonne après leur analyse par un spectrophotomètre d'absorption ($\lambda_{ex} = 280$ nm, longueur d'onde d'absorption caractéristique des protéines). Le tampon N1 va permettre d'équilibrer la colonne. Le tampon N2 (30 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH7.5) contenant peu d'imidazole va éluer les protéines accrochées à la colonne de manière non spécifique. Enfin, l'élution de la protéine se fait avec le tampon N3 (30 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 150 mM imidazole, pH 7,5), l'imidazole ayant une plus grande affinité des ions Ni²⁺ que la protéine.

C.II.1.2.c Evaluation de la pureté de la protéine (électrophorèse en conditions dénaturantes)

Le principe de l'électrophorèse en conditions dénaturantes repose sur la migration des ions sous l'effet d'un champ électrique dans un gel d'acrylamide. En fonction des conditions de l'électrophorèse (tension appliquée, charge des protéines, nature du gel), ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

La première étape consiste à dénaturer les protéines grâce à un détergeant anionique, le SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium : $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{-O-SO}_3^-$, Na^+). Ce dernier se fixe sur la surface des protéines et en particulier sur leurs parties hydrophobes et contribue ainsi à les charger négativement. Sous l'effet du champ électrique, les protéines vont alors migrer en fonction de leur poids moléculaires : Celles qui possèdent le poids moléculaire apparent le plus élevé mettent plus de temps à passer à travers les mailles du gel.

L'analyse électrophorétique des différentes protéines étudiées s'est faite en utilisant des gels NuPage 10 % (Invitrogen). Celui-ci est placé dans le compartiment intermédiaire de la boîte à électrophorèse avec le tampon d'électrode Nu-PAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen). Les échantillons de protéines (10 μL) sont préparés par l'ajout de 10 μL de bleu de Laemli formé par 4% de SDS, 20% de Glycérol et 10 % de β -mercaptoéthanol. Elles sont ensuite chauffées pendant 10 min à 90°C afin de les dénaturer complètement. Cette étape est particulièrement importante pour les protéines fluorescentes qui résistent fortement à la dénaturation. Les mélanges obtenus sont déposés avec une seringue Hamilton dans les puits. Le compartiment extérieur est rempli de tampon d'électrode dans le but de fermer le circuit électrique. La migration aura lieu pendant 45 minutes sous un champ électrique de 175 Volts.

Le gel est ensuite retiré de la cuve et placé dans une solution de fixation (20 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique) sous agitation douce pendant 30 minutes. Il est ensuite coloré à l'aide d'une solution de coloration (40 % d'éthanol, 7 % d'acide acétique et 0,25 % de bleu brillant). Après plusieurs bains dans un tampon de décoloration et de rinçage (10 % d'éthanol et 7 % d'acide acétique) les bandes correspondant aux protéines du mélange apparaissent.

Une fois la pureté de la protéine vérifiée, elle est dialysée pour échanger le solvant N3 avec deux solvants différents : MCBtP et l'acide citrique (voir description dans le paragraphe suivant) et dont la concentration est de 2 mM, et le pH de 7,4 pour les deux. Les protéines sont ensuite stockées congelées à -20°C sous forme d'aliqots dont le volume est de quelques μL en protéine.

C.II.2 CONDITIONS OPERATOIRES UTILISEES : TAMPONS ET CONCENTRATIONS TYPES EN PROTEINE.

Afin de caractériser les propriétés d'émission des protéines fluorescentes sur une large gamme de pH compris entre pH 2,5 et pH 11, nous avons employé deux solutions de tampons différents, le tampon acide citrique / NaOH pour sonder les pH compris entre 2,5 et 6 et le tampon MCBtP pour le domaine de pH 5,5 – 11. Ces deux tampons ont été choisis de telle

sorte qu'il y ait un recouvrement des domaines de pH accessibles. Ceci permet sur ce domaine de recouvrement de vérifier que les propriétés photophysiques des protéines sont identiques dans les deux tampons indiquant que les protéines fluorescentes étudiées ne présentent pas de réponses spécifiques à un des constituants des tampons. Ces deux tampons sont détaillés ci-dessous.

L'étude des propriétés photophysiques des protéines fluorescentes pour des pH compris entre 2,5 et 6 a été menée en utilisant une solution tampon à base d'acide citrique. L'acide citrique ou l'acide 3-carboxy-3-hydroxypentanedioïque (Figure 43) est un triacide dont les pKa sont 3,13/4,76/6,40. Une solution mère d'acide citrique de concentration 0,1 mol.L⁻¹ est préparée dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté par l'ajout de soude NaOH. Le mélange est ensuite dilué dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une solution de concentration 50 mM en acide citrique. Pour la dialyse, une solution de concentration 2mM et de pH 7,4 est utilisée.

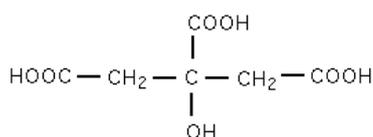


Figure 43 : Formule semi-développée de l'acide citrique

Le tampon MCBtP est un mélange équimolaire de trois tampons : MES, Bis-Tris Propane et CAPS (Figure 44). Le tampon MES ou acide 2-(N-morpholino)ethane sulfonique a un pKa de 6,15 à 20°C et présente un pouvoir tampon entre pH 5,5 et pH 6,7. Le pouvoir tampon du Bis-Tris Propane ou 1,3-Bis (tris(hydroxyméthyl)méthylamino)propane (à 25°C, pKa₁ = 6,8, pKa₂ = 9,0) se situe quant à lui entre pH 6,3 et pH 9,5 alors que celui du CAPS ou acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonique est compris entre pH 9,7 et pH 11,1 (pKa = 10,40).

Une solution mère de 0,1 mM des trois tampons est préparée. Son pH est de l'ordre de 9. Pour obtenir des solutions tampons de pH différents, le pH est ajusté pour des pH inférieurs à 9 avec de l'acide sulfurique H₂SO₄ et pour des pH supérieurs avec de la soude. Une dilution est effectuée avec de l'eau distillée afin d'avoir une solution tampon de concentration 33 mM pour chacun des trois composés. Pour la dialyse, une solution tampon de pH 7,4 et de concentration 2mM est préparée.

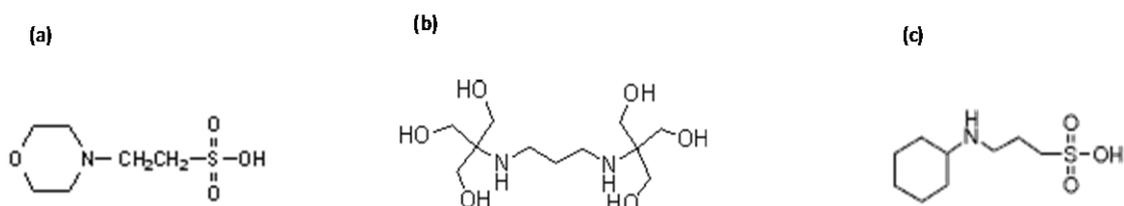


Figure 44 : Structure chimique des composés (a) MES, (b) Bis-Tris Propane et (c) CAPS

Une fois purifiée, chaque protéine est dialysée dans deux solutions tampons de MCBtP et d'acide citrique séparés et dont la concentration est de 2 mM, et le pH de 7,4 pour les deux. Les protéines sont stockées congelés à -20°C sous forme d'aliqots dont le volume est de quelques μL en protéine. Pour les mesures de spectroscopie stationnaire, des solutions de protéine de concentration finale de l'ordre de 10 μM sont préparées à partir des aliqots en ajoutant un volume adéquat de tampon acide citrique/NaOH ou MCBtP de concentrations respectives 50 et 33 mM et de pH souhaité. La même procédure est suivie pour la préparation des solutions utilisées pour l'acquisition des déclin d'émission de fluorescence. Dans ce cas, la concentration finale en protéine est de l'ordre 12 μM . Les spectres et les déclin sont enregistrés sur des solutions ayant été préparées au minimum 12h à l'avance.

C.II.3 SPECTROSCOPIES STATIONNAIRES (ABSORPTION ET EMISSION).

Les spectres d'absorption ont été obtenus à température ambiante (salle climatisée à 20°C) sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 900, avec une largeur de fentes de 2 nm, un pas de 1 nm et une vitesse de balayage de 60nm/mn. Les spectres d'émission de fluorescence stationnaires ont été enregistrés à une température fixée par un thermostat à 20°C à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog 3 (Horiba JobinYvon). La largeur de la bande passante pour l'excitation et l'émission a été fixée à 1 nm et le temps d'intégration de 1s. Pour chaque spectre d'émission de fluorescence, a été soustrait le spectre du tampon correspondant.

C.II.4 DETERMINATION DU RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE

Les rendements quantiques des principales protéines fluorescentes étudiées ont été déterminés en prenant comme référence la ECFP. Pour cela, une solution de ECFP a été préparée à une concentration telle que la densité optique ou absorbance (A_{ref}) à 420 nm soit du même ordre que celle (A) de la protéine étudiée à la même longueur d'onde. Les spectres d'émission ont été enregistrés exactement dans les mêmes conditions expérimentales de manière à être comparables.

Connaissant le rendement quantique de fluorescence de la ECFP ($\phi_f^{\text{ref}} = 0,40$ (121)), celui de la protéine étudiée peut être estimé à partir de l'expression suivante :

$$\phi_f = \frac{I_f}{I_f^{\text{ref}}} \frac{(1 - 10^{-A_{\text{ref}}})}{(1 - 10^{-A})} \left(\frac{n}{n_{\text{ref}}} \right)^2 \phi_f^{\text{ref}}$$

où l'indice ou l'exposant ref se réfère à la ECFP prise comme référence. n est l'indice de réfraction du solvant. Ici, les mêmes solutions tampons sont utilisées, l'indice n est donc pas modifiés. Enfin, I_f représente l'intensité d'émission de fluorescence à une longueur d'onde donnée suite à une excitation à 420 nm. Dans les faits, nous avons calculé le rapport des aires des spectres d'émission de fluorescence $\frac{\text{Aire}_f}{\text{Aire}_f^{\text{ref}}}$ au lieu de $\frac{I_f}{I_f^{\text{ref}}}$. Les deux méthodes sont équivalentes.

C.II.5 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS.

Les déclins d'émission de fluorescence ont été obtenus sur le montage LOLITA décrit dans le chapitre A.II. La longueur d'onde d'excitation est de 420 nm et les déclins ont été enregistrés à une longueur d'onde d'émission donnée (majoritairement 474 nm) avec une bande passante de 6 nm. Tous les déclins ont été enregistrés à la même température, $19,9 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, fixée à l'aide d'un bain thermostaté. Pour chaque déclin, l'intensité de fluorescence issue de l'échantillon de protéines purifiées, d'une part, et la lumière diffusée par une solution de Ludox permettant d'obtenir la fonction d'appareil, d'autre part, sont collectées de façon alternative durant un nombre suffisant de cycles permettant d'obtenir une statistique de comptage élevée. Typiquement, le nombre total de photons collectés pour chaque déclin est compris entre 20 et $25 \cdot 10^6$. Le temps d'acquisition des déclins est donc nécessairement long, au minimum 1h, et, suivant les puissances incidentes utilisées, peut être à l'origine de processus de photoconversion ou de photoblanchiment. Cette procédure consistant à collecter de façon alternative les déclins et la fonction d'appareil permet de suivre la dérive des signaux liée à l'éventuelle formation de photoproduits fluorescents ou liée aux processus de photoblanchiment. Ceci s'effectue grâce au suivi du barycentre et de l'intensité relative du déclin (corrigée de la variation de l'intensité du laser) au cours des différents cycles. Compte tenu des puissances incidentes au niveau de l'échantillon utilisées, inférieures à $1,3 \text{ } \mu\text{W}$, la plupart des déclins ne présente aucune variation significative de ces deux paramètres.

Enfin, à pH 7,4, six déclins d'émission dans les mêmes conditions expérimentales ont été enregistrés pour la plupart des protéines, permettant d'obtenir une incertitude de mesure sur la durée de vie moyenne, et sur les amplitudes et les durées de vie des diverses composantes de temps issues de l'analyse par MEM. La distribution présentée pour ces protéines est la distribution moyenne de ces six expériences.

C.II.6 DETERMINATION DU COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLAIRE (TEST BCA)

Le « test BCA » est employé pour la détermination des concentrations de solutions de protéines. Nous l'utilisons comme méthode biochimique de mesure de concentration des solutions de protéines fluorescentes afin de déterminer leur coefficient d'extinction molaire via la loi de Beer Lambert. Cette mesure doit donc être réalisée avec beaucoup de soin puisqu'elle détermine directement l'incertitude sur la valeur des coefficients d'extinction molaires des protéines fluorescentes.

Ce test utilise comme réactif l'acide bicinchoninique (BCA) en présence de sulfate de cuivre (24,5 mL de BCA avec 0,5 mL de CuSO_4 : Solution S1).

Une première réaction qui se déroule entre les liaisons peptidiques de la protéine et les ions Cu^{2+} conduit à la formation d'ions Cu^+ qui sont complexés et donc stabilisés par le BCA. Le complexe obtenu possède une forte absorption à 562 nm. La quantité de complexe formé est proportionnelle à la concentration initiale en protéine. Afin d'établir cette relation de proportionnalité, nous réalisons une droite d'étalonnage à l'aide de volumes croissants d'une protéine standard de concentration connue : la bovine serum albumin (BSA) de concentration $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Sigma). Les points de la droite d'étalonnage sont réalisés en mélangeant les volumes suivants :

S1	1 mL								
Volume de BSA (μL)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Concentration en BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	5	10	15	20	25	30	35	40

Tableau 5 : Solutions pour l'étalonnage du test BCA avec de la bovine serum albumin ou BSA.

La solution de bovine serum albumin est prélevée avec une seringue Hamilton afin de minimiser les erreurs sur les volumes. En même temps que les échantillons de la gamme d'étalonnage, les échantillons de protéines fluorescentes sont préparés en mélangeant 1 mL de la solution S1 avec 30 et 60 μL en protéine à une concentration approximative de $15 \mu\text{M}$ (deux solutions pour chaque volume ont été préparées). Toutes les solutions sont incubées 30 min à 37°C puis 30 min à température ambiante afin de s'assurer que la réaction est totale. On augmente ainsi la sensibilité du test et réduit les variations de la réponse en fonction de la composition de la protéine. Les densités optiques ou DO de toutes les solutions sont lues en

même temps à 562 nm. On construit ainsi la droite d'étalonnage dont on déduit la concentration exacte des solutions de protéines fluorescentes.

En parallèle, des spectres d'absorption de différentes dilutions de la protéine fluorescente sont réalisés. Nous traçons la droite Absorbance (430 nm)= f(C) où C représente la concentration réelle en protéine déterminée par le test BCA. À partir de cette courbe et en utilisant la loi de Beer-Lambert, nous déterminons le coefficient d'extinction molaire à 430 nm de la protéine fluorescente.

C.II.7 DETERMINATION DU pH DE DEMI-TRANSITION ACIDE (pH_{1/2})

Après avoir enregistré les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la protéine étudiée à différents pH, nous avons estimé, pour chaque pH l'intensité de fluorescence émise sur un intervalle de longueur d'onde de 6nm centré sur le maximum de la bande d'émission à 474 nm. Cette intensité a ensuite été corrigée de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, soit 420 nm. La variation en fonction du pH de l'intensité relative (en %) par rapport à l'intensité maximale permet de déterminer le pH de demi-transition acide qui correspond à la perte de 50% de l'intensité maximale. Pour la plupart des protéines étudiées, l'intensité maximale se situe dans la zone des pH neutres, hormis pour la ECFP et la ECFP-T65S qui voient leur intensité de fluorescence augmenter au delà de pH 7,4. Pour ces deux protéines, la valeur de l'intensité à pH 7,4 a été prise comme référence.

Chapitre C.III PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES MUTANTS DE LA ECFP EN POSITION 65 ET 148.

C.III.1 CARACTERISATIONS DES PRINCIPAUX DERIVES CYANS DE LA LITTERATURE : ECFP, CERULEAN ET mTURQUOISE.

Afin de pouvoir comparer les propriétés des différentes protéines élaborées au cours de ce travail avec celles de la ECFP et de ces deux principaux dérivés, la Cerulean et la mTurquoise, nous avons pour ces deux dernières caractérisé en détail, dans les mêmes conditions de température et de tampon, leurs propriétés spectrales, leur cinétique d'émission de fluorescence (déclin d'émission, distribution de durées de vie et durée de vie moyenne) et leur sensibilité au pH ($pH_{1/2}$). Concernant la ECFP, nous avons complété l'étude antérieure déjà très importante, menée sur une gamme de pH allant de 5,5 à 11, par la détermination du $pH_{1/2}$, imposant d'étendre du côté acide la gamme de pH sondée jusqu'à pH 2,5.

C.III.1.1 LES RESULTATS EXPERIMENTAUX :

C.III.1.1.a *La ECFP : quelques résultats supplémentaires et détermination du pH de demi-transition acide ($pH_{1/2}$)*

L'extension de l'étude de la ECFP à des pH plus acides jusqu'à pH 2,5 nous a permis de mettre en évidence des changements spectraux importants (Figure 45). En effet, jusqu'à pH 4,7, les spectres d'absorption subissent de légères modifications caractérisées par une variation du rapport des amplitudes au niveau des deux maxima à 430 nm et 450 nm. En revanche, au-delà de pH 4,7, le spectre d'absorption perd sa structure bimodale et est déplacé vers le bleu. Il est caractérisé par une bande symétrique ayant un maximum à 415 nm. Les spectres d'émission de fluorescence subissent également des changements significatifs lorsque le pH diminue : outre leur déplacement vers le rouge d'environ 10 nm entre pH 7,4 et 4,7 concomitant avec une perte de leur structure fine ainsi que l'émergence d'un épaulement vers 460 nm pour des pH compris entre 4,7 et 5,5, en dessous de pH 4,7, le spectre d'émission perd sa structure fine. Il se présente sous la forme d'une bande d'allure assez symétrique centrée vers 470 nm. L'ensemble de ces changements spectraux est associé à une perte de près de 100% de l'intensité de fluorescence lorsque le pH passe de 11 à 2,5 (Figure 46).

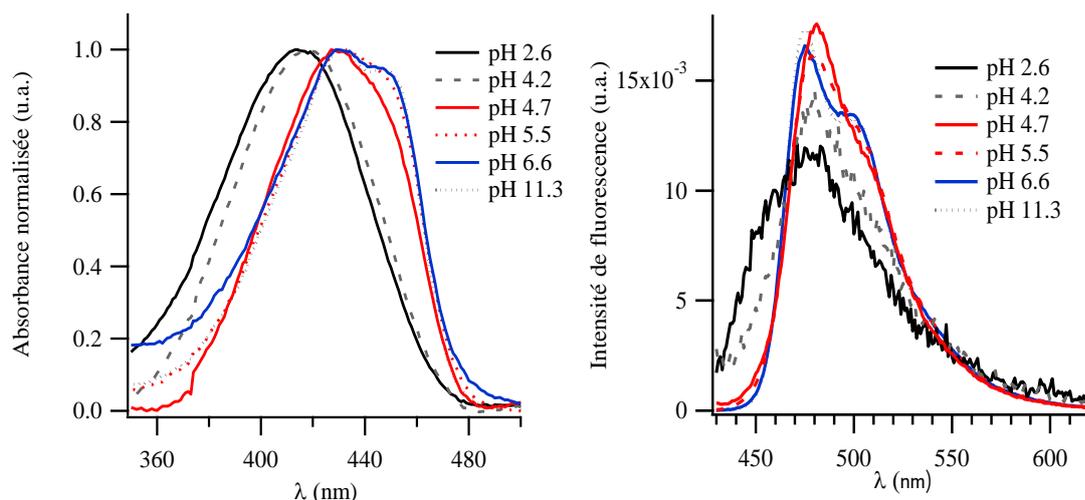


Figure 45 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et des spectres d'émission de fluorescence (à droite) de la ECFP avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

A partir de la variation de l'intensité relative en fonction du pH, la valeur du pH de demi-transition acide de la ECFP a été estimée à 5,6. Cette valeur est supérieure à celle usuellement rapportée dans la littérature, à savoir 4,7 (62, 113, 121) ou inférieure à celle rapportée par Loppis *et al.* qui s'élève à 6,4 (122). Curieusement, ces derniers auteurs ne constatent qu'une perte de 50% de l'intensité d'émission entre pH 7,4 et pH 4,5.

A ce jour, nous n'avons pas identifié l'origine d'une telle différence. En revanche, nous pouvons éliminer quelques pistes.

i. Modes d'estimation de l'intensité de fluorescence aux différents pH :

Il est également possible d'estimer l'intensité émise à différents pH en intégrant l'intensité d'émission de fluorescence sur l'ensemble du spectre d'émission. Cette méthode conduit à une variation de l'intensité avec le pH et un pH $\frac{1}{2}$ similaires. Nous avons fait le choix de conserver la méthode consistant à intégrer l'intensité de fluorescence sur un court domaine de longueur d'onde centré sur 474 nm pour les raisons suivantes :

- En imagerie de fluorescence, la sélection spectrale de l'émission de fluorescence s'effectue généralement sur un domaine de longueur d'onde assez réduit centré sur la longueur d'onde du maximum du spectre d'émission du fluorophore, rarement sur la totalité du spectre, ceci, en particulier, pour permettre d'éviter de collecter l'émission provenant d'un autre fluorophore, un accepteur de FRET par exemple.
- En intégrant l'intensité sur une gamme de longueur d'onde étroite autour de 474 nm, nous procédons comme pour l'acquisition des déclin d'émission de fluorescence qui sont obtenus en collectant la totalité des photons émis dans un intervalle de longueur

d'onde de 6 nm centré sur 474 nm. Ceci nous permettra par la suite de comparer le comportement avec le pH de l'intensité de fluorescence d'une part et de la durée de vie de fluorescence d'autre part, afin de mettre en évidence l'existence de populations non fluorescentes.

Se pose également la question de la correction de l'intensité par l'absorbance à 420 nm. En effet, en imagerie, la valeur de l'absorbance n'est pas accessible et cette correction n'est pas faite. De plus, dans notre cas, nous travaillons à priori sur des solutions de concentration identique. Nous avons montré que la correction ou non de l'intensité de fluorescence par l'absorbance ne modifiait pas de façon significative la valeur de $\text{pH}_{1/2}$ qui sans correction de l'absorbance est de l'ordre de $5,5 \pm 0,1$ (Figure 46). Dans la suite, et pour toutes les protéines, nous avons choisi d'effectuer la correction de l'intensité par l'absorbance. En effet, entre pH 4 et 5, toutes les protéines étudiées précipitent. La concentration de surnageant n'est pas donc celle attendue conduisant à des intensités de fluorescence erronées nécessitant de les corriger. De plus, la concentration en protéine dans les solutions de tampon acide citrique est différente de celle des solutions de tampon MCBtP. Ceci nous oblige à corriger ces variations de concentrations au travers de l'absorbance.

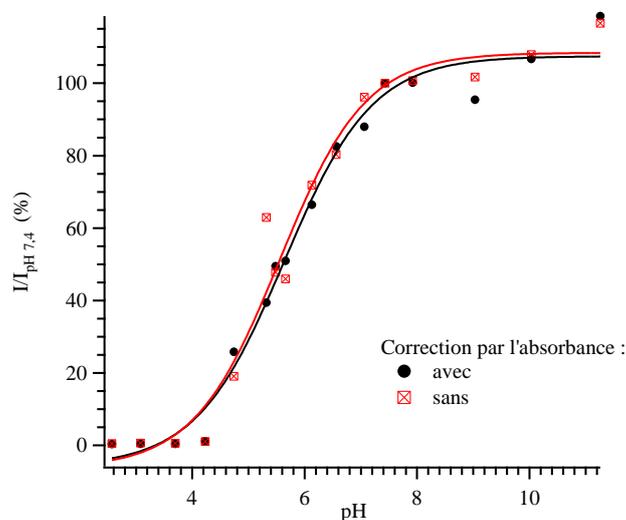


Figure 46 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence relative de la ECFP émise à 474 nm ($\Delta\lambda=6$ nm) avec (en noir) et sans (en rouge) correction des variations d'absorbance à la longueur d'onde d'excitation. La valeur de l'intensité de fluorescence à pH 7,4 est prise comme référence.

ii. La présence d'ions chlorure et la force ionique des tampons

La EYFP présente une sensibilité au chlore bien établie qui se traduit par l'augmentation de la valeur du pK_a suite à une augmentation de la concentration en ions chlorure (83, 123). Dans le cas de la ECFP, aucune sensibilité aux ions chlorure n'a été rapportée dans la littérature.

Pour autant, les tampons utilisés dans la littérature pour estimer le $\text{pH } \frac{1}{2}$ de la ECFP contiennent pour la grande majorité des ions chlorure. En revanche, les tampons employés dans nos études (MCBtP et acide citrique) n'en contiennent pas. Nous avons souhaité vérifier que la différence de $\text{pH } \frac{1}{2}$ n'avait pas pour origine une sensibilité de la ECFP pour les ions chlorure. Pour ce faire, la variation de l'intensité relative en fonction du pH de la ECFP a été également établie (Figure 47) en utilisant les mêmes tampons mais en ajoutant pour tous les pHs 100 mM de NaCl^{V} . La valeur de $\text{pH } \frac{1}{2}$ estimée dans ces conditions s'élève à $5,7 \pm 0,1$ indiquant que la ECFP ne présente pas de sensibilité significative aux ions chlorure, ni à la force ionique. L'origine de la différence de $\text{pH } \frac{1}{2}$ entre nos études et celles de la littérature ne peut pas, non plus, être attribuée à une différence de concentration en ions chlorure.

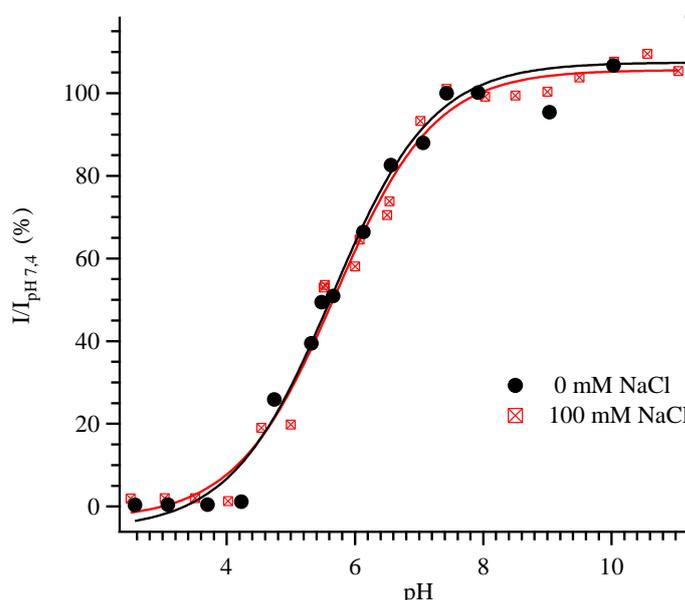


Figure 47 : Influence de la présence d'ions chlorure sur la sensibilité en pH de la ECFP. Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la ECFP solubilisée dans un tampon exempt d'ions chlorure ou contenant 100mM de NaCl

C.III.1.1.b La Cerulean, ECFP –S72A, Y145A, H148D : propriétés photophysiques et sensibilité au pH.

Comme attendu, le comportement global de la Cerulean est comparable à celui de son précurseur, la ECFP-H148D, précédemment étudiée par l'équipe de Photobiologie(8, 10).

A pH physiologique, les caractéristiques spectrales de la Cerulean comme celles de ses deux précurseurs, ECFP-H148D et ECFP-Y145A, H148D, restent similaires à celles de la ECFP

^V La concentration en Cl^- dans les cellules vivantes varie entre 3 et 60 mM

avec une allure typique en double bande. Néanmoins, par rapport à la ECFP, plusieurs comportements spectraux distincts sont constatés :

- Pour le spectre d'absorption, une réduction de l'amplitude relative de l'épaule vers 450 nm (Tableau 6) et la disparition du pied de bande du côté rouge du spectre vers 460-490 nm (Figure 48)
- Pour le spectre d'émission, l'absence de dépendance significative de celui-ci avec la longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{exc} \geq 470\text{nm}$) (Figure 49) et une augmentation du rapport d'intensité entre les bandes à 474 nm et 500 nm (Tableau 6).

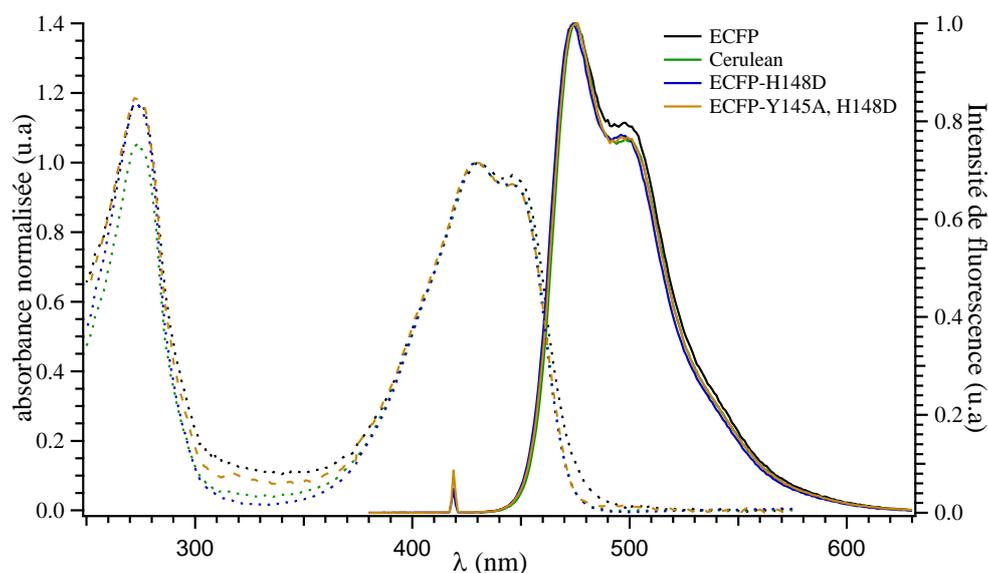


Figure 48 : Spectres d'absorption (en pointillés) et d'émission de fluorescence (en trait plein) de la Cerulean et de ses 2 précurseurs ECFP-H148D et ECFP-Y145A, H148D. Comparaison avec la ECFP. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

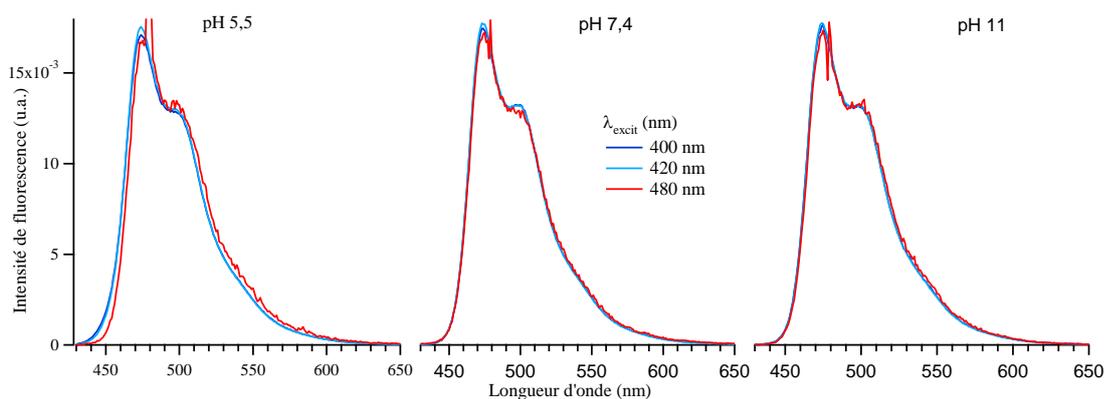


Figure 49 : Spectres d'émission de fluorescence de la Cerulean enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation pour différents pH.

Le déclin d'émission de fluorescence de la Cerulean est non monoexponentiel, en accord avec la littérature (88). Son analyse par la méthode MEM conduit à une distribution de durées de vie aussi complexe que celle de la ECFP-H148D (Figure 50). La monoexponentialité du

déclin de la Cerulean, définie par l'amplitude relative de la composante de temps long (a_L) majoritaire, est effectivement améliorée ($a_L = 64\%$) par rapport à la ECFP ($a_L = 59\%$). En revanche, elle est réduite par rapport à celle de la ECFP-H148D suite à l'introduction de la mutation Y145A (Tableau 6). La réduction d'un processus de quenching dynamique, constaté suite à l'introduction de la mutation H148D dans la ECFP et se manifestant par l'augmentation de la valeur de la composante de temps long τ_L , entre autres, de la distribution de durées de vie (8), l'est également dans la Cerulean mais dans une moindre mesure (Tableau 6). Ces deux éléments se traduisent par une durée de vie moyenne ($\langle \tau \rangle$) dont la valeur de 3,05 ns est, certes, plus élevée que celle de la ECFP (2,46 ns) dans les mêmes conditions expérimentales, mais inférieure à celle obtenue pour la ECFP-H148D (3,34 ns).

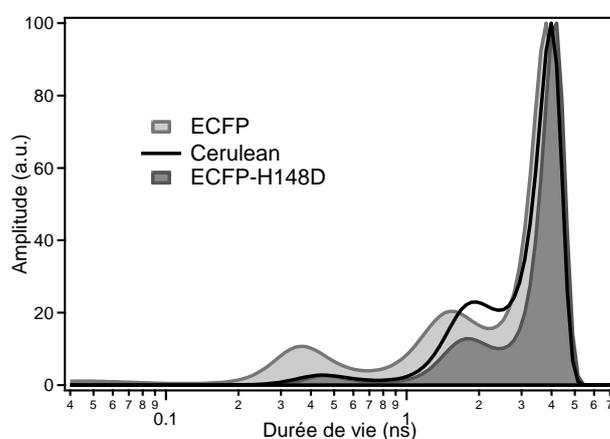


Figure 50 : Distribution de durées de vie de fluorescence de la Cerulean, de la ECFP-H148D et de la ECFP à pH 7,4 et T=20°C.

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	A_{430}/A_{450}	I_{474}/I_{500}	pH _{1/2} ($\pm 0,1$)
ECFP	59 \pm 5	3,51 \pm 0,12	2,46 \pm 0,05	1,057	1,262	5,6
ECFP-H148D	72 \pm 6	3,99 \pm 0,09	3,34 \pm 0,04	1,089	1,31	5,5
ECFP-Y145A, H148D	66 \pm 3	3,79 \pm 0,08	3,03 \pm 0,02	1,090	1,304	5,7
Cerulean	64 \pm 7	3,80 \pm 0,13	3,05 \pm 0,01	1,087	1,312	5,2

Tableau 6 : Caractéristiques photophysiques et valeurs du pH_{1/2} de la Cerulean et de ses précurseurs. a_L et τ_L désignent respectivement l'amplitude relative et la durée de vie moyenne de la composante de temps long de la distribution des durées de vie. $\langle \tau \rangle$ est la durée de vie moyenne. A_{430}/A_{450} représente le rapport des absorbances à 430 et 450 nm et I_{474}/I_{500} est le rapport des intensités de fluorescence au maximum à 474 et à l'épaule à 500 nm

En fonction du pH, le comportement spectral de la Cerulean (Figure 51) est similaire à celui précédemment rapporté pour la ECFP-H148D avec des différences nettes par rapport au comportement de la ECFP :

- L'absence à pH acide de déplacement vers le rouge du spectre d'émission suite à l'acidification du milieu.
- L'absence de dépendance du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 470 nm.
- Pour des pH inférieurs à 5,5, l'apparition d'une nouvelle espèce, similaire à celle observée à pH 5 par Malo *et al.* (116), et caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission déplacés vers le bleu, situés respectivement vers 400 nm et 450-460 nm.

Par contre, pour des pH inférieurs à 3,6, les spectres d'absorption et d'émission se déplacent vers le bleu et perdent leur structure, comme pour la ECFP.

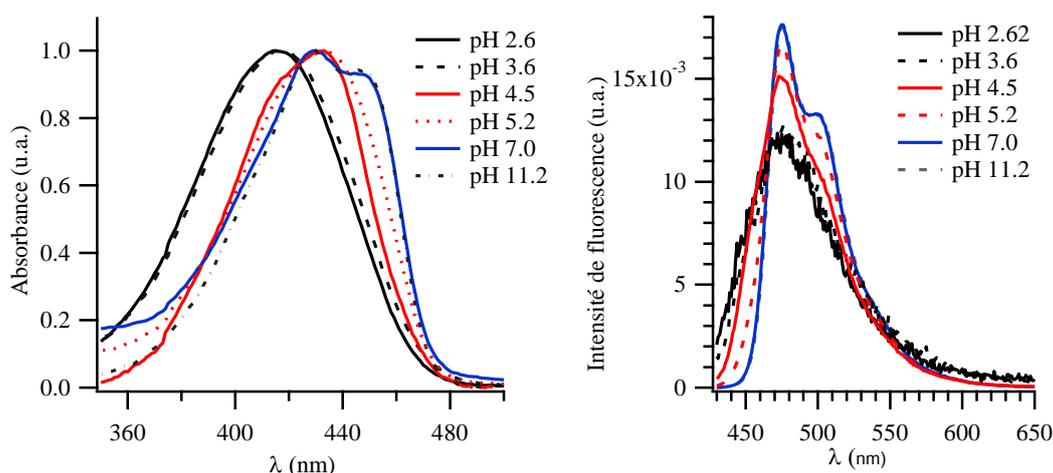


Figure 51 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et des spectres d'émission de fluorescence (à droite) de la Cerulean avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

L'ensemble de ces changements spectraux s'accompagne, d'une part, d'une perte totale de l'intensité de fluorescence entre pH 7,4 et 2,5 avec une valeur de $pH_{1/2}$ estimée à 5,2, légèrement améliorée par rapport à la ECFP (Figure 52) et, d'autre part, d'une réduction de la durée de vie moyenne (perte de 42% entre pH 7,4 et pH 5,5 contre 33% pour la ECFP) (Figure 53).

Enfin, nous pouvons noter qu'outre une diminution de la durée de vie moyenne et de l'amplitude relative de la composante de temps long, l'introduction de la mutation Y145A

conduit également à une très légère augmentation de la valeur de $pH_{1/2}$ (Tableau 6, Figure 52).

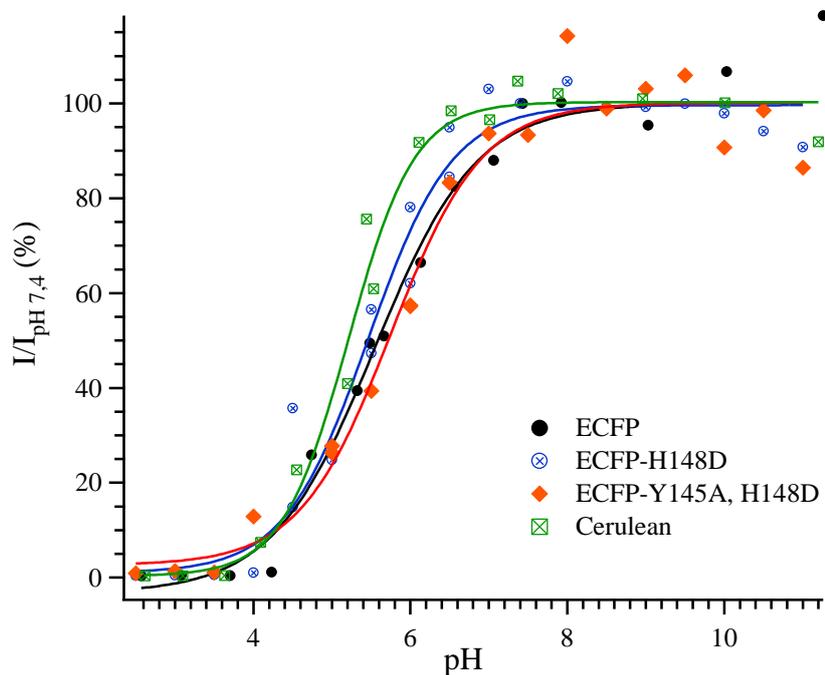


Figure 52 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la Cerulean et de ses précurseurs, ECFP , ECFP-H148D et ECFP- Y145A, H148D.

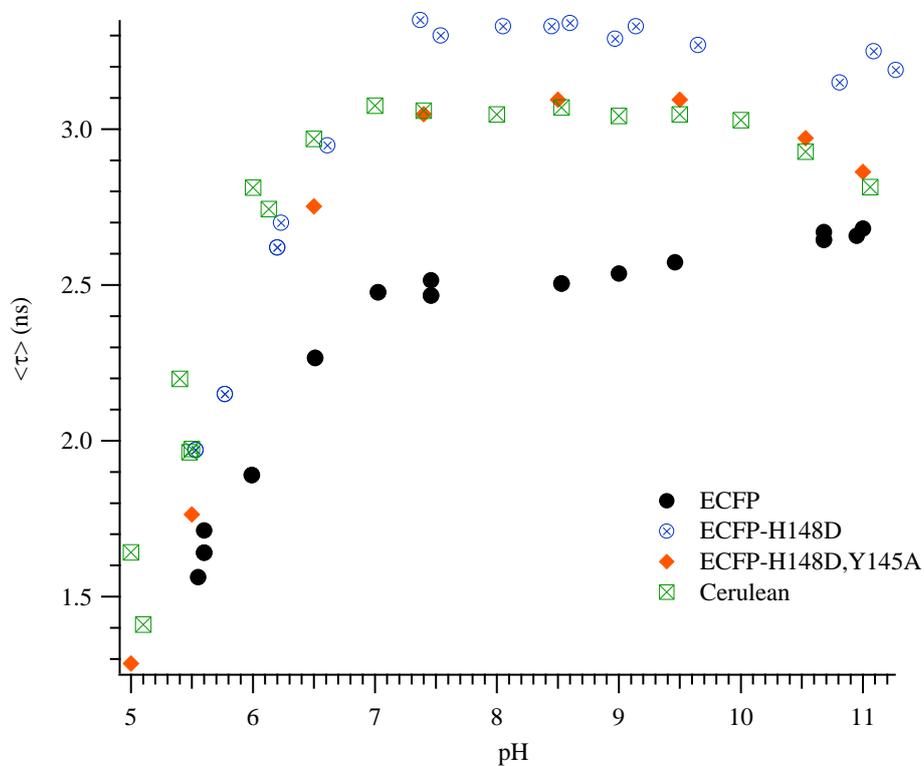


Figure 53 : Influence du pH sur la durée de vie moyenne de la Cerulean et de ses précurseurs, ECFP , ECFP-H148D et ECFP- Y145A, H148D.

C.III.1.1.c La mTurquoise : ECFP –T65S, S72A, H148D, S175G, A206K

Comme attendu, l'étude détaillée des propriétés photophysiques de la mTurquoise à pH physiologique et sur une large gamme de pH confirme l'avancée que constitue cette protéine dans l'amélioration des performances des protéines fluorescentes cyans renfermant un chromophore contenant un tryptophane.

A pH neutre, la mTurquoise conserve le même caractère bimodal spécifique aux dérivés de la ECFP. Elle conserve également toutes les simplifications constatées dans la Cerulean à savoir l'absence d'un pied de bande du côté rouge du spectre d'absorption et l'absence de dépendance des spectres d'émission avec la longueur d'onde d'excitation. Enfin, dans le cas de la mTurquoise, le rapport des intensités de fluorescence à 474 nm et à 500 nm est plus important que celui de la Cerulean. Ceci suggère une réduction, plus importante dans la mTurquoise que dans la Cerulean, de la population d'une ou de plusieurs espèces présentant des propriétés d'émission décalées du côté rouge du spectre global de la ECFP. Le rendement quantique de la mTurquoise à pH 7,4 a été estimé à 0,85 en prenant la ECFP comme référence (Tableau 7).

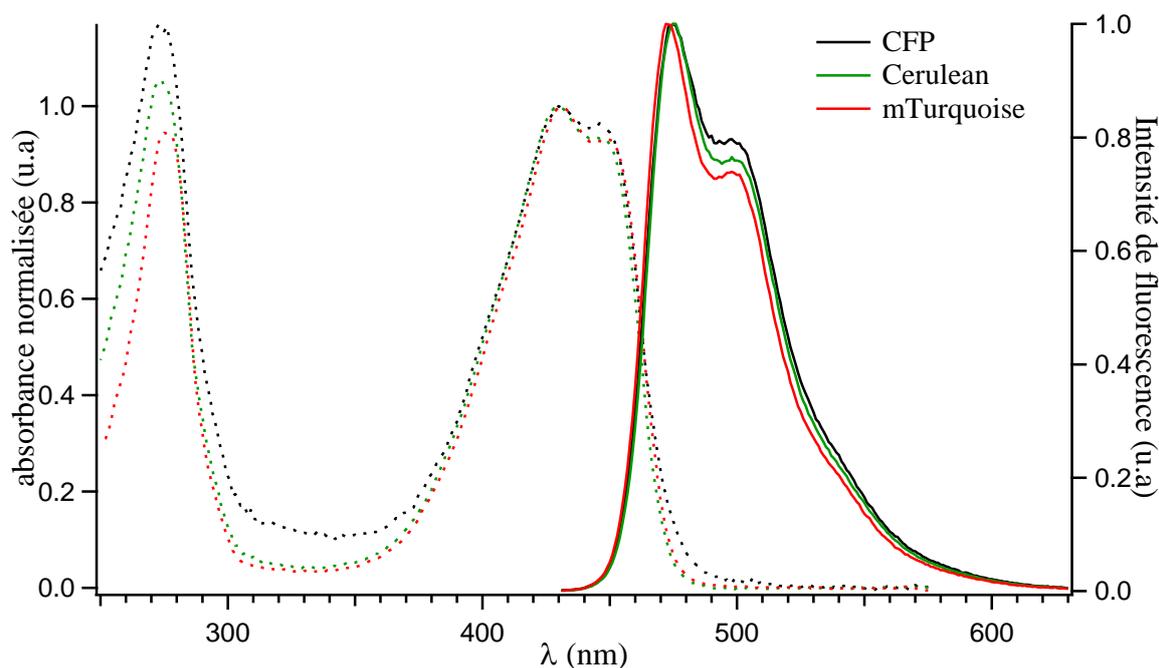


Figure 54 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la mTurquoise à pH 7,4. Comparaison avec ceux de la ECFP et de la Cerulean.

Le déclin d'émission de fluorescence de la mTurquoise, en accord avec les résultats de Goedhart *et al.* obtenus en spectrofluorimétrie de phase(12), est nettement simplifié par

rapport à celui de la ECFP ou encore de la Cerulean. Son analyse par la méthode MEM conduit à une distribution de durées de vie formée par une composante de temps long, très majoritaire, d'amplitude relative estimée à $87 \pm 9 \%$ (Figure 56). Une analyse comparative plus fine des distributions de durées de vie montre en supplément, une augmentation significative de la valeur de la durée de vie de la composante longue par rapport à la ECFP ou la Cerulean (Tableau 7), ce qui indique une inhibition plus importante d'un ou de plusieurs processus de désactivation non radiatifs dans le cas de la mTurquoise. Néanmoins, le déclin reste non monoexponentiel du fait de la présence de composantes de temps court. L'amélioration de la monoexponentialité du déclin associée à l'augmentation de la durée de vie de la composante de temps long se traduit par une durée de vie moyenne élevée, estimée à $4,06 \text{ ns} \pm 0,01 \text{ ns}$.

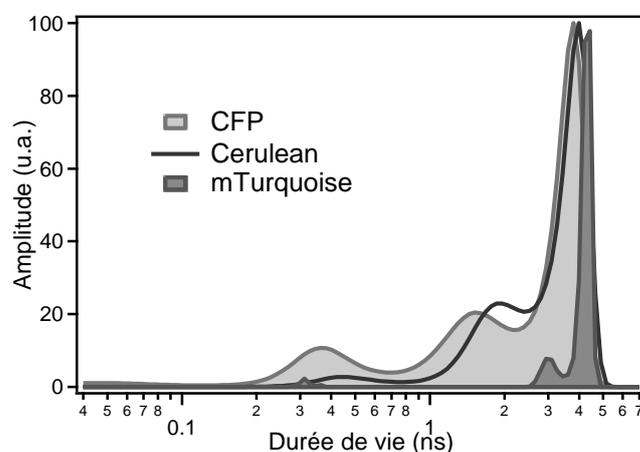


Figure 55 : Distribution de durées de vie de fluorescence de la mTurquoise à pH 7,4 et T=20°C. Comparaison avec la distribution de la ECFP et de la Cerulean.

Concernant la sensibilité au pH de la mTurquoise, l'évolution avec le pH des propriétés spectrales de cette protéine est sensiblement différente de celle constatée pour la Cerulean et *a fortiori* pour la ECFP. Ces différences se jouent d'une part, sur la disparition de l'espèce caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission déplacés vers le bleu, et observée chez la Cerulean, et, d'autre part, sur l'étendue du domaine de pH caractérisé par l'invariance des propriétés spectrales. De façon plus précise, aucune perturbation de l'allure des spectres d'absorption et d'émission n'est constatée sur une gamme de pH s'étendant entre 11 et 4,5 (Figure 56). En dessous de ce pH, un déplacement vers le bleu associé à la perte de la structure en double bande des spectres d'absorption et d'émission similaire à celui observé pour la ECFP ou pour la Cerulean est de nouveau observé chez la mTurquoise.

Par ailleurs, la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH s'effectue suivant une transition abrupte caractérisée par un $\text{pH}_{1/2}$ de 3,4 (Figure 57), valeur significativement réduite par rapport à celle de la ECFP et de la Cerulean et différente de celle annoncée par Goedhart *et al.* (4,5) (12). En parallèle, la durée de vie moyenne commence à diminuer pour des pH inférieurs à 5,5 alors que pour des pH supérieurs, l'invariance de la valeur de la durée de vie moyenne est constatée sur un intervalle de pH s'étendant jusqu'à 11 (Figure 58).

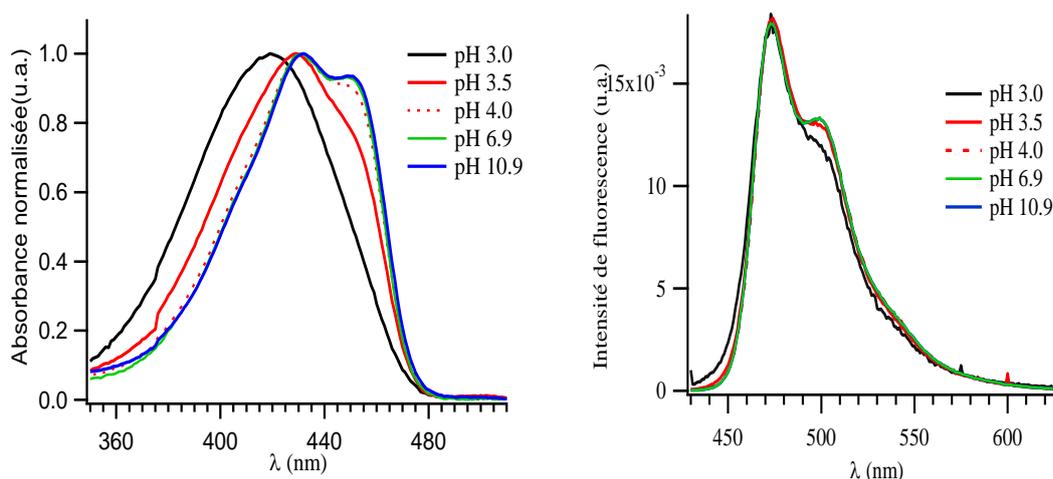


Figure 56 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et des spectres d'émission de fluorescence (à droite) de la mTurquoise avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

Protéine	Φ	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	I_{430}/I_{450}	I_{474}/I_{500}	$\text{pH}_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
ECFP	0,40 (121)	59 ± 5	$3,51 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,05$	1,057	1,262	5,6
Cerulean	0,67	64 ± 7	$3,80 \pm 0,13$	$3,05 \pm 0,01$	1,087	1,312	5,2
mTurquoise	0,85	87 ± 9	$4,26 \pm 0,08$	$4,06 \pm 0,01$	1,075	1,353	3,4

Tableau 7 : Caractéristiques photophysiques et valeur du $\text{pH}_{1/2}$ de la mTurquoise. Comparaison avec la ECFP et la Cerulean.

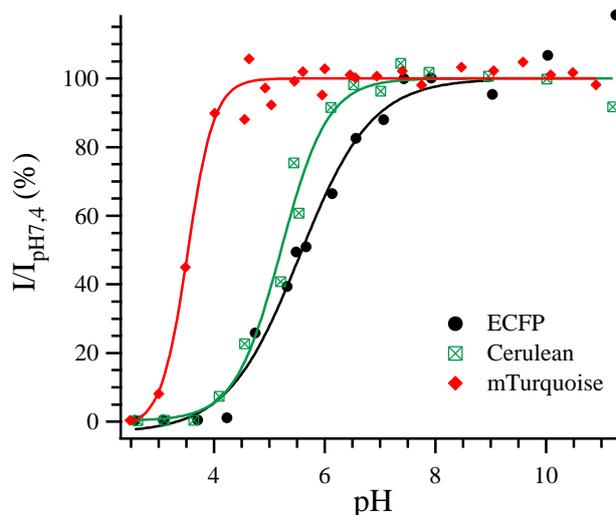


Figure 57 : Détermination du $pH_{1/2}$ de la mTurquoise. Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la mTurquoise.

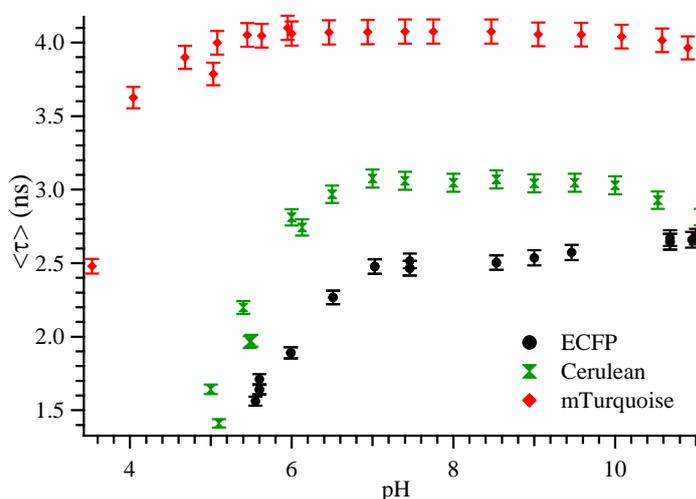


Figure 58 : Evolution de la durée de vie moyenne en fonction du pH pour la ECFP, Cerulean et la mTurquoise

C.III.1.2 ANALYSE DES RESULTATS.

C.III.1.2.a Comportement à pH très acide

Malgré des comportements spectraux très divers le long de la transition acide et des performances photophysiques très variées, les trois protéines ECFP, Cerulean et mTurquoise se conduisent de façon identique à pH très acide. En dessous d'une valeur de pH dépendant de la protéine, les spectres d'absorption et d'émission se singularisent par l'absence de structure avec une allure assimilable en première approximation à une gaussienne et un déplacement vers le bleu par rapport aux spectres à pH moins acide. A pH 2,5, le maximum du spectre d'absorption est situé à 414 nm et celui du spectre d'émission à 470 nm. En prenant comme référence le rendement quantique de chaque protéine connu à pH 7,4 (ϕ_{ref}), le rendement quantique d'émission de fluorescence de cette espèce (ϕ) ne dépasse pas $3,1 \cdot 10^{-3}$ (Tableau 8).

	ECFP	Cerulean
ϕ_{ref} (pH 7,4)	0,40 (121)	0,67
ϕ (pH 2,5)	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$

Tableau 8 : rendement quantique à pH 2,5 de la ECFP et de la Cerulean.

Les spectres d'absorption et d'émission ayant été enregistré environ toutes les 0,5 unités pH, il est possible de positionner approximativement la transition acide conduisant à l'obtention de spectres non structurés. L'examen de ces spectres permet d'identifier une valeur de pH inférieure que nous noterons $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$ correspondant, en partant des pH très acides, au pH du dernier spectre d'absorption que nous avons obtenus ayant la même allure que le spectre à pH 2,5. De la même façon, le pH correspondant au pH du premier spectre affichant une structure sera notée $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$. Les valeurs de ces deux pH sont rapportées dans le tableau ci-dessous et dépendent de la protéine (Tableau 9). Pour la ECFP et la Cerulean, les valeurs de ces deux pH se situent en dessous du pH ½. Ceci suggère que divers processus impliquant des équilibres acido-basiques de nature distincte contribuent à la transition de l'intensité de fluorescence induite par le pH. Un de ces processus, à l'origine de la déstructuration des spectres et leur déplacement vers le bleu, semble se produire à des pHs très acides inférieurs à $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$. Des études de dichroïsme circulaire nous permettrons d'apporter quelques éléments structuraux sur les phénomènes se produisant aux pHs très acides. Pour la mTurquoise, les valeurs de $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$ et $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$ encadrent la valeur du $\text{pH}_{1/2}$.

Protéine	ECFP	Cerulean	mTurquoise
$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$	4,2	4,1	3
$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$	4,7	4,5	3,5
$\text{pH}_{1/2} (\pm 0,1)$	5,6	5,2	3,4

Tableau 9 : Valeurs de $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$ et de $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$ pour la ECFP, la Cerulean et la mTurquoise. Comparaison avec la valeur du $\text{pH}_{1/2}$.

C.III.1.2.b Les différentes espèces spectrales.

Les trois protéines, ECFP, Cerulean et mTurquoise, présentent un comportement en fonction du pH variable : simple dans le cas de la mTurquoise, la transition en pH dans le cas de la ECFP et de la Cerulean apparaît plus complexe caractérisée par l'émergence de nouvelles bandes, par des déplacements spectraux spécifiques, etc (Tableau 10). A pH physiologique également, ces trois protéines aux propriétés spectrales en première approximation très similaires (spectres d'allure en double bande) présentent des différences notables : dépendance ou non du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation, dépendance ou non de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission, ... (Tableau 10).

	ECFP	ECFP-H148D	Cerulean	mTurquoise	
Caractère bimodal des spectres à pH neutre ?	Oui	Oui	Oui	Oui	
Rapport A_{430}/A_{450} à pH neutre	1,057	1,066	1,071	1,075	
Rapport I_{474}/I_{500} à pH neutre	1,262	1,299	1,306	1,353	
Dépendance du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation à pH neutre ?	Oui	Non	Non	Non	
Dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission à pH neutre ?	Oui	Très réduite	Pas de données	Pas de données	
Déplacement des spectres vers le rouge à pH acide ?	Oui	Non	Non	Non	
Dépendance du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation à pH acide 5,5 ?	Oui	Non	Non	Non	
Apparition d'une nouvelle bande d'émission vers 450-460 nm associée à un spectre d'absorption déplacé vers le bleu à pH acide ?	?	Très léger épaulement observé dans cette zone	Oui	Oui	Non
Evolution des spectres d'absorption sur une échelle de temps de quelques dizaines de minutes suite à un saut de pH neutre à pH 5 ?	Pas de données	Oui (118)	Oui	Pas de données	
Déplacement vers le bleu et perte de la structure des spectres d'absorption et d'émission à pH très acide ?	Oui	Oui	Oui	Oui	

Tableau 10 : Résumé des comportements spectraux et temporels observés dans la ECFP, la ECFP-H148D, la Cerulean et la mTurquoise.

La prise en compte de l'ensemble des données obtenues pour chacune de ces trois protéines et pour la ECFP-H148D, associée à la comparaison de leurs propriétés spectrales et temporelles et de leur évolution en fonction du pH met en lumière l'existence de plusieurs espèces

émissives spécifiques pour lesquelles nous pouvons émettre quelques hypothèses quant à leurs propriétés spectrales et temporelles. Ainsi, nous avons pu discerner les espèces spectrales suivantes :

Espèce spectrale principale : cette espèce, de durée de vie longue, possède des spectres d'absorption et d'émission présentant un caractère bimodal. Ils sont caractérisés par un rapport des amplitudes relatives (i) à 430 nm et à 450 nm du spectre d'absorption et (ii) à 474 nm et à 500 nm du spectre d'émission plus proche de ceux constatés dans la mTurquoise que de ceux présentés par la ECFP. Ces spectres pourraient être assimilés à ceux de la mTurquoise.

Espèce spectrale rouge $I_{pH7,4}$: cette espèce est associée à un spectre d'émission décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui de l'espèce principale. Sa durée de vie est plus courte que celle de l'espèce principale. Sa fraction molaire dans la ECFP s'élève au minimum à 25% à pH 7,4, valeur estimée grâce à l'étude du mutant ECFP-H148D(8). La présence de cette espèce se traduit par une forte dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission. Nous n'avons pas d'éléments précis concernant ses propriétés d'absorption. Sa présence pourrait être à l'origine d'un rapport A430/A450 plus faible dans le cas de la ECFP (Tableau 10)

Espèce spectrale rouge $I_{pHacide}$: Cette espèce est associée à un spectre d'émission décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui de l'espèce principale et présente également une durée de vie plus courte que l'espèce principale. Sa présence se manifeste par un déplacement vers le rouge du spectre d'émission associée à une perte de la structure fine suite à une acidification du milieu. Ce déplacement n'étant pas observé dans le cas de la Cerulean, de la ECFP-H148D et de la ECFP-H148D, Y145A, l'introduction de la mutation H148D conduit à une réduction drastique de la population de cette espèce voire à son élimination.

Espèce spectrale rouge $2_{pH7,4}$: cette espèce est spécifiquement observée suite à une excitation du côté des grandes longueurs d'onde du spectre d'absorption de la ECFP, typiquement pour des longueurs d'onde supérieures à 470 nm. Elle se manifeste par une dépendance de l'allure du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation. Son spectre d'émission est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à l'espèce principale ce qui se traduit par l'obtention d'un spectre d'émission non structuré et dont le maximum est déplacé de 15 nm vers les grandes longueurs d'onde suite à une excitation à 480 nm (Figure 28). Sa présence pourrait être à l'origine de l'épaulement du côté rouge du spectre d'absorption de la

ECFP non observé dans les autres dérivés étudiés jusqu'au présent : la ECFP-H148D, ECFP-Y145A, H148D, la Cerulean et la mTurquoise.

Espèce spectrale rouge₂_{pHacide} : Son spectre d'émission semble présenter une allure similaire à celle de l'espèce spectrale rouge₁_{pHacide} tout en étant décalé vers les grandes longueurs d'onde de moins d'une dizaine de nm. Elle se manifeste par un déplacement vers le rouge du spectre d'émission pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 470 nm.

Espèce spectrale Em460 : L'introduction de la mutation H148D dans la ECFP conduit à l'apparition, à pH acide, d'un épaulement du côté des courtes longueurs d'onde du spectre d'émission, vers 450-460 nm, similaire à celui observé dans la Cerulean. Cette nouvelle bande est associée à un spectre d'absorption situé, lui aussi, du côté des faibles longueurs d'onde du spectre d'absorption de la protéine vers 400 nm. La formation de cette espèce est lente et se produit sur une échelle de temps de quelques dizaines de minutes (116, 118).

Espèce Acide_{pH2,5} : De rendement quantique très faible, inférieure à $\sim 3 \cdot 10^{-3}$, cette espèce est caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission non structurés dont le maximum est situé à 414 nm et à 470 nm, respectivement. Cette espèce est formée en dessous d'une certaine valeur de pH très acide, dépendant de la protéine.

C.III.2 INFLUENCE DE LA NATURE DU RESIDU EN POSITION 148

Comme attendu, la nature du résidu en position 148 joue profondément sur les performances photophysiques de la protéine et sur sa sensibilité au pH. Globalement, les divers dérivés de la ECFP générés, portant une unique mutation en position 148 (ECFP-H148X, avec X=G, A, V, S, E, N, R) peuvent être classés en trois groupes, en se basant sur leur comportement spectral à pH neutre et en fonction du pH :

- protéines présentant un comportement de type ECFP : ECFP-H148R
- protéines présentant un comportement similaire à celui de la Cerulean et de la ECFP-H148D : ECFP-H148N
- protéines présentant un comportement spectral simplifié par rapport à celui de la Cerulean sans pour autant atteindre les performances de la mTurquoise et principalement caractérisé par la réduction de la population voire la suppression de l'espèce Em460 : ECFP-H148G, ECFP-H148A, ECFP-H148S et ECFP-H148E.

La protéine ECFP-H148V dont nous avons constaté que la maturation était faible n'a pas été étudiée.

Enfin, à pH très acide, le même comportement spectral que celui rapporté pour la ECFP, la Cerulean et la mTurquoise, à savoir la perte de la structure des spectres d'absorption et d'émission et leur déplacement vers le bleu a également été constaté pour toutes les protéines mutées en position 148. Dans la suite, nous ne détaillerons pas de nouveau cet aspect.

C.III.2.1 PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE LA ECFP-H148R

Comme indiqué précédemment, globalement la ECFP-H148R présente un comportement proche de celui de la ECFP.

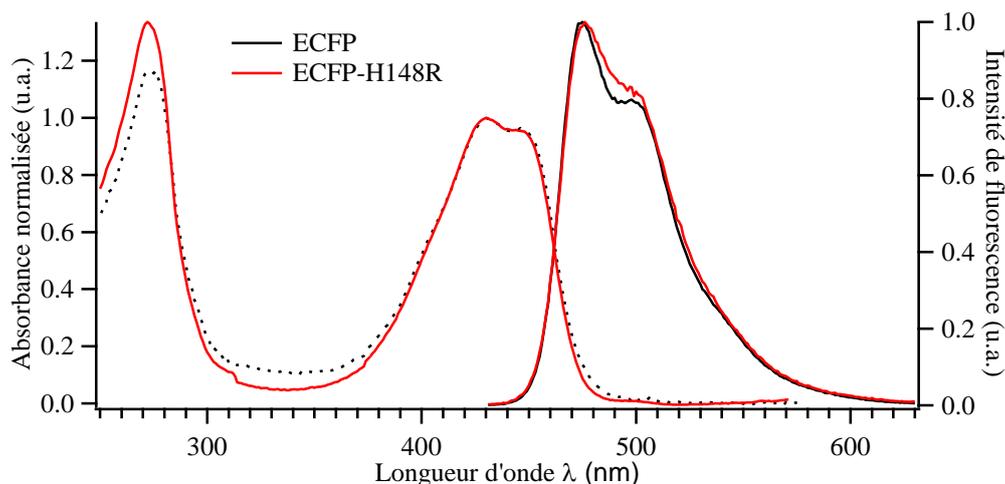


Figure 59 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la ECFP-H148R à pH 7,4. Comparaison avec ceux obtenus pour la ECFP dans les mêmes conditions expérimentales.

A pH physiologique, l'allure des spectres d'absorption et d'émission de la ECFP-H148R est similaire à celle pour la ECFP. Les spectres d'absorption des deux protéines sont comparables au niveau de la bande du chromophore suggérant la présence d'un pied de bande vers 460-490 nm dans la ECFP-H148R, comme pour la ECFP. Une légère différence est constatée sur l'allure du spectre d'émission qui est caractérisé par un épaulement vers 500 nm moins marqué que dans la ECFP, d'où un rapport d'intensité I_{474}/I_{500} plus faible (Figure 59, Tableau 11). Une autre similarité de comportement avec la ECFP est la dépendance de l'allure du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation pour des longueurs d'onde supérieures à 470 nm. Cette dépendance se traduit par un déplacement vers le rouge du spectre d'émission associé à une perte de structure. Ces résultats suggèrent l'existence de l'espèce rouge $2_{pH\ 7,4}$ dans le cas de la ECFP-H148R (Figure 60).

Nous avons enregistré le déclin d'émission de fluorescence de la ECFP-H148R à pH 7,4. La cinétique de décroissance de ce dérivé est plus rapide que celle de la ECFP et se traduit par une distribution de durées de vie fortement modifiée (Figure 61). En particulier, l'amplitude des composantes de temps court est augmentée. Concernant la composante de temps long,

nous avons constaté qu'elle est dédoublée dans le cas de la ECFP-H148R. Le déclin d'émission de fluorescence de la ECFP-H148R ayant été enregistré une seule fois, nous ne pouvons pas exclure que ce dédoublement résulte d'un artéfact d'analyse. Aussi, une première approche consiste à considérer la composante de temps long comme une moyenne du pic large, dédoublé vers 3 ns ce qui nous donne 49% comme borne supérieure pour la valeur de l'amplitude relative de la composante de temps long. Par rapport à la ECFP, l'introduction de la mutation H148R réduit donc la monoexponentialité du déclin, mais également les valeurs de toutes les composantes de temps. Ce dernier point suggère le renforcement des processus de désactivation non radiatif lors de l'ajout de la mutation H148R dans la ECFP.

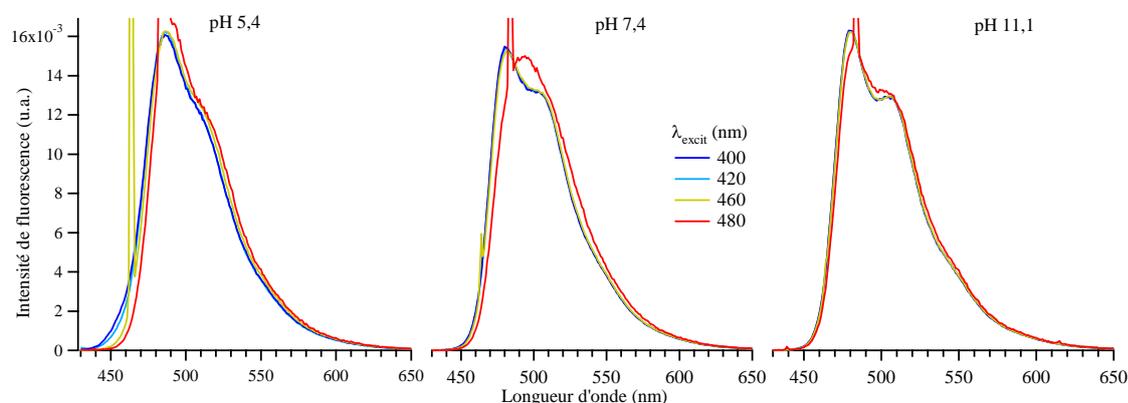


Figure 60 : Spectres d'émission de fluorescence de la ECFP-H148R enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation pour différents pH.

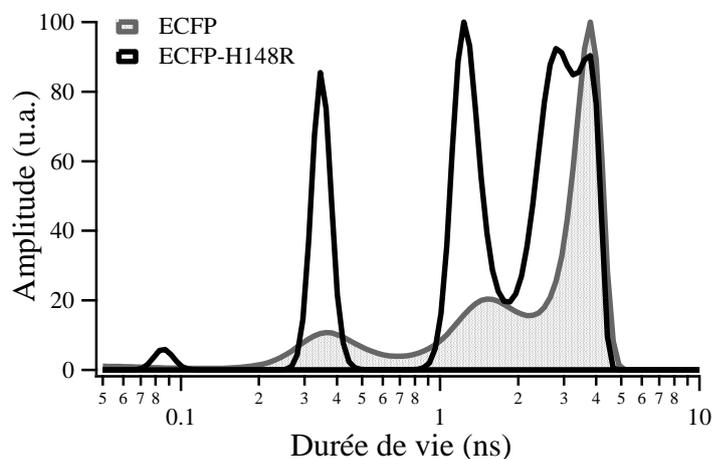


Figure 61 : Distribution de durées de vie de la ECFP-H148R à pH 7,4 et T=20°C. Comparaison avec la distribution de la ECFP.

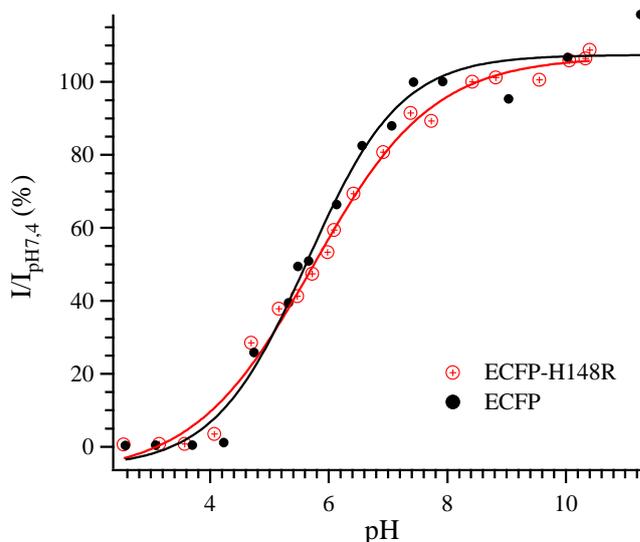


Figure 62 : Détermination du $\text{pH}_{1/2}$ de la ECFP-H148R. Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la ECFP-H148R et de la ECFP. Les valeurs d'intensité à pH 7,4 ont été prises comme références.

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	A_{430}/A_{450}	I_{474}/I_{500}	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$	$\text{pH}_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
ECFP	59 ± 5	$3,51 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,05$	1,057	1,262	4,2	4,7	5,6
ECFP-H148R	$\leq 49 \pm 3$	$\geq 3,13 \pm 0,08$	$2,04 \pm 0,04$	1,063	1,206	4	5	5,7

Tableau 11 : Caractéristiques photophysiques et valeurs du $\text{pH}_{1/2}$ de la ECFP-H148R. Comparaison avec la ECFP.

La dépendance en pH des propriétés spectrales de la ECFP-H148R se caractérise, comme pour la ECFP, par un déplacement vers le rouge d'une dizaine de nm des spectres d'émission associé à une réduction de la structure fine de ces spectres suite à une acidification du milieu (Figure 63). En parallèle, un épaulement vers 450-460 nm sur le spectre d'émission commence à apparaître pour des pH inférieurs à 6,4. Cette émission est associée à une absorption déplacée vers le bleu comme en témoigne la dépendance, pour des longueurs d'onde d'excitation comprise entre 400 et 460 nm de l'allure des spectres d'émission dans la zone de longueur d'onde 450-460 nm (Figure 60). Un épaulement analogue est observé dans la ECFP pour des pH inférieurs à 6 mais avec une amplitude plus faible. Ces changements spectraux sur le spectre d'émission s'accompagnent d'une réduction de l'épaulement de la bande d'absorption du chromophore vers 450 nm qui peut être décelée pour des pH inférieurs à 6,4 (Figure 63).

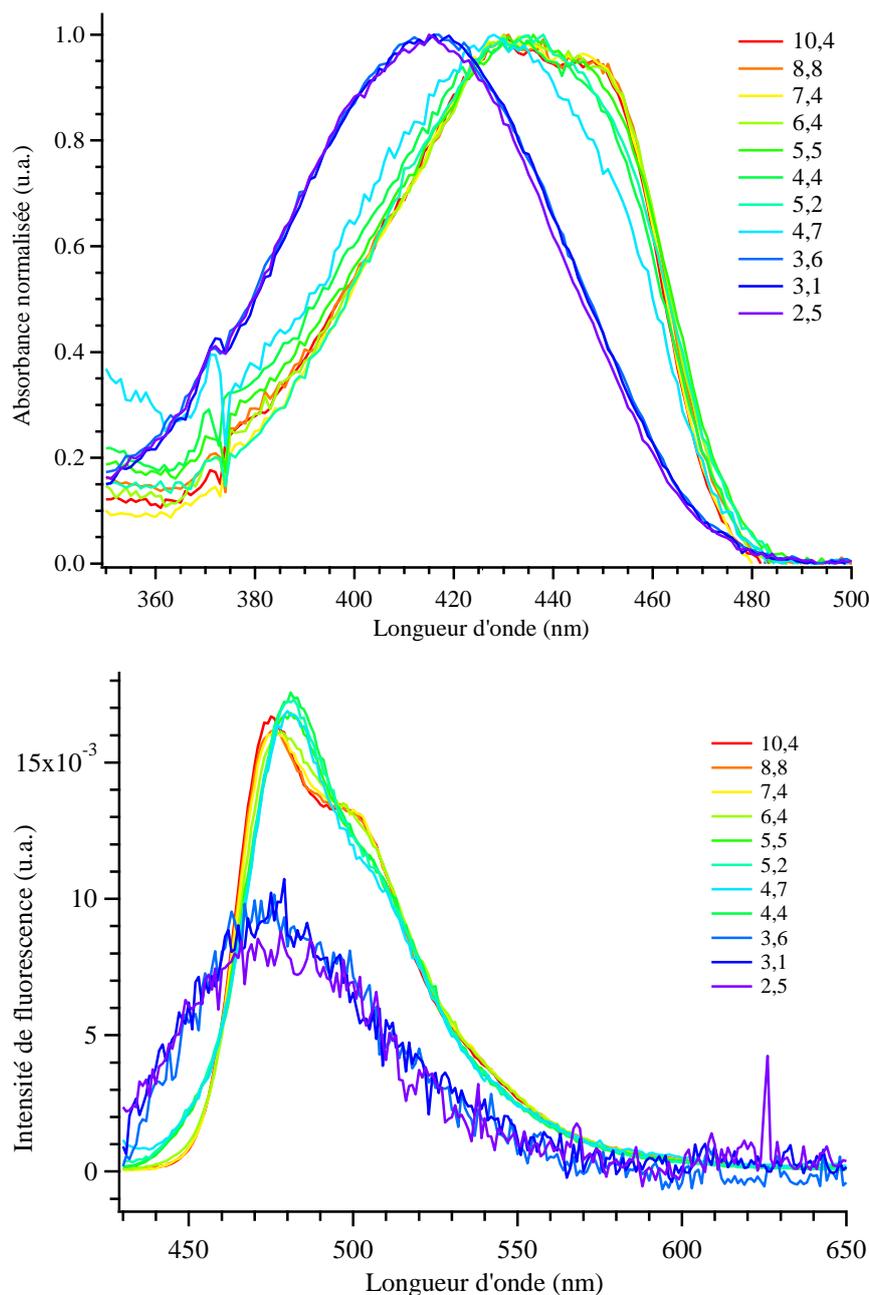


Figure 63 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (en haut) et d'émission de fluorescence (en bas) de la ECFP-H148R avec le pH.

Pour des pH plus acides, inférieurs à 4,7, nous retrouvons les mêmes changements spectraux profonds que ceux observés pour la ECFP et ses autres dérivés caractérisés par un déplacement vers le bleu et une perte totale de la structure des spectres d'absorption et d'émission (Figure 63, Tableau 11). Enfin, à pH basique, comme dans le cas de la ECFP, une augmentation de l'intensité de fluorescence est constatée suggérant l'existence d'une autre transition induite par le pH dans la zone des pHs basiques pour ces deux protéines.

C.III.2.2 PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE LA ECFP-H148N

L'introduction d'un résidu asparagine (N) à la place de l'histidine en position 148 (ECFP-H148N) modifie le comportement photophysique de la ECFP de façon similaire à celui constaté suite au remplacement de cette histidine par un acide aspartique (D) (ECFP-H148D ou Cerulean).

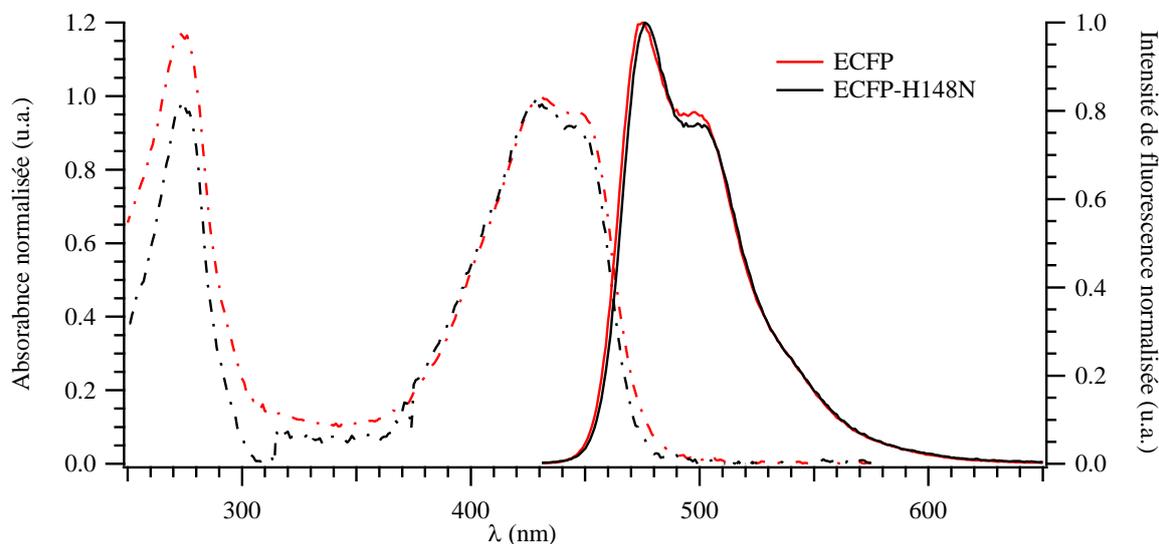


Figure 64 : Spectre d'absorption et d'émission de la ECFP et la ECFP-H148N à pH neutre. Les spectres ont été normalisés à 1.

Plus précisément, les différences dans les propriétés photophysiques de la ECFP-H148N par rapport à la ECFP sont :

- A pH 7,4, sur le spectre d'absorption, l'absence d'un pied de bande vers 460-490 nm et une réduction de l'amplitude relative de l'épaule vers 450 nm par rapport à celle au maximum vers 430 nm (Figure 64, Tableau 12)
- A pH 7,4, sur le spectre d'émission, une réduction de l'amplitude relative de l'épaule vers 500 nm par rapport à celle au maximum à 474 nm et une dépendance de l'allure des spectres d'émission avec la longueur d'onde d'excitation très fortement réduite. Contrairement à la ECFP ou encore la ECFP-H148R, le spectre d'émission pour une excitation à 480 nm est nettement moins déformé conservant encore une structure en double bande.
- En fonction du pH, l'absence de déplacement vers le rouge des spectres d'émission suite à une acidification du milieu et l'apparition d'une bande d'émission vers 460-490 nm associée à une absorption déplacée vers le bleu comme en témoigne la déformation dépendante de la longueur d'onde d'excitation du spectre d'émission dans

la région 430-460 nm à pH 5,4 (Figure 65). Une légère dépendance avec la longueur d'onde d'excitation de l'allure du spectre d'émission au-delà de 460 nm est observée à pH 5,4 alors que pour la ECFP un déplacement net vers le rouge sans modification majeure de l'allure avait été notée (Figure 28, p- 55 -). A pH 11, la ECFP-H148N ne présente plus aucune dépendance de son spectre d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

Ces différences entre la ECFP-H148N et la ECFP sont similaires à celles observées entre la ECFP-H148D ou encore la Cerulean et la ECFP. Le $\text{pH}_{1/2}$ de la ECFP-H148N reste du même ordre de grandeur que la ECFP-H148D, ou encore de la ECFP : il a été estimé à 5,7.

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	A_{430}/A_{450}	I_{474}/I_{500}	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$	$\text{pH}_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
ECFP	59 ± 5	$3,51 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,05$	1,057	1,262	4,2	4,7	5,6
Cerulean	64 ± 7	$3,80 \pm 0,13$	$3,05 \pm 0,01$	1,087	1,312	4,1	4,5	5,2
ECFP-H148D	72 ± 6	$3,99 \pm 0,09$	$3,34 \pm 0,01$	1,075	1,353	4	4,5	5,5
ECFP-H148N	68 ± 6	$3,70 \pm 0,12$	$2,93 \pm 0,01$	1,097	1,305	3,6	5	5,7

Tableau 12 : Caractéristiques photophysiques et valeurs du $\text{pH}_{1/2}$ de la ECFP-H148N. Comparaison avec la ECFP, la ECFP-H148D et la Cerulean.

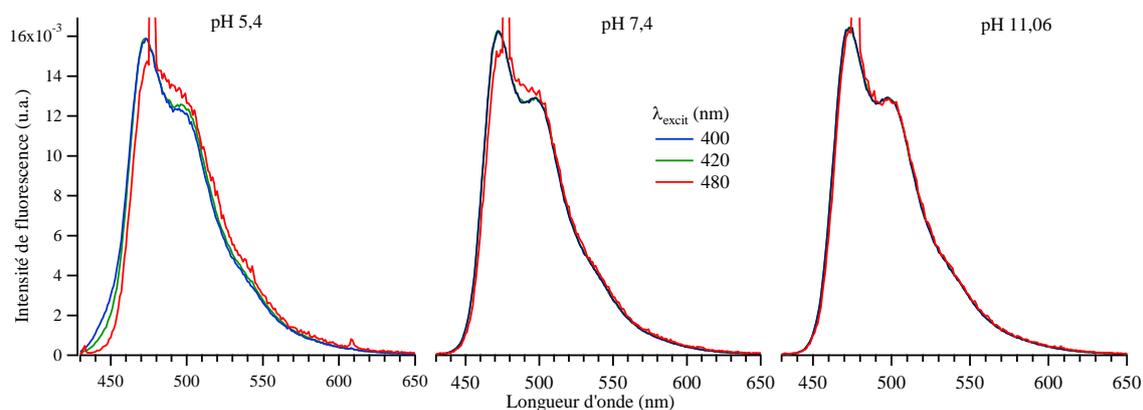


Figure 65 : Spectres d'émission de fluorescence de la ECFP-H148N enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation pour différents pH.

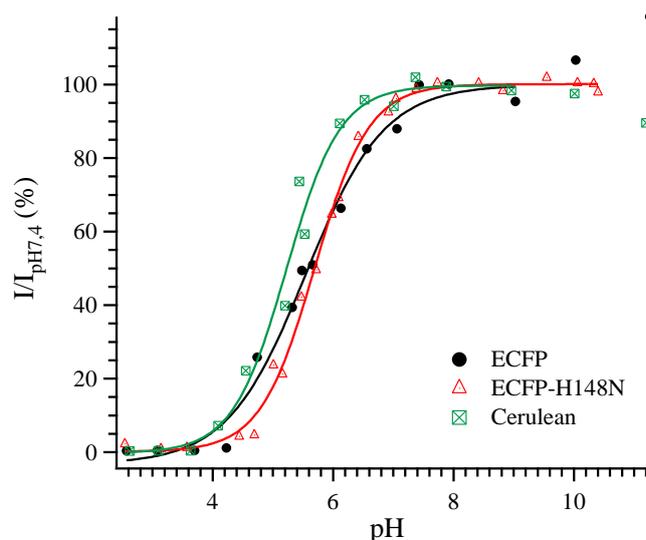


Figure 66 : Détermination du $pH_{1/2}$ de la ECFP-H148N. Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la ECFP-H148N comparée à celle de la Cerulean et de la ECFP.

Concernant les propriétés temporelles de la ECFP-H148N, l'analyse par MEM du déclin d'émission de fluorescence de cette protéine conduit à une distribution de durées de vie qui reste complexe, similaire à celle de la ECFP-H148D et de la Cerulean (Tableau 12). Elle se caractérise par la présence d'une composante de temps long dont l'amplitude relative et la valeur de la durée de vie sont du même ordre de grandeur que celles de la Cerulean. Ceci conduit à une durée de vie moyenne légèrement plus faible que pour la Cerulean (2,93 ns) à pH neutre (Tableau 12).

Par ailleurs, pour identifier une éventuelle dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission, nous avons enregistré les déclins d'émission de fluorescence de la ECFP-H148N à trois longueurs d'onde, 474 nm, 500 nm et 530 nm (Tableau 13). A pH 7,4, comme dans le cas de la ECFP-H148D, la variation de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission est plus faible que pour la ECFP mettant en lumière une amélioration de l'homogénéité des signaux de fluorescence. Cependant, la baisse de la durée de vie à 530 nm est plus importante que dans le cas de la ECFP-H148D. Cette observation associée à une valeur de l'amplitude relative de la composante de temps long plus faible dans la ECFP-H148N que dans la ECFP-H148D suggère que l'espèce $rougeI_{pH7,4}$ de durée de vie courte, émettant dans le rouge et dont la population a été réduite voire éliminée suite à l'introduction de la mutation H148D l'est moins lorsqu'une asparagine est en position 148.

Enfin, la réduction du pH dans le milieu s'accompagne également d'une baisse de la durée de vie, qui s'élève à 35 % entre pH 7,4 et pH 5,5 (Tableau 14).

λ (nm)	ECFP-H148N		ECFP-H148D		ECFP	
	$\langle \tau \rangle$ (ns) $\pm 0,01$	$\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%)	$\langle \tau \rangle$ (ns) $\pm 0,01$	$\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	$\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%)
474 nm	2,93	100,0	3,34	100,0	2,48	100,0
500 nm	2,86	97,7	3,29	98,5	2,32	93,5
530 nm	2,84	96,7	3,30	98,8	2,25	90,7

Tableau 13 : Variation de la durée de vie moyenne et pourcentage de perte de durée de vie par rapport à la durée de vie à 474 nm de la ECFP-H148N avec la longueur d'onde d'émission. Comparaison avec la ECFP et la ECFP-H148D.

pH	5,4	7,4	11
$\langle \tau \rangle$ (ns) ($\pm 0,06$ ns)	1,90	2,93	2,95

Tableau 14 : variation de la durée de vie moyenne à 474 nm ($\Delta\lambda=6\text{nm}$) de la ECFP-H148N en fonction du pH.

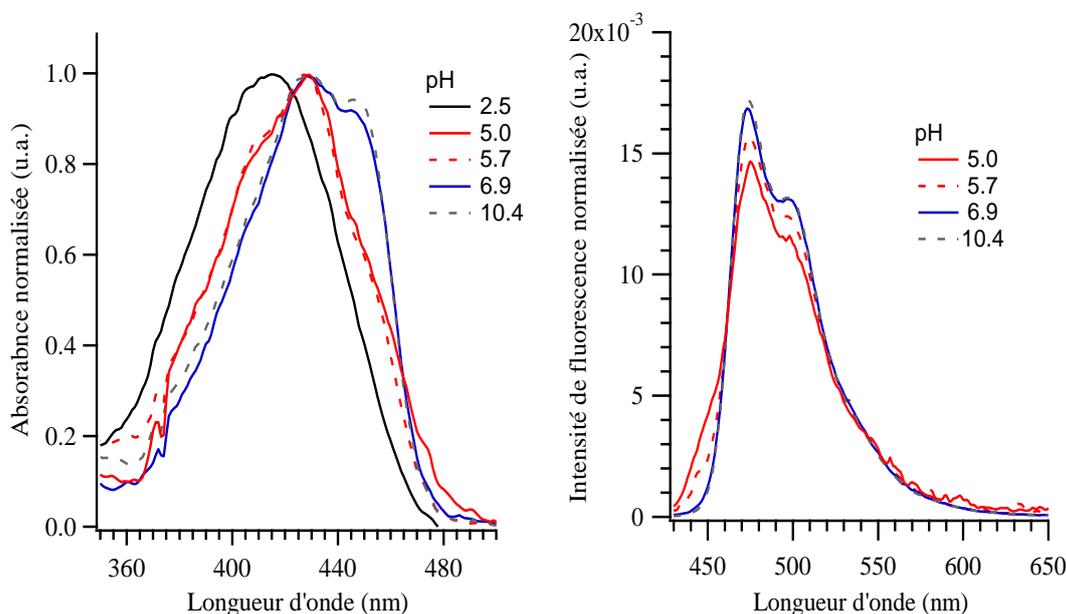


Figure 67 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et des spectres d'émission de fluorescence (à droite) de la ECFP-H148N avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

C.III.2.3 LES MONOMUTANTS EN POSITION 148 PRESENTANT UNE PHOTOPHYSIQUE SIMPLIFIEE

L'introduction d'un résidu glycine, alanine, sérine ou encore acide glutamique en position 148 sur la ECFP génère des dérivées présentant un comportement photophysique aussi bien à pH neutre qu'en fonction du pH très similaires. En particulier, le remplacement de l'histidine 148 par un de ces quatre résidus conduit à une simplification notable du comportement spectral de la ECFP. Pourtant ces résidus possèdent une chaîne latérale de taille, de pouvoir d'ionisation et de caractère hydrophobe ou hydrophile très distincts.

C.III.2.3.a Propriétés photophysiques des protéines ECFP-H148G, ECFP-H148A, ECFP-H148S et ECFP-H148E.

Les quatre mutants ECFP-H148G, ECFP-H148A, ECFP-H148S et ECFP-H148E présentent des spectres d'absorption et d'émission similaires conservant le caractère bimodal typique des protéines cyans à chromophore tryptophane (Figure 69). Leur comportement photophysique est caractérisé par

- l'absence de modifications spectrales suite à une variation de pH, notamment ni le déplacement vers le rouge des spectres d'émission (ECFP, ECFP-H148R), ni l'apparition d'un épaulement du côté bleu des spectres d'absorption et d'émission ne sont constatés (Cerulean, ECFP-H148D, ECFP-H148N). Ceci suggère que ces mutations défavorisent les espèces *rougeI_{pHacide}* et *Em460*.
- une dépendance de l'allure du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation et en fonction du pH non significative contrairement à ce qui se produit dans la ECFP (Figure 68). Ces observations indiquent que chacune des 4 mutations H148G, H148A, H148S et H148E défavorise les espèces *rouge2pH7,4* et *rouge2pHacide*.

Deux évolutions spectrales sont constatées suite à une réduction du pH. Tout d'abord, pour des pH compris entre 5,7 et 4,7, une réduction de l'intensité relative des épaulements à 500nm et à 450 nm des spectres respectivement d'émission et d'absorption concomitant avec l'apparition d'un épaulement vers 450-460 nm sur le spectre d'émission. Puis, pour des pH inférieurs à 4,7, un déplacement vers le bleu et une perte totale de la structure des spectres d'absorption et d'émission, comme dans le cas de la ECFP, de la Cerulean ou encore de la mTurquoise.

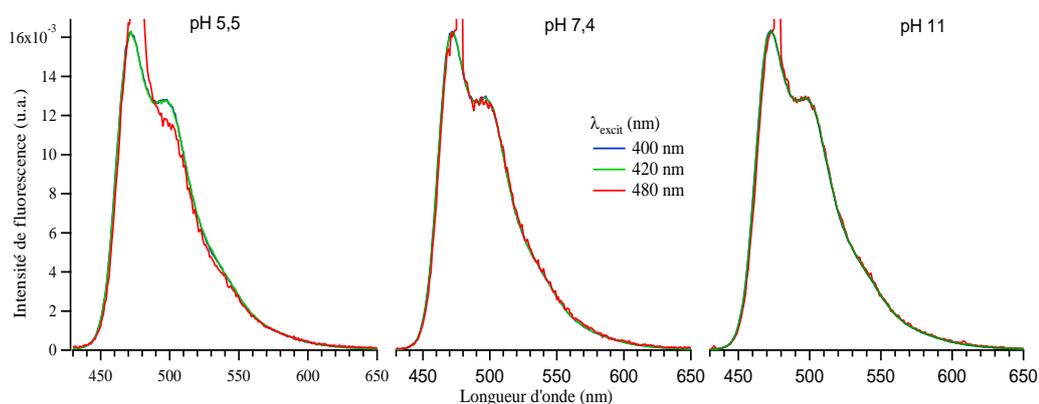


Figure 68 : Spectres d'émission de fluorescence de la ECFP-H148G enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation pour différents pH

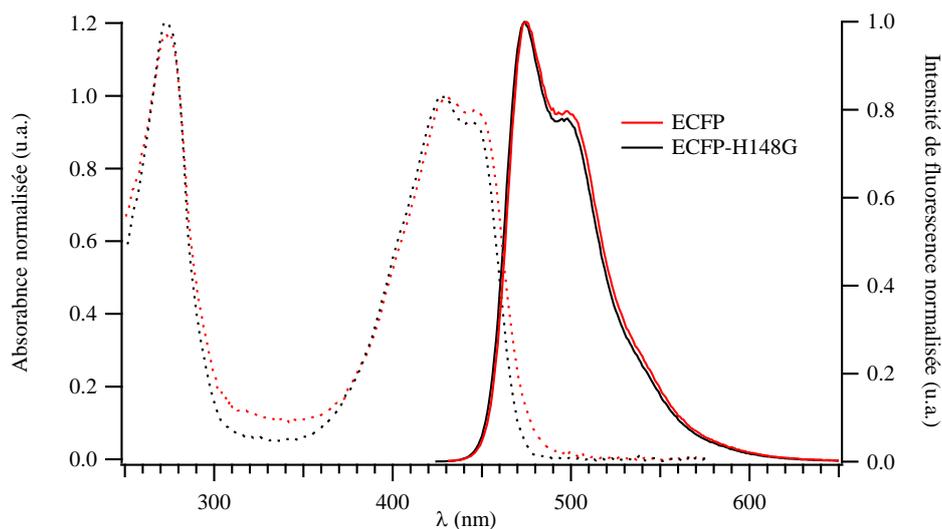


Figure 69 : Spectres d'absorption et d'émission de la ECFP-H148G et de la ECFP à pH neutre. Les spectres ont été normalisés à 1 au maximum des bandes d'absorption et d'émission du chromophore.

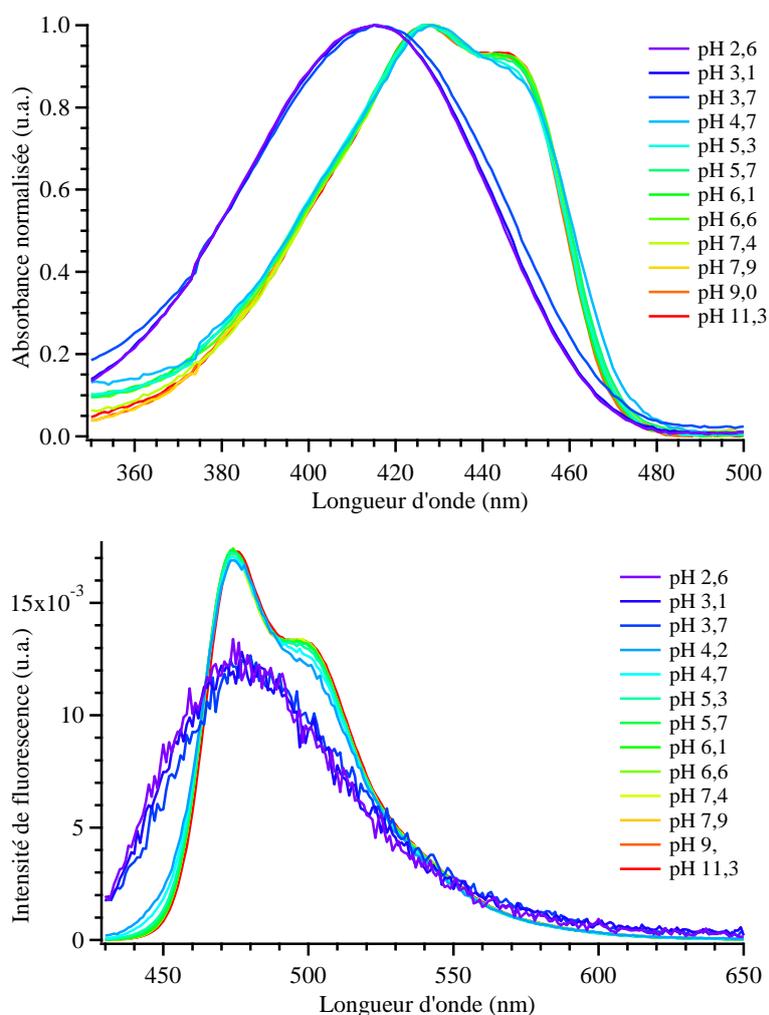


Figure 70 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (spectres du haut) et d'émission de fluorescence (spectres du bas) de la ECFP-H148G avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

Par ailleurs, la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH s'effectue selon une transition qui s'étale sur un domaine de pH de deux unités pH, similaire à ce qui a été constaté pour la Cerulean ou encore la ECFP-H148D, par exemple mais plus large que la transition se produisant pour la mTurquoise (Figure 71). Le pH de demi-transition est amélioré et est réduit de plus d'une unité pH par rapport à la ECFP pour les plus performantes pouvant ainsi descendre à 4,5 (Tableau 15). A titre d'exemple, alors que la ECFP perd 50% de son intensité de fluorescence entre pH 7,4 et pH 5,5, la ECFP-H148G n'en perd que 18 % et la ECFP-H148A, 7%.

Concernant les propriétés temporelles à pH 7,4, la distribution de durées de vie reste complexe, analogue à celle obtenue pour la Cerulean ou la ECFP-H148D, avec une composante de temps long majoritaire et des composantes de temps court (Figure 72). Néanmoins, ces mutations conduisent à une amélioration de la monoexponentialité des déclinés par rapport à la ECFP avec une augmentation de l'amplitude relative de la composante de temps long (Tableau 15). Elles induisent également une augmentation de la valeur des composantes de temps comparativement à la ECFP, suggérant une réduction des processus de désactivation non radiatif dans ces protéines. Nous avons, de plus, examiné la dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission par la ECFP-H148G. La variation de la durée de vie moyenne est comparable à celle présentée par la ECFP-H148D (Tableau 16), indiquant que l'amélioration de l'homogénéité des signaux de fluorescence est conservée dans la ECFP-H148G.

Par ailleurs, l'acidification du milieu s'accompagne également d'une diminution de la durée de vie moyenne avec une transition qui se situe à des pH inférieurs à celle de la ECFP en accord avec la réduction de la sensibilité en pH de ces protéines constatées au travers de la valeur du $pH_{1/2}$ (Tableau 15, Figure 71). Typiquement, la perte de durée de vie moyenne entre pH 7,4 et pH 5,5 pour la ECFP-H148G, la ECFP-H148A, la ECFP-H148S et la ECFP-H148E est significativement réduite et s'élève respectivement à 6%, 4%, 15% et 18%, sachant qu'elle a été estimée à 33 % pour la ECFP.

Partie C : Résultats expérimentaux

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	I_{430}/I_{450}	I_{474}/I_{500}	pH_{acide}^{inf}	pH_{acide}^{sup}	$pH_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
ECFP	59 ± 5	$3,51 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,05$	1,057	1,262	4,2	4,7	5,6
ECFP-H148G	68 ± 8	$4,08 \pm 0,12$	$3,31 \pm 0,06$	1,116	1,298	3,7	4,2	4,9
ECFP-H148A	74 ± 5	$3,79 \pm 0,10$	$3,15 \pm 0,06$	1,060	1,320	4	4,5	4,5
ECFP-H148S	72 ± 6	$3,88 \pm 0,08$	$3,17 \pm 0,06$	1,100	1,292	3,6	4,2	4,5
ECFP-H148E	67 ± 6	$3,88 \pm 0,10$	$3,15 \pm 0,06$	1,053	1,325	3,6	4,5	5,1

Tableau 15 : Caractéristiques photophysiques et valeurs du $pH_{1/2}$ des mutants ECFP-H148G, ECFP-H148A, ECFP-H148S et ECFP-H148E. Comparaison avec la ECFP.

λ (nm)	ECFP-H148G		ECFP-H148D	
	$\langle \tau \rangle$ (ns) $\pm 0,06$	$\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%)	$\langle \tau \rangle$ (ns) $\pm 0,01$	$\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%)
474 nm	3,37	100,00	3,34	100,0
500 nm	3,32	99,0	3,29	98,5
530 nm	3,28	97,5	3,30	98,8

Tableau 16 : Variation de la durée de vie moyenne et pourcentage de perte de durée de vie par rapport à la durée de vie à 474 nm de la ECFP-H148G avec la longueur d'onde d'émission. Comparaison avec la ECFP-H148D.

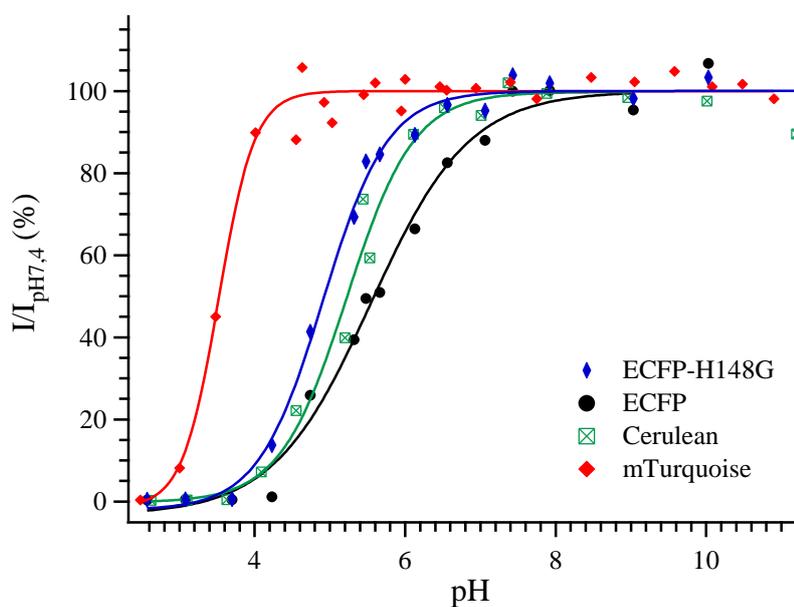


Figure 71 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la ECFP-H148G. Comparaison avec la ECFP, la Cerulean et la mTurquoise.

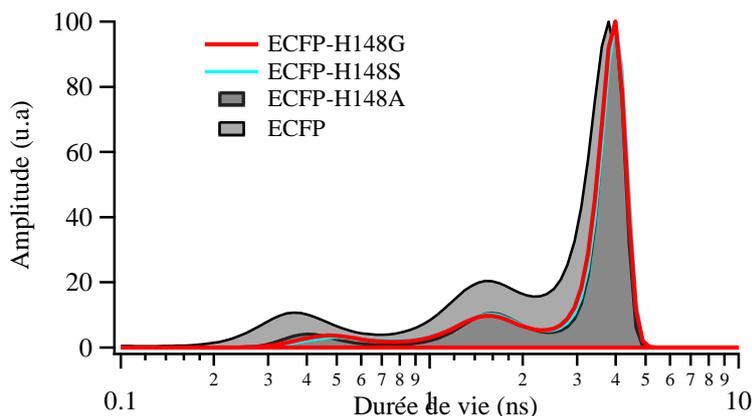


Figure 72 : Distribution de durées de vie de la ECFP-H148X (X=G,S,A) à pH 7,4 . Comparaison avec la ECFP.

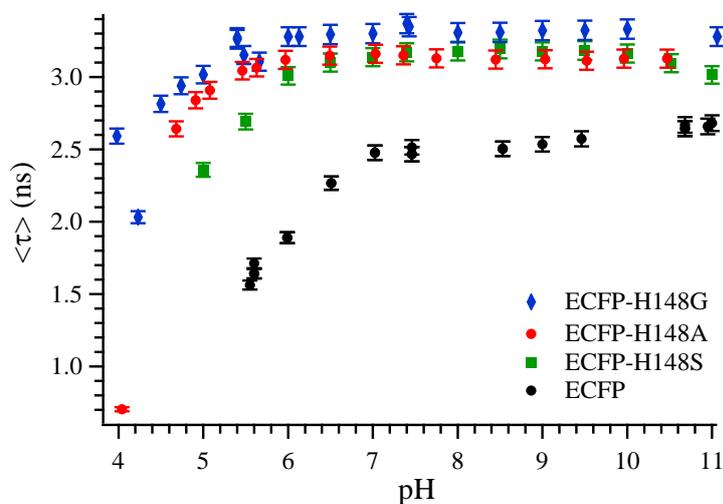


Figure 73 : Evolution de la durée de vie moyenne en fonction du pH pour les protéines ECFP-H148G, ECFP-H148A, ECFP-H148S et ECFP.

C.III.2.3.b La Cerulean-D148G.

Les études précédentes indiquent que l'introduction de chacune des quatre mutations introduites donne lieu à des améliorations du même ordre que celles constatées suite à l'insertion de la mutation H148D. Mieux encore, ces mutations permettent d'éliminer l'hétérogénéité spectrale liée à l'espèce Em460 observée à pH acide et de réduire la sensibilité au pH.

Parmi les quatre mutations, la H148G permet d'obtenir la meilleure performance en termes de durée de vie moyenne (valeur et sensibilité au pH, voir Tableau 15 et Figure 73). Nous avons souhaité vérifier l'apport de cette mutation dans la Cerulean. Pour ce faire, nous avons généré par mutagenèse dirigée le variant Cerulean-D148G dont nous présentons ci-après les caractéristiques photophysiques.

Les résultats obtenus montrent qu'effectivement, l'introduction de la mutation D148G dans la Cerulean permet de conserver les améliorations apportées suite au remplacement de

l'histidine 148 par un acide aspartique dans la ECFP (ECFP-H148D et Cerulean), voire même d'apporter d'autres améliorations en supplément. Plus précisément, la mutation H148G permet au même titre que la H148D

- de rendre la dépendance de l'allure des spectres d'émission avec la longueur d'onde d'excitation très mineure et ce quel que soit le pH (Figure 75). Elimination des espèces *rouge_{2pH7,4}* et *rouge_{2pHacide}*
- d'éliminer le déplacement vers le rouge du spectre d'émission suite à une acidification du milieu (Figure 74). Elimination de l'espèce *rouge_{1pHacide}*.
- d'améliorer la monoexponentialité des déclin et de défavoriser un processus de quenching dynamique conduisant à une amélioration de la durée de vie moyenne (Tableau 17).

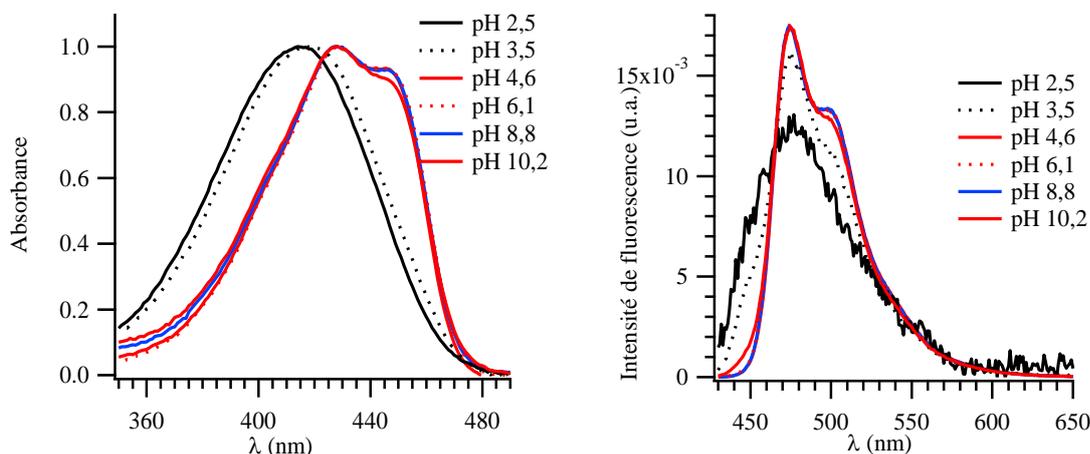


Figure 74 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la Cerulean-D148G avec le pH. Les spectres d'absorption ont été normalisés à 1 au maximum de la bande du chromophore, les spectres d'émission ont été normalisés à la même aire.

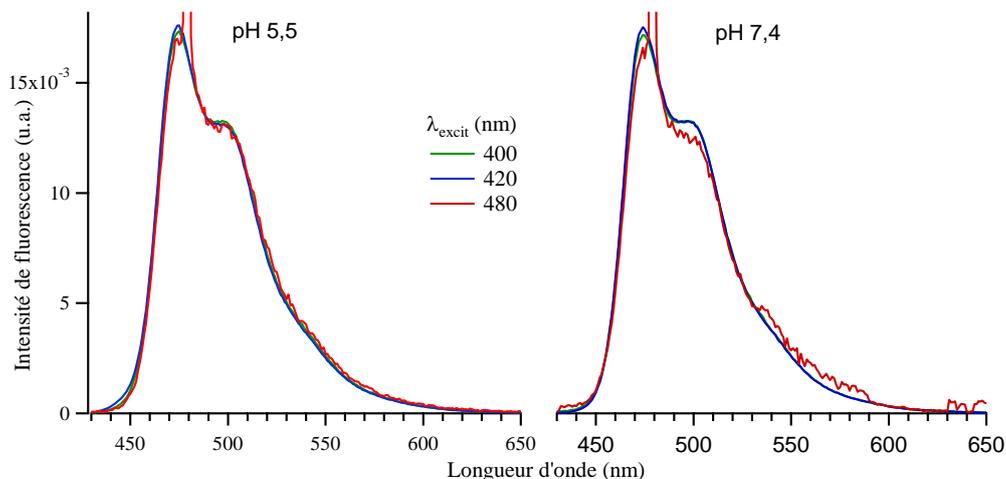


Figure 75: Spectres d'émission de fluorescence de la Cerulean-D148G enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation à pH 5,5 et 7,4.

En supplément, l'insertion d'une glycine en position 148 dans la Cerulean offre l'opportunité :

- d'éliminer l'espèce Em460 caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission déplacés vers le bleu, conduisant à une invariance des spectres d'absorption et d'émission sur une large gamme de pH
- de réduire la sensibilité au pH avec une valeur de pH de demi transition de 0,8 unité pH inférieure à celle estimée dans la Cerulean (Tableau 17, Figure 76). La perte de durée de vie moyenne entre pH 7,4 et 5,5 est estimée à ~3% alors qu'elle s'élève à ~32 % dans la Cerulean (Figure 77).

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	A_{430}/A_{450}	I_{474}/I_{500}	pH_{acide}^{inf}	pH_{acide}^{sup}	$pH_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
Cerulean-D148G	62 ± 9	$3,94 \pm 0,15$	$3,12 \pm 0,06$	1,105	1,314	3,6	4,2	4,4
Cerulean	64 ± 7	$3,80 \pm 0,13$	$3,05 \pm 0,01$	1,087	1,312	4,1	4,5	5,2
ECFP-H148G	68 ± 8	$4,08 \pm 0,12$	$3,31 \pm 0,06$	1,116	1,298	3,7	4,2	4,9
ECFP	59 ± 5	$3,51 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,05$	1,057	1,262	4,2	4,7	5,6

Tableau 17 : Caractéristiques photophysiques et valeurs du $pH_{1/2}$ du mutant Cerulean-D148G. Comparaison avec les dérivés Cerulean, ECFP-H148G et ECFP.

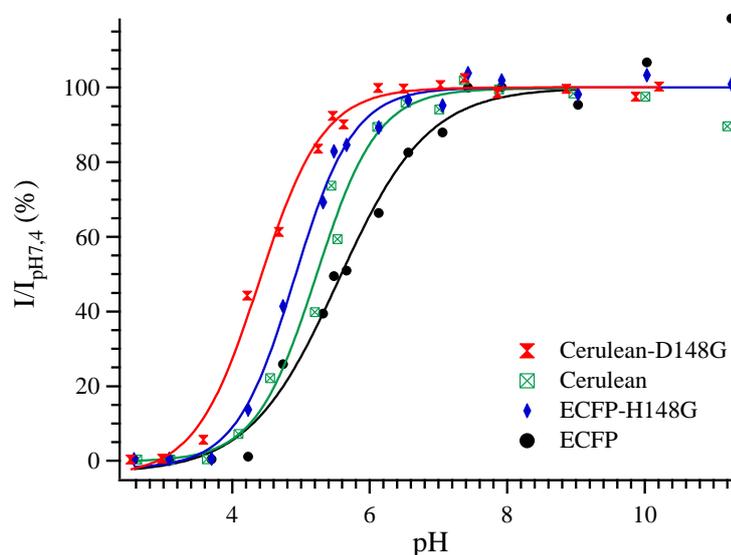


Figure 76 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la Cerulean-D148G. Comparaison avec la Cerulean, la ECFP-H148G et la ECFP.

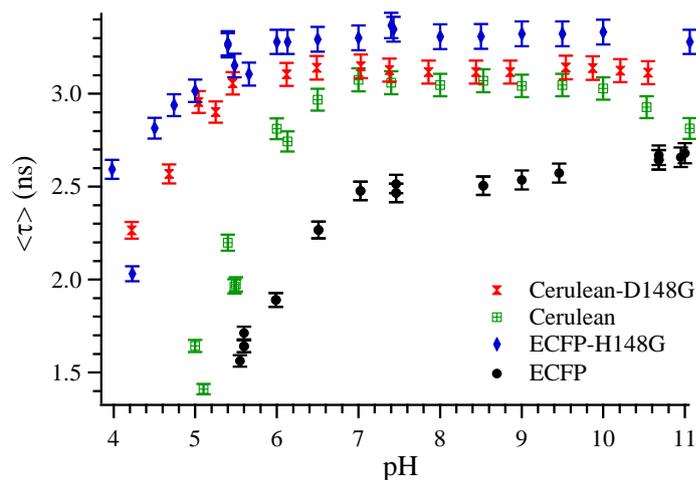


Figure 77 : Evolution en fonction du pH de la durée de vie moyenne de la Cerulean-D148G. Comparaison avec la Cerulean, la ECFP-H148G et la ECFP.

C.III.3 INTRODUCTION DE LA MUTATION T65S DANS LA ECFP : LA ECFP-T65S

La mutation T65S semble être la mutation clé dans la mTurquoise dont les performances sont nettement améliorées par rapport à celles de la SCFP3A(113). Nous avons examiné, suite à son introduction, les conséquences sur les propriétés spectrales et cinétiques et sur la sensibilité au pH de la ECFP. En parallèle à la ECFP-T65S, nous avons également étudié le dérivé ECFP-T65S, S72A, A206K. Les deux protéines, ECFP-T65S et ECFP-T65S, S72A, A206K, se comportant de façon similaire, nous détaillerons dans la suite les résultats obtenus dans le cas de la ECFP-T65S. Les grandeurs obtenues pour ECFP-T65S, S72A, A206K seront indiquées dans les tableaux.

C.III.3.1 PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES A PH NEUTRE

À pH neutre, les spectres d'absorption et d'émission de la ECFP-T65S sont similaires à ceux de la ECFP et de ses dérivés de caractère bimodal. Le spectre d'absorption présente une amplitude relative de l'épaule à 450 nm similaire à celle de la mTurquoise. L'introduction de la mutation T65S permet également de réduire le pied de bande vers 460-490 nm. Concernant le spectre d'émission, la différence constatée par rapport à la ECFP se situe au niveau de l'épaule à 500 nm dont l'amplitude relative est plus faible que dans la ECFP, proche de celle de la mTurquoise (Tableau 18). De plus, nous avons constaté que l'allure du spectre d'émission ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation contrairement à la ECFP.

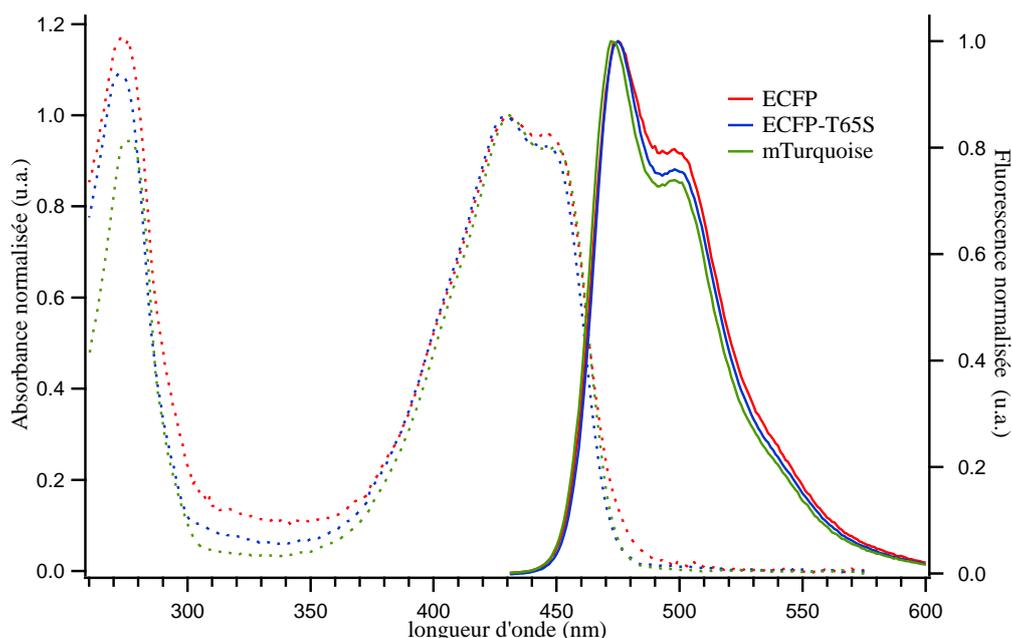


Figure 78 : Spectres d'absorption et d'émission de la ECFP/ECFP-T65S/mTurquoise à pH 7,4. Les spectres ont été normalisés à 1 au maximum des bandes d'absorption et d'émission du chromophore

Du point de vue des propriétés temporelles, l'allure de la distribution de durées de vie, obtenue suite à l'analyse par MEM du déclin d'émission de fluorescence à 474 nm, reste complexe, similaire à celle de la ECFP, traduisant un déclin non monoexponentiel. Elle est caractérisée par la présence d'une composante de temps long dont la population (a_L) est majoritaire et d'un ensemble de composante de temps court d'amplitude relative faible (Tableau 18).

	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Rendement quantique Φ	$\langle \tau \rangle$ (ns)	τ_L (ns)	a_L (%)	A_{430}/A_{450}	I_{474}/I_{500}
ECFP	29,0	0,40	$2,46 \pm 0,05$	$3,51 \pm 0,12$	59 ± 5	1,057	1,262
ECFP-T65S	28,5	0,59	$3,30 \pm 0,01$	$3,78 \pm 0,11$	77 ± 8	1,083	1,316
ECFP-T65S, S72A, A206K	n.d	n.d	$3,38 \pm 0,06$	$3,76 \pm 0,14$	81 ± 10	1,090	1,337

Tableau 18 : Propriétés photophysiques de la ECFP, la ECFP-T65S et la ECFP-T65S, S72A, A206K à pH neutre.

L'analyse de cette distribution et sa comparaison avec celle de la ECFP indique que l'introduction de la mutation T65S a deux répercussions :

- l'amélioration de la monoexponentialité du déclin d'émission avec une amplitude relative de la composante majoritaire accrue.

- La réduction d'un quenching dynamique caractérisé par une augmentation de la valeur de la durée de vie de toutes les composantes de temps.

Ces deux facteurs combinés conduisent à une amélioration de la durée de vie moyenne en accord avec l'augmentation du rendement quantique de la ECFP-T65S par rapport à la ECFP.

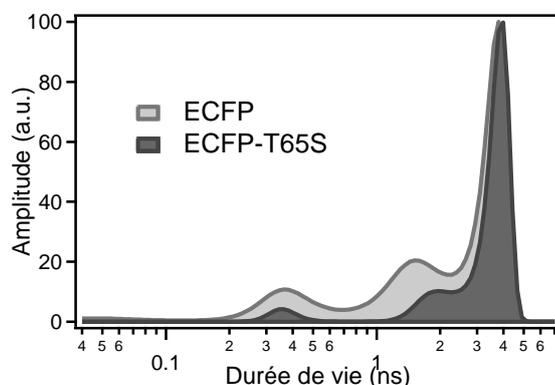


Figure 79 : Distribution de durées de vie de l'ECFP et de l'ECFP-T65S à pH 7,4 et T= 20°C.

Par ailleurs, nous avons enregistré les déclins d'émission de la ECFP-T65S à différentes longueurs d'onde d'émission. Contrairement à la ECFP, la durée de vie moyenne de la ECFP-T65S ne varie pas de façon significative avec la longueur d'onde d'émission pour des longueurs d'onde supérieures à 474 nm. En revanche, pour des longueurs d'onde inférieures à cette valeur, une réduction de la durée de vie moyenne a été constatée. Elle est du même ordre de grandeur que dans la ECFP (Figure 80).

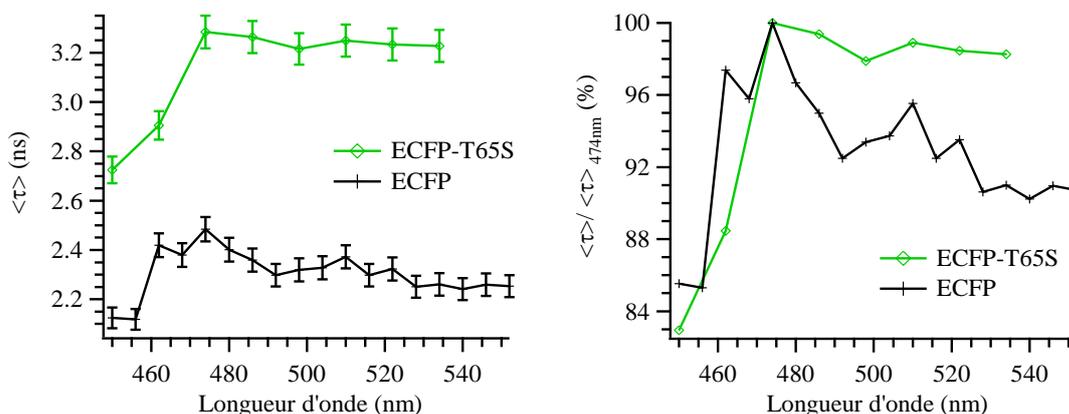


Figure 80 : Variation de la durée de vie moyenne $\langle \tau \rangle$ (ns) et du rapport $\langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_{474 \text{ nm}}$ (%) en fonction de la longueur d'onde d'émission.

C.III.3.2 SENSIBILITE AU PH

La dépendance des propriétés spectrales de la ECFP-T65S avec le pH se traduit par une légère perte de la structure du spectre d'absorption avec un abaissement de l'épaule vers 450

nm assez similaire à ce qui a déjà été observé dans le cas de la ECFP (Figure 82). Cet abaissement est détectable dans la ECFP-T65S pour des pH inférieurs à 5,7. En parallèle, le spectre d'émission subit lui aussi une forte réduction de l'intensité relative de l'épaulement vers 500 nm concomitant avec l'apparition d'un épaulement vers 450-460 nm. En revanche, nous ne constatons plus de déplacement significatif vers le rouge du spectre d'émission suite à l'acidification du milieu. De même, l'allure des spectres d'émission à pH acide ne présente pas de dépendance avec la longueur d'onde d'excitation. Ces observations suggèrent que la population des espèces à l'origine (i) du déplacement vers le rouge du spectre d'émission (espèce *rouge* $I_{pHacide}$) et (ii) de la modification de l'allure du spectre d'émission avec la longueur d'onde d'excitation (*rouge* $I_{pHacide}$) a été réduite voire éliminée suite à l'introduction de la mutation T65S. Enfin, les spectres spécifiques à l'espèce *acide* $pH_{2,5}$ apparaissent pour des pH inférieurs à 4,3. La transition acide reste caractérisée par une perte totale d'intensité de fluorescence entre pH 7,4 et 3,5 avec une valeur de $pH_{1/2}$ estimée à 4,5 plus faible de 1,1 unité pH par rapport à la ECFP (Tableau 19). Cette diminution de la sensibilité au pH suite à l'introduction de la mutation T65S se traduit également par une diminution plus modeste de la durée de vie moyenne entre pH 7,4 et 5,5, à savoir 16% contre 33% pour la ECFP (Figure 81).

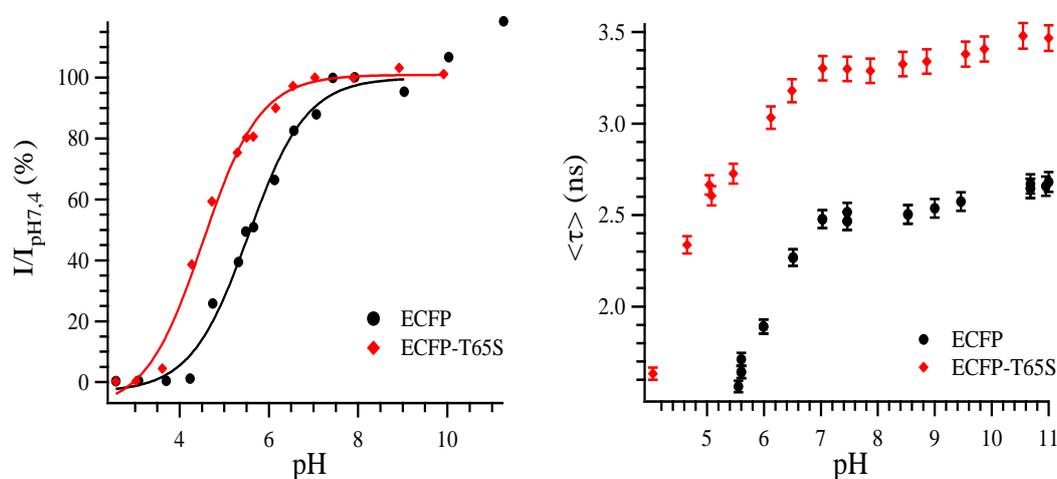


Figure 81 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence (à gauche) et de la durée de vie moyenne (à droite) de la de ECFP-T65S. Comparaison avec la ECFP.

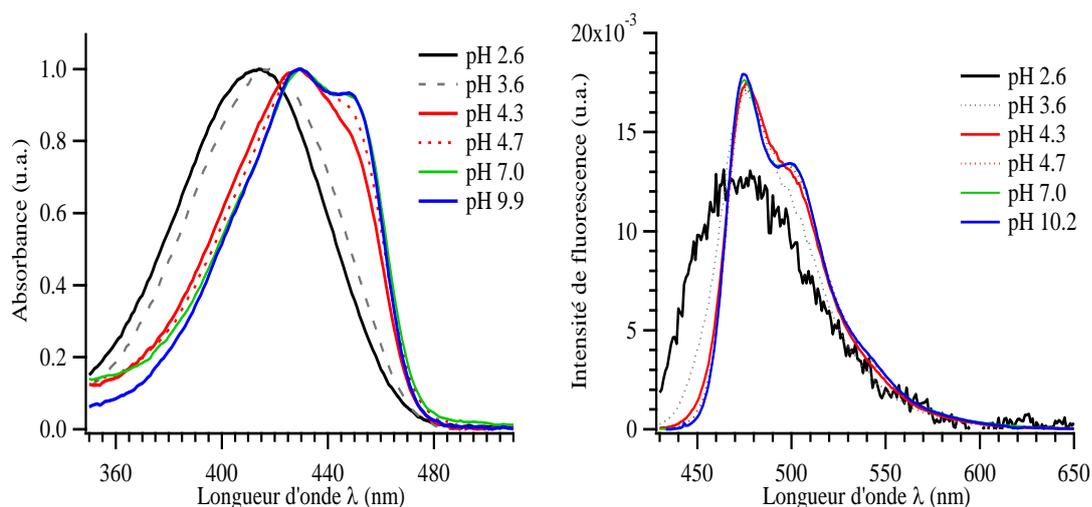


Figure 82 : Influence du pH sur l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et d'émission de fluorescence (à droite) de la ECFP-T65S.

	$\text{pH}_{1/2} (\pm 0,1)$	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$	$\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$
ECFP	5,5	4,2	4,7
ECFP-T65S	4,5	3,6	4,3
ECFP-T65S, S72A, A206K	4,6	3,6	4,2

Tableau 19 : Valeurs des $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{inf}}$ et $\text{pH}_{\text{acide}}^{\text{sup}}$ pour la ECFP, la ECFP-T65S et la ECFP-T65S, S72A, A206K. Comparaison avec la valeur du $\text{pH}_{1/2}$.

C.III.3.3 SYNTHÈSE DES RESULTATS

L'étude précédente met en évidence le rôle crucial de la mutation T65S dans l'amélioration du comportement photophysique de la ECFP. Plus précisément, cette mutation permet de :

- Améliorer l'homogénéité des propriétés d'émission de fluorescence de la protéine à pH physiologique : le déclin d'émission de fluorescence devient plus monoexponentiel et la durée de vie moyenne varie peu avec la longueur d'onde. Cette mutation réduit voire élimine une population de durée de vie courte et présentant un spectre d'émission déplacé vers le rouge.
- Améliorer le rendement quantique et la durée de vie moyenne.
- Réduire la sensibilité en pH de la ECFP : le $\text{pH}_{1/2}$ est déplacé d'environ une unité pH vers les pH plus acides et le pourcentage de perte de la durée de vie moyenne entre pH 7,4 et 5,5 est fortement diminué.
- Réduire l'hétérogénéité spectrale de la ECFP à pH acide : la mutation T65S semble éliminer l'espèce *rouge*_{pHacide} responsable du déplacement vers le rouge constaté dans

le ECFP, et l'espèce *rouge2_{pHacide}* à l'origine de la dépendance des spectres d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

C.III.4 LES DOUBLES MUTATIONS T65S-H148X, X=G, S, E, ET D. L'AQUAMARINE, UNE PROTEINE CYAN PERFORMANTE.

Nous venons de montrer que l'introduction de résidus bien spécifiques en position 148 avaient des répercussions très positives à la fois sur les performances photophysiques (monoexponentialité et durée de vie moyenne accrue, réduction de l'hétérogénéité des signaux, ...) et sur la sensibilité au pH (pH_{1/2} abaissé, perte en intensité et en durée de vie entre pH 7,4 et 5,5 significativement réduite, ...). D'un autre côté, nous obtenons des améliorations analogues suite à l'introduction de la mutation T65S. Pour autant, ni les meilleurs dérivés portant une mutation en position 148, ni la ECFP-T65S ne présentent des performances photophysiques à la hauteur de celles de la mTurquoise. Dans un premier temps, nous avons introduit la mutation T65S dans la Cerulean (Cerulean-T65S) afin d'avoir une première idée de l'impact du couplage des mutations T65S et H148D sur les propriétés photophysiques et la sensibilité au pH des dérivés de la ECFP. Dans un second temps, nous avons couplé la mutation T65S avec les mutations H148X les plus performantes examinées précédemment, mais également avec la mutation H148D, permettant ainsi de former des dérivés de la ECFP aux propriétés quasi-idéales et ne portant qu'un nombre limité de mutations, à savoir uniquement deux.

C.III.4.1 LA CERULEAN-T65S

Nous avons réalisé une étude détaillée des propriétés photophysiques de la Cerulean-T65S. Du point de vue des propriétés spectrales, cette étude montre qu'à pH physiologique, la Cerulean-T65S a un comportement similaire à celui de la Cerulean. Outre la conservation du caractère bimodal des spectres d'absorption et d'émission (Figure 83), les spectres d'émission sont indépendants de la longueur d'onde d'excitation (Figure 85).

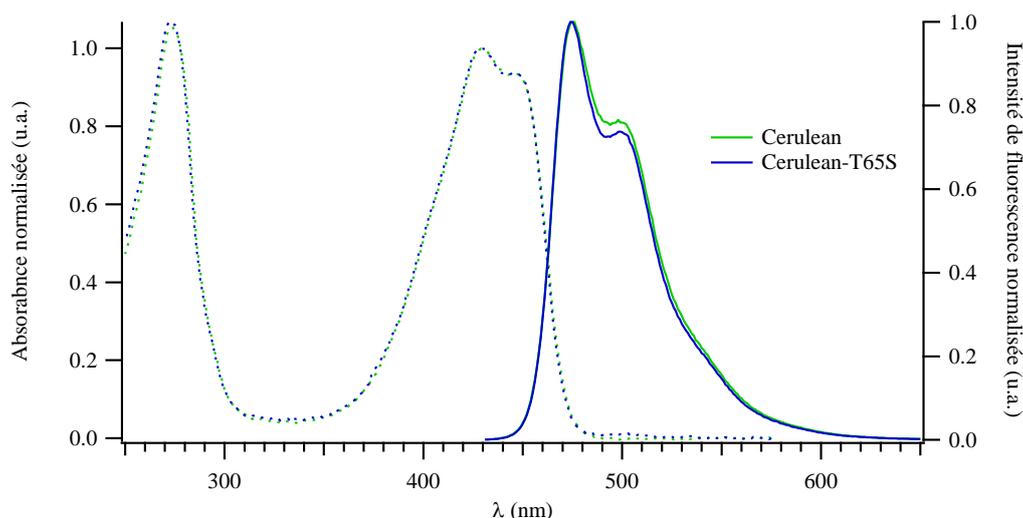


Figure 83 : Spectres d'absorption et d'émission de la Cerulean-T65S et de la Cerulean à pH neutre. Les spectres ont été normalisés à 1 au maximum des bandes d'absorption et d'émission du chromophore.

Du point de vue des propriétés temporelles, comme pour la ECFP-T65S, l'introduction de la mutation T65S dans la Cerulean conduit à une amélioration nette de la monoexponentialité du déclin d'émission de fluorescence ce qui se traduit par une distribution de durées de vie simplifiée, comparable à celle de la mTurquoise (Figure 84). Elle est formée d'une composante de temps très majoritaire avec une amplitude relative de 84 ± 11 % suivie de composantes de temps plus court minoritaires (Tableau 20). Une comparaison de la distribution de durées de vie de la Cerulean-T65S avec celle de la Cerulean montre que suite à l'introduction de la mutation T65S, les composantes de temps, en particulier la composante majoritaire, sont nettement déplacées vers les plus hautes valeurs de durée de vie. L'introduction de la mutation T65S semble défavoriser des processus de désactivation non radiatifs. Par rapport à la Cerulean, ceci conduit à une augmentation de la valeur de la durée de vie moyenne et du rendement quantique de l'ordre de 25 à 30 % et dont les valeurs ont été estimées respectivement à $3,96 \pm 0,04$ ns et à 0,84.

	ϵ ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Rendement quantique Φ	$\langle \tau \rangle$ (ns)	τ_L (ns)	a_L (%)	pH $\frac{1}{2}$
ECFP	29,0	0,40	$2,46 \pm 0,05$	$3,51 \pm 0,12$	59 ± 5	5,6
ECFP-T65S	28,5	0,59	$3,3 \pm 0,01$	$3,78 \pm 0,11$	77 ± 8	4,5
Cerulean	29,2	0,67	$3,05 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,13$	64 ± 7	5,2
Cerulean-T65S	34,8	0,84	$3,96 \pm 0,04$	$4,17 \pm 0,09$	83 ± 11	3,6

Tableau 20 : Caractéristiques photophysiques et valeurs de pH $\frac{1}{2}$ de la Cerulean-T65S. Comparaison avec la Cerulean, la ECFP-T65S et la ECFP

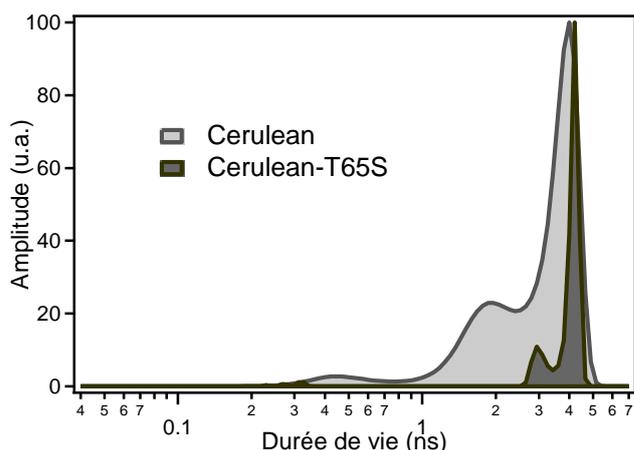


Figure 84 : distribution de durées de vie de la Cerulean-T65S et de la Cerulean à pH 7,4 et T=20°C

Par ailleurs, concernant l'influence du pH, comme dans le cas de la Cerulean, aucun déplacement vers le rouge du spectre d'émission n'est constaté suite à une acidification du milieu. L'allure des spectres d'émission est également indépendante de la longueur d'onde d'excitation quelque soit le pH et en particulier à pH acide (Figure 85). En revanche, nous n'observons plus le déplacement vers le bleu des spectres d'absorption et d'émission relevé dans la Cerulean pour des pH compris entre 5,5 et 4,5. Ceci indique que l'introduction de la mutation T65S dans la Cerulean permet de contrer la formation de l'espèce *Em460*. Enfin, pour des pH très acides, inférieurs à 3,6, la Cerulean-T65S a un comportement identique à toutes les autres protéines déjà étudiées avec un déplacement et une perte de la structure fine des spectres d'absorption et d'émission.

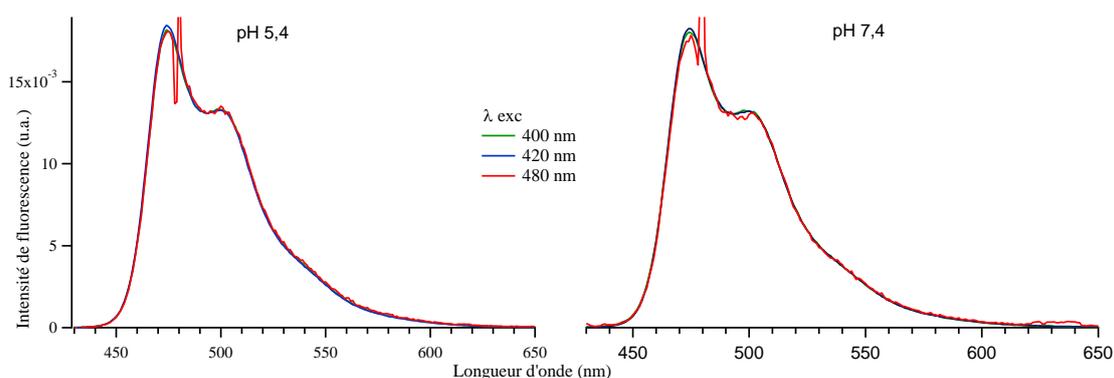


Figure 85 : Spectres d'émission de fluorescence de la Cerulean-T65S enregistrés à différentes longueurs d'onde d'excitation à pH 5,5 et pH 7,4.

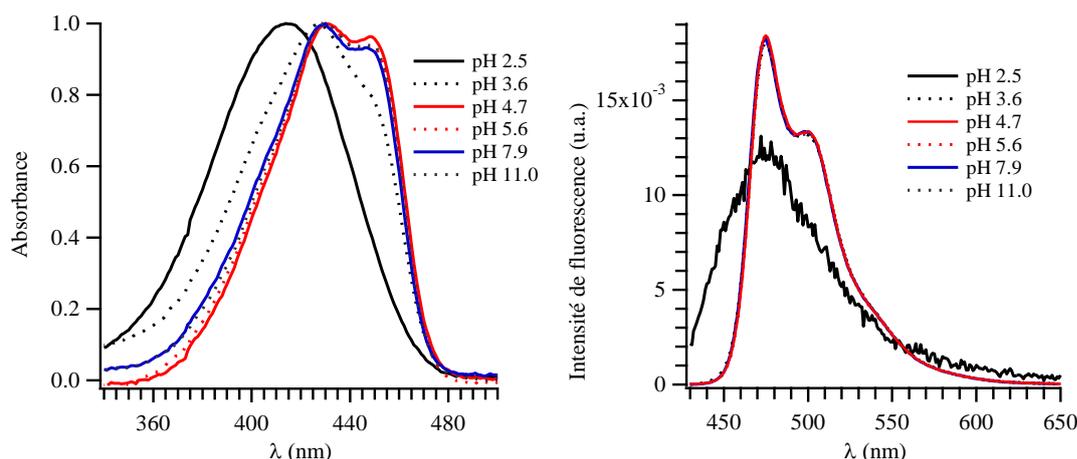


Figure 86 : Influence du pH sur l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et d'émission de fluorescence (à droite) de la Cerulean-T65S.

La simplification du comportement à pH acide de la Cerulean suite à l'introduction de la mutation T65S s'accompagne d'une réduction de la valeur de $pH_{1/2}$ de 1,6 unité pH par rapport à la Cerulean (Figure 87). Le $pH_{1/2}$ atteint dorénavant des valeurs inférieures à 4, estimé à 3,6. La durée de vie moyenne présente un large domaine d'invariance qui s'étend entre pH 5 et pH 10 alors que pour la Cerulean, ce domaine était restreint entre pH 6,5 et 10 (Figure 88).

L'ensemble des résultats obtenus sur la Cerulean-T65S indique que les apports de la mutation T65S mis en évidence lors de son introduction dans la ECFP sont conservés lorsqu'elle est introduite dans la Cerulean. Mieux encore, l'introduction de la mutation T65S dans la Cerulean permet d'inhiber la formation de l'espèce Em460, associée à une forme isomérisée c_2 CFP (Figure 40 p- 70 -) du chromophore, conduisant à une simplification notable des propriétés d'émission de fluorescence sur une large gamme de pH.

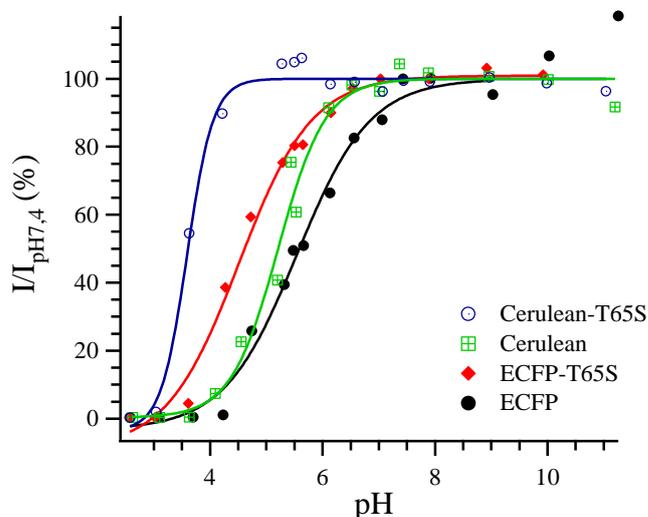


Figure 87 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de la Cerulean-T65S. Comparaison avec la Cerulean, la ECFP-T65S et la ECFP.

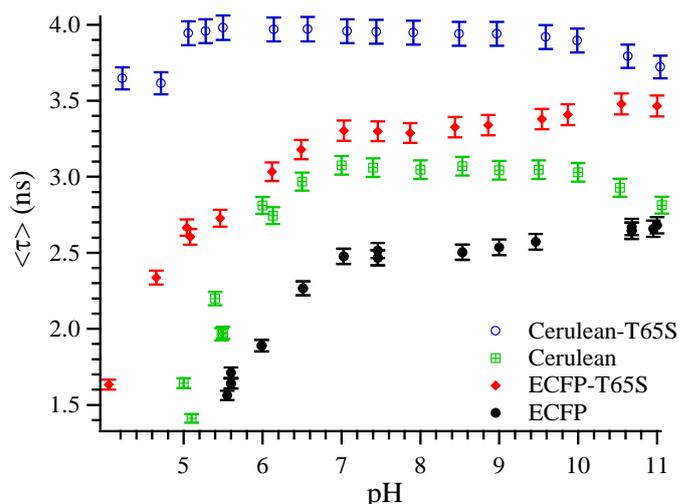


Figure 88 : Evolution en fonction du pH de la durée de vie moyenne de la Cerulean-T65S. Comparaison avec la Cerulean, la ECFP-T65S et la ECFP.

C.III.4.2 L'AQUAMARINE ET LES DOUBLES MUTATIONS.

En couplant la mutation T65S aux mutations en position 148 les plus performantes (H148X, X=G,S,E) mais également à la mutation H148D, nous avons généré des protéines ne possédant que deux mutations par rapport à la ECFP (ECFP-T65S,H148G, ECFP-T65S,H148E, ECFP-T65S,H148S et ECFP-T65S,H148D). En ne considérant que les quatre premiers critères du cahier de charges (cf. p- 73 -), toutes présentent des performances analogues à la Cerulean-T65S voire, pour certaines, meilleures que la mTurquoise.

En termes de modifications spectrales suite à une variation de pH, elles ne présentent que les perturbations constatées à pH très acide dans la ECFP et dans tous les dérivés étudiés au cours de ce travail, et associées à un déplacement vers le bleu et une perte de la structure des spectres d'absorption et d'émission (Figure 91). Le pH de demi-transition de tous ces doubles mutants est proche voire inférieur à 4 (Figure 92, Tableau 21). La plus performante de ces doubles mutants, la ECFP-T65S-H148G, présente une valeur de $\text{pH}^{1/2}$ de 3,3. Nous avons nommé ce mutant Aquamarine dont les spectres d'absorption et d'émission sont indiqués ci-dessous (Figure 89).

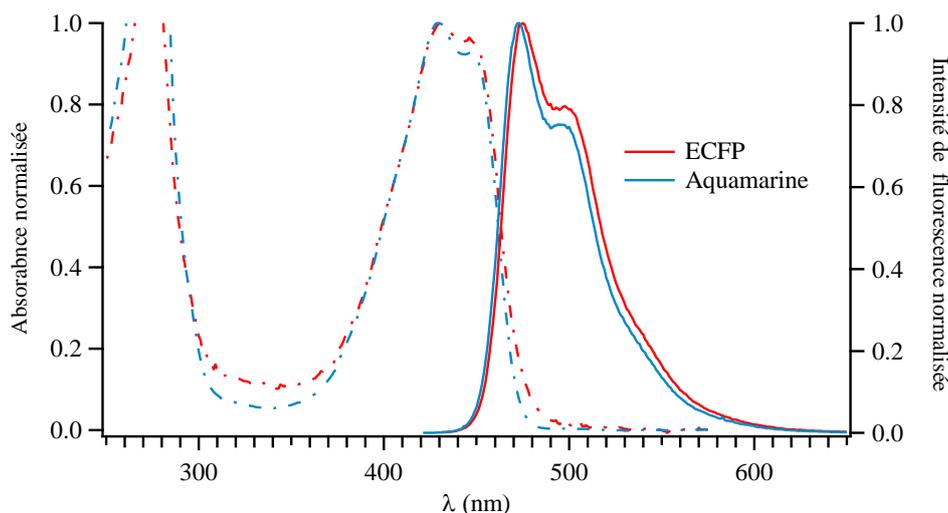


Figure 89 : Spectres d'absorption et d'émission de l'Aquamarine (ECFP-T65S, H148G) et de la ECFP à pH neutre. Les spectres ont été normalisés à 1 au maximum des bandes d'absorption et d'émission du chromophore. Nous avons également enregistré les cinétiques de décroissance de l'intensité de fluorescence de l'Aquamarine et des autres doubles mutants à pH neutre. Les distributions de durées de vie obtenues suite à leur analyse par MEM sont similaires à celles de la Cerulean-T65S et de la mTurquoise (Figure 90). Elles se caractérisent là encore par une composante de temps très majoritaire dont la valeur de durée de vie dépasse 4,1 ns et par quelques composantes de temps plus court (Tableau 21). Ceci confère un caractère quasi-monoexponentiel aux déclinés de ces protéines et leur durée de vie moyenne est fortement augmentée par rapport aux mutants ne portant qu'une seule des deux mutations. Cette durée de vie peut aller jusqu'à 4,11 ns \pm 0,01 ns dans le cas de l'Aquamarine. En parallèle, nous avons estimé la valeur de rendement quantique pour l'Aquamarine qui s'élève à 0,89, valeur plus importante que celle présentée par la mTurquoise (0,85). Pour l'Aquamarine, nous avons par ailleurs vérifié que la durée de vie moyenne ne présentait pas de dépendance significative avec la longueur d'onde d'émission, les valeurs obtenues à quatre longueurs d'onde d'émission entre 474 nm et 546 nm présentant une variabilité au plus égale à l'incertitude sur les mesures. Enfin, la variation en fonction du pH de la durée de vie moyenne de tous les doubles mutants étudiés est mineure. Par exemple, l'Aquamarine présente une invariance de la durée de vie moyenne sur un domaine de pH s'étendant entre pH 11 et 4 (Figure 93).

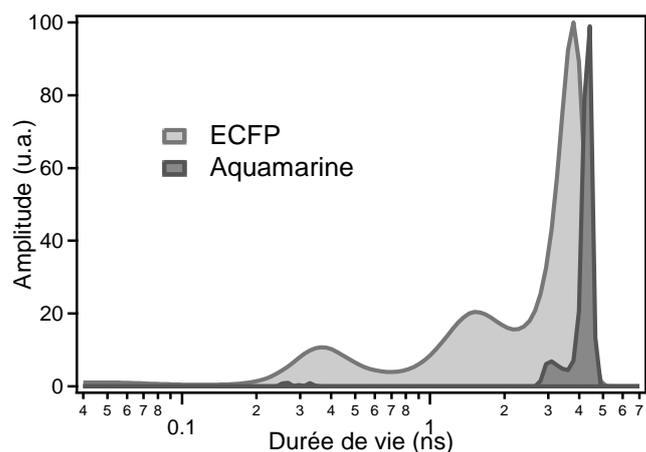


Figure 90 : Distribution de durées de vie de l'Aquamarine et de la ECFP à pH 7,4

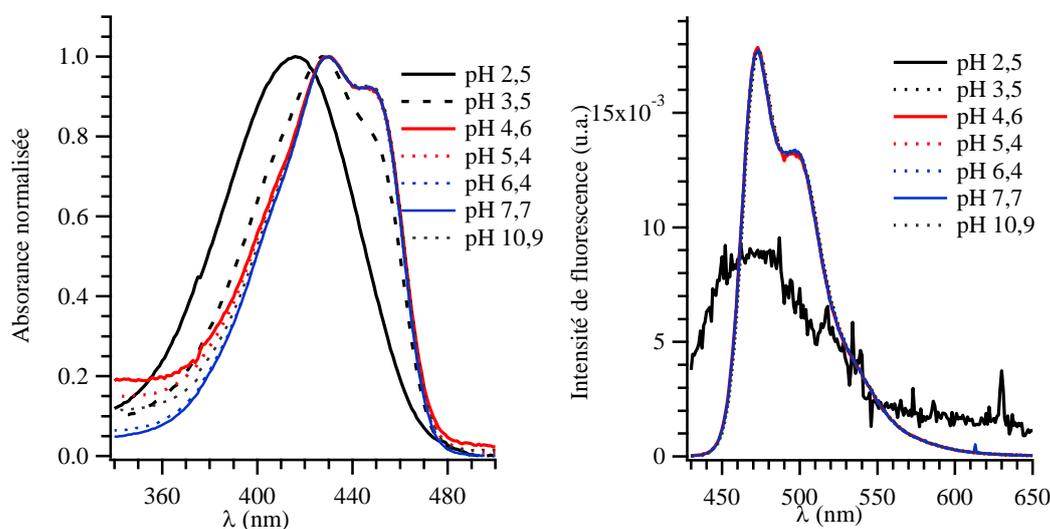


Figure 91 : Evolution des spectres d'absorption (à gauche) et d'émission de fluorescence (à droite) de l'Aquamarine en fonction du pH.

Protéine ECFP- T65S, H148X	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	I_{430}/I_{450}	I_{474}/I_{500}	pH_{acide}^{inf}	pH_{acide}^{sup}	$pH_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
X=G	88 ± 11	$4,29 \pm 0,09$	$4,11 \pm 0,01$	1,092	1,330	3	3,5	3,3
X=S	81 ± 2	$4,13 \pm 0,02$	$3,86 \pm 0,01$	1,091	1,332	3,5	4	3,6
X=E	83 ± 1	$4,11 \pm 0,02$	$3,86 \pm 0,02$	1,063	1,354	3,5	4,5	4,1
X=D	83 ± 4	$4,28 \pm 0,03$	$4,02 \pm 0,01$	1,082	1,347	3,5	4,0	4,0

 Tableau 21: Paramètres photophysiques des mutants ECFP-T65S,H148X (X=G,S,D et E) et valeurs de $pH_{1/2}$.

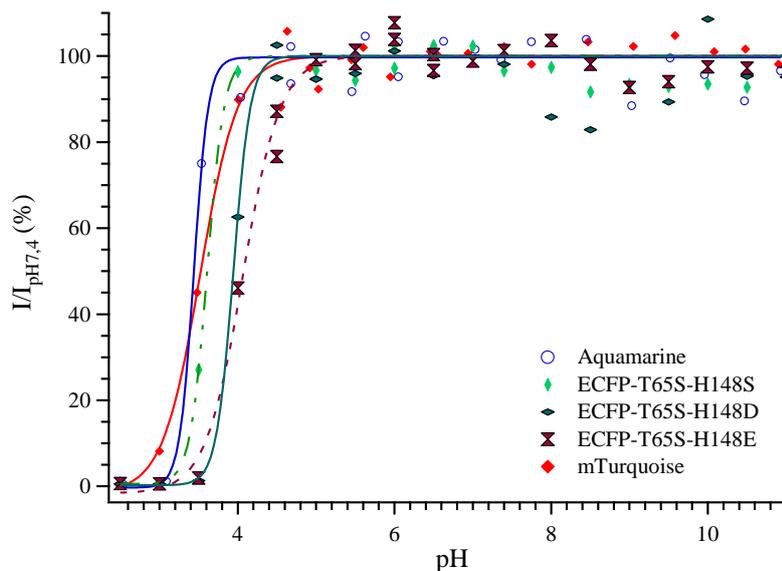


Figure 92 : Evolution en fonction du pH de l'intensité de fluorescence de l'Aquamarine et des trois autres doubles mutants ECFP-T65S,H148D. Comparaison avec la mTurquoise.

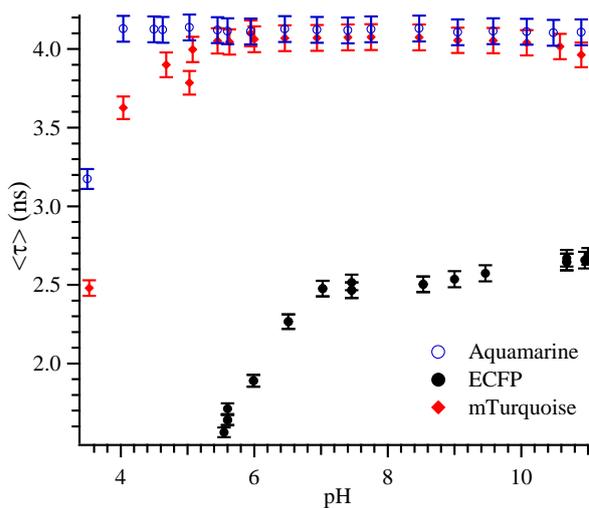


Figure 93 : Evolution en fonction du pH de la durée de vie moyenne de l'Aquamarine. Comparaison avec la ECFP et la mTurquoise.

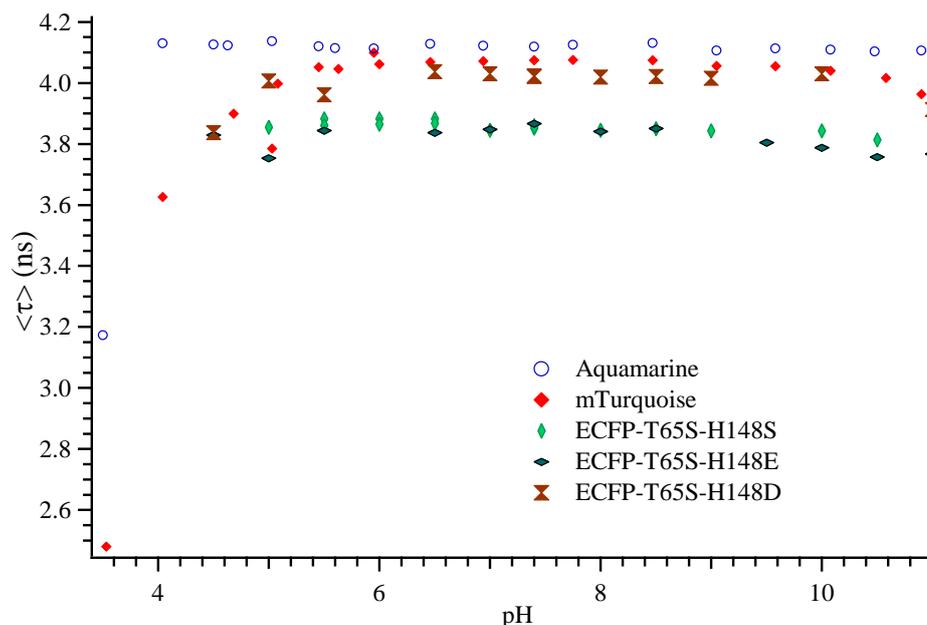


Figure 94 : Evolution en fonction du pH de la durée de vie moyenne des quatre doubles mutants ECFP-T65S-H148X, X=G, S, E, D)

C.III.5 INFLUENCE DE MUTATIONS ANNEXES SUR LES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES, LA SENSIBILITE AU pH ET LA MATURATION DES DERIVES DE LA ECFP

C.III.5.1 ROLES DE QUELQUES MUTATIONS SUR LES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES ET LA SENSIBILITE AU pH DES DERIVES DE LA ECFP

L'étude précédente a montré que deux mutations dans la ECFP sont suffisantes pour atteindre des performances à la hauteur voire supérieures à celles de la mTurquoise. Cette dernière comporte 3 mutations en plus des mutations en position 148 et 65, à savoir S72A, A206K et S175G. Nous avons souhaité avoir quelques pistes sur le rôle de ces mutations qui sont couramment introduites dans la littérature sans que pour autant leur influence sur les propriétés photophysiques ou sur leur sensibilité au pH, par exemple, soit clairement établie.

C.III.5.1.a Influence de la mutation A206K

La mutation A206K est quasi-omniprésente dans la plupart des protéines fluorescentes dérivées de la GFP_{av}, en particulier de la ECFP, dans la mesure où elle permet une réduction de la tendance à dimériser des dérivés de la GFP_{av}(38). Notons que l'équipe de Photophysique du LCP a récemment montré qu'une telle mutation était inutile dans le cas de la ECFP, l'isoleucine en position 146, introduite à l'origine pour accroître la capacité de la ECFP à fluorescer, déstabilisant le dimère(90).

Pour étudier l'influence de la mutation A206K, plus particulièrement sur la sensibilité en pH des dérivées de la ECFP, nous l'avons introduite dans la ECFP, générant le dérivé ECFP-A206K. Les propriétés spectrales de ce mutant et leur évolution en fonction du pH sur l'ensemble du domaine de pH allant de 2,5 à 11 sont analogues à celles présentées par la ECFP. Ceci indique que cette mutation ne perturbe pas de façon significative les processus photophysiques impliqués dans la ECFP. Par ailleurs, son pH de demi-transition, estimé à 5,3, est à peine plus acide que celui de la ECFP (5,6), indiquant que l'influence de la mutation A206K sur la sensibilité au pH de la ECFP est très faible voire négligeable (Figure 95).

Une conclusion similaire a été établie suite à l'étude comparative de la sensibilité en pH de la EYFP et de la EYFP-A206K. Nous avons montré là encore que cette mutation ne perturbait ni les propriétés photophysiques de la EYFP ni sa sensibilité en pH, les pHs de demi-transition des deux protéines EYFP et EYFP-A206K étant identiques ($5,8 \pm 0,1$ dans un tampon exempt de chlore).

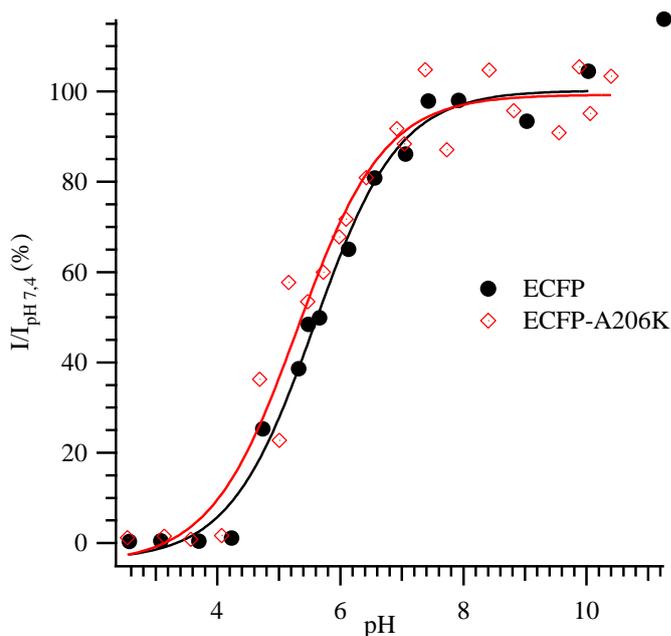


Figure 95 : Variation de l'intensité de fluorescence de la ECFP-A206K et la ECFP en fonction du pH.

C.III.5.1.b Influence de la mutation S175G

Nous avons généré un précurseur de la mTurquoise ne portant pas la mutation S175G. Il s'agit du mutant ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K. L'étude détaillée du comportement photophysique de ce précurseur de la mTurquoise dépourvu de la mutation S175G montre qu'aucune différence significative dans les propriétés spectrales et temporelles des deux protéines n'a été observée. Une durée de vie moyenne de 4,05 ns a été obtenue pour la ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K. En revanche, cette mutation semble être susceptible d'agir sur

la sensibilité en pH. En effet, son introduction permet de réduire la valeur du $pH_{1/2}$ de 0,5 unité pH, abaissant la valeur de ce paramètre à 3,4 pour la mTurquoise (Tableau 22). Néanmoins, aucune différence significative de sensibilité au pH entre ces deux protéines n'est observée à partir de la dépendance de la durée de vie moyenne avec le pH (Figure 96). Ceci suggère que l'absence de la mutation S175G favorise la formation d'espèce non fluorescente à pH très acide.

Protéine	a_L (%)	τ_L (ns)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	$pH_{1/2}$ ($\pm 0,1$)
mTurquoise	87 ± 9	$4,26 \pm 0,08$	$4,06 \pm 0,01$	3,4
ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K	88 ± 11	$4,24 \pm 0,09$	$4,05 \pm 0,06$	3,9

Tableau 22 : Paramètres photophysiques et valeurs de $pH_{1/2}$ de la mTurquoise et de la ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K.

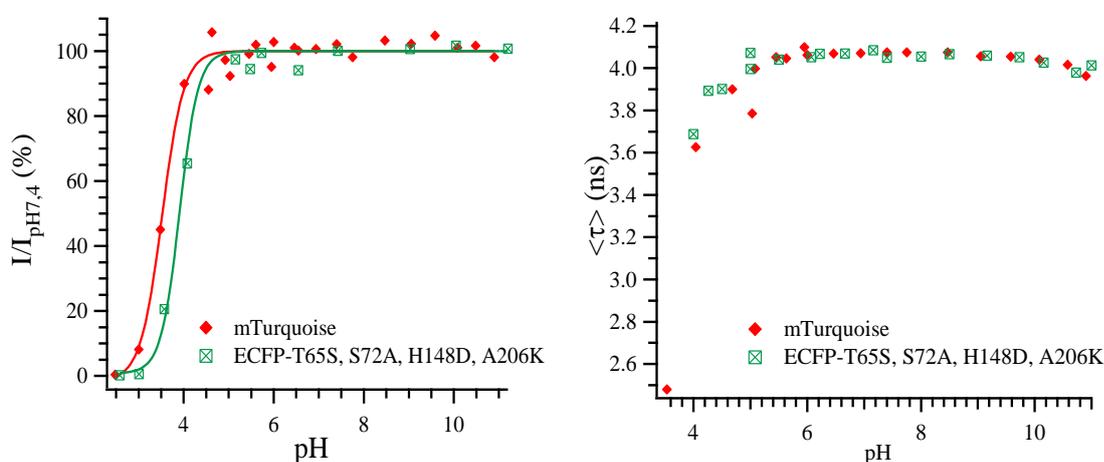


Figure 96 : Influence de la mutation S175G. Dépendance de l'intensité de fluorescence (à gauche) et de la durée de vie moyenne (à droite) en fonction du pH de la mTurquoise et de la ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K .

C.III.5.1.c Influence de la mutation S72A (couplée à Y145A ou A206K) : vers une protéine cyan présentant une très forte stabilité vis-à-vis du pH : l'Aquamarine-S72A-A206K.

Nous n'avons pas étudié de façon spécifique le rôle de la mutation S72A en l'introduisant, par exemple, seule sur la ECFP. En revanche, quelques éléments peuvent être tirés de l'analyse des résultats obtenus sur des mutants portant ou ne portant pas la mutation S72A.

Tout d'abord, la comparaison des propriétés présentées par le mutant ECFP-Y145A,H148D et la Cerulean semble indiquer que l'introduction de la mutation S72A n'a pas de répercussions très nettes sur les propriétés photophysiques notamment la durée de vie moyenne. Ceci est en accord avec d'autres résultats de la littérature(113, 124). En revanche, elle semble améliorer la sensibilité au pH. En effet, la valeur de $pH_{1/2}$ est réduite de 0,5 unité pH dans la Cerulean et

la baisse de durée de vie moyenne s'effectue à des pH un peu plus acides pour la Cerulean que pour son précurseur ECFP-Y145A,H148D (Tableau 6, Figure 53). A noter que les études menées par Lelimosin *et al.* montrent que la mutation S72A améliore la stabilité de la protéine en augmentant la température de fusion de la protéine et en rendant sa dénaturation plus difficile (94).

La réduction de la sensibilité au pH semble être une tendance générale lorsque la mutation S72A est introduite dans un dérivé de la ECFP portant la mutation Y145A. En effet, une réduction de la valeur de $pH_{1/2}$ de 0,4 à 0,5 unité pH est également constatée dans la Cerulean-D148G ou encore la Cerulean-T65S par rapport aux mutants simples, respectivement ECFP-H148G et ECFP-H148D (Figure 97). Notons que nous avons observé précédemment que l'introduction de la mutation Y145A seule avait un effet inverse en augmentant très légèrement la sensibilité au pH.

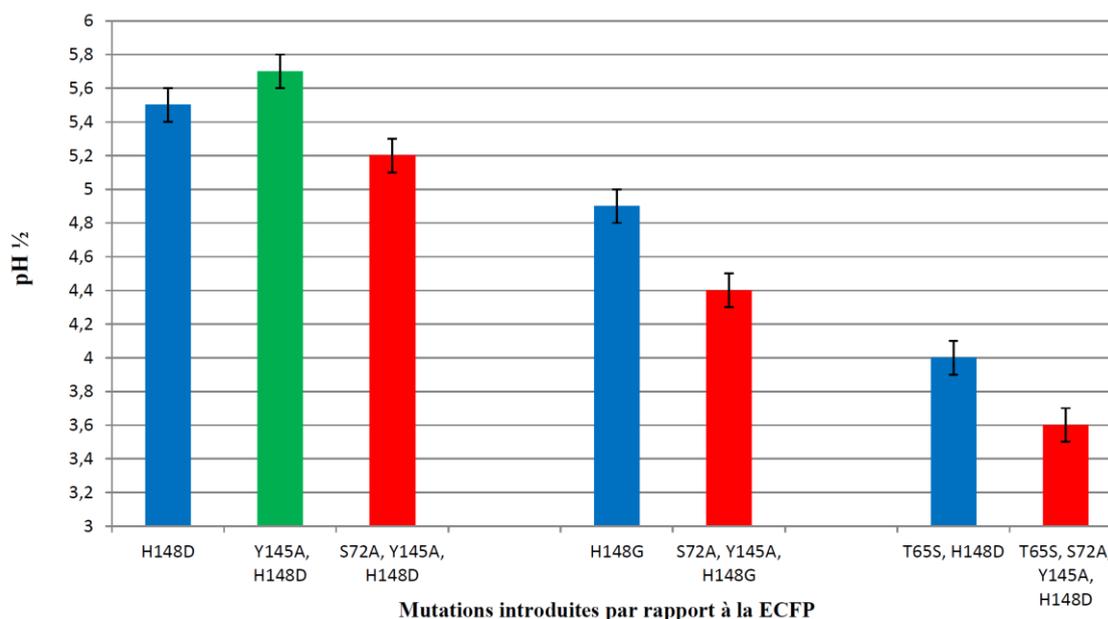


Figure 97 : Influence des mutations S72A et Y145A sur la valeur du $pH_{1/2}$ de quelques dérivés de la ECFP. Les barres bleues correspondent aux mutants de départ, celles en vert aux mutants ayant la mutation Y145A en supplément et celles en rouge aux mutants portant les deux mutations S72A et Y145A en supplément.

En revanche, lorsque la mutation S72A est introduite dans un dérivé de la ECFP portant également la mutation A206K, la mise en évidence d'une tendance générale concernant la sensibilité au pH est moins manifeste. Alors que nous avons précédemment montré que la mutation A206K avait une influence très légère voire nulle sur la sensibilité au pH, lorsque ces deux mutations sont couplées, nous constatons une légère réduction du $pH_{1/2}$, au pire aucune répercussion (Figure 98). Ces résultats soulignent bien que l'effet des mutations n'est pas obligatoirement additif.

Pour autant, l'introduction des deux mutations A206K et S72A dans l'Aquamarine conduit à un dérivé appelé Aquamarine-S72A-A206K présentant une stabilité au pH exceptionnelle. En effet, alors que ses propriétés spectrales et temporelles sont globalement analogues à celles de l'Aquamarine, l'Aquamarine-S72A-A206K possède le pH de demi-transition le plus faible (3,05) de tous les dérivés de la ECFP étudiés (Figure 99, Tableau 23). Aussi bien l'intensité de fluorescence que la durée de vie moyenne sont stables sur une gamme de pH s'étendant de 11 à 3,5 (Figure 100). La durée de vie moyenne de la Aquamarine-S72A-A206K estimée à 4,07 ns est du même ordre de grandeur que la mTurquoise, légèrement inférieure à celle de l'Aquamarine (Tableau 23).

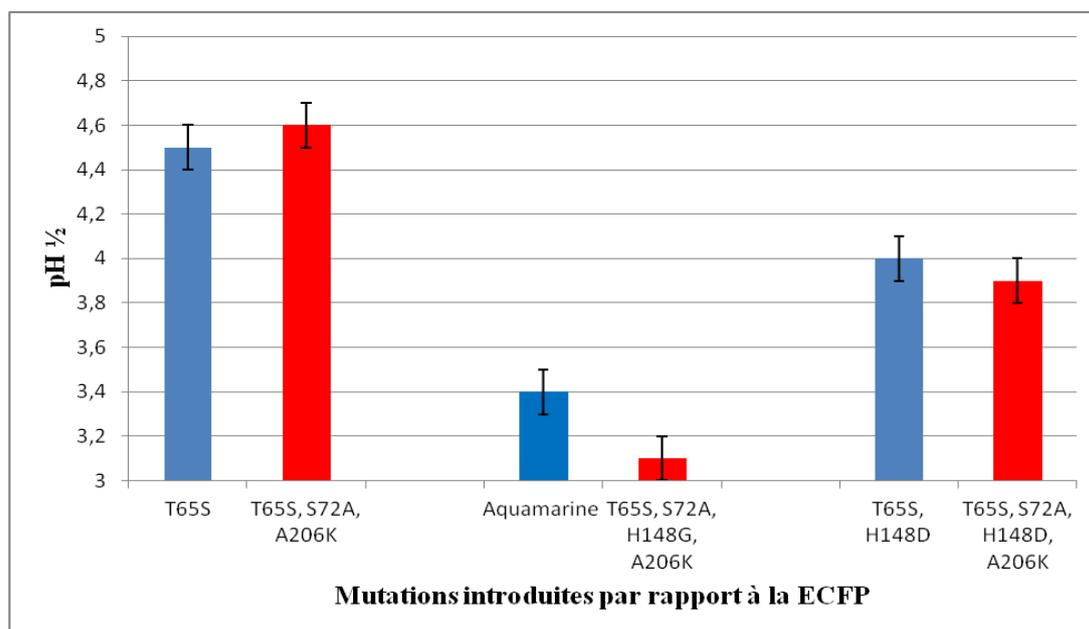


Figure 98 : Influence des mutations S72A et A206K sur la valeur du pH_{1/2} de quelques dérivés de la ECFP. Les barres bleues correspondent aux mutants de départ, et celles en rouge aux mutants portant les deux mutations S72A et A206K en supplément.

Protéine	a _L (%)	τ _L (ns)	< τ > (ns)	pH _{acide} ^{inf}	pH _{acide} ^{sup}	pH _{1/2} (±0,1)
Aquamarine	88± 11	4,29± 0,09	4,11 ± 0,01	3	3,5	3,3
Aquamarine-S72A-A206K	91± 8	4,25± 0,08	4,07 ± 0,06	2,5	3	3,05

Tableau 23 : Paramètres photophysiques et valeurs de pH_{1/2} de l'Aquamarine-S72A-A206K et de l'Aquamarine.

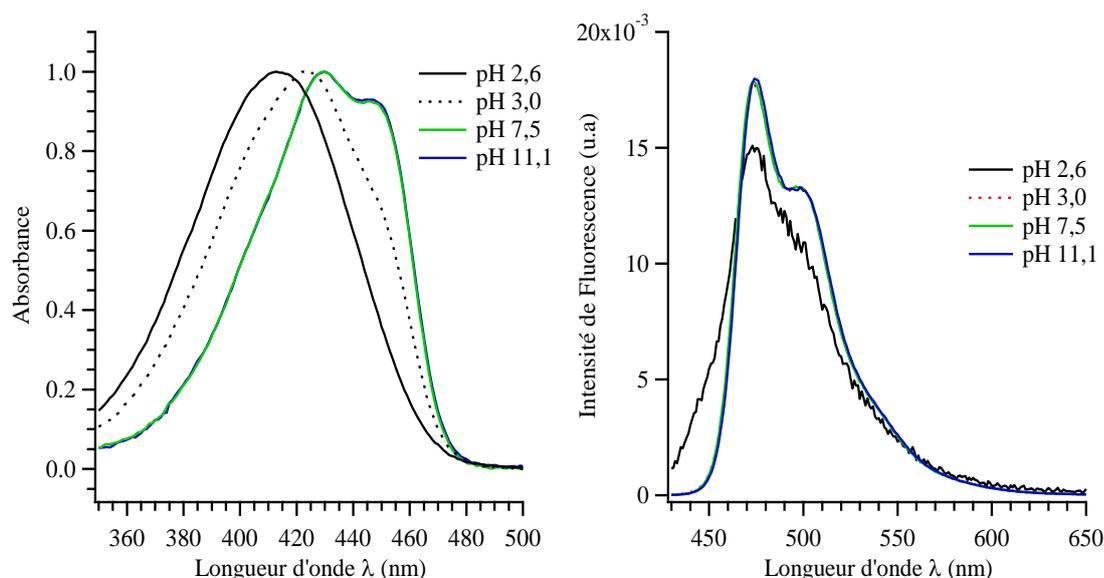


Figure 99 : Evolution de l'allure des spectres d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) de l'Aquamarine-S72A-A206K en fonction du pH.

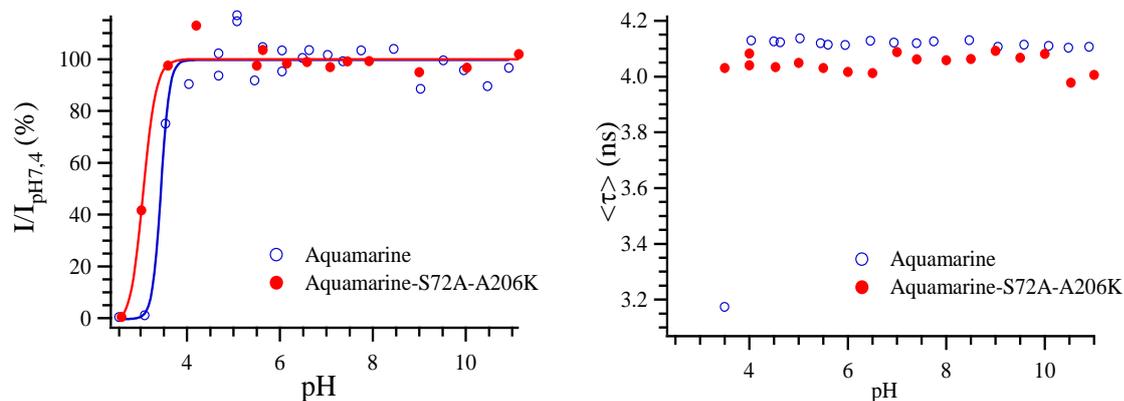


Figure 100 : Dépendance avec le pH de l'intensité de fluorescence (à gauche) et de la durée de vie moyenne (à droite) de l'Aquamarine-S72A-A206K et de l'Aquamarine.

C.III.5.2 ROLES DE QUELQUES MUTATIONS SUR LA MATURATION DES DERIVES DE LA ECFP

L'estimation des coefficients d'extinction molaires des diverses protéines a été effectuée à partir d'un test biochimique, le test BCA, dont le principe est décrit au début de ce chapitre. Ce test permet de déterminer la concentration en protéines à partir de l'absorbance à 280 nm. Puis connaissant cette concentration, il est possible de déterminer le coefficient d'absorption molaire au maximum de la bande du chromophore. Les valeurs que nous avons obtenues pour divers dérivés de la ECFP et dont la structure chimique du chromophore est identique sont assez dispersées (Tableau 24). Une telle diversité a déjà été notée dans la littérature (12, 14) et a

été attribuée à des taux de maturation distincts entre les protéines, pouvant dépendre également du milieu d'expression utilisé (12).

Protéine	ECFP	ECFP-H148N	ECFP-H148G	ECFP-T65S
ϵ à 430nm (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	29000 ± 400	29430	29620	29200 ± 1200

Protéine	Cerulean	Cerulean-T65S	Aquamarine	mTurquoise
ϵ à 430nm (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	29400 ± 300	34700 ± 650	25650 ± 1300	36100 ± 400

Tableau 24 : Coefficients d'extinction molaire (L. mol⁻¹.cm⁻¹) de plusieurs dérivés de la ECFP estimés en utilisant la concentration en protéine déterminée à partir du test BCA. Pour chaque protéine, trois tests BCA ont été effectués et les valeurs obtenues moyennées. L'erreur indiquée est l'écart type sur ces trois valeurs. Pour la ECFP-H148N et la ECFP-H148G, un seul test BCA a été effectué.

Le test BCA détermine le contenu en liaison peptidique d'un échantillon, quelque soit l'état de la protéine, qu'elle soit repliée ou non, que son chromophore soit mature ou non. L'existence d'une éventuelle proportion de protéine non mature n'est pas prise en compte. De fait, la concentration en protéine estimée lors de ce test $C_{\text{estimée}}$ constitue une borne supérieure pour la concentration en protéine mature, C_{protmat} . De plus, si la protéine étudiée présente un taux de maturation inférieure à 1, la valeur du coefficient d'extinction molaire estimée lors du test BCA, $\epsilon_{\text{estimée}}^{430}$, est alors inférieure à celle attendue, $\epsilon_{\text{chromomat}}^{430}$. En effet, si A_{430} désigne l'absorbance à 430 nm d'une solution de protéine fluorescente, alors :

$$A_{430} = \epsilon_{\text{estimée}}^{430} \cdot C_{\text{estimée}} \cdot \ell = \epsilon_{\text{chromomat}}^{430} \cdot C_{\text{protmat}} \cdot \ell \quad \text{Équation 51}$$

$$\text{Si } C_{\text{protmat}} \leq C_{\text{estimée}} \text{ alors } \epsilon_{\text{chromomat}}^{430} \geq \epsilon_{\text{estimée}}^{430} \cdot$$

C.III.5.3

C.III.5.3.a *Le spectre d'absorption : une mesure du taux de maturation d'une protéine*

L'analyse fine du spectre d'absorption de la ECFP et de ses dérivés, en particulier du rapport d'absorbance entre les bandes à 280 nm et 430 nm, constitue un moyen d'appréhender de façon plus précise la capacité de chaque protéine à maturer.

Le spectre d'absorption de la ECFP et de ses dérivés est constitué de deux bandes, une à 280 nm et l'autre à 430 nm. La première bande résulte de l'absorption des résidus aromatiques de la protéine, principalement les résidus tryptophane et tyrosine, mais également du chromophore, lorsque la protéine est mature, soit :

$$A_{280} = \epsilon_{\text{aromat}}^{280} \cdot C_{\text{prot}} \cdot \ell + \epsilon_{\text{chromomat}}^{280} \cdot C_{\text{protmat}} \cdot \ell \quad \text{Équation 52}$$

$$\text{Avec } \epsilon_{\text{aromat}}^{280} = \epsilon_{\text{Tyr}} \cdot n_{\text{Tyr}} + \epsilon_{\text{Trp}} \cdot n_{\text{Trp}}$$

Où n_{Tyr} et n_{Tyr} désignent le nombre de résidus respectivement tryptophane et tyrosine contenus dans la séquence peptidique de la protéine étudiée y compris le his-Tag dans notre cas, qui n'a pas été coupé après la purification de la protéine. L'absorbance à 430 nm provient uniquement du chromophore mature soit :

$$A_{430} = \varepsilon_{\text{chromomat}}^{430} \cdot C_{\text{protmat}} \cdot \ell \quad \text{Équation 53}$$

$\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280}$ et $\varepsilon_{\text{chromomat}}^{430}$ désigne le coefficient d'extinction molaire du chromophore mature à 280 nm et 430 nm, respectivement.

En conséquence, en supposant que $\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280} < \varepsilon_{\text{chromomat}}^{430}$ (voir C.III.5.3.b), l'augmentation du taux de maturation ($\tau_{\text{mat}} = \frac{C_{\text{protmat}}}{C_{\text{prot}}}$) va conduire à une réduction du rapport des absorbances à 280 nm et 430 nm ($\frac{A_{280}}{A_{430}}$). Connaissant les coefficients d'extinction molaire du chromophore à 280 et 430 nm ainsi que celui associé aux résidus aromatiques à 280 nm, il est possible de calculer le taux de maturation, τ_{mat} , selon :

$$\tau_{\text{mat}} = \left(\frac{A_{280}}{A_{430}} - \frac{\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280}}{\varepsilon_{\text{chromomat}}^{430}} \right)^{-1} \cdot \frac{\varepsilon_{\text{aromat}}^{280}}{\varepsilon_{\text{chromomat}}^{430}} \quad \text{Équation 54}$$

C.III.5.3.b *Ordre de grandeur du coefficient d'extinction molaire du chromophore à 280 nm.*

Afin d'estimer l'ordre de grandeur du coefficient d'extinction molaire du chromophore à 280 nm, $\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280}$, nous avons supposé que la mTurquoise présente un taux de maturation idéal, égal à 1. En effet, cette protéine présente le coefficient d'extinction molaire à 430 nm le plus élevé parmi ceux que nous avons déterminés et un rapport $\frac{A_{280}}{A_{430}}$ le plus petit. Dans des conditions de maturation idéale, l'expression de $\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280}$ s'écrit :

$$\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280} = \left(\frac{A_{280}}{A_{430}} - \frac{\varepsilon_{\text{aromat}}^{280}}{\varepsilon_{\text{chromomat}}^{430}} \right) \cdot \varepsilon_{\text{chromomat}}^{430} \quad \text{Équation 55}$$

A partir des valeurs des diverses grandeurs nécessaires pour l'estimation de $\varepsilon_{\text{chromomat}}^{280}$, rassemblées dans le tableau ci-dessous, nous avons estimé le coefficient d'extinction molaire du chromophore à 3330 L.mol⁻¹cm⁻¹.

$\frac{A_{280}}{A_{430}}$	n_{Trp}	n_{Tyr}	$\epsilon_{\text{aromat}}^{280}$ (L. mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\epsilon_{\text{chromomat}}^{430}$ (L. mol ⁻¹ cm ⁻¹)
0,9012	2	14	29300	36100

Tableau 25 : Grandeurs nécessaires pour le calcul de $\epsilon_{\text{chromomat}}^{280}$.

C.III.5.3.c Simulation du rapport d'absorbance à 280 nm et 430 nm en fonction du taux de maturation.

En supposant que les coefficients d'extinction molaire du chromophore mature à 280 nm et à 430 nm sont identiques pour toutes les protéines et égaux à ceux de la mTurquoise, nous pouvons simuler l'évolution du rapport $\frac{A_{280}}{A_{430}}$ en fonction du taux de maturation.

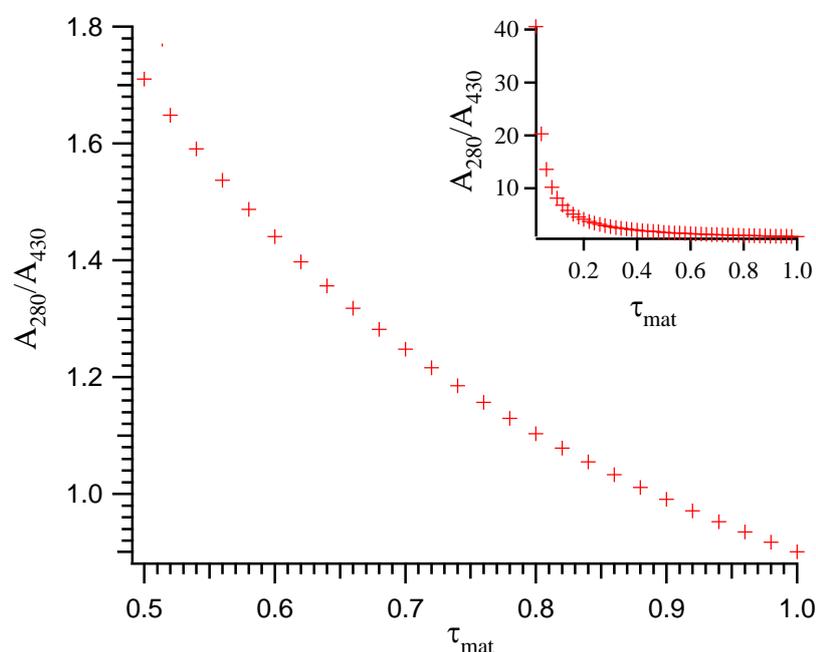


Figure 101 : Evolution du rapport d'absorbance A_{280}/A_{430} en fonction du taux de maturation τ_{mat} . Pour cette simulation, il a été supposé $\epsilon_{\text{chromomat}}^{280} = 3330 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{aromat}}^{280} = 29300 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{\text{chromomat}}^{430} = 36200 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La figure montre qu'idéalement, les protéines présentant un taux de maturation proche de 1 seront caractérisées par un spectre d'absorption dont les deux bandes à 280 nm et 430 nm seront d'amplitude similaire. En revanche, un spectre d'absorption avec une bande à 280 nm d'amplitude supérieure à celle à 430 nm sera le signe d'un taux de maturation plus faible.

C.III.5.3.d Ordre de grandeur du taux de maturation des divers dérivés de la ECFP.

A partir des spectres d'absorption des différentes protéines étudiées, obtenus à pH 7,4, il est donc a priori possible d'estimer, d'après l'équation 54, un taux de maturation pour chacune

d'entre elles. Pour la plupart des protéines étudiées, une seule préparation et purification a été faite et les valeurs indiquées dans le Tableau 26 suivant repose sur l'acquisition d'un seul spectre d'absorption. De fait, dans la mesure où le taux de maturation peut dépendre de nombreux paramètres (conditions de température, agitation, induction..), qui peuvent varier d'une purification à une autre, les valeurs proposées ci-dessous doivent être a priori considérées avec précaution. Néanmoins, les spectres d'absorption à pH 7,4 obtenus pour différentes purifications effectuées au sein de l'équipe de Photobiologie pour la ECFP, la ECFP-H148R et l'Aquamarine ont été examinés. Ils présentent un rapport d'absorbance entre 280 et 430 nm dont l'ordre de grandeur est similaire pour chacune des purifications. Concernant la mTurquoise, Goedhart *et al.* rapporte un spectre d'absorption pour la mTurquoise2 dont le rapport des absorbances à 280 et 430 nm est similaire à celui que nous avons obtenus pour la mTurquoise (13). Ceci suggère que ces deux protéines qui ne se distinguent qu'au niveau du résidu 146 présentent un taux de maturation similaire.

	ECFP	ECFP-A206K	ECFP-H148R	ECFP-H148N	ECFP-H148S	ECFP-H148E	ECFP-H148A	ECFP-H148G
$\frac{A_{280}}{A_{430}}$	1,132±0,023	1,092	1,287	0,956	0,926	1,127	1,014	1,045
τ_{mat}	0,778±0,013	0,808	0,676	0,936	0,927	0,781	0,877	0,848

	ECFP-T65S	ECFP-T65S, S72A, A206K	ECFP-H148D	ECFP-H148D-Y145A	Cerulean	Cerulean-T65S	Cerulean-D148G
$\frac{A_{280}}{A_{430}}$	1,037	0,968	1	1,033	0,922	0,894	0,895
τ_{mat}	0,856	0,923	0,884	0,821	0,932	0,964	0,963

	ECFP-H148S-T65S	ECFP-H148E-T65S	ECFP-H148D-T65S	Aquamarine	Aquamarine-S72A,A206K	ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K	mTurquoise
$\frac{A_{280}}{A_{430}}$	1,304	1,031	1,219	1,387 ± 0,005	1,026	1,114	0,901
τ_{mat}	0,667	0,860	0,717	0,625 ± 0,003	0,866	0,791	1

Tableau 26 : Estimation à partir de l'équation 54 du taux de maturation de tous les dérivés de la ECFP étudiés. Pour la Cerulean, la Cerulean-T65S, la Cerulean-D148G et la ECFP-H148D-Y145A, les paramètres utilisés sont $n_{Tyr}=13$, $n_{Trp}=2$ et $\epsilon_{aromat}^{280} = 28020 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pour toutes les autres protéines, $n_{Tyr}=14$, $n_{Trp}=2$ et $\epsilon_{aromat}^{280} = 29300 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

C.III.5.3.e Influence de quelques mutations annexes sur le taux de maturation.

D'après les résultats du tableau précédent, l'introduction de la mutation A206K dans la ECFP ne semble pas avoir d'influence significative sur le taux de maturation (Figure 102). Cette mutation introduite dans les dérivés de la GFPav pour réduire leur tendance à dimériser (38), bien que non nécessaire dans le cas de la ECFP (90), apparaît d'après l'ensemble des résultats présentes dans ce manuscrit être silencieuse tant d'un point de vue des propriétés photophysiques que physicochimiques et biochimiques en accord avec les derniers résultats en cristallographie de Von Stetten *et al.* (125).

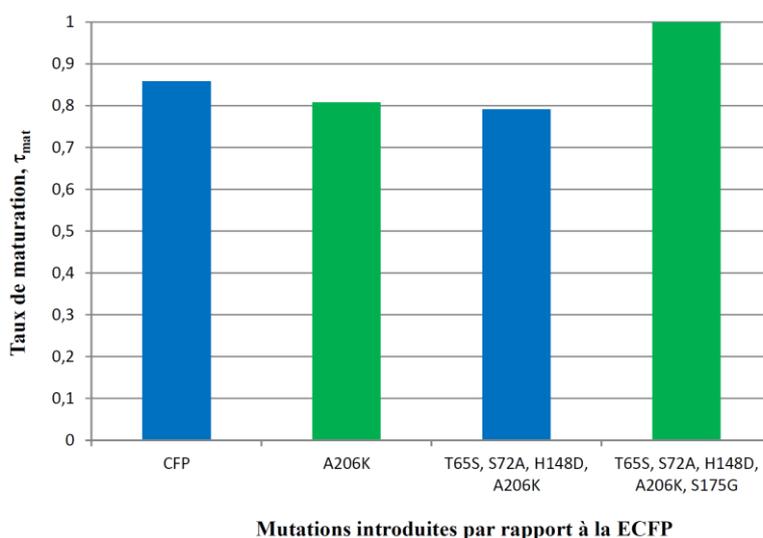


Figure 102 : Influence des mutations A206K et S175G respectivement sur la valeur de taux de maturation de la ECFP et de la ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K. Les barres bleues correspondent aux mutants de départ, celles en vert aux mutants ayant soit la mutation A206K it la mutation S175G en supplément.

Par ailleurs, nos résultats confirment le rôle joué par la mutation S175G dans l'amélioration de la maturation des protéines, décrit dans la littérature (119). En effet, son introduction dans la ECFP-T65S, S72A, H148D, A206K générant la mTurquoise permet d'augmenter le taux de maturation d'environ 20 % (Figure 102).

Enfin, nous avons examiné l'effet de la mutation S72A seule. La présence de cette mutation semble avoir un effet positif sur le taux de maturation de la protéine. En effet, ce dernier augmente d'environ 11% suite à l'incorporation de cette mutation dans la ECFP-H148D-Y145A pour former la Cerulean. Cet effet positif sur l'amélioration du taux de maturation de cette mutation semble être une tendance générale qu'elle soit couplée à la mutation Y145A (Figure 104) ou à la mutation A206K (Figure 103). Notons que la mutation Y145A semble avoir une répercussion faible sur le taux de maturation (Figure 104), résultat qui, pour être validé, devra être confirmé lors d'autres purifications.

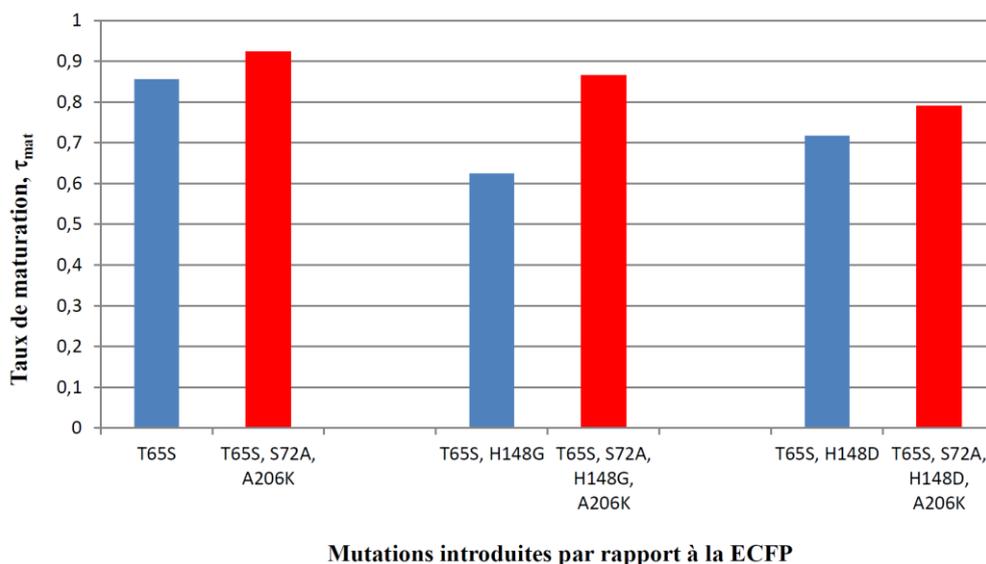


Figure 103 : Influence des mutations S72A et A206K sur la valeur du taux de maturation de quelques dérivés de la ECFP. Les barres bleues correspondent aux mutants de départ, et celles en rouge aux mutants portant en supplément les deux mutations S72A et A206K.

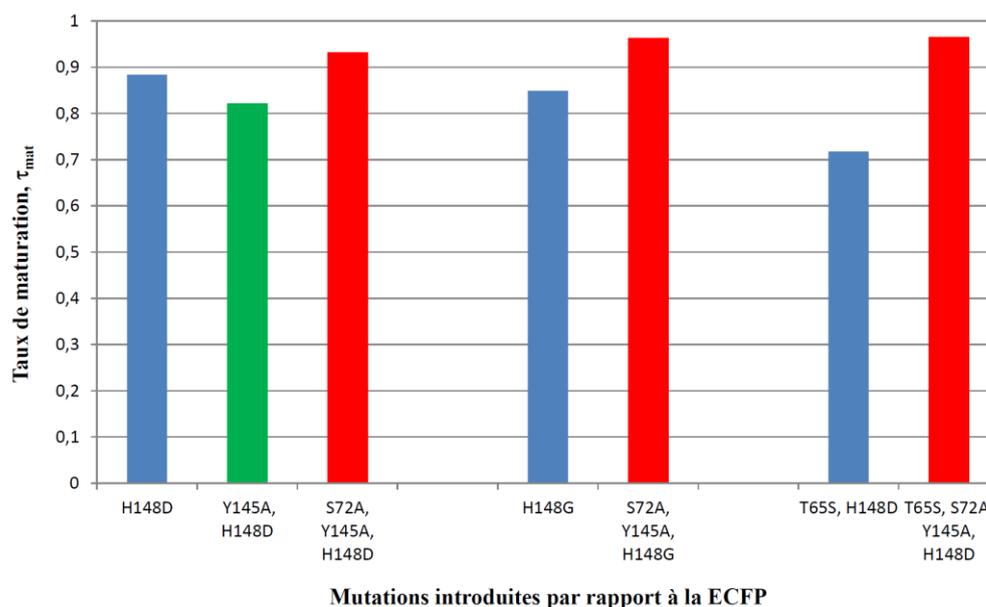


Figure 104 : Influence des mutations S72A et Y145A sur la valeur de taux de maturation de quelques dérivés de la ECFP. Les barres bleues correspondent aux mutants de départ, celles en vert aux mutants ayant la mutation Y145A en supplément et celles en rouge aux mutants portant les deux mutations S72A et Y145A en supplément.

C.III.6 EFFET DE L'ATP SUR LES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE LA ECFP, LA CERULEAN, LA MTURQUOISE ET L'AQUAMARINE.

Les travaux de Borst *et al.* ont mis en évidence une sensibilité de la ECFP vis à vis de l'ATP, source primaire d'énergie dans la cellule vivante. Ceci se traduit par une augmentation de la durée de vie moyenne de la ECFP avec la concentration en ATP (117). En revanche, cette sensibilité est absente dans le cas de la Cerulean (117). Au même titre qu'une variation des

propriétés photophysiques de la ECFP et de ses dérivés avec le pH, une sensibilité de ces protéines vis-à-vis de l'ATP constitue un obstacle pour l'interprétation quantitative des signaux en imagerie de fluorescence. Une maîtrise de cette sensibilité est nécessaire, au minimum cette sensibilité doit être établie. Dans cette partie, l'étude de l'effet de l'ATP sur les propriétés photophysiques de deux protéines très performantes, l'Aquamarine et la mTurquoise, est présentée. Pour avoir un point de comparaison, nous avons ré-établi la sensibilité de la ECFP et de la Cerulean dans les mêmes conditions expérimentales que les deux précédentes protéines. Pour toutes les protéines, nous avons travaillé à pH 7,4 dans le tampon MCBtP 30 mM auquel a été ajouté de l'ATP en concentration variable, allant de 2 à 100 mM.

En accord avec les résultats de Borst *et al.*(117), l'ajout d'ATP n'affecte pas l'allure des spectres d'émission de fluorescence de la ECFP (Figure 105). En revanche, elle conduit à une augmentation de sa durée de vie moyenne. Cette augmentation est de 17% pour une concentration en ATP allant de 2 mM à 100 mM (Figure 107).

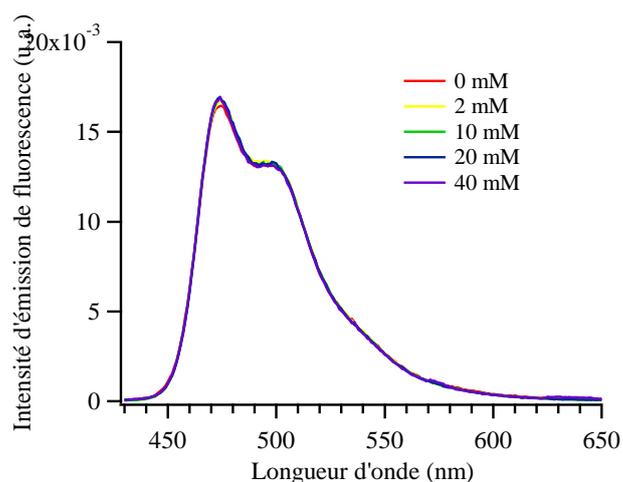


Figure 105 : Influence de la concentration en ATP sur l'allure des spectres d'émission de fluorescence de la ECFP ($\sim 10 \mu\text{M}$) à pH 7,4 et $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$. Les spectres ont été normalisés à la même aire.

Une analyse plus fine des distributions de durées de vie de la ECFP en présence d'ATP indique qu'une augmentation de la concentration en ATP déplace toutes les composantes de temps vers les grandes valeurs de durées de vie (Figure 106). Ces observations suggèrent que la présence de l'ATP réduit un processus de quenching dynamique, vraisemblablement en stabilisant le chromophore par une réduction de sa flexibilité. Ceci s'accompagne également d'une légère augmentation de l'amplitude relative de la composante de temps long d'environ 10%.

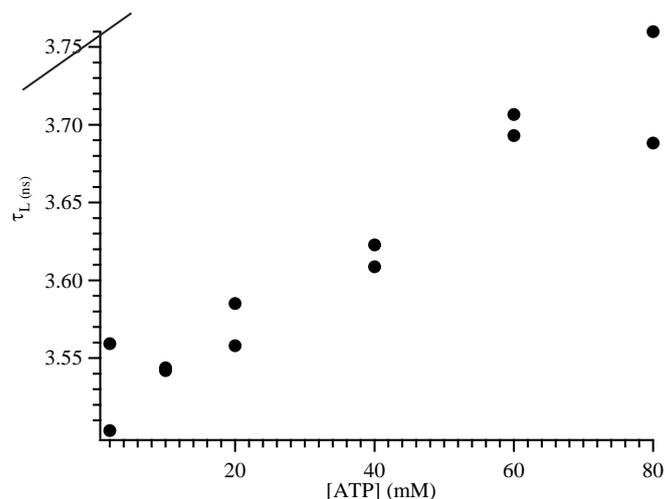


Figure 106 : Variation de la valeur de la durée de vie associée à la composante de temps le plus long de la distribution de durées de vie de la ECFP pour différentes concentrations en ATP.

L'étude de la sensibilité de la Cerulean avec l'ATP sur une gamme de concentration comprise entre 10 et 40 mM révèle un comportement en concordance avec la littérature (117). En effet, aucune variation de la durée de vie moyenne n'a été observée lorsque la quantité d'ATP est augmentée dans la solution (Figure 107).

Nous avons réalisés les mêmes expériences avec l'Aquamarine et avec la mTurquoise. Au niveau de l'allure des spectres d'émission, aucune variation en fonction de la concentration en ATP n'a été constaté. De même, la durée de vie moyenne pour des concentrations en ATP allant jusqu'à 100 mM ne présente aucune évolution (Figure 107).

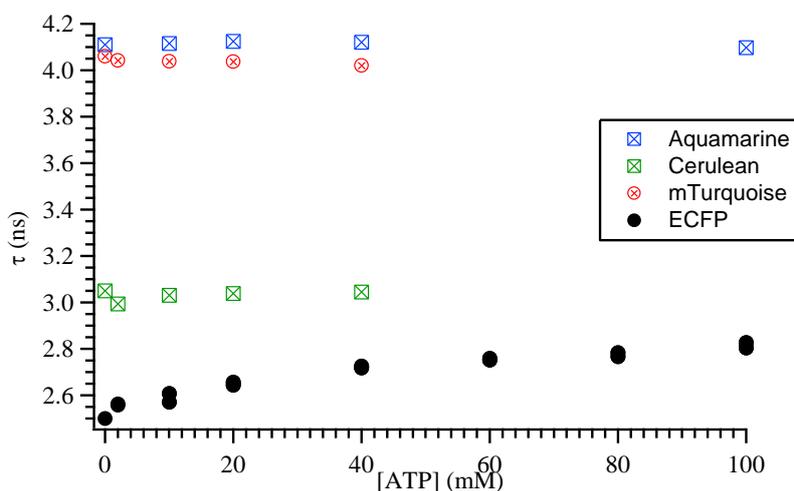


Figure 107 : Variation de la durée de vie moyenne de la ECFP et ses dérivés en fonction de la concentration de l'ATP

En conclusion, nos résultats confirment, d'une part, la sensibilité de la ECFP vis-à-vis de l'ATP et d'autre part, le rôle que joue la nature du résidu 148 dans la modulation de cette

sensibilité. La substitution de l'histidine en position 148 par un acide aspartique (travaux de Borst et al. (117) et nos travaux) ou par une glycine (nos travaux) élimine cette sensibilité.

Nos résultats suggèrent que l'ATP stabilise le chromophore de la ECFP et son environnement, le rendant moins flexible. Ceci pourrait être dû à une stabilisation du 7^{ième} brin grâce à l'interaction de l'ATP avec l'histidine 148. Concernant la nature de cette interaction, sur la base de nos résultats et de ceux de Borst *et al.*, il paraît difficile de pouvoir trancher entre les trois hypothèses avancées par ces derniers afin d'expliquer la sensibilité de la ECFP vis-à-vis de l'ATP :

- une interaction électrostatique entre la charge positive de l'histidine et la charge négative de l'ATP.
- Interaction de type π - π entre la chaîne latérale aromatique de l'histidine et le noyau aromatique de l'ATP.
- Interaction de type cation- π : cette interaction apparaît lorsqu'un cation est au voisinage d'un noyau conjugué. Dans notre cas, elle pourrait se produire entre la charge positive de l'histidine et le système conjugué présent dans l'ATP.

L'étude de la sensibilité vis-à-vis de l'ATP de la ECFP-H148R permettrait au moins d'exclure soit la première hypothèse, soit les deux dernières.

C.III.7 L'ESPECE EM460 EST-ELLE FORMEE A PH ACIDE DANS LA ECFP, LA ECFP-H148R ET LA ECFP-H148N ?

Précédemment, nous avons nommé *Em460* l'espèce à l'origine des déplacements vers le bleu des spectres d'absorption et d'émission de la Cerulean et de la ECFP-H148D pour des pH inférieurs à 6. Cette espèce est caractérisée par un spectre d'absorption situé du côté bleu du spectre d'absorption global de la ECFP et centré vers 380-400 nm. Son spectre d'émission est également déplacé vers le bleu par rapport au spectre de la ECFP et conduit à un épaulement sur le spectre d'émission vers 450-460 nm. Cette espèce se forme à pH acide et sa vitesse de formation est lente, avec un temps caractéristique de 47 min dans le cas de la Cerulean, suite à un saut de pH, de pH 8 à pH 5. La formation lente de cette espèce témoigne de l'existence d'une modification structurale impliquant une barrière de potentiel élevée telle que l'isomérisation du chromophore.

L'examen des spectres d'émission de la ECFP et de la ECFP-H148R obtenus à différents pH fait apparaître l'existence d'un épaulement vers 450-460 nm pour des pH inférieurs à 6 et 6,4 respectivement. Cet épaulement, d'amplitude plus faible dans le cas de la ECFP que dans celui de la ECFP-H148R, est associé à un spectre d'absorption déplacé vers le bleu comme en témoigne le déplacement vers le bleu du spectre d'excitation pour des longueurs d'onde d'émission situées elle aussi du côté bleu du spectre d'émission inférieurs à 474 nm (Figure 108). D'un point de vue spectral, ces caractéristiques correspondent bien à l'espèce *Em460*. Néanmoins, afin de pouvoir attribuer l'épaulement sur le spectre d'émission à cette espèce et ainsi à une forme isomérisée du chromophore, nous devons nous assurer que sa formation est lente.

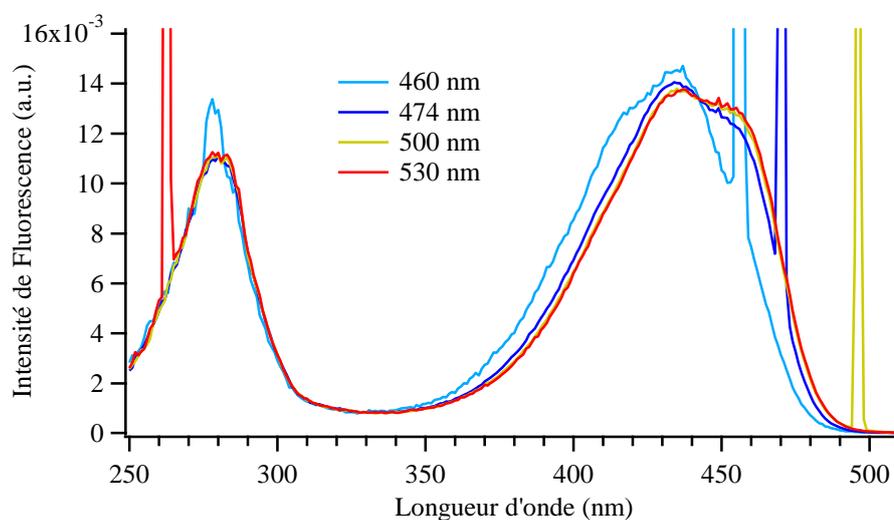


Figure 108 : Influence de la longueur d'onde d'émission sur l'allure du spectre d'excitation de fluorescence de la ECFP-H148R à pH 5,5.

Dans ce contexte, nous avons examiné l'évolution au cours du temps du spectre d'absorption de la ECFP et de la ECFP-H148R suite à un saut de pH, de pH 7,4 à pH 5. Afin d'avoir un point de comparaison, nous avons mené la même étude sur la Cerulean, dans les mêmes conditions de tampons et de pH. Nous avons ensuite étendu notre étude à la ECFP-H148N qui présente un comportement spectral en fonction du pH similaire à celui de la Cerulean.

C.III.7.1 LA CERULEAN.

Nous avons enregistré les spectres d'absorption de la Cerulean en fonction du temps suite à un saut de pH, de pH 7,4 à pH 5. L'expérience a été faite deux fois avec des résultats similaires. L'évolution de ces spectres sur une durée d'une heure après le saut de pH révèle des modifications significatives de leur allure, l'allure des spectres d'absorption initial et final étant similaires à celle rapportée par Malo *et al.* (116). Ces modifications spectrales se

traduisent par un déplacement du spectre d'environ 13 nm vers les petites longueurs d'onde (Figure 109). Le spectre final est constitué d'une seule bande dans le visible, structurée, formée de deux maxima à 421 nm et à 440 nm, alors que pour le spectre initial, les maxima étaient situés à 434 nm et à 453 nm. L'ensemble de ces spectres fait apparaître un point isobestique net à 450 nm indiquant que deux formes de la Cerulean présentent en ce point le même coefficient d'absorption molaire. Ceci suggère l'existence d'un échange à l'état fondamental entre ces deux formes sans intermédiaires réactionnels. Un comportement spectral similaire est rapporté par Malo *et al* (116).

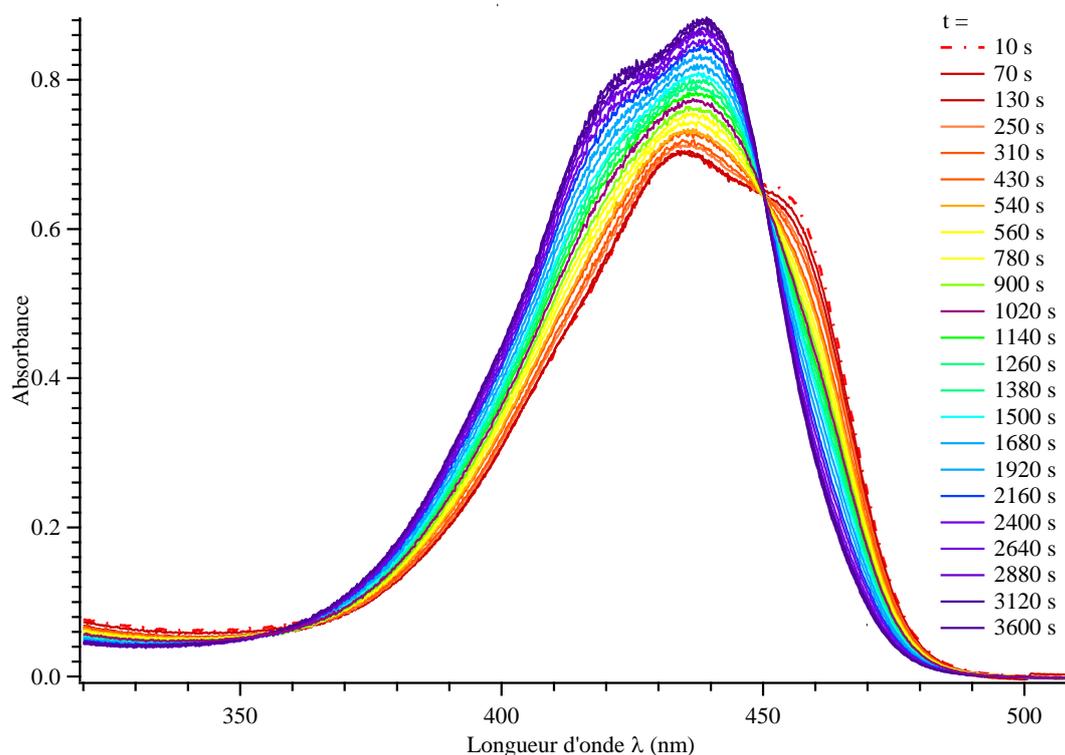


Figure 109: Evolution en fonction du temps du spectre d'absorption de la Cerulean suite à un saut de pH de 7,4 à 5.

Afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de Malo *et al.*, nous avons procédé à l'analyse de nos données comme dans leur article (116). Ainsi, nous avons tracé la courbe représentant l'évolution au cours du temps de l'absorbance à 440 nm, au maximum du spectre final. Celle-ci a été ajustée par une loi monoexponentielle dont la constante de temps a été estimée à 43 ± 4 min. Cette valeur est proche de celle proposée par Malo *et al.*, 47 ± 2 min.

De fait, l'ensemble de nos résultats apparaît compatible avec ceux obtenus par Malo *et al.* (116). L'espèce Em460 apparaissant à pH acide suite à un saut de pH avec une cinétique lente et associée à des spectres d'absorption et d'émission déplacée vers les petites longueurs d'onde est associée à une forme isomérisée du chromophore.

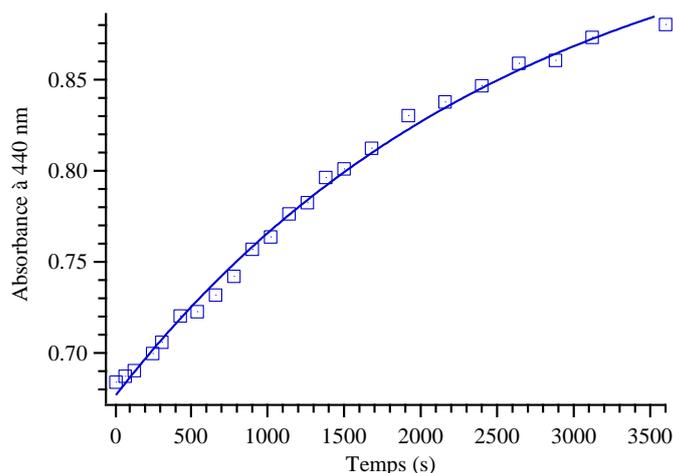


Figure 110 : Evolution au cours du temps de l'absorbance à 440 nm de la Cerulean suite à un saut de pH de 7,4 à 5. Les points expérimentaux sont ajustés par une fonction monoexponentielle.

C.III.7.2 LA ECFP ET LA ECFP-H148R.

Le même protocole expérimental a été suivi dans le cas de la ECFP et de la ECFP-H148R. Les spectres d'absorption de ces deux protéines suite à un saut de pH de 7,4 à 5 n'évoluent pas comme ceux de la Cerulean (Figure 111, Figure 112). En effet, pour les deux protéines, une légère déformation du spectre initial est observée avec un abaissement de l'amplitude relative de l'épaule à 450 nm. En ajustant la portion décroissante de la courbe décrivant l'évolution de l'absorbance au niveau de l'épaule à 450 nm par une monoexponentielle, il apparaît que ce processus s'effectue rapidement avec une constante de temps apparente de 74 ± 15 s dans le cas de la ECFP et de 46 ± 4 s dans le cas de la ECFP-H148R. Nous avons constaté ensuite une augmentation légère et lente, puis brusque et d'amplitude plus importante de l'absorbance totale sans modification de l'allure du spectre, pour les deux protéines (Figure 113).

L'évolution de l'absorbance quelques dizaines de minutes après le saut de pH est étonnante et mérite d'être confirmée. Malgré tout, le comportement suite au saut de pH des deux protéines ECFP et ECFP-H148R par rapport à la Cerulean est très différent. Il n'implique pas de déplacement significatif des spectres d'absorption vers le bleu avec une cinétique lente de quelques dizaines de minutes. Ceci suggère que l'espèce Em460 ne se forme pas de façon significative dans le cas de ces deux protéines. En d'autres termes, l'isomérisation du chromophore telle que observée dans la Cerulean ne semble pas se produire de façon significative dans la ECFP et la ECFP-H148R. Et l'épaule léger observé sur le spectre

d'émission vers 450-460 nm suite à une acidification du milieu est la résultante d'un autre processus.

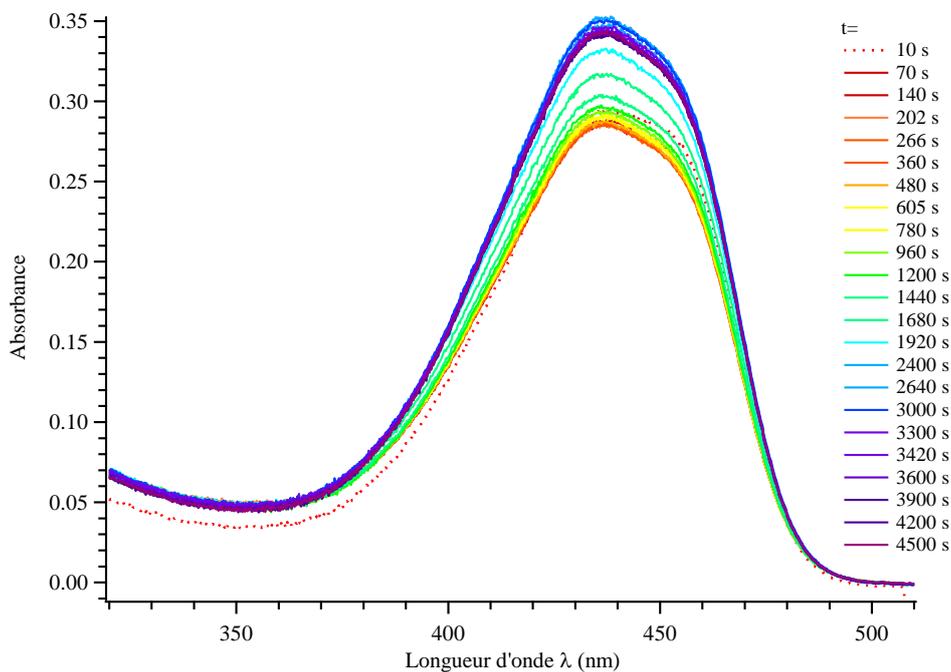


Figure 111 : Evolution au cours du temps du spectre d'absorption de la ECFP-H148R suite à un saut de pH de 7,4 à 5.

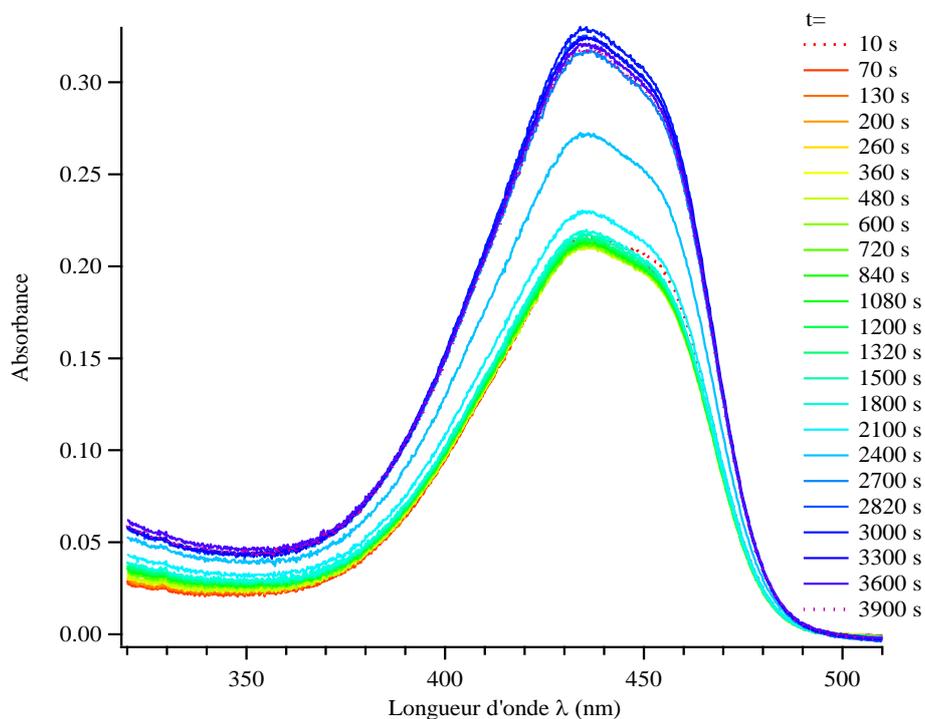


Figure 112 : Evolution au cours du temps du spectre d'absorption de la ECFP suite à un saut de pH de 7,4 à 5.

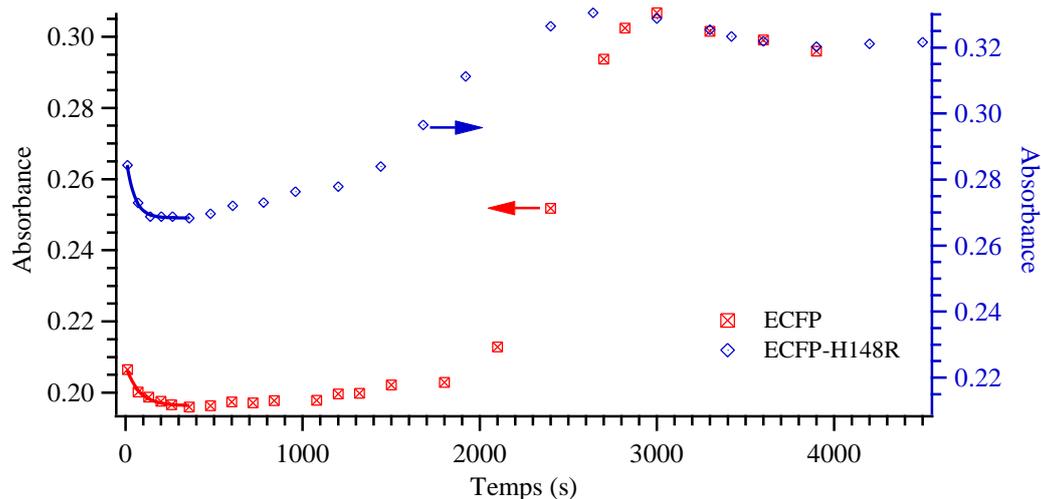


Figure 113 : Evolution de l'absorbance à 450 nm de l'ECFP (axe des abscisses de gauche) et de l'ECFP-H148R (axe des abscisses de droite) suite à un saut de pH de 7,4 à 5.

C.III.7.3 LA ECFP-H148N

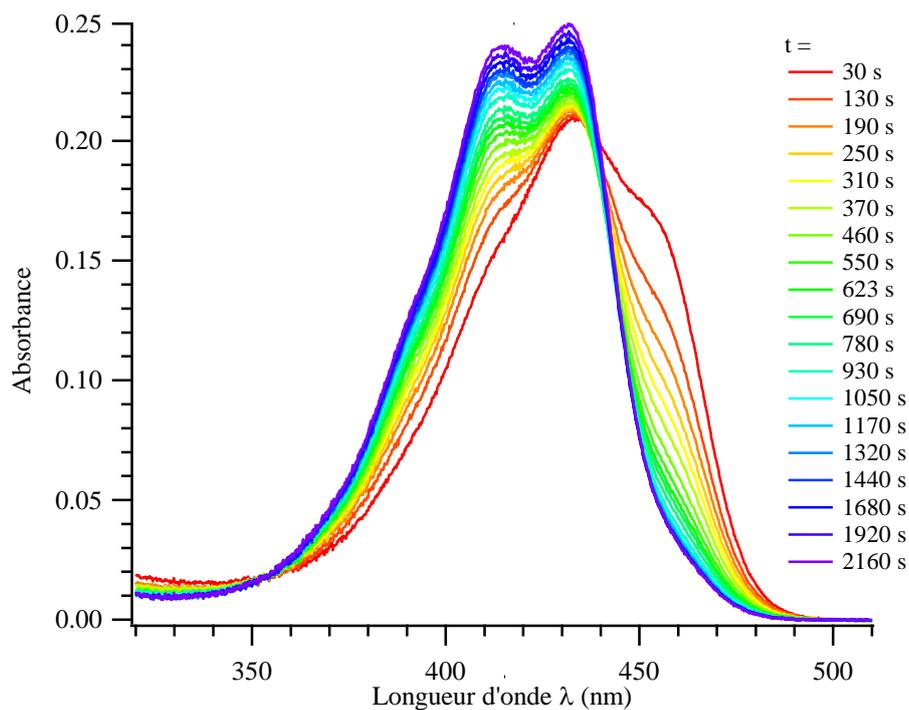


Figure 114 : Evolution au cours du temps des spectres d'absorption de la ECFP-H148N suite à un saut de pH de 7,4 à 5.

Nous avons enregistré les spectres d'absorption de la ECFP-H148N suite à un saut de pH de 7,4 à 5 (Figure 114). Là encore, l'expérience a été faite deux fois avec des résultats similaires. L'allure des spectres d'absorption évolue fortement au cours du temps avec un déplacement du barycentre du spectre vers les petites longueurs d'onde. Le comportement de la ECFP-H148N suite au saut de pH bien que globalement assez similaire à celui de la Cerulean se

distingue par rapport à la Cerulean au niveau de l'allure des spectres initial et final et au niveau de la position et de la netteté du point isobestique. En effet, le spectre final est caractérisé par une bande ayant deux maxima à 415 nm et à 432 nm. Il est décalé de 6 à 8 nm vers les petites longueurs d'onde par rapport à celui de la Cerulean et le rapport des absorbances relatives des deux maxima est également distinct (Figure 115). A noter que le spectre initial dans le cas de la ECFP-H148N présente un maximum à 433 nm et deux épaulements vers 415 nm et 453 nm. Par ailleurs, contrairement à la Cerulean, nous n'observons pas un point isobestique net. Les courbes d'absorption se coupent sur un domaine de longueurs d'onde d'environ 10 nm de large centré autour de 440 nm. Ceci suggère que dans le cas de la ECFP-H148N, le processus induit par le saut de pH est plus complexe que dans la Cerulean et implique au moins trois espèces aux propriétés spectrales distinctes.

Enfin, nous avons analysé la cinétique d'évolution de l'absorbance au maximum du spectre final à 432 nm par une fonction monoexponentielle (Figure 116). La constante de temps apparente obtenue dans ces conditions a été estimée à 28 ± 2 min, valeur inférieure à celle obtenue dans la Cerulean.

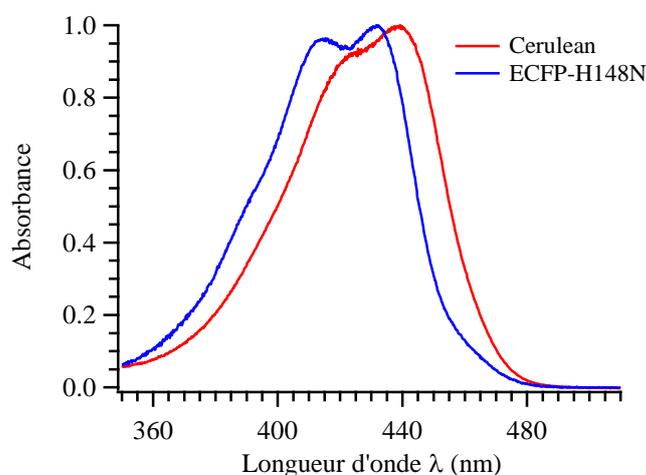


Figure 115 : Allure des spectres d'absorption de la ECFP-H148N et de la Cerulean obtenus après stabilisation du système (1 heure pour la Cerulean, 36 min pour la ECFP-H148N) suite à un saut de pH de 7,4 à 5. Les spectres ont été normalisés à 1 au maximum du spectre.

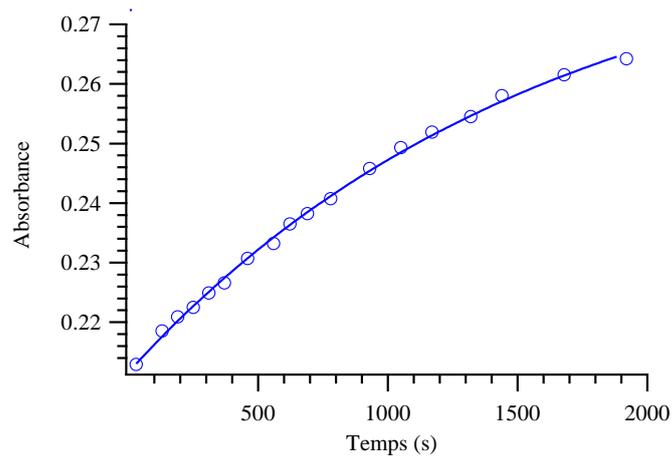


Figure 116 : Evolution au cours du temps de l'absorbance à 432 nm de la ECFP-H148N suite à un saut de pH de 7,4 à 5. Les points expérimentaux sont ajustés par une fonction monoexponentielle

En conclusion, la ECFP-H148N est sujette à un processus semblable à celui observé dans le cas de la Cerulean impliquant le saut d'une barrière de potentiel élevée. En revanche le mécanisme impliqué et le produit final apparaissent être distincts de ceux observés dans la Cerulean.

Chapitre C.IV APPROCHE STRUCTURALE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE.

La technique de dichroïsme circulaire met à profit la propriété chiroptique inhérente aux substances chirales qui absorbent différemment la lumière de polarisation circulaire droite ou circulaire gauche pour la caractérisation de la structure secondaire et tertiaire des protéines. En effet, Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés dans la région spectrale allant de l'UV lointain au visible permettent d'obtenir des informations relatives à la structure secondaire et tertiaire des protéines (126). Le dichroïsme circulaire peut également être appliqué à l'étude de changements conformationnels que subit la protéine en présence de ligands, ou à l'analyse de la stabilité d'un échantillon en fonction des conditions expérimentales (température, présence d'inhibiteurs, pH, agents dénaturants,...). En outre, la perturbation des signaux de dichroïsme circulaire, suite à l'ajout d'agents dénaturants (urée, chlorure de guanidinium, ...) ou encore suite à une augmentation de la température, apporte des informations précieuses sur l'état de repliement et sur la dénaturation de la protéine. La caractérisation thermodynamique de la dénaturation de la protéine est obtenue grâce à l'examen des spectres de dichroïsme circulaire et en particulier de leur perte d'amplitude suite à une augmentation de température (127).

D'après le chapitre précédent, toutes les protéines dérivées de la ECFP étudiées au cours de ces travaux présentent un comportement identique à pH très acide (inférieure à 3) : toutes subissent des changements spectraux profonds caractérisés par la perte du caractère bimodal des spectres d'absorption et d'émission et leur déplacement vers le bleu, ainsi qu'une diminution de près de 100% de l'intensité d'émission de fluorescence par rapport à celle à pH neutre. La technique de dichroïsme circulaire est tout à fait adaptée pour apporter des informations sur l'origine structurale de tels phénomènes.

Nous avons alors enregistré les spectres de dichroïsme circulaire de la ECFP et de quelques dérivés permettant d'avoir des résultats qualitatifs et quantitatifs sur la structure de la protéine, essentiellement à pH acide ais également sous l'effet d'autres facteurs dénaturants comme la température et la présence de chlorure de guanidinium connu par sa forte action dénaturante.

Ce chapitre est dédié à la présentation (i) des concepts de base du dichroïsme circulaire, (ii) des conditions expérimentales utilisés pour nos études et (iii) des résultats obtenus sur la ECFP et ses dérivés à différents pH et sous différentes conditions de dénaturation.

C.IV.1 PRINCIPE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE.

C.IV.1.1 HISTORIQUE

La découverte du dichroïsme circulaire remonte à la découverte de l'activité optique au début du 19^{ème} siècle. Cette dernière appelée également, pouvoir rotatoire, ou parfois *biréfringence circulaire*, est la propriété de certains milieux de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière monochromatique initialement polarisée rectilignement, vers la gauche ou vers la droite. Dans le premier cas, on parle de substance lévogyre et, dans le deuxième, de substance dextrogyre. Ce phénomène a été observé pour la première fois par Arago en 1811 sur un cristal de quartz. Trois années plus tard, Jean Baptiste Biot rapporte ce phénomène de rotation de la lumière sur plusieurs liquides comme la turpentine ou des solutions de camphor (128). En 1848, Louis Pasteur montre que l'acide tartrique existe sous deux formes asymétriques capables de faire tourner la lumière polarisée rectilignement selon deux directions. Le Bel et Vant'Hoff, en 1874, relie le pouvoir rotatoire à un réarrangement non symétrique des substituants sur l'atome de carbone autrement dit à la chiralité des molécules.

En 1895, le physicien français Aimé Cotton découvre le phénomène de dichroïsme circulaire en se basant sur les travaux de Haidinger mettant en évidence une nouvelle caractéristique de l'activité optique dans les cristaux à savoir la différence d'absorption entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite. (129) A. Cotton réalisa ses expériences sur une solution de tartrate de chrome. Il montra que cette solution présente un fort signal de dichroïsme circulaire traduit par une différence de l'intensité de la lumière transmise lorsque la solution est traversée par une lumière polarisée circulairement gauche ou circulairement droite. Ceci est la propriété de base sur laquelle repose le principe du dichroïsme circulaire.

C.IV.1.2 ASPECTS THEORIQUES

C.IV.1.2.a Lumière polarisée : quelques définitions.

La lumière est définie comme une onde électromagnétique. Elle est constituée de deux champs, un électrique \vec{E} et l'autre magnétique \vec{B} orthogonaux entre eux et oscillant en phase, perpendiculairement à la direction de propagation donnée par l'axe (oz).

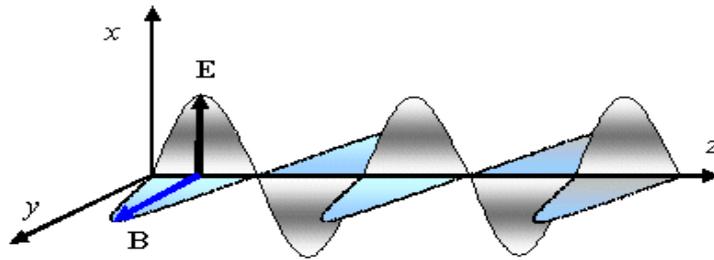


Figure 117 : Décomposition d'une onde électromagnétique dans l'espace

Une onde est dite polarisée linéairement lorsque le vecteur du champ électrique \vec{E} oscille dans un plan bien défini de l'espace. Dans le cas contraire où \vec{E} ne présente pas de direction particulière et peut prendre toutes les directions perpendiculaires à la direction de propagation, l'onde sera non polarisée comme dans le cas de la lumière naturelle.

Enfin, une onde est polarisée circulairement si son champ électrique décrit un cercle dans le plan orthogonal à la direction de propagation.

C.IV.1.2.b *Rotation optique et ellipticité.*

La lumière polarisée rectilignement envoyée sur un échantillon peut être considérée comme étant la superposition de deux ondes polarisées circulairement gauche et droite. Elle est caractérisée par un champ électrique \vec{E} présentant deux composantes \vec{E}_G et \vec{E}_D de même amplitude, tournant en phase mais en sens inverse.

$$\vec{E} = \vec{E}_G + \vec{E}_D$$

Équation 56

Le phénomène de dichroïsme circulaire se produit dès lors que l'absorption des deux composantes \vec{E}_G et \vec{E}_D diffère. Dans le cas d'un échantillon optiquement actif (molécule chirale), chaque onde va interagir avec un milieu d'indice de réfraction (n_G et n_D) et de coefficients d'absorption linéaires (α_G et α_D) différents. La lumière à l'issue de cet échantillon reste polarisée mais les deux champs \vec{E}_G et \vec{E}_D présentent alors un déphasage l'un par rapport à l'autre et des amplitudes différentes dues à une absorption distincte suivant les deux directions.

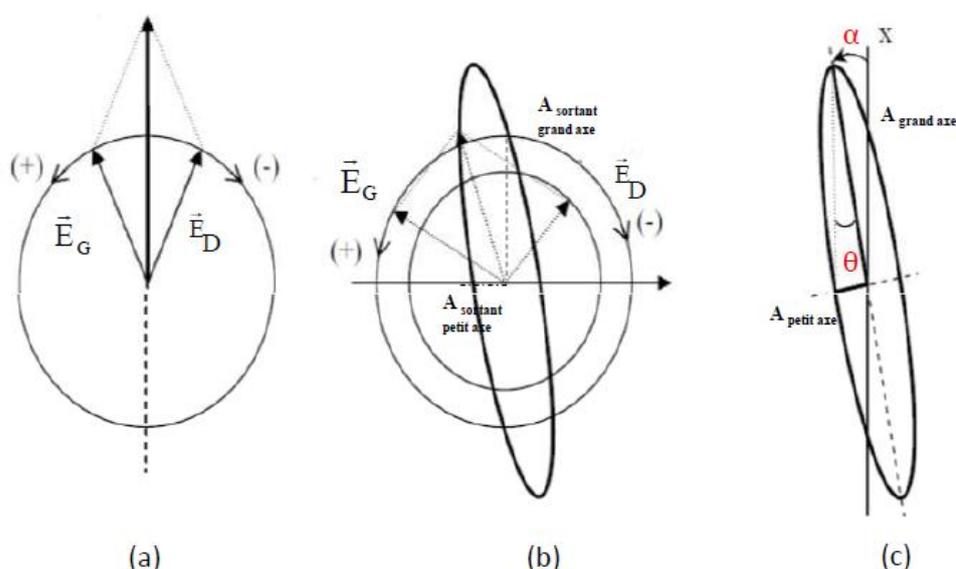


Figure 118 : (a) L'onde initialement linéairement polarisée (dont le champ électrique $\vec{E}_{\text{incident}}$ est dirigé selon le grand axe (ox)) est décomposée en deux ondes circulaires droite (+) et gauche (-) de même amplitude. (b) Après traversée de l'échantillon, il résulte un déphasage entre les deux ondes (+) et (-) car l'onde (+) est plus absorbée que l'onde (-) (c) L'onde formée caractérisée par le champ électrique \vec{E}_{sortant} est elliptiquement polarisée. L'angle α est l'angle de rotation optique de l'ellipse par rapport à la direction du grand axe (ox). L'ellipticité de cette polarisation est donnée par l'angle θ .

L'ellipticité θ de cette polarisation (Figure 117), ou plus exactement sa tangente, représente le rapport des amplitudes du champ électrique de l'onde résultante suivant les petit et grand axes selon :

$$\tan \theta = \frac{A_{\text{petit axe}}}{A_{\text{grand axe}}} \quad \text{Équation 57}$$

La différence entre les coefficients d'absorption linéaires α_G et α_D étant faible, l'angle θ est donc petit et on peut assimiler θ à $\tan \theta$. De plus, on peut montrer que l'ellipticité, exprimée en radian, est reliée aux coefficients d'absorption linéaires selon :

$$|\theta| \cong \frac{|\alpha_G - \alpha_D| \cdot \ell}{4} \quad \text{Équation 58}$$

C.IV.1.2.c Le dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire (noté DC) est défini comme la différence des coefficients d'absorption molaires des ondes polarisées circulairement gauche et droite selon l'équation suivante :

$$\text{DC} = \Delta \varepsilon = \varepsilon_{\text{Gauche}} - \varepsilon_{\text{Droite}} \quad \text{Équation 59}$$

On peut également relier le dichroïsme circulaire aux coefficients d'absorption linéaire correspondants. En effet, DO désignant la densité optique. C désigne la concentration en espèce chirale (en mol.L⁻¹) et ℓ l'épaisseur de l'échantillon traversé (en cm). Sachant que :

$$DC = \Delta\varepsilon = \frac{1}{C \cdot \ell} (DO_{\text{gauche}} - DO_{\text{droite}}) \quad \text{Équation 60}$$

et que $10^{-DO} = e^{-\alpha \cdot \ell}$

$$\text{Donc } DO = \frac{\alpha \cdot \ell}{\ln(10)} \quad \text{Équation 61}$$

L'équation 60 devient :

$$DC = \Delta\varepsilon = \frac{1}{2,3 \cdot C} \cdot (\alpha_G - \alpha_D) \quad \text{Équation 62}$$

La grandeur DC est exprimée en L.mol⁻¹.cm⁻¹.

La mesure de l'ellipticité θ donne également accès à la mesure du dichroïsme circulaire. Lorsque θ est exprimé en degré, l'équation 58 devient :

$$\theta = \frac{180}{\pi} \cdot \frac{1}{4} \cdot \ell \cdot \Delta\alpha. \quad \text{Équation 63}$$

Ou encore

$$\theta = \frac{180}{\pi} \cdot \frac{1}{4} \cdot 2,3 \cdot C \cdot \ell \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{Équation 64}$$

Il est alors possible de quantifier le dichroïsme circulaire en termes d'ellipticité molaire $[\theta]_{\text{mol}}$ en deg.mol⁻¹.L.m⁻¹ selon :

$$[\theta]_{\text{mol}} = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot \ell} \quad \text{Équation 65}$$

Avec C en mol.L⁻¹ et ℓ en cm

Soit

$$[\theta]_{\text{mol}} = \frac{100}{C \cdot \ell} \cdot \frac{180}{\pi} \cdot \frac{1}{4} \cdot 2,3 \cdot C \cdot \ell \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{Équation 66}$$

Ou encore

$$[\theta]_{\text{mol}} = 3298 \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{Équation 67}$$

Pour comparer des échantillons de macromolécules entre eux, l'ellipticité moyenne par résidu θ_{MRE} est utilisée et est définie selon :

$$\theta_{\text{MRE}} = \frac{\text{MM}}{\text{N}-1} \cdot \frac{\theta}{10 \cdot \text{C} \cdot \ell} \quad \text{Équation 68}$$

Avec MM la masse molaire en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, N le nombre de résidus dans la protéine, C la concentration en $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et ℓ la largeur de la cuve en cm.

De la même façon, il est possible de définir un dichroïsme circulaire moyen par résidu $\Delta\varepsilon_{\text{MRE}}$ selon :

$$\Delta\varepsilon_{\text{MRE}} = \frac{\theta_{\text{MRE}}}{3298} \quad \text{Équation 69}$$

C.IV.1.3 LES MESURES EXPERIMENTALES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE.

Il existe deux méthodes pour mesurer le dichroïsme circulaire.

La première méthode est la plus classique et la plus simple, réalisée par A. Cotton en 1895. Elle consiste à mesurer directement la différence d'absorption, plutôt que l'ellipticité, entre ondes circulaires, à l'aide d'un spectrophotomètre dont la polarisation rectiligne du faisceau lumineux incident a été transformée, avant son passage à travers l'échantillon, en une polarisation circulaire modulée à gauche et à droite à l'aide d'un modulateur photo élastique ou photoélectrique.

Le dichroïsme circulaire peut également être déterminé par une mesure directe de l'ellipticité induite par une onde incidente polarisée rectilignement. Le dispositif expérimental doit contenir un polariseur suivi par une lame biréfringente qui va convertir une onde incidente en une onde polarisée linéairement puis elliptiquement. En traversant ensuite un échantillon optiquement actif, une variation de l'ellipticité est induite. Cette dernière peut alors être mesurée à l'aide d'un analyseur positionné suivant le petit axe de l'ellipse. Cette technique est la plus répandue et le dichroïsme circulaire est alors quantifié en termes d'ellipticité molaire (130, 131).

C.IV.1.3.a Informations structurales données par les spectres de dichroïsme circulaire.

Les signaux de dichroïsme circulaire sont liés aux propriétés d'absorption de la molécule en question, ils seront donc non nuls uniquement dans les régions où la molécule absorbe. Pour les protéines, divers chromophores peuvent conduire à un signal d'absorption, chacun étant associé à une bande d'absorption spécifique. Aussi, des informations complémentaires sur la structure de la protéine peuvent être a priori obtenues à partir de l'analyse de différentes régions spectrales (127).

Pour les protéines, les principaux chromophores contribuant au signal de dichroïsme circulaire sont :

- Les chromophores aromatiques présentés par les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et contribuant au signal pour des longueurs d'onde comprises entre 250 nm et 320 nm. Les acides aminés soufrés cystéine et cystine présentent également une absorption vers 260 nm mais leur faible coefficient d'extinction molaire rend leur contribution négligeable. Les chaînes latérales aromatiques et soufrées présentent également une bande d'absorption en dessous de 260 nm (132).
- La fonction amide de la liaison peptidique absorbe à des longueurs d'onde inférieures à 250 nm. Le chromophore peptidique seul est plan et ne possède donc pas d'activité optique. En revanche, dans les protéines, plusieurs perturbations vont intervenir : celles induites par les chaînes latérales mais qui sont de faibles amplitudes et celles résultant des groupements peptidiques voisins. Cette dernière perturbation est prépondérante. C'est elle qui sera porteuse de l'information structurale car elle est spécifique de la géométrie des liaisons peptidiques les unes par rapport aux autres et ainsi de la structure secondaire de la chaîne polypeptidique. Le très grand nombre de liaisons peptidiques constituant la protéine rend la contribution du chromophore peptidique au signal de dichroïsme circulaire prépondérante en dessous de 250 nm.
- D'autres éléments peuvent présenter un signal dichroïque comme les cofacteurs extrinsèques (flavine, hème,..) et les ligands qui sont intrinsèquement non chiraux mais qui acquièrent une chiralité lorsqu'ils se trouvent liés à un environnement asymétrique provoqué par la protéine(133).

De fait, l'analyse des spectres de dichroïsme circulaire permet d'accéder à de nombreuses informations, en particulier sur la structure secondaire des protéines et sur laquelle nous allons nous concentrer.

Comme indiqué ci-dessus, les informations relatives à la composition de la structure secondaire (teneur en hélices α , feuillets β , boucles/coudes, ...) sont tirées à partir des spectres de dichroïsme circulaire enregistrés dans la région spectrale caractéristique de la liaison peptidique en dessous de 250 nm. Est supposée négligeable la contribution des chaînes latérales des résidus aromatiques et des résidus soufrés. La géométrie des liaisons peptidiques étant caractéristique de la structure secondaire de la chaîne polypeptidique, chaque élément de structure secondaire possèdera un spectre de dichroïsme circulaire qui lui est propre. La

Figure 119 montre les spectres de dichroïsme circulaire, enregistrés dans la région de l'UV lointain, caractéristiques de deux formes de structure secondaire des protéines : l'hélice α et les feuillets β . Le spectre de l'hélice α est formé par deux bandes négatives respectivement à 208 nm et 222 nm ainsi qu'une bande positive à 192 nm. Celle à 222 nm résulte d'une transition de type $n \rightarrow \pi^*$ due à la présence d'un doublet non-liant sur l'atome d'azote lié au groupement carbonyle C=O de la liaison peptidique, tandis que les bandes localisées à 208 nm et 192 nm sont associées à une transition de transfert de charge de l'azote vers l'atome d'oxygène $\pi \rightarrow \pi^*$. Contrairement au spectre de l'hélice α , celui des feuillets β est plus diversifié selon que sa disposition soit parallèle ou antiparallèle. Il est formé par une bande négative entre 210 et 220 nm, ayant pour origine la transition $n \rightarrow \pi^*$ au sein de la fonction amide, en plus de la bande positive se situant entre 195 et 200 nm résultant d'une transition de type $\pi \rightarrow \pi^*$ (130). Enfin, une protéine possédant une structure secondaire irrégulière se présente avec un spectre ayant une bande négative prédominante autour de 200 nm (

Figure 119).

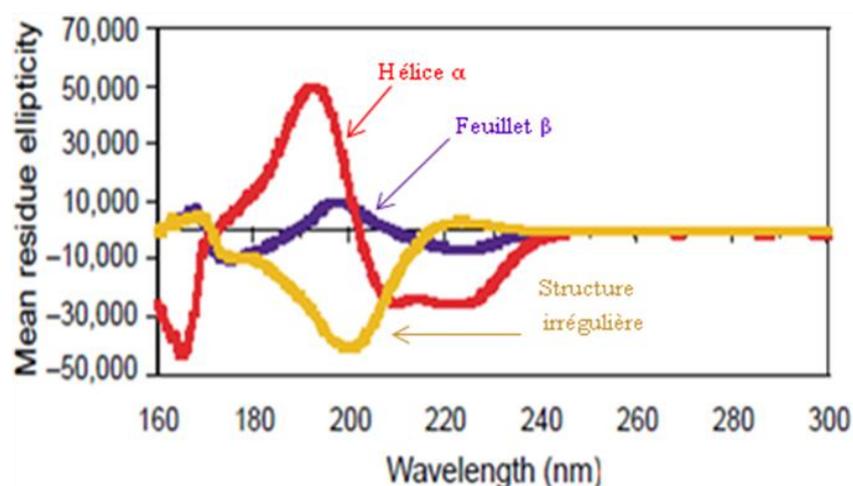


Figure 119 : Spectres SRCD associés aux différentes structures secondaires de la protéine, hélice α en rouge, feuillet β en violet, protéine ayant une structure secondaire irrégulière en jaune. Extrait de Wallace *et al.* (134)

C.IV.2 ASPECTS EXPERIMENTAUX

Il est préférable d'utiliser un instrument de dichroïsme circulaire associé à un rayonnement synchrotron. En effet, l'intensité du faisceau est très intense et permet d'accroître le rapport signal sur bruit par rapport à un spectromètre classique. De plus, il permet l'enregistrement des spectres dans l'UV lointain (jusqu'à 170 nm) ce qui offre une résolution plus fiable de la structure secondaire. En effet, pour le dichroïsme circulaire conventionnel qui est un

instrument possédant comme source de lumière une lampe Xe, il est difficile de prendre des mesures à des longueurs d'onde inférieures à 180 nm, parce que l'intensité des radiations s'éteint dans ces régions, et le diazote et l'eau utilisés pour purger l'échantillon absorbent fortement dans cette région (135). Pour des longueurs d'onde avoisinant 190 nm, les spectres de dichroïsme circulaire des hélices α et feuillets β sont de forme similaire mais le signal dû aux feuillets β est largement écrasé par celui plus intense des hélices α . En dessous de 190 nm, ces deux structures secondaires possèdent des spectres bien distincts. Aussi l'enregistrement d'un spectre de dichroïsme circulaire sur un rayonnement synchrotron offre la possibilité de mieux quantifier la teneur en feuillets β .

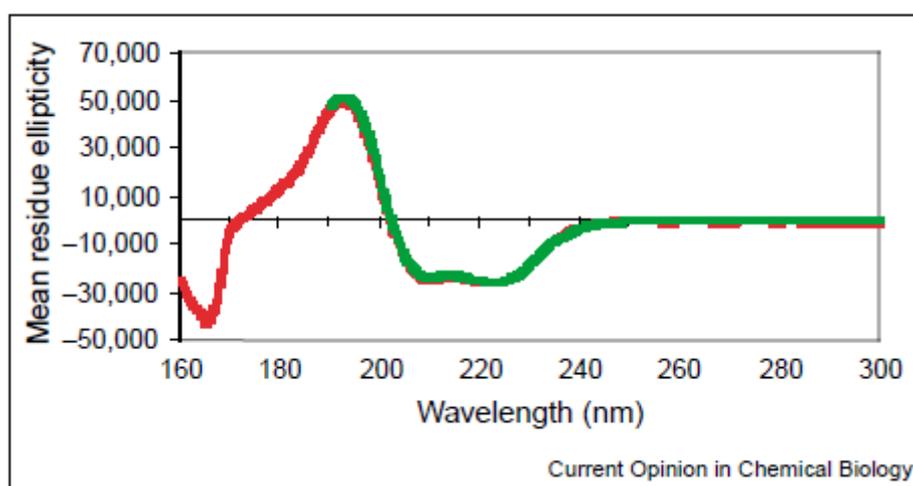


Figure 120 : Spectres de dichroïsme circulaire issus d'un instrument classique (en vert) et celui associé à un faisceau synchrotron (en rouge)

C.IV.2.1 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons enregistré les spectres SRCD sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL (Gif-sur Yvette) des protéines purifiées : ECFP, mTurquoise, ECFP-T65S, Cerulean et Aquamarine, solubilisées (i) dans le tampon MCBtP ajusté à un pH égal à 7,4 ou (ii) dans le tampon acide citrique ajusté à un pH de 2,5. Dans les deux cas, la concentration en tampon est de $30 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. A de telles concentrations, le signal du tampon ne masque pas celui de la protéine et se traduit par un spectre plat.

Pour chaque protéine, quatre spectres consécutifs sur le domaine de la longueur d'onde 170-280 nm avec un pas de 1 nm ont été acquis puis moyennés. De la même façon, quatre spectres consécutifs pour le tampon et correspondant au même domaine spectral ont été enregistrés, moyennés puis soustraits au spectre obtenu pour la solution de protéine.

Les spectres enregistrés sur la ligne DISCO du synchrotron Soleil représentent la variation de l'ellipticité θ en fonction de la longueur d'onde. Afin de pouvoir comparer les spectres entre eux, ils ont été corrigés des valeurs de chemin optique ℓ en cm, de la concentration en protéine C en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et de la masse molaire moyenne par résidu MRW sur la base de l'équation suivante dérivée des équations 68 et 69 :

$$\Delta\varepsilon_{\text{MRE}} = \frac{\text{MRW}}{3298} \cdot \frac{\theta}{10 \cdot C \cdot \ell} \quad \text{Équation 70}$$

Le Tableau 27 ci-dessous rassemble les valeurs de la masse molaire moyenne par résidu et calculées selon :

$$\text{MRW} = \frac{\text{MM}}{\text{Nombre de résidus} - 1} \quad \text{Équation 71}$$

Protéine	ECFP	ECFP-T65S	Cerulean	mTurquoise	Aquamarine	EYFP
MM (Da)	29739	29552	29609	29714	29609	29825
MRW	113,94	113,23	113,44	113,85	113,44	114,27

Tableau 27 : Valeurs de la masse molaire moléculaire moyenne par résidu (MRW) pour chaque protéine étudiée dont la masse molaire (MM) est indiquée. Le nombre total de résidus pour toutes les protéines est de 262 (la chaîne correspondant à la protéine en elle-même -238 résidus- à laquelle s'ajoutent les 23 résidus formant le lien peptique portant les 6 histidines nécessaires pour la purification).

La concentration en protéine pour chaque solution à pH 7,4 a été estimée à partir de la valeur de l'absorbance au maximum du spectre d'absorption (434 nm pour la ECFP et ses dérivés et 508 nm pour la EYFP) et en prenant comme valeur du coefficient d'absorption molaire $32000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour toutes les ECFP et $80000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour la EYFP.

C.IV.2.2 METHODES D'ANALYSE DES SPECTRES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE.

Il existe plusieurs méthodes d'analyse des spectres de dichroïsme circulaire permettant la détermination du contenu en structure secondaire de la protéine (136, 137). Toutes supposent que le spectre CD d'une protéine est la combinaison linéaire des spectres de structure secondaire élémentaire selon :

$$\theta_\lambda = \sum_i f_i \cdot S_{\lambda,i} \quad \text{Équation 72}$$

Où θ_λ représente le spectre CD de la protéine étudiée, fonction de la longueur d'onde λ , f_i la fraction de la structure secondaire élémentaire i et $S_{\lambda,i}$ l'ellipticité de la structure secondaire élémentaire i , fonction de la longueur d'onde λ . La détermination du contenu en structure

secondaire repose sur la comparaison du spectre de la protéine étudiée avec un panel de spectres de protéines dit de référence, dont le contenu en structure secondaire est connu, déterminé à partir de la structure cristallographique. La comparaison s'effectue via diverses approches d'ajustement des données tels que, par exemple, la décomposition en valeur simple (SVD). La qualité de l'ajustement est quantifiée au travers de l'écart quadratique moyen (rmsd) défini selon $\text{rmsd} = \left[\frac{\sum (\theta_{\text{exp}} - \theta_{\text{calc}})^2}{\sum (\theta_{\text{exp}})^2} \right]^{1/2}$ qui doit être le plus proche de 0. Ceci est complété par l'analyse visuelle des résidus.

Parmi les divers algorithmes disponibles d'analyse des spectres CD, nous avons constaté que deux conduisent à de bons ajustements de nos données. Il s'agit de CONTIN et CDSSTR dont les principes sont brièvement indiqués ci-après.

CONTIN(138) ajuste le spectre CD de la protéine étudiée par comparaison avec une combinaison linéaire de spectres CD de protéines de référence, contenus dans une base de données plus large. Seuls les spectres de référence dont la combinaison linéaire conduit à un bon ajustement entre le spectre théorique reconstitué et le spectre CD expérimental vont contribuer à l'analyse. Ceci implique que les spectres de référence utilisés peuvent être différents suivant l'analyse notamment lors de celle de spectres CD de protéines se différenciant par une mutation.

CDSSTR (139-141) utilise au départ une base de données contenant un jeu important de spectres CD de protéines de référence. La structure secondaire est déterminée en utilisant la méthode de décomposition en valeur simple (SVD). L'algorithme exclu de la base de données les spectres des protéines de référence qui ne permettent pas de répondre aux critères de qualités d'une solution suivants :

- La somme des éléments de structure secondaire doit être comprise entre 0,9 et 1,1.
- Toutes les fractions de structure secondaire doivent être supérieures à -0,03, idéalement elles doivent être positives.
- L'ajustement du spectre CD reconstruit doit être inférieur au niveau de bruit porté par les données expérimentales.
- La fraction en hélice doit être similaire à celle obtenue en utilisant tous les spectres CD des protéines de la sous-base de données utilisées.

Plusieurs jeux de spectres de protéines de référence peuvent répondre à l'ensemble de ces critères et leur solution est moyennée.

Enfin, nous avons utilisé la base de données de référence SP175, la seule permettant une analyse des spectres SRCD sur une large gamme de longueur d'onde s'étendant de 175 nm à 240 nm. Cette base de données ne contient pas la GFP comme protéine de référence puisque le spectre CD de cette protéine n'a jusqu'alors jamais été obtenu en utilisant un rayonnement synchrotron.

C.IV.3 ETUDE DE LA ECFP, DE SES DERIVES ET DE LA EYFP PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE.

L'étude par dichroïsme circulaire des principaux dérivés de la ECFP a pour but d'obtenir des informations sur la structure secondaire de ces protéines. Nous avons tenté de déterminer l'influence de divers paramètres physicochimiques (pH, T°, conditions de dénaturation) notamment afin d'apporter des réponses structurales aux phénomènes observés par spectroscopie de fluorescence, entre autres, à pH très acide.

C.IV.3.1 STRUCTURE SECONDAIRE ESTIMEE A PARTIR DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE.

A partir de la structure cristallographique des protéines, il est possible d'estimer le contenu en structure secondaire de celle-ci à savoir la proportion d'éléments conformationnels locaux de la chaîne peptidique que l'on peut regrouper en quatre grandes catégories : hélices, feuillets, tours ou coudes et structures aperiodiques ou désordonnées. Il existe de nombreux outils permettant une telle analyse. Certains serveurs sur internet offrent également cette possibilité. Nous avons choisi ici d'utiliser le serveur PDBsum du European Bioinformatics Institute (EBI) : <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>. Celui-ci permet à partir de la structure PDB (Protein data Bank) de la protéine, une décomposition de la structure secondaire en hélice α , hélice 3-10, feuillets, coudes ou tours et structures désordonnées. Par ailleurs, hormis pour la mTurquoise2, les structures publiées de la ECFP et de ses dérivées portent sur 228 résidus alors que la protéine complète en contient 238 voire 262 dans le cas des protéines étudiées au cours de ces travaux, dû à la présence du lien peptidique contenant 6 histidines nécessaire pour la purification. Nous avons supposé que ces résidus supplémentaires n'adoptent pas de structures secondaires régulières et contribuent au pourcentage de structures désordonnées. Dans ce contexte, nous avons recalculé le pourcentage de chaque structure secondaire élémentaire. Le tableau ci-dessous regroupe les analyses effectuées sur la grande majorité des structures publiées de la ECFP et de ses dérivés ainsi que sur la EYFP (Tableau 28).

Comme attendu, la ECFP, ses dérivés et la EYFP sont des protéines dont la structure secondaire est principalement constituée de feuillets β (~44%) et est très faiblement perturbée suite aux diverses mutations introduites même si une corrélation attendue semble se dessiner : les protéines les plus performantes, à savoir ayant les propriétés photophysiques les plus performantes et une forte stabilité envers le pH présentent une proportion moindre en structures désordonnées et un contenu en feuillets plus important. Ces données serviront de base pour valider les analyses de structure secondaire issues des données de dichroïsme circulaire.

Protéine	PDB ID	Feuillet (%)	Hélices (%)	Tours/coudes (%)	Structures désordonnées (%)
ECFP	1OXD	<i>50,0</i>	<i>12,39</i>	<i>7,96</i>	<i>29,65</i>
		43,13	10,69	6,87	39,31
	1OXE	<i>51,33</i>	<i>12,39</i>	<i>7,96</i>	<i>28,32</i>
		44,27	10,69	6,87	38,17
Cerulean pH 7,4	2WSN	<i>51,79</i>	<i>12,05</i>	<i>7,59</i>	<i>28,57</i>
		44,27	10,31	6,49	38,93
Cerulean pH 7,4	2wso	<i>52,23</i>	<i>9,38</i>	<i>8,93</i>	<i>29,46</i>
		44,66	8,02	7,63	39,69
Cerulean pH 5	2q57	<i>51,33</i>	<i>9,29</i>	<i>9,29</i>	<i>30,09</i>
		44,27	8,02	8,02	30,09
SCFP3A	2ydz	<i>52,44</i>	<i>11,11</i>	<i>8,44</i>	<i>28</i>
		45,04	9,54	7,25	38,17
mTurquoise	2ye0	<i>52,44</i>	<i>9,78</i>	<i>9,33</i>	<i>28,44</i>
		45,04	8,40	8,02	38,55
mTurquoise2	3ztf	<i>50,0</i>	<i>11,83</i>	<i>8,05</i>	<i>30,08</i>
		45,04	10,69	7,25	37,02
EYFP	1yfp	<i>50,89</i>	<i>9,82</i>	<i>9,82</i>	<i>29,46</i>
		43,51	8,40	8,40	39,69

Tableau 28 : Contenu en structure secondaire de la ECFP, de certains de ces dérivés et de la YFP obtenu à partir de l'analyse de la structure cristallographique. En italique, sont indiqués les résultats bruts. En gras, sont indiquées les valeurs obtenues en tenant compte de la présence dans nos protéines du lien peptique supplémentaire, comportant les 6 histidines nécessaires à la purification.

C.IV.3.2 SPECTRE SRCD DE LA ECFP, DE SES DERIVES ET DE LA EYFP A PH 7,4. ALGORITHMES D'ANALYSE.

C.IV.3.2.a Description des spectres

Les spectres SRCD dans l'UV-lointain obtenus pour la ECFP, ses dérivés ECFP-T65S, Cerulean, mTurquoise et Aquamarine et la EYFP (Figure 121) sont d'allure similaire au spectre CD (190-240nm) de la EGFP rapporté par Visser *et al.*(101). Ils sont caractéristiques des protéines à haute teneur en feuillets β (142) : ils sont d'amplitude faible ; ils sont caractérisés par une bande négative à 217 nm attribuée à la transition $n-\pi^*$ et une bande

positive à 197 nm et une autre négative vers 180 nm dues aux transitions $\pi - \pi^*$ de la liaison peptidique. La position des points d'intersection du spectre avec l'axe des abscisses sont situés à 205,5 nm et 187,5 nm, proche des valeurs présentées par le spectre de la EGFP (38).

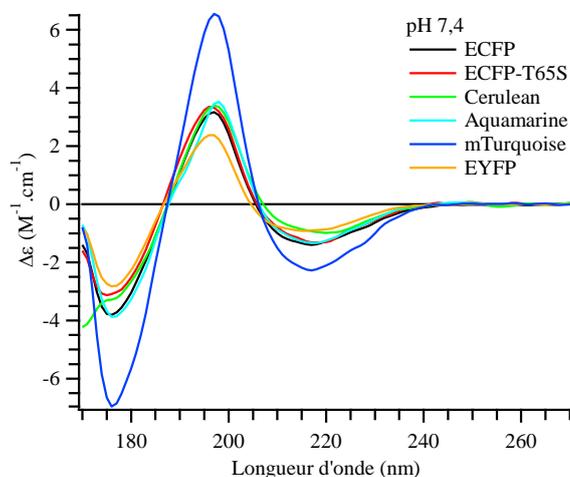


Figure 121 : Spectres SRCD de la ECFP, de certains de ses dérivés et de la EYFP à pH 7,4 et T=25°C.

C.IV.3.2.b Détermination du contenu en structure secondaire.

Nous avons analysé les spectres SRCD de la ECFP à pH 7,4 en utilisant les deux algorithmes CONTIN et CDSSTR et la base de données SP175. L'analyse faite sur les spectres obtenus pour deux échantillons distincts, enregistrés à des sessions distinctes, conduit à des résultats similaires et fait ressortir un haut contenu en feuilletts β (Tableau 29). Globalement, les deux algorithmes conduisent à un contenu en structure secondaire assez proche de celui issu de la structure cristallographique. Néanmoins, de petites différences sont constatées. CDSSTR semble être en accord avec l'analyse de la structure cristallographique en termes de contenu en feuilletts et en structures désordonnées mais semble sous-estimer le contenu en hélices et surestimer le contenu en coudes. Pour CONTIN, un bon accord est trouvé pour le contenu en structures désordonnées et en hélices, par contre il sous-estime le contenu en feuilletts et en coudes. Aucun des deux algorithmes ne semble donc parfaitement retrouver les valeurs issues de la structure cristallographique. Le fait de comparer des analyses obtenues sur des cristaux, d'un côté, et sur des solutions, de l'autre, pourrait à la rigueur expliquer l'écart observé sur le contenu en structure secondaire entre le CD et les structures cristallographiques. En revanche, le fait que deux algorithmes utilisant la même base de données n'aient pas de point de convergence est plus ennuyeux. Dans une première approche, l'obtention dans le cas de CDSSTR de bien meilleurs résidus et une estimation plus proche de la structure

crystallographique du contenu en feuillets β pourrait laisser penser que cet algorithme est le mieux approprié à nos analyses.

Echantillon	Algorithme	Hélices (%)	Feuillets (%)	Coudes (%)	Structures désordonnées (%)	rmsd
1 (As06451)	<i>CDSSTR</i>	6	44	11	39	0,046
	CONTIN	11,1	39,7	10,7	38,5	0,137
2 (As05788)	<i>CDSSTR</i>	7	46	9	39	0,031
	CONTIN	13	40,4	8,9	37,8	0,147
Moyenne	<i>CDSSTR</i>	6,5 \pm 0,7	45 \pm 1,4	10 \pm 1,4	39	
	CONTIN	12,1	40,1	9,8	38,2	
Structure secondaire RX		10,7	43-44	6,9	38-39	

Tableau 29 : Contenu en structure secondaire (hélice α , feuillet β , coudes/tours et structures désordonnées) de la ECFP à pH 7,4 déterminé par analyse des spectres SRCD obtenus sur deux échantillons distincts. Comparaison des deux algorithmes utilisés pour l'analyse des spectres. Comparaison avec le contenu en structure secondaire déterminé à partir de la structure cristallographique.

Nous avons analysé de façon similaire les spectres SRCD obtenus pour d'autres dérivés purifiés de la ECFP et pour la EYFP purifiée. Hormis la mTurquoise dont le comportement apparaît atypique, les autres protéines présentent un contenu en structure secondaire très analogue à celui de la ECFP (Tableau 30). Concernant la mTurquoise, le spectre SRCD obtenu est d'amplitude nettement supérieure à celles des spectres des autres protéines ce qui se traduit par un contenu accru en hélices α . Néanmoins, ces résultats doivent être pris avec précaution puisque le spectre SRCD de la mTurquoise n'a été enregistré que sur un seul échantillon. Nous devons réitérer ces expériences sur la mTurquoise afin de confirmer ou non le comportement de cette protéine.

Protéine	Algorithme	Hélices (%)	Feuillets (%)	Coudes (%)	Structures désordonnées (%)
Cerulean	<i>CDSSTR</i>	5,0	45,0	10,0	37,5
	CONTIN	11,1	40,2	11,0	37,7
CFP-T65S	<i>CDSSTR</i>	5,0	45,0	11,0	38,0
	CONTIN	11,1	40,6	10,9	37,5
mTurquoise	<i>CDSSTR</i>	18	40,0	8,0	34
	CONTIN	14,6	42,3	6,1	36,9
Aquamarine	<i>CDSSTR</i>	5,5	45,5	10,0	38,0
	CONTIN	11,4	40,8	9,6	38,2
EYFP	<i>CDSSTR</i>	5,0	44,0	11,0	38,0
	CONTIN	11,1	38,2	11,7	38,9

Tableau 30 : Contenu en structure secondaire (hélice α , feuillet β , coudes/tours et structures désordonnées) de dérivés de la ECFP et de la EYFP à pH 7,4. Ce contenu est une moyenne des résultats obtenus pour deux échantillons distincts sauf pour la mTurquoise et la EYFP pour lesquelles un seul échantillon a été analysé. Comparaison des deux algorithmes utilisés pour l'analyse des spectres.

C.IV.3.2.c Influence de la concentration en protéine sur la détermination du contenu en structure secondaire à partir des spectres SRCD.

La concentration en protéines dans nos échantillons a été estimée à partir de l'absorbance à 430 nm et en supposant une valeur de $32000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le coefficient d'absorption molaire ϵ_{430} pour toutes les protéines. Néanmoins, nous avons précédemment montré que la détermination du coefficient d'absorption molaire de la ECFP et de ses dérivés par le test BCA peut être biaisée par la possible présence dans la solution d'une quantité de protéines non matures. Une mésestimation de la valeur du coefficient d'absorption molaire peut, a priori, avoir des répercussions importantes sur l'estimation du contenu en structures secondaires des spectres SRCD dans la mesure où ces derniers sont corrigés de la valeur de la concentration en protéine préalablement à leur analyse. Nous avons donc souhaité évaluer l'impact, sur le contenu en structure secondaire déterminé à partir des spectres SRCD d'une mauvaise estimation de la concentration en protéines du fait de l'incertitude sur la valeur du coefficient d'absorption de nos protéines.

Facteur correctif	0,75	1	1,5
ϵ_{430} ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	24	32	48
Concentration en protéine (μM)	21,86	16,40	10,93

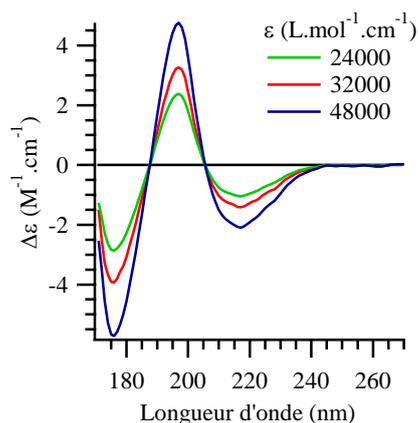


Figure 122 : Gamme du facteur multiplicatif appliqué sur le spectre SRCD de la ECFP à pH 7,4 afin de modéliser une variation du coefficient d'absorption molaire entre $24000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $48000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. L'application de ce facteur conduit à une modification significative de l'amplitude du spectre SRCD. Le graphe de droite représente les spectres SRCD obtenus en considérant la valeur du coefficient d'absorption molaire à 430 nm égale à 24000, 32000 et 48000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Pour ce faire, nous avons généré à partir d'un spectre SRCD expérimental de la ECFP à pH 7,4 plusieurs autres spectres qui se différencient par un facteur multiplicatif permettant de modéliser une variation de la concentration pouvant atteindre un facteur 2 sur l'ensemble de la gamme testée. Cela revient à prendre une valeur du coefficient d'absorption molaire à 430 nm comprise entre $24000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $48000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Cet intervalle encadre l'ensemble des valeurs obtenues dans ce travail ou rapportées dans la littérature, Rizzo *et al.* annonçant par exemple une valeur de $43000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour la Cerulean (88).

Les spectres SRCD générés en utilisant un facteur correctif compris entre 0,75 et 1,5 ont été analysés avec les deux algorithmes CONTIN et CDSSTR. Globalement, bien que l'amplitude du spectre varie d'un facteur 2 sur l'ensemble de la gamme testée (Figure 122), les répercussions sur le contenu en structure secondaire sont peu significatives, inférieures à 5% pour l'algorithme CONTIN. Concernant l'algorithme CDSSTR, un comportement similaire est également constaté hormis pour des valeurs de ϵ_{430} supérieures à 45000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ où un saut brutal est observé pour les taux en hélices α et en feuillets β . L'augmentation de l'amplitude du spectre s'accompagne d'un accroissement du taux en hélices α et d'une réduction de celui en feuillets β . Ce comportement est celui logiquement attendu dans la mesure où l'amplitude du spectre d'une protéine principalement en feuillet β est plus faible que celle d'une protéine à haute teneur en hélice α . Ce qui l'est moins est le saut brusque : pour une amplitude légèrement plus importante du spectre SRCD, l'algorithme CDSSTR fait ressortir 8% de taux en hélice α en supplément et 5% de taux en feuillet β en moins.

Nous avons cherché à vérifier si ce comportement de l'algorithme CDSSTR était général pour nos protéines. Nous avons donc analysé de la même façon une série de spectres générés en appliquant un facteur multiplicatif variable sur un spectre SRCD expérimental de la ECFP à pH 2,5. Un comportement similaire à celui observé à pH 7,4 est constaté (Figure 124) : le contenu en structure secondaire ne varie pas significativement avec l'amplitude du spectre d'après l'algorithme CONTIN. Par contre, le même saut brusque que celui relevé à pH 7,4 se produit en utilisant l'algorithme CDSSTR avec un gain de 8% du contenu en hélice α et une perte de 5% du contenu en feuillet β . Une analyse plus fine des divers spectres et en particulier de leur amplitude au niveau de chaque bande révèle qu'il existe une amplitude négative seuil pour la bande négative à 217 nm en dessous de laquelle l'algorithme CDSSTR indique un taux en hélices α significativement plus important. Cette amplitude seuil est de -2 M⁻¹.cm⁻¹.

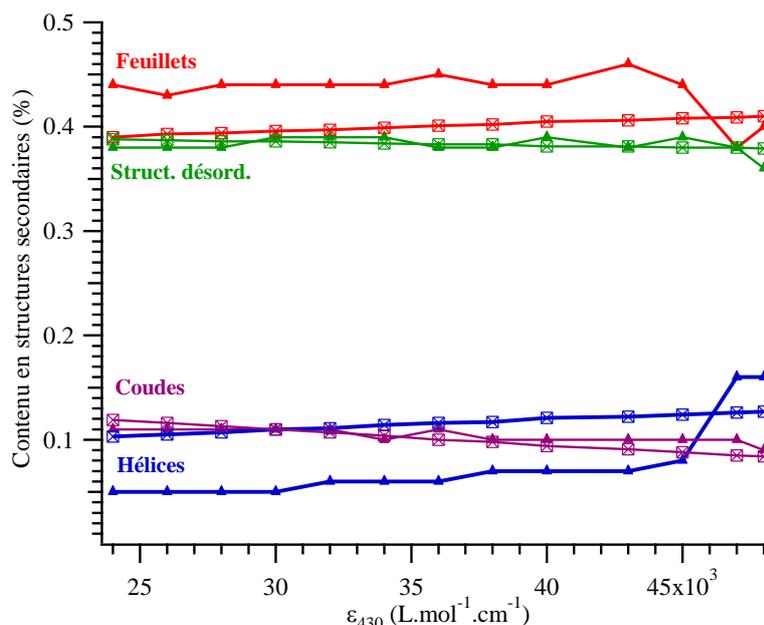


Figure 123 : Variation du contenu en structures secondaires (hélices α -courbes bleues, feuillets β -courbes rouges, tours/coudes-courbes violettes et structures désordonnées-courbes vertes) de la ECFP à pH 7,4 suivant la valeur du coefficient d'absorption molaire ϵ_{430} utilisée pour déterminer la concentration en ECFP dans l'échantillon. Les courbes avec les marqueurs \square correspondent à l'analyse par CONTIN, celles avec les marqueurs \blacktriangle à l'analyse par CDSSTR.

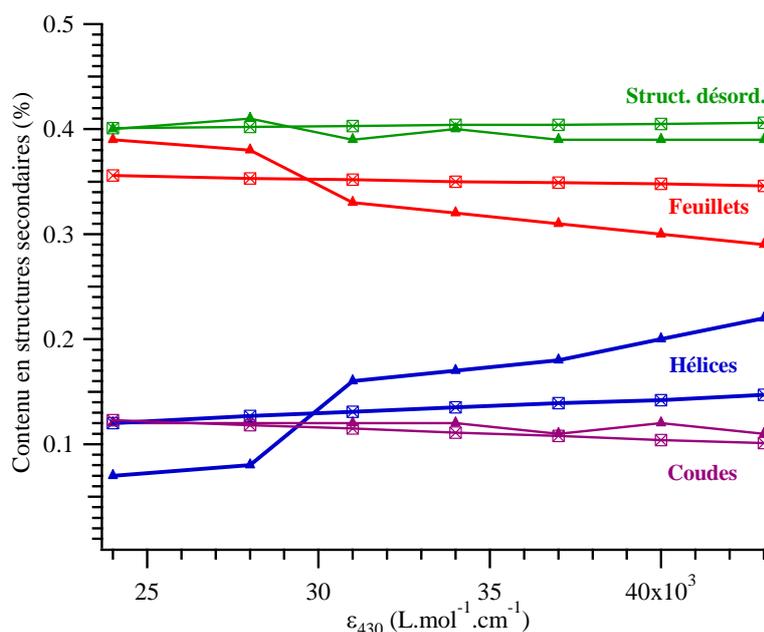


Figure 124 : Variation du contenu en structures secondaires (hélices α -courbes bleues, feuillets β -courbes rouges, tours/coudes-courbes violettes et structures désordonnées-courbes vertes) de la ECFP à pH 2,5 suivant la valeur du coefficient d'absorption molaire du maximum de la bande d'absorption du chromophore utilisée pour déterminer la concentration en ECFP dans l'échantillon. Les courbes avec les marqueurs \square correspondent à l'analyse par CONTIN, celles avec les marqueurs \blacktriangle à l'analyse par CDSSTR.

De ces résultats, il ressort que les deux algorithmes CDSSTR et CONTIN semblent, de façon préférentielle, sélectionner dans la base de données, ici SP175, des protéines avec un spectre

SRCD dont la position et l'amplitude relative des diverses bandes est similaire à celle du spectre analysé. En effet, l'amplitude du spectre semble être, dans une certaine mesure et pour des amplitudes faibles caractéristiques des protéines en tonneau β , un critère qui joue peu. Cet état de fait provient sans doute d'une sous-représentativité des spectres SRCD de protéines en tonneau β dans la base de données SP175. Ceux de la GFPav ou d'autres protéines fluorescentes analogues ne sont d'ailleurs pas intégrés dans cette base.

C.IV.3.2.d CDSSTR, CONTIN ou les deux ?

Afin de pouvoir comparer les analyses du contenu en structures secondaires obtenus sous différentes conditions physicochimiques, s'offrent à nous deux possibilités :

- Comparer les analyses obtenues avec le même algorithme. Bien que conduisant à des ajustements moins satisfaisants que CDSSTR qui se traduisent par des résidus et une valeur de rmsd moins bons, l'algorithme CONTIN semble être plus robuste, moins soumis à de brusques variations dans les contenus en hélices α et en feuillets β que CDSSTR.
- Utiliser les valeurs du contenu en structures secondaires au niveau du point de convergence des deux algorithmes. Néanmoins, au final cela revient à utiliser les valeurs obtenues à partir de l'algorithme CONTIN puisque sur le domaine d'amplitudes dans lequel tombe les spectres SRCD que nous avons enregistrés, le contenu en structures varie peu (Figure 123, Figure 124).

De fait, dans la suite, nous comparerons les valeurs obtenues avec l'algorithme CONTIN.

C.IV.3.3 INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES SUR LE CONTENU EN STRUCTURES SECONDAIRES DE LA ECFP, DE SES DERIVES ET DE LA YFP.

Nous avons souhaité caractériser l'influence de divers paramètres pouvant conduire, à des degrés divers, à des perturbations structurales de la protéine : les pH très acides, la température, la combinaison des deux ou encore l'ajout d'agent dénaturant.

C.IV.3.3.a Comportement à pH très acide.

Les spectres SRCD de la ECFP, des dérivés ECFP-T65S, Cerulean, mTuquoise, Aquamarine et de la EYFP à pH 2,5 ont été enregistrés. Globalement, une acidification du milieu conduit à une légère modification de l'allure des spectres SRCD. Ceci se traduit par une réduction de l'amplitude relative de la bande positive à 197 nm par rapport aux deux autres bandes négatives qui, à l'inverse, voient leur amplitude relative augmenter, surtout celle vers 217 nm

lorsque le pH de la solution passe de 7,4 à 2,5. Un léger déplacement des deux bandes en dessous de 200 nm est également observé qui se traduit par un déplacement net de près de 3 nm vers les petites longueurs d'onde des deux points d'intersection avec l'axe des abscisses vers 205 nm et vers 188 nm (Figure 125).

Des études théoriques visant à calculer le spectre de dichroïsme circulaire montrent que l'importance de la torsion (ou twist) des feuilletts β conduit à des variations de l'intensité relative des deux bandes à 217 nm et 195 nm(143). Plus cette torsion est importante, plus le rapport, en valeur absolue, de l'intensité des bandes à 197 nm et 217 nm est important. Nous avons calculé ce rapport dans le cas de la ECFP, aux deux pH, 7,4 et 2,5. Egal à 2,28 à pH 7,4, ce rapport est réduit à 0,6 à pH 2,5, ce qui suggère qu'à un tel pH, la torsion des feuilletts dans le tonneau est au moins en partie perdue et de fait, la protéine perd de sa structure tertiaire.

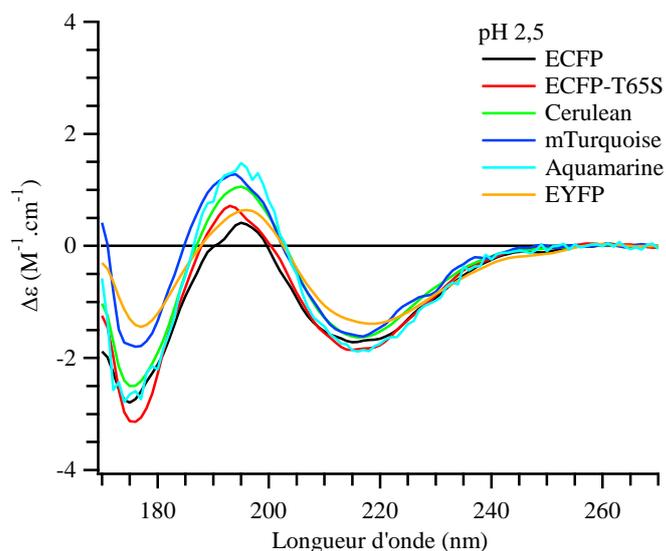


Figure 125 : Spectres SRCD de la ECFP, de certains de ses dérivés et de la EYFP à pH 2,5 et T=25°C.

Nous avons analysé ces spectres à l'aide de l'algorithme CONTIN (Figure 126). Toutes les protéines étudiées présentent à pH 2,5 un contenu en structures secondaires assez similaires. Globalement, même à des pHs aussi acides, la protéine garde un contenu conséquent en structures secondaires caractérisé par une forte teneur en feuilletts β même si celle-ci diminue entre pH 7,4 et pH 2,5. Il semble également que cette teneur soit en rapport avec les performances photophysiques et la stabilité en pH de ces protéines. Il apparaît en effet que les protéines telles que l'Aquamarine ou encore la mTurquoise conservent à pH 2,5 un taux en feuillet β plus important que pour les autres protéines que sont la ECFP, la Cerulean ou encore la ECFP-T65S. Pour les autres types de structure secondaire en particulier la teneur en

hélice α , il est difficile de mettre en évidence une tendance sûre dans la mesure où les variations observées entre 7,4 et 2,5 sont assez faibles et sont parfois plus faibles que les barres d'erreur. Nous ne chercherons donc pas à tirer plus d'informations à partir des données acquises jusqu'à ce jour. Seul l'enregistrement d'un nombre plus conséquent de spectres SRCD dans les mêmes conditions expérimentales permettrait d'affiner les barres d'erreur et de pouvoir éventuellement faire ressortir une tendance générale.

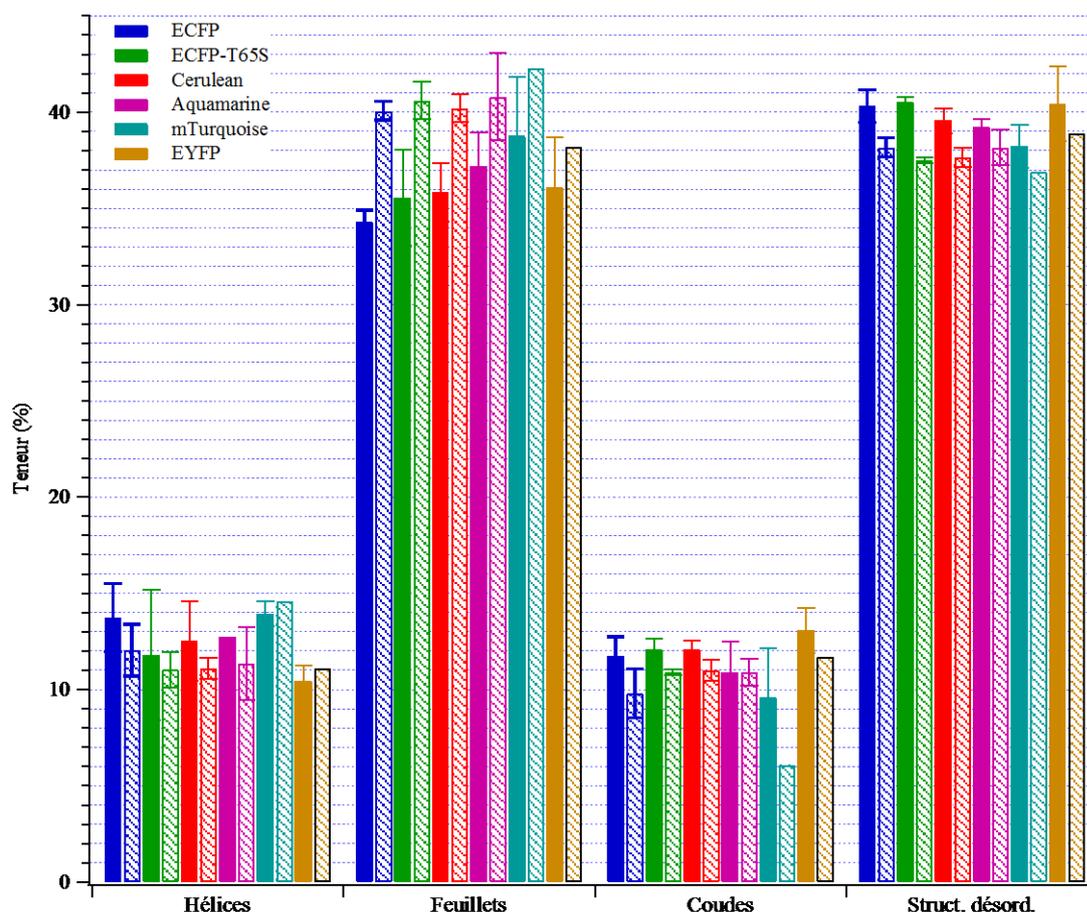


Figure 126 : Teneur en structures secondaires de différentes protéines fluorescentes à pH 2,5 (barres pleines) et à pH 7,4 (barres hachurées), obtenue par l'analyse avec l'algorithme CONTIN de leur spectre SRCD. Hormis pour la mTurquoise et la EYFP à pH 7,4, cette teneur est la moyenne d'au minimum deux échantillons distincts, préparés de façon indépendante mais acquis avec les mêmes conditions opératoires. Une couleur correspond à une protéine.

C.IV.3.3.b Effet de la température.

Nous avons enregistré les spectres SRCD de la Cerulean à pH 9 en fonction de la température de 5°C à 95°C par pas de 5°C (Figure 127). Ces spectres ne subissent pas de variations significatives pour des températures inférieures à 40°C. Au-delà de cette température, une réduction de l'amplitude des deux bandes à 197 nm et à 175 nm accompagnée d'un déplacement de la bande à 197 nm est observée. L'évolution de ces spectres ainsi que du rapport des amplitudes à 197 nm et 217 nm suggère une perte de structure tertiaire à

température élevée. Pour les deux protéines, un point isobestique est observé suggérant un équilibre impliquant deux formes de la protéine, une native à faible température et une autre dénaturée, à température élevée.

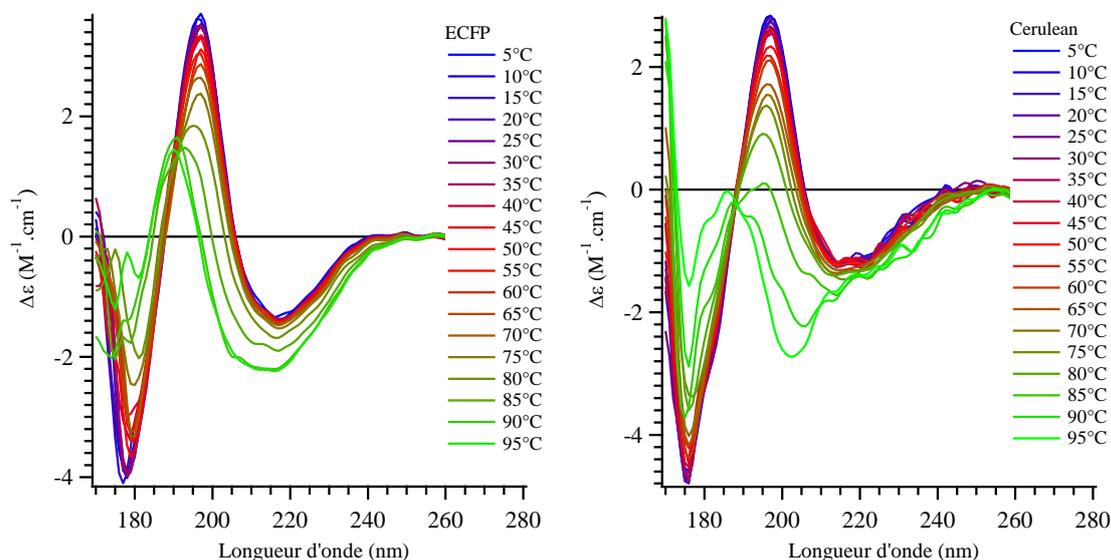


Figure 127 : Evolution du spectre SRCD de la ECFP et de la Cerulean à pH 9 en fonction de la température. Les spectres sont enregistrés après stabilisation de la température pendant 5 minutes. Le spectre obtenu à 95°C pour la Cerulean est très bruité

La variation du dichroïsme circulaire à 197 nm montre une transition en fonction de la température (Figure 128). La température de fusion de la protéine peut être estimée à partir de la courbe de la dérivée première du dichroïsme circulaire par rapport à la température, qui présente un minimum à cette température. Pour les deux protéines, cette température est de l'ordre de 85°C. Pour la Cerulean, cette valeur est en accord avec celle rapportée dans la littérature, qui s'élève à 85,3 °C (94). En revanche, pour la ECFP, la valeur que nous avons obtenue est supérieure de 10°C par rapport à celle déterminée par Lelimosin *et al.* (75,7°C) (94). La faible résolution de nos valeurs (1 point tous les 5°C) peut en partie être à l'origine de cette différence. Néanmoins, l'origine de cette différence est sans doute liée à la diversité des méthodes utilisées et du paramètre suivi. En effet, Lelimosin *et al.* ont déterminé la température de fusion à partir de la courbe de perte de l'intensité de fluorescence avec la température. La torsion du chromophore étant la principale cause de perte de la fluorescence, cette perte peut advenir dès lors que la structure de la protéine offre au chromophore une liberté (volume et flexibilité de son environnement) suffisante. La différence de valeurs obtenues entre les deux méthodes suggère que ce processus de torsion à l'état excité peut se produire avant une perte plus significative des structures tertiaire et secondaire de la protéine.

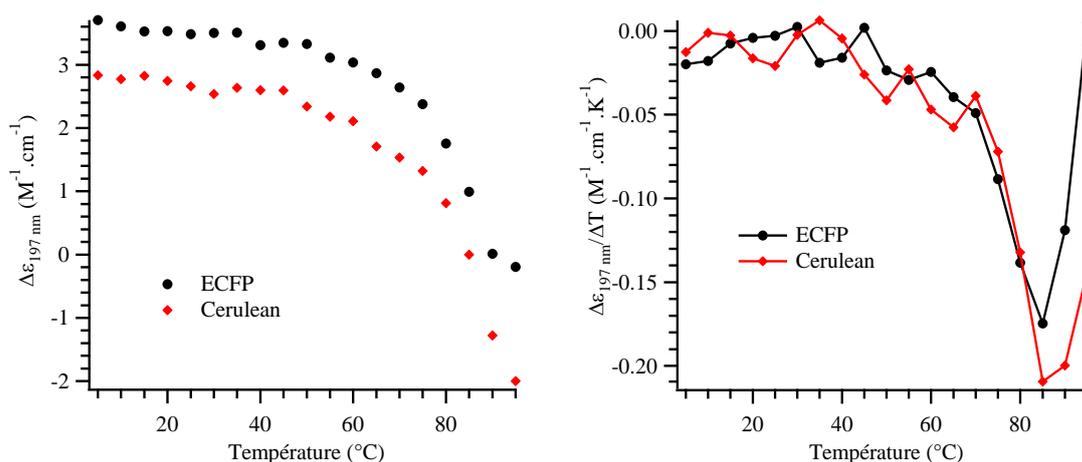


Figure 128 : Détermination de la température de fusion, T_M , de la ECFP et de la Cerulean à pH 9. Graphe de gauche : évolution du dichroïsme circulaire à 197 nm en fonction de la température. Graphe de droite : Première dérivée par rapport à la température de la courbe de variation du dichroïsme circulaire à 197 nm, permettant la détermination de T_M .

Par ailleurs, nous avons analysé les spectres SRCD obtenus aux différentes températures à l'aide de l'algorithme CONTIN. Ces analyses font ressortir une perte progressive de la structure secondaire en feuillets β de l'ordre de 10 % entre 5 °C et 95°C. Curieusement, la teneur en hélices α s'accroît légèrement avec la température, de l'ordre de 5% – une augmentation est également constatée avec l'algorithme CDSSTR. Ces résultats indiquent que même à haute température, les protéines conservent encore une part assez importante de leur structure secondaire.

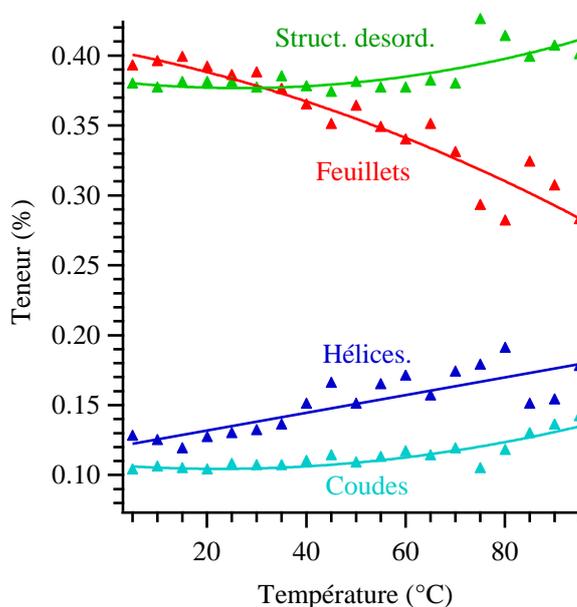


Figure 129 : Evolution en fonction de la température de la teneur en structures secondaires (hélices α , feuillets β , coudes/tours et structures désordonnées) de la ECFP à pH 9 déterminée par l'algorithme CONTIN. Les courbes en trait plein servent uniquement à guider l'œil.

C.IV.3.3.c Effet de l'ajout d'un agent dénaturant.

Les spectres SRCD d'une solution purifiée de Cerulean à pH 7,4 ont été enregistrés en présence d'un agent dénaturant, le chlorure de guanidinium de concentration 6M, consécutivement à 25 °C puis à 95°C (Figure 130). En dessous de 205 nm, ces spectres sont masqués par le signal du chlorure de guanidinium. L'ajout de cet agent à 25°C ne semble pas induire, dans le domaine de longueurs d'onde au dessus de 205 nm, de modifications significatives au niveau de l'allure du spectre de la protéine. Ceci indique que, comme attendu, l'addition de chlorure de guanidinium seul ne perturbe pas la structure de la protéine et n'est pas suffisant pour rompre les liaisons hydrogènes et autres interactions faibles assurant la stabilité structurale de ces protéines. En revanche, la combinaison de la présence de cet agent dénaturant et de température élevée conduit à une perturbation très significative du spectre SRCD. Le spectre obtenu dans ces conditions est très similaire à celui rapporté dans la littérature pour la GFP_{av} dans les mêmes conditions(54). Il est caractérisé par l'apparition d'une bande négative en dessous de 210 nm et est d'allure typique des structures secondaires irrégulières(133).

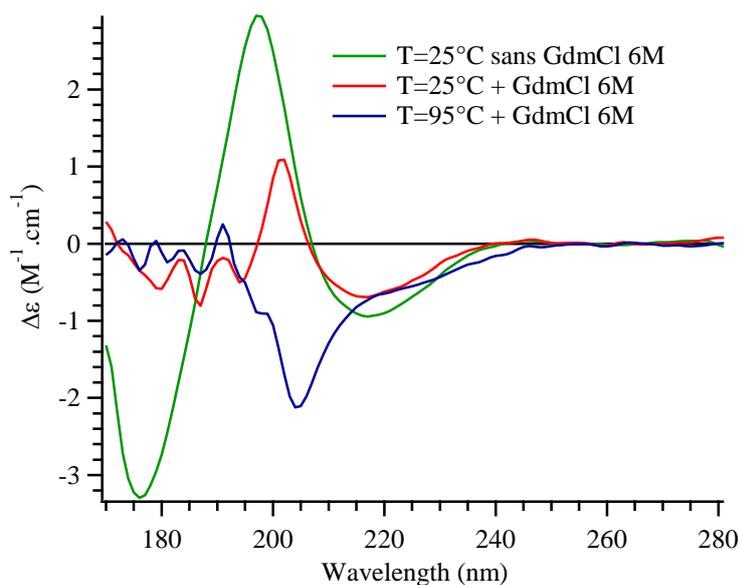
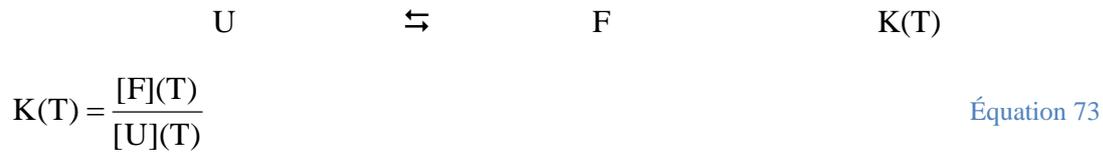


Figure 130 : Spectres SRCD de la Cerulean à pH 7,4 en présence ou non d'un agent dénaturant, le chlorure de guanidinium (GdmCl) de concentration 6M. Effet de la température.

Enfin, en supposant que la transition induite par la température implique un équilibre entre deux états de la protéine, un état natif noté F et un état dénaturé noté U, il est, à priori, possible d'extraire de nos données expérimentales des caractéristiques thermodynamiques sur

cet équilibre. Supposons l'équilibre entre les deux formes F et U caractérisé par la constante d'équilibre K de repliement selon :



où [F](T) et [U](T) représente la concentration en forme native et dénaturée à la température T. A chaque température, le dichroïsme circulaire moyen par résidu, $\Delta\varepsilon(T)$, peut s'exprimer comme la somme du dichroïsme moyen par résidu de chaque forme, $\Delta\varepsilon_F$ et $\Delta\varepsilon_U$, pondérée par leur fraction molaire dans la solution, soit :

$$\Delta\varepsilon(T) = \Delta\varepsilon_F \cdot \frac{[F](T)}{C_0} + \Delta\varepsilon_U \cdot \frac{[U](T)}{C_0} \quad \text{Équation 74}$$

où C_0 désigne la concentration totale en protéine dans la solution.

A partir des deux équations précédentes, la constante d'équilibre à la température T s'écrit

$$K(T) = \frac{\Delta\varepsilon(T) - \Delta\varepsilon_U}{\Delta\varepsilon_F - \Delta\varepsilon(T)} \quad \text{Équation 75}$$

Sachant que

$$\ln(K(T)) = -\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Équation 76}$$

il est possible, a priori, d'estimer les valeurs de l'enthalpie, ΔH , et de l'entropie, ΔS , de repliement. Nous avons tracé la courbe de dépendance, avec l'inverse de la température, du logarithme népérien de la constante d'équilibre calculée d'après l'équation 75. Les valeurs de $\Delta\varepsilon_F$ et de $\Delta\varepsilon_U$ ont été prises égales aux valeurs de dichroïsme circulaire expérimentales aux températures extrêmes, respectivement à 5°C et 95°C. Les courbes obtenues pour la ECFP et pour la Cerulean sont très similaires mais ne sont pas linéaires. Elles font apparaitre au moins deux transitions, dont une se situe en dessous de 70 °C et l'autre au dessus (Figure 131).

Nous avons déterminé les constantes thermodynamiques associées à l'équilibre impliqué aux températures inférieures à 70 °C. Nous supposons que cet équilibre implique deux états de la protéine, un état prédominant à faible température, noté E_{BasT} , et un autre prédominant à haute température, noté E_{HautT} selon



Avec

$$K_{\text{eq}}(T) = \frac{[E_{\text{BasT}}](T)}{[E_{\text{HautT}}](T)} \quad \text{Équation 77}$$

Ou encore

$$K_{\text{eq}}(T) = \frac{\Delta\varepsilon(T) - \Delta\varepsilon_{E_{\text{HautT}}}}{\Delta\varepsilon_{E_{\text{BasT}}} - \Delta\varepsilon(T)} \quad \text{Équation 78}$$

Nous avons utilisés comme valeurs de $\Delta\varepsilon_{E_{\text{basT}}}$ et de $\Delta\varepsilon_{E_{\text{HautT}}}$ celles obtenues respectivement à 5°C et à 70°C. Les courbes ainsi générées pour les deux protéines sont présentées Figure 132 et leur ajustement par une relation linéaire nous a permis d'extraire les valeurs d'enthalpie et d'entropie de l'équilibre mis en jeu. Les valeurs obtenues pour la ECFP sont assez proches de celles obtenues précédemment à partir de l'analyse des distributions de durées de vie de la ECFP à différentes températures et, plus précisément de la variation de l'amplitude relative de la composante de temps long en fonction de la température(8) (Figure 132). En effet, les données de spectroscopie d'émission de fluorescence obtenues précédemment ont relevé qu'une élévation de la température favorisait une (ou plusieurs) espèce(s) de durée de vie courte, alors que les spectres d'émission de fluorescence ne subissaient que de faibles perturbations (Figure 33). Le relativement bon accord entre les deux techniques, spectroscopies de fluorescence et dichroïsme circulaire, suggère qu'il pourrait s'agir du même équilibre.

L'examen minutieux des spectres SRCD et des analyses de structures secondaires révèle qu'une élévation de la température entre 5°C et 70°C conduit à une perte progressive de la teneur en feuillets β ainsi qu'à une réduction de l'amplitude relative de la bande à 197 nm par rapport à celle à 217 nm (Figure 127, Figure 129). Cette perte de structures secondaire et tertiaire peut se traduire par une augmentation de la flexibilité de la protéine mais également de l'environnement du chromophore et du chromophore lui-même suite à une déstabilisation du réseau de liaisons hydrogènes. Favorisant les processus non-radiatifs et notamment le mouvement de torsion du chromophore, ceci est compatible avec une réduction de la durée de vie de fluorescence.

Ainsi, l'ensemble des données expérimentales suggère l'existence, à pH 9, d'une (ou de plusieurs) conformation(s) de la ECFP de durée de vie courte et dont le spectre d'émission est légèrement décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre global de la protéine. La fraction molaire de cette espèce à 20°C est de l'ordre de 16% et de 10% dans le cas respectivement de la ECFP et de la Cerulean, estimée à partir de la valeur de la constante

d'équilibre obtenue par dichroïsme circulaire. Cette conformation présente une structure globale plus flexible avec un tonneau β qui semble être moins twisté que la conformation majoritaire à ce pH et avec une teneur en feuillets β plus faible.

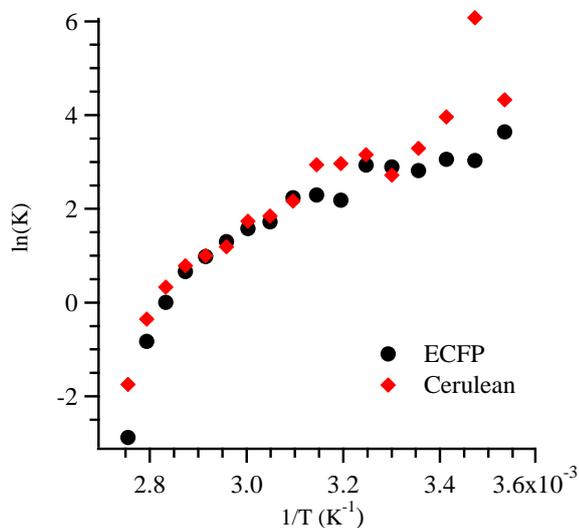
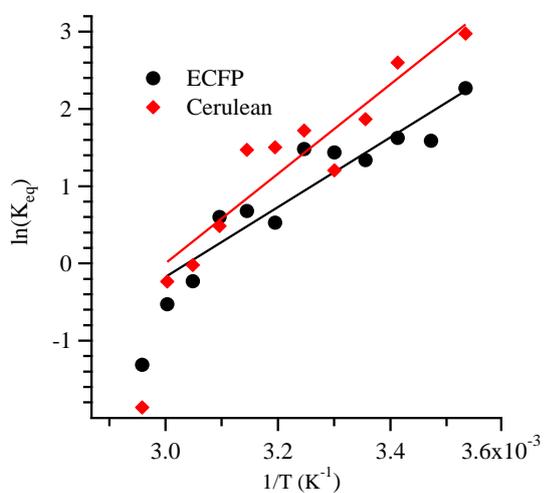


Figure 131 : Mise en évidence de plusieurs transitions thermiques par l'analyse du dichroïsme circulaire à 197 nm. La constante d'équilibre K est calculée à chaque température à partir de l'équation 75 et en prenant les valeurs de dichroïsme circulaire aux températures extrêmes, 5°C et 95°C comme référence.



Protéine	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K)
ECFP	-38 ± 5	-114 ± 15
<i>ECFP(8)</i>	-33 ± 3	-112 ± 10
Cerulean	-48 ± 6	-144 ± 20
<i>ECFP-H148D(8)</i>	-38 ± 6	-123 ± 10

Figure 132 : Grandeurs thermodynamiques obtenues en ajustant par une droite la variation avec l'inverse de la température de $\ln(K_{eq})$ défini selon l'équation 78.

**PARTIE D : ANALYSE DES RESULTATS ET
DISCUSSION**

Chapitre D.I LA TRANSITION DE DENATURATION ACIDE DE LA ECFP ET DE CES DERIVES

D.I.1 L'ESPECE $ACIDE_{pH2,5}$: ASPECTS SPECTROSCOPIQUES ET STRUCTURAUX.

Malgré des performances photophysiques et une sensibilité vis-à-vis du pH très variées, la ECFP et ses dérivés étudiés au cours de ce travail présentent tous, à bas pH, les mêmes caractéristiques photophysiques. Ayant perdu leurs structures fines, les spectres d'absorption et d'émission de ces protéines sont en supplément déplacés vers les plus petites longueurs d'onde par rapport à des pH plus élevés, avec un maximum situé à 414 nm et à 470 nm, respectivement. Ceci s'accompagne également d'une perte quasi-totale de l'intensité de fluorescence, le rendement quantique d'émission de fluorescence estimé à un pH 2,5 étant de l'ordre de $3 \cdot 10^{-3}$. Cette uniformité de comportement indique que toutes ces protéines se trouvent dans un état structural comparable à pH très acide, que nous avons précédemment dénommé espèce $Acide_{pH2,5}$.

Par ailleurs, l'allure des spectres d'absorption de ces protéines à pH 2,5 est très similaire à celle du spectre obtenu par Voliani *et al.* sur un analogue synthétique du chromophore de la ECFP solubilisé dans l'eau (11) (Figure 41). Au regard uniquement de ces aspects spectraux et en prenant en compte également la perte des propriétés d'émission de fluorescence de ces protéines à pH très acide, l'ensemble de ces résultats suggère qu'à de tels pH, la structure de la protéine est telle que le chromophore n'est plus soumis à son environnement protéique, mais à celui du solvant. Ceci laisse supposer une dénaturation partielle ou totale de la protéine dont l'état structural ne permet plus de bloquer la torsion du chromophore à l'état excité.

Des informations complémentaires sur cet état structural peuvent être obtenues à partir des études par dichroïsme circulaire à pH 2,5. Elles ont révélé qu'effectivement, les structures tertiaire et secondaire de la protéine étaient altérées à de tels pH, ce qui est compatible avec les données de spectroscopie d'absorption et d'émission de fluorescence. En revanche, les données de dichroïsme circulaire montrent que l'altération de la structure secondaire reste assez faible avec un maximum de 6% de perte de la structure en feuillets β , obtenu dans le cas de la ECFP. Ces observations vont dans le même sens que les résultats obtenus par diverses équipes sur la GFPuv, un mutant de la GFPav, indiquant qu'une structure secondaire résiduelle était conservée dans l'état dénaturé à pH acide de cette protéine (144-147). Nos

résultats de dichroïsme circulaire indiquent que pour atteindre un état plus dénaturé, il est nécessaire d'utiliser des conditions expérimentales plus drastiques, telle que des températures élevées, ou mieux encore, l'ajout d'un agent dénaturant associé à des températures élevées.

En d'autres termes, l'état structural de la ECFP et de ses dérivés à pH très acide semble constituer un état intermédiaire dans la dénaturation de la protéine. La déstructuration de la protéine à un tel pH est au minimum suffisante pour déstabiliser l'environnement et le réseau de liaisons hydrogènes entourant le chromophore qui lui assuraient une certaine rigidité et gênaient sa torsion à l'état excité.

D.I.2 LES TRANSITIONS EN pH. LA TRANSITION DE DENATURATION ACIDE.

Toutes les protéines générées au cours de ce travail présentent une évolution de leur intensité de fluorescence en fonction du pH qui se traduit pour toutes par une perte totale de cette intensité à pH 2,5 due à la génération de l'espèce *Acide_{pH2,5}*. En revanche, l'allure de cette transition est très dépendante de la protéine et se produit sur un domaine de pH plus ou moins important. Leur description par l'équation 50 supposant un équilibre acido-basique simple ne conduit pas à un ajustement acceptable pour la majeure partie des protéines étudiées. Dans le cas de l'Aquamarine et des mutants de la ECFP les plus performants portant la double mutation T65S et H148X (X=G, S, D ou E), cette transition est abrupte et peut se produire en moins d'une unité pH. Pour les autres protéines moins performantes, cette transition est large et peut s'étendre sur 3 unités pH comme c'est le cas par exemple pour la ECFP. Ces observations associées à l'examen du comportement spectral de ces protéines avec le pH indiquent qu'un ou plusieurs processus peuvent être à l'origine de la transition acide. Dans ce qui suit, nous allons analyser plus en détails les deux catégories de transition observées suivant leur raideur et décrites ci-dessus.

D.I.2.1 L'AQUAMARINE ET LES MUTANTS PORTANT LES MUTATIONS T65S ET H148X (X=G, S, D OU E).

L'Aquamarine et tous les dérivés de la ECFP étudiés portant les deux mutations T65 S et X (X=G, S, D ou E) présentent un comportement spectral avec le pH simple qui se traduit par la formation, à pH très acide, des caractéristiques spectrales associées à l'espèce *Acide_{pH2,5}*. La transition en pH décrivant la perte de l'intensité de fluorescence avec le pH est très abrupte. Elle est d'allure similaire à celle observée lors du processus coopératif de dénaturation basique de la GFP_{av} (63) ou encore lors de la transition coopérative de dénaturation acide des

protéines(148). Ces éléments suggèrent que la transition acide dans ces protéines est le reflet d'un unique processus, en l'occurrence la dénaturation acide de la protéine.

Il est possible de vérifier cette hypothèse, en comparant par exemple les spectres d'absorption expérimentaux à ceux reconstruits en supposant un modèle à deux états décrivant l'équilibre dépendant du pH entre un état natif de la protéine et l'espèce $Acide_{pH2,5}$ selon :



L'état natif est l'état dans lequel se trouve la protéine pour des pH supérieurs à une valeur seuil au-delà de laquelle ses propriétés photophysiques (spectres et distributions de durées de vie) sont invariables. Dans le cas de l'Aquamarine et des autres protéines très performantes, cet état natif présente les propriétés spectrales de l'espèce spectrale *principale*.

A un pH donné, les deux espèces contribuent à l'absorbance totale du mélange selon

$$A_{\text{total}}(\lambda, \text{pH}) = (1 - \alpha) \cdot A_{\text{natif}}(\lambda) + \alpha \cdot A_{Acide_{pH2,5}}(\lambda) \quad \text{Équation 79}$$

Où $A_{\text{natif}}(\lambda)$ et $A_{Acide_{pH2,5}}(\lambda)$ représentent les spectres d'absorption de la forme native et de l'espèce $Acide_{pH2,5}$, respectivement. α désigne le taux de protéine dans l'état $Acide_{pH2,5}$ à un pH donné, il s'agit en d'autres termes d'un taux de dénaturation de la protéine. Comme spectres d'absorption de la forme native et de la forme $Acide_{pH2,5}$, nous avons pris les spectres obtenus à pH 7,4 et 2,5 respectivement. Nous avons comparé les spectres d'absorption reconstruits à partir de l'équation 79 avec les spectres expérimentaux à différents pH (Figure 133). Une bonne concordance entre les deux types de spectres, simulés et expérimentaux, est constatée, ce qui nous a permis d'estimer la valeur du coefficient α à différents pH. La variation de α obtenue par ce biais ajuste parfaitement celle de l'intensité de fluorescence. Un traitement similaire peut être effectué avec les spectres d'émission. En conclusion, supposer que la transition acide résulte du processus coopératif de dénaturation acide de la protéine est compatible avec nos données spectrales.

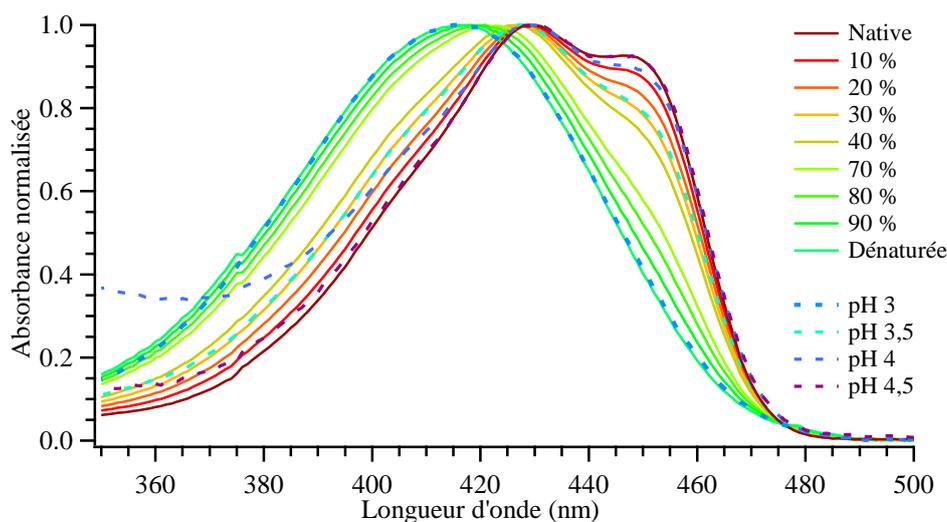


Figure 133 : Spectres d'absorption de l'Aquamarine reconstruits (traits pleins) en supposant un équilibre entre la forme native de la protéine et l'espèce $Acide_{pH2.5}$. Comparaison avec les spectres expérimentaux (traits pointillés). Au-delà de pH 4,5, tous les spectres d'absorption sont similaires. Pour la reconstruction des spectres, nous avons utilisés les spectres à pH 7,4 et à pH 2,5 normalisés à 1 au maximum de la bande. Dans la mesure où les coefficients d'absorption molaire au maximum de la bande du chromophore de la forme native et de l'espèce $Acide_{pH2.5}$ sont très proches, la contribution de chaque spectre dans le spectre global peut être assimilée à la fraction molaire de chaque espèce.

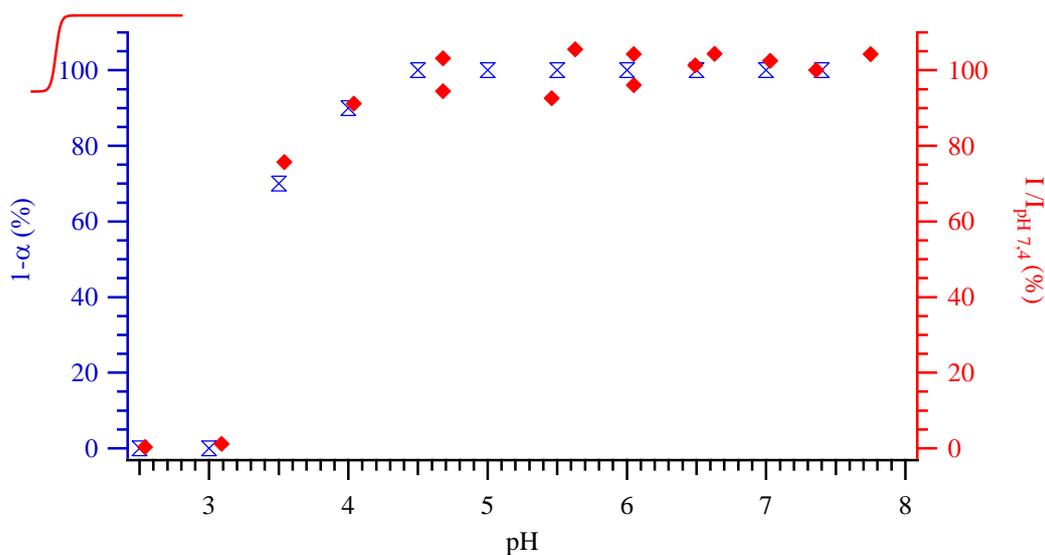


Figure 134 : Variation du taux de protéine native ($1-\alpha$) avec le pH (abscisse de droite) dans le cas de l'Aquamarine. Comparaison avec la variation avec le pH de l'intensité d'émission de fluorescence (abscisse de gauche).

Afin de valider définitivement ce modèle à deux états pour décrire le comportement en fonction du pH de l'Aquamarine et des autres dérivés performants de la ECFP, il sera nécessaire de comparer l'évolution de la durée de vie avec celle attendue dans le cadre de ce modèle à deux états. Compte tenu du faible rendement quantique de l'espèce $Acide_{pH2.5}$, celle-ci doit présenter une durée de vie faible pouvant être de l'ordre de quelques ps, proche de la

valeur de la durée de vie du chromophore de la GFP_{av} en solution. De fait, suivant les vitesses d'échange relatives des deux espèces à l'état excité par rapport à leur durée de vie, deux cas de figures peuvent être observés. Dans le cas d'un équilibre lent entre les deux espèces, plus lent que la durée de vie de la forme native qui est de l'ordre de 4 ns, l'espèce *Acide_{pH2,5}* pourra être considérée comme une espèce non-fluorescente et aucune modification de la durée de vie ne sera observée. En revanche, si les vitesses d'échange sont du même ordre de grandeur que les durées de vie des deux espèces, alors une réduction de la durée de vie pourra être observée. Nous n'avons pas assez de points expérimentaux dans la zone de la transition en pH pour mener à bien une telle étude.

Il est possible de décrire la coopérativité de cette transition de dénaturation acide en introduisant un facteur de coopérativité dans l'équation 50 au travers du coefficient n_{denat} selon

$$I_{\text{total}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}, \text{pH}) = \frac{I_{\text{natif}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}) + I_{\text{denat}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}) \cdot 10^{n_{\text{denat}}(\text{pH}_{\text{denat}} - \text{pH})}}{1 + 10^{n_{\text{denat}}(\text{pH}_{\text{denat}} - \text{pH})}} \quad \text{Équation 80}$$

pH_{denat} désigne le pH de demi-dénaturation et $I_{\text{natif}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}})$ et $I_{\text{denat}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}})$ l'intensité de fluorescence, respectivement, de la forme native et de l'espèce *Acide_{pH2,5}*. L'ajustement de la transition acide par l'équation 80 conduit à des résidus aléatoirement distribué autour de zéro, contrairement à l'ajustement par un équilibre acido-basique simple selon l'équation 50 (Figure 135). Les valeurs de pH_{denat} obtenues par ce biais sont très similaires à celles du $\text{pH}_{1/2}$ estimé précédemment en considérant le pH correspondant à la perte de 50% de l'intensité de fluorescence maximum (Tableau 31).

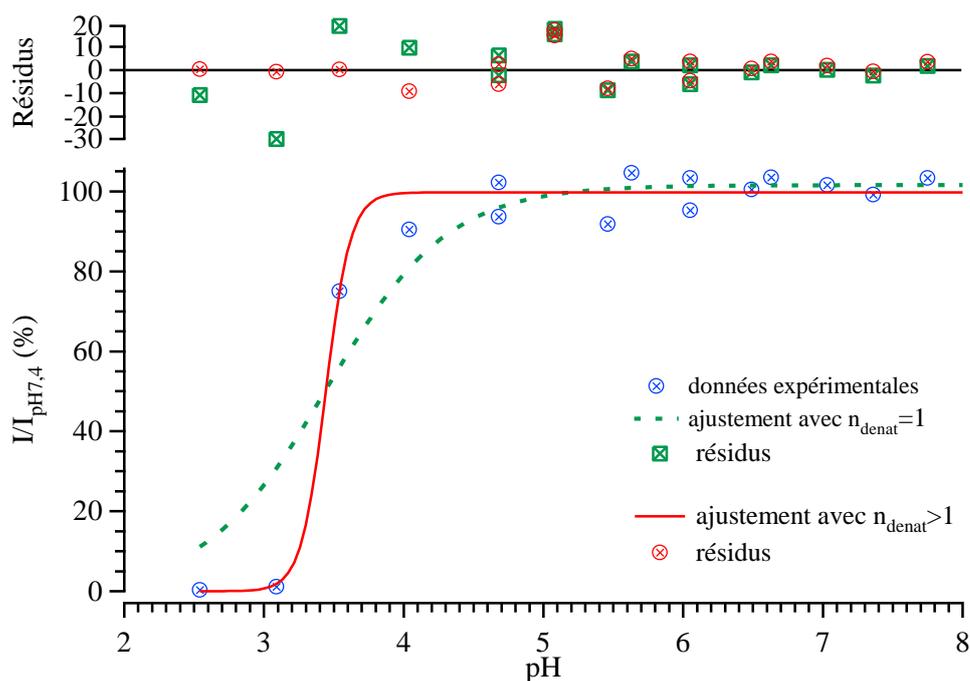


Figure 135 : Ajustement de la transition acide de l'Aquamarine en supposant un équilibre acido-basique simple (courbe en pointillés vert) selon l'équation 50 ou en prenant en compte un facteur de coopérativité positive (courbe en trait plein rouge) selon l'équation 80. Les résidus obtenus suite à l'ajustement de la courbe expérimentale par ces deux modèles sont indiqués.

Protéine	n_{denat}	$\text{pH}_{\text{denat}} \pm 0,1$	$\text{pH}_{1/2} \pm 0,1$	$[\text{pH}_{\text{ac}}^{\text{inf}} ; \text{pH}_{\text{ac}}^{\text{sup}}]$
Aquamarine	$4,9 \pm 5,6$	3,4	3,3	[3 ; 3,5]
CFP-H148S,T65S	$3,9 \pm 2,7$	3,6	3,6	[3,5 ; 4]
CFP-H148E,T65S	$1,9 \pm 0,3$	4,1	4,1	[3,5 ; 4,5]
CFP-H148D,T65S	$3,9 \pm 6,4$	3,9	4,0	[3,5 ; 4]
mTurquoise	$1,9 \pm 0,3$	3,5	3,4	[3 ; 3,5]
Aquamarine-S72A, A206K	$3,8 \pm 4,3$	3,1	3,1	[3 ; 3,5]
Cerulean-T65S	$2,1 \pm 0,5$	3,6	3,6	[3,6 ; 4,2]

Tableau 31 : Analyse de la transition acide de l'intensité de fluorescence de l'Aquamarine et d'autres dérivés performants de la ECFP en tenant compte de la coopérativité de la transition au travers du coefficient n_{denat} selon l'équation 80.

D.I.2.2 LA ECFP ET TOUS LES DERIVES NE PORTANT PAS SIMULTANEMENT LES DEUX MUTATIONS T65S ET H148X (X=G, S, D OU E).

La ECFP et ses dérivés ne portant pas simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E) sont caractérisés par une transition acide s'étendant sur un domaine de pH large. Pour la plupart de ces dérivés, l'ajustement de la transition acide par la fonction analytique décrivant un équilibre acido-basique simple (équation 50) ne conduit pas à des résidus aléatoirement distribués autour de zéro. Cette transition en pH peut être associée à des changements spectraux- déplacement vers le rouge des spectres d'émission comme dans le

cas de la ECFP, apparition d'un épaulement vers le bleu sur les spectres d'émission comme pour la Cerulean- auxquels s'ajoute, à des pH plus acides et pour toutes les protéines, l'apparition des caractéristiques spectrales associées à l'espèce $Acide_{pH2,5}$. Mais pour certains dérivés, ceux portant la mutation H148X (X=G, A, S ou E) ou la mutation T65S, seule l'apparition des caractéristiques spectrales de l'espèce $Acide_{pH2,5}$ semble accompagner cette transition.

L'ensemble de ces observations suggère qu'outre la transition de dénaturation acide à bas pH, la ECFP et ces dérivés ne portant pas simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E) sont le lieu d'une ou de plusieurs autres transitions induites par le pH et mettant en jeu diverses espèces dont la nature sera discutée ultérieurement. Dans une première approche, nous pouvons décrire la transition acide observée pour ces dérivés comme la superposition de deux transitions : une associée au processus coopératif de dénaturation acide de la protéine et l'autre, à un ou plusieurs équilibres entre le ou les états en équilibre avec l'espèce $acide_{pH2,5}$ et le ou les espèces présentes aux pH avoisinants le pH neutre (Figure 134). Cette dernière transition sera dans la suite dénommée transition 2 pour plus de commodité. Nous ne discuterons pas des transitions qui pourraient avoir lieu pour des pH plus basiques encore.

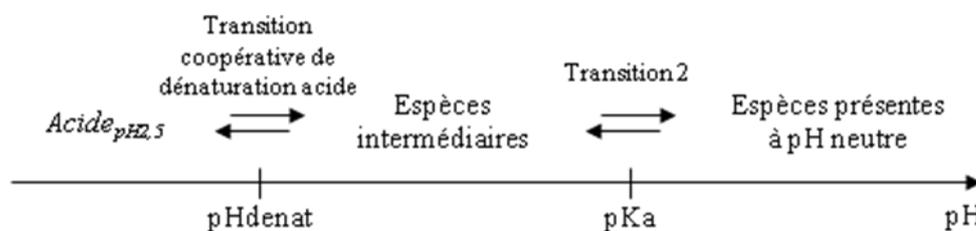


Figure 136 : représentation schématique du modèle utilisé pour décrire la transition acide de la ECFP et de ces dérivés ne portant pas simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E).

Dans le cadre de ce modèle à deux transitions, la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH peut être décrite selon

$$I_{total}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}, pH) = \frac{I_{A^-}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + I_{int\ erm}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot 10^{n \cdot (pKa - pH)}}{1 + 10^{n \cdot (pKa - pH)}} + \frac{I_{int\ erm}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) + I_{denat}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \cdot 10^{n_{denat} \cdot (pH_{denat} - pH)}}{1 + 10^{n_{denat} \cdot (pH_{denat} - pH)}} - I_{int\ erm}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \quad \text{Équation 81}$$

Où $I_{A^-}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$, $I_{int\ erm}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ et $I_{denat}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ représentent l'intensité de fluorescence émise, respectivement, par le mélange d'espèces présentes à pH neutre, par le mélange d'espèces intermédiaires et par l'espèce $Acide_{pH2,5}$. Le pKa ici doit être, au moins

dans une première approche, considéré comme un pH de demi-transition. Nous avons ajusté les courbes de variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH obtenus pour ces protéines en utilisant l'équation 81. Les ajustements par cette équation conduisent à des résidus bien mieux aléatoirement distribués autour de 0 qu'un ajustement supposant un équilibre acido-basique simple (équation 50) ou encore qu'un ajustement supposant une seule transition coopérative ($n > 1$) ou anti-coopérative ($n < 1$) selon l'équation suivante (Figure 135) :

$$I_{\text{total}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}, \text{pH}) = \frac{I_{\text{A}} - (\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}) + I_{\text{AH}}(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}) \cdot 10^{n \cdot (\text{pH}_{1/2} - \text{pH})}}{1 + 10^{n \cdot (\text{pH}_{1/2} - \text{pH})}} \quad \text{Équation 82}$$

Il est rassurant de noter que des protéines ayant un comportement photophysique proche, telles que par exemple la ECFP et la ECFP-H148R, ou encore ne se différenciant que par des mutations ayant peu d'influence sur leurs propriétés photophysiques telles que, par exemple, la ECFP-T65S et la ECFP-T65S, S72A, A206K présentent une transition en pH comparable et conduisent à des ajustements par l'équation 82 très similaires. Quelques exemples d'ajustements sont présentés sur la Figure 137 et la Figure 138.

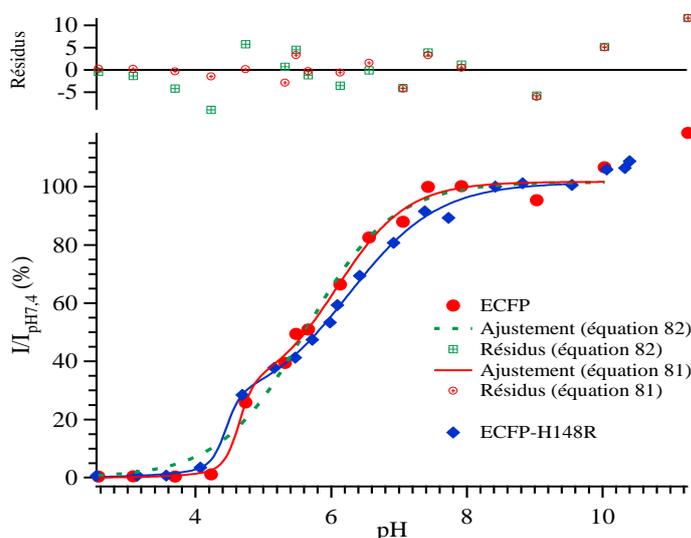


Figure 137 : Ajustement de la transition acide de la ECFP en supposant l'existence de deux transitions, selon l'équation 81 (courbe en trait plein rouge) ou en supposant une seule transition pouvant présenter une coopérativité négative ou positive (courbe en pointillés verte) selon l'équation 82. Les résidus obtenus suite à l'ajustement de la courbe expérimentale par ces deux modèles sont indiqués. Comparaison avec la ECFP-H148R dont la transition acide a été ajusté selon l'équation 81.

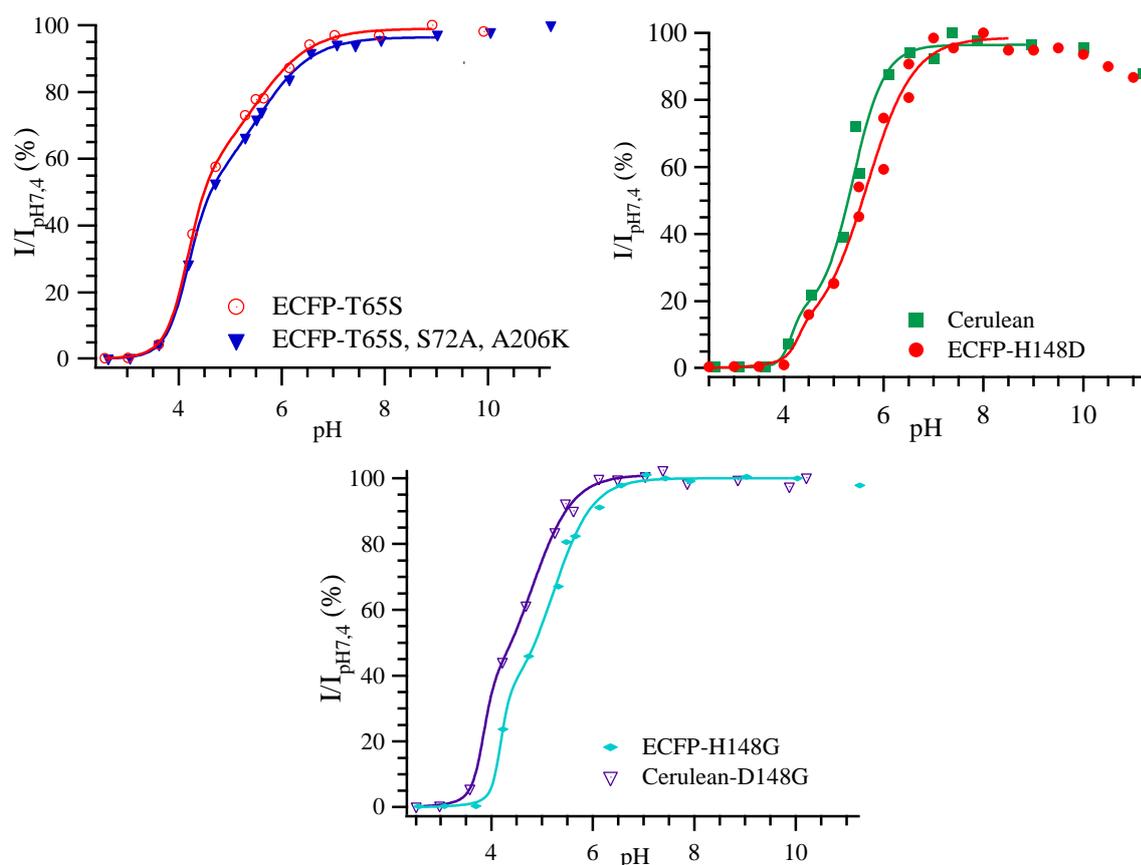


Figure 138 : Ajustement de la transition acide de divers dérivés de la ECFP en supposant l'existence de deux transitions, selon l'équation 81.

Les valeurs du pH de demi-dénaturation, et de demi-transition de la seconde transition (transition 2) ainsi que les valeurs des facteurs de coopérativité pour les deux transitions sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 32). Il est intéressant de constater que pour toutes les protéines, la valeur du pH de demi-dénaturation, pH_{denat} , tombe dans l'intervalle délimité par les deux pH, pH_{acide}^{inf} et pH_{acide}^{sup} , qui correspond à l'intervalle de pH dans lequel les spectres d'absorption subissent des changements spectraux associés à la formation ou à la disparition, suivant le sens de variation du pH, de l'espèce $Acide_{pH2,5}$. Néanmoins, compte tenu du nombre de points expérimentaux faible au niveau de la transition de dénaturation, les valeurs obtenues pour n_{denat} doivent être considérées avec précaution. A minima, ces analyses nous disent qu'il est possible de décrire la transition en pH observées expérimentalement comme la somme de deux transitions, dont une est associée à un processus hautement coopératif.

Protéine	n_{denat}	$\text{pH}_{\text{denat}} \pm 0.3$	n	$\text{pK}_a \pm 0.5$	$[\text{pH}_{\text{ac}}^{\text{inf}}; \text{pH}_{\text{ac}}^{\text{sup}}]$
ECFP	4,1	4,7	$0,7 \pm 0,3$	6,1	[4,3 ; 4,7]
ECFP-A206K	3,6	4,5	$1,4 \pm 0,5$	6,2	[3,6-4 ; 4,7]
ECFP-H148A	3,4	4,4	$1,2 \pm 1,5$	5,3	[3,7 ; 4,5]
ECFP-H148D	4	4,3	$0,9 \pm 0,3$	5,7	[4 ; 4,5]
ECFP-H148E	6,5	4,2	$1,3 \pm 0,5$	5,4	[3,6 ; 4,5]
ECFP-H148G	5	4,2	$1,1 \pm 0,3$	5,2	[3,7 ; 4,2]
ECFP-H148N	3	4,9	$1,1 \pm 0,3$	5,9	[3,6 ; 5]
ECFP-H148R	4,1	4,5	$0,6 \pm 0,1$	6,4	[4 ; 5]
ECFP-H148S	2,2	4,6	$1,5 \pm 0,6$	5,1	[3,6 ; 4,5]
ECFP-Y145A, H148D	2	4,0	$1,2 \pm 0,4$	6,1	[4 ; 5]
Cerulean	4,2	4,2	$1,5 \pm 0,7$	5,4	[3,6 ; 4,5]
Cerulean-D148G	4,0	3,8	$1,1 \pm 0,5$	4,8	[3,6 ; 4,2]
ECFP-T65S	2,1	4,2	$0,8 \pm 0,2$	5,4	[3,6 ; 4,3]
ECFP-T65S, S72A, A206K	2	4,2	$0,8 \pm 0,4$	5,5	[3,6 ; 4,2]

Tableau 32 : Valeurs du pH de demi-dénaturation, pH_{denat} , du pH de demi-transition de la transition 2, pK_a , ainsi que des facteurs de coopérativité de la transition de dénaturation et de la transition 2 pour la ECFP de ces dérivés ne portant pas simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, S, D ou E).

D.I.2.3 LE pH DE DEMI-DENATURATION ACIDE. STABILITE DE LA PROTEINE.

L'approche développée précédemment, en assimilant la transition acide à la somme de deux transitions, nous a permis d'estimer le pH de demi-dénaturation des protéines étudiées dans ce travail. Cette grandeur peut être considérée comme une mesure quantitative de la stabilité de la protéine puisqu'il correspond au pH de demi-transition au cours de laquelle l'intégrité structurale de la protéine est affectée. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lelimosin *et al.* (38) indiquant au travers de la température de fusion une stabilité plus importante de la Cerulean par rapport à la ECFP. En revanche, à la lecture des valeurs de pH_{denat} obtenues dans ce travail. La ECFP-Y145A,H148D serait légèrement plus stable ou de stabilité équivalente à

la Cerulean en accord avec la valeur de température de fusion plus importante de 5°C dans le cas de la Cerulean par rapport à la ECFP-Y145A, H148D (38). Par ailleurs, nous avons constaté que la valeur de la composante de temps long des distributions de durées de vie est directement corrélée à la valeur de pH_{denat} et ainsi à la stabilité de la protéine (Figure 139). En d'autres termes, une forte stabilité de la ECFP et de ses dérivés paraît être associée à une meilleure cohésion de la protéine avec une flexibilité structurale de cette dernière moindre. La torsion du chromophore qui est un des processus majeurs de désactivation non radiative devient dans ces conditions un évènement plus rare, moins probable, conduisant à une durée de vie plus importante. Comme attendu, les protéines présentant une valeur de la composante de temps la plus importante sont les plus stables, avec une réduction du pH de demi-dénaturation de près de 1,5 unités pH par rapport à la ECFP et nécessitent le couplage de la mutation T65S avec certains résidus en position 148 (Tableau 31).

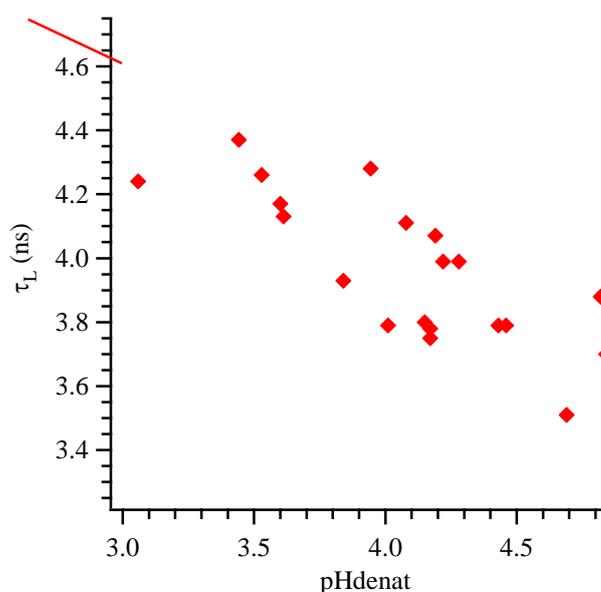


Figure 139 : Corrélation entre la valeur de la composante de temps long de la distribution de durée de vie et le pH de demi-dénaturation, obtenu à partir de l'équation 81, et qui peut être considéré comme une mesure de la stabilité de la protéine.

Chapitre D.II DEJA DANS LA ZONE DES pH NEUTRES, PLUSIEURS ESPECES COEXISTENT.

Au regard de la dépendance en fonction de la longueur d'onde d'émission de la durée de vie moyenne et de la complexité des déclin obtenus dans la zone des pH neutres, en gros entre pH 7,4 et pH 9,5, nous pouvons classer la ECFP et ses dérivés en trois catégories :

- Groupe Aquamarine : ce groupe est constitué de l'Aquamarine et des autres dérivés portant simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, A, S, et D) : ces protéines ne présentent pas de dépendance significative de leur durée de vie avec la longueur d'onde d'émission et la simplicité de leur distribution est telle que nous pouvons en première approximation assimiler leur déclin à une monoexponentielle.
- Groupe mono-mutation : il est constitué des protéines portant soit la mutation T65S soit une mutation en position 148, H148X avec X=G, A, S, N, D ou E, la cerulean ou encore la ECFP-H148G, par exemple, en font partie. Pour ces protéines, la dépendance de la durée de vie avec la longueur d'onde existe mais elle est faible. Par contre, elle présente un déclin non-monoexponentiel caractérisé par une distribution de durée de vie complexe.
- Groupe ECFP : ce dernier groupe est constitué de la ECFP et sans doute de la ECFP-H148R. Elles sont caractérisées par une distribution complexe et, au moins pour la ECFP, par une forte dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission.

Dans la suite, nous allons analyser en détails les résultats obtenus dans la zone des pH neutres pour chacun de ces trois groupes ce qui nous permettra d'identifier les espèces présentes.

Nous partons de l'hypothèse que pour les protéines du groupe Aquamarine, seule l'espèce spectrale *principale* existe dans la zone de pH considérée. Dans ces conditions, les spectres d'absorption et d'émission de cette espèce peuvent être assimilés à ceux de l'Aquamarine, une des deux protéines les plus performantes de ce groupe. Cette espèce de durée de vie longue de l'ordre de 4,3 ns est sans doute associée à la conformation de la protéine observée par cristallographie dans le cas de la mTurquoise (13). Par ailleurs, globalement, les protéines des deux autres groupes sont caractérisées par des spectres d'absorption et d'émission ayant une

structure typique en double bande, très similaires à ceux des protéines du groupe Aquamarine. Les différences se situent uniquement au niveau du rapport des intensités de fluorescence à 474 nm et à 500 nm, I_{474}/I_{500} , qui varie suivant la protéine. De plus, toutes les distributions de durées de vie présentent également une composante de temps long majoritaire dont la durée de vie peut atteindre 4,1 ns (ECFP-H148G) qui est une valeur du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les protéines du groupe Aquamarine. Nous pouvons donc raisonnablement supposer que l'espèce spectrale *principale* est présente dans la zone des pH neutres pour toutes les protéines et qu'elle est l'espèce majoritaire (hormis dans le cas de la ECFP-H148R). La population de cette espèce au travers de l'amplitude relative de sa composante de temps long est corrélé au rapport I_{474}/I_{500} ce qui suggère que d'autres espèces aux propriétés spectrales et temporelles distinctes vont contribuer aux propriétés photophysiques des protéines des deux autres groupes (Figure 140).

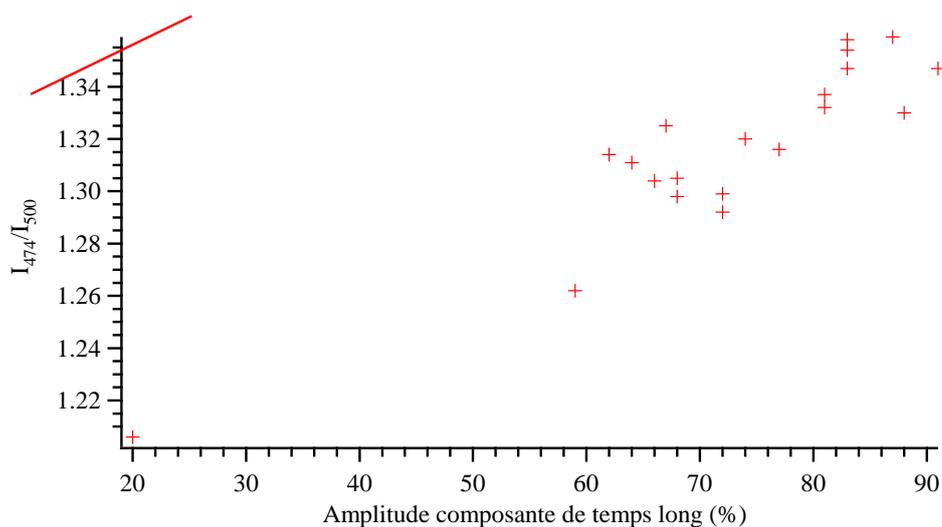


Figure 140 : Corrélation entre le rapport des intensités de fluorescence à 474 nm et 500 nm et l'amplitude relative de la composante de temps long pour toutes les protéines étudiées.

Par ailleurs, diverses approches structurales mettent également en évidence l'existence de diverses conformations dans la zone des pH neutres pour la ECFP et la Cerulean. En effet, les études de cristallographie menées sur la ECFP et sur Cerulean à pH neutre ont mis en lumière l'existence de respectivement trois et deux conformations(94). Il est raisonnable de penser qu'elles présentent toutes des propriétés d'absorption et d'émission (le cristal de la ECFP comme celui de la Cerulean en présente) et nous pouvons supposer que leurs propriétés temporelles sont différentes surtout si elles induisent une flexibilité du chromophore distincte. Les études en température menées par dichroïsme circulaire sur la ECFP et sur la Cerulean

font également apparaître dans les deux cas un équilibre entre deux formes structurales de la protéine. Là encore, des changements structuraux au niveau de la protéine peuvent conduire à des modifications des propriétés spectrales et temporelles et à des hétérogénéités au niveau des propriétés photophysiques.

En d'autres termes, la mise en commun des données spectroscopiques et structurales suggèrent que, dans les protéines des groupes mono-mutation et ECFP, plusieurs espèces (au moins deux) coexistent à l'état fondamental et présentent des propriétés spectrales et temporelles pouvant être différentes.

D.II.1 CAS DES DERIVES PORTANT LA MUTATION T65S OU UNE MUTATION H148X, X=G, A, S, N, D OU E.

L'obtention d'un déclin complexe pour les dérivés de la ECFP portant soit la mutation T65S, soit une mutation H148X, avec X=G, A, S, N, D ou E, met en lumière l'existence d'une ou de plusieurs espèces émissives autres que l'espèce *principale* dans la zone des pH neutres. Ceci est corroboré par deux autres différences constatées par rapport à l'Aquamarine. D'une part, l'allure du spectre d'émission est légèrement différente avec une intensité relative de l'épaule à 500 nm plus importante que pour l'Aquamarine. D'autre part, une dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission a été constatée, ce qui signifie que le spectre d'émission global pour ces protéines est hétérogène.

Plusieurs données expérimentales nous permettent d'apporter des informations sur les propriétés spectrales et temporelles de cette ou ces espèces à l'origine des hétérogénéités spectrales et temporelles constatées. Tout d'abord, d'après nos données, la dépendance de la durée de vie moyenne avec la longueur d'onde d'émission de la ECFP-H148G (Tableau 16) ou encore de la ECFP-T65S (Figure 80) est similaire à celle observée précédemment dans le cas de la ECFP-H148D (Figure 38) : la durée de vie moyenne est légèrement plus faible vers 500-530 nm que vers 474 nm. Pour la ECFP-H148D, suffisamment de points avaient été acquis afin de reconstruire les spectres d'émission résolus en temps(10). L'évolution au cours du temps de ces derniers se caractérise par un léger déplacement de leur barycentre vers les grandes longueurs d'onde : le spectre initial, à temps court, associé à une espèce de durée de vie courte présente une intensité relative de l'épaule vers 500 nm plus importante que le spectre à temps long associé à une espèce de durée de vie plus longue (Figure 138). Ceci

suggère que pour ces protéines, en plus de l'espèce spectrale *principale*, une ou plusieurs espèces de durée de vie courte et présentant des propriétés d'émission légèrement décalés vers le rouge existe. Ces deux affirmations sont en accord avec les données obtenues à pH 9 par M. Ridhoir (10), visant à établir la dépendance spectrale et temporelle de la ECFP-H148D avec la température. En effet, il a été montré que l'augmentation de la température déplace un équilibre vers une ou plusieurs espèces de durée de vie courte (8), caractérisée(s) par un spectre d'émission dont le barycentre est déplacé vers le rouge (Figure 139). Dans la suite, nous nommerons cette/(ces) espèce(s), espèce *secondaire_rouge*.

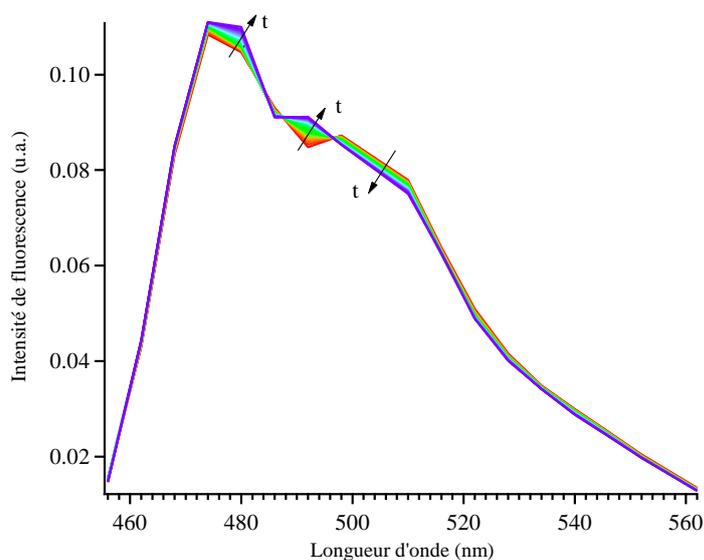


Figure 141 : Spectres d'émission de fluorescence résolus en temps normalisés à la même aire de la ECFP-H148D, pH 7,4 et T=20°C (10).

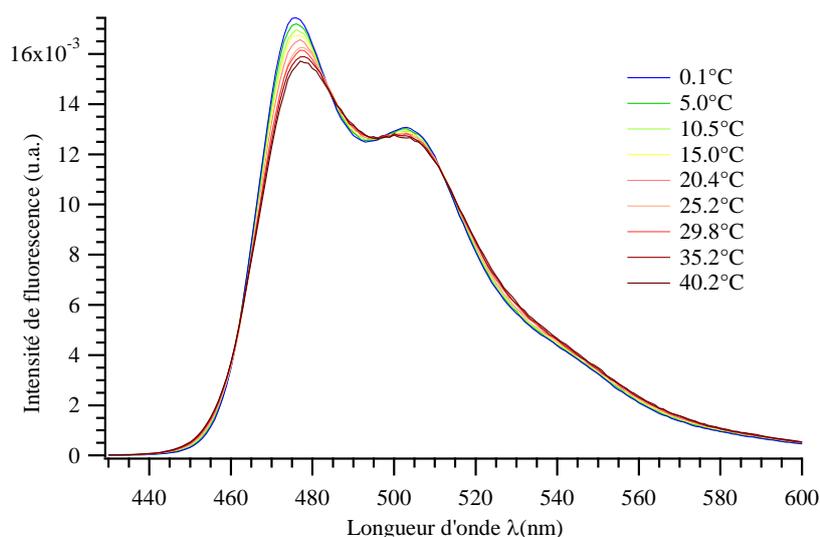


Figure 142 : Evolution en fonction de la température de l'allure du spectre d'émission de la ECFP-H148D à pH 9 (10).

En supposant que (i) les propriétés spectrales (ϵ , f) et temporelles (k_r) (cf. équation 19) de l'espèce *principale* et de l'espèce *secondaire_{rouge}* sont similaires, (ii) que l'espèce *secondaire_{rouge}* ne contribue pas à la composante de temps long des distributions de durées de vie et (iii) que seules les deux espèces *principale* et *secondaire_{rouge}* coexistent, alors il est possible d'estimer la fraction molaire de l'espèce *secondaire_{rouge}* à partir des distributions de durée de vie. Dans la mesure où les spectres d'émission des deux espèces *principale* et *secondaire_{rouge}* sont assez similaires, supposer que la probabilité d'émission, f , à la longueur d'onde d'émission est la même pour les deux espèces est tout à fait justifiée. Par contre, nous ne disposons pas d'éléments expérimentaux nous permettant d'obtenir des pistes sur une éventuelle différence des propriétés d'absorption de l'espèce *secondaire_{rouge}* par rapport à celles de l'espèce *principale*. Nous supposons qu'elles sont similaires. Avec ces hypothèses, la fraction molaire, à 20°C et dans la zone des pH neutres, de l'espèce *secondaire_{rouge}* est de l'ordre de 30% (Tableau 33). Ceci est logiquement en accord avec la fraction molaire de 31% obtenue à partir des constantes thermodynamiques de l'équilibre thermique impliqué à pH 9 dans le cas de la ECFP-H148D, et qui avaient été estimées sur la base des mêmes hypothèses (8). En revanche, ces valeurs sont assez éloignées de la valeur déduite des constantes thermodynamiques associées à l'équilibre mis en évidence par dichroïsme circulaire et qui s'élève, à pH 9 et à 20°C, à 10% dans le cas de la Cerulean. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cet écart, en particulier, une différence entre les valeurs des constantes de vitesse radiative (k_r) des deux espèces que nous avons supposées égales ici. La détermination du rendement quantique d'émission de fluorescence de ces protéines nous permettra d'estimer une constante de vitesse radiative apparente et dont la comparaison avec celle obtenue pour les protéines du groupe Aquamarine nous renseignera sur un éventuel écart entre les valeurs des constantes de vitesse radiative (k_r) des deux espèces.

Protéine	x (<i>secondaire_{rouge}</i>)	Protéine	x (<i>secondaire_{rouge}</i>)
ECFP-H148D	28 %	Cerulean	36 %
ECFP-H148N	32 %	ECFP-T65S	23 %
ECFP-H148G	32 %	ECFP-H148E	33 %
ECFP-H148A	26 %	ECFP-H148S	28 %

Tableau 33 : Fraction molaire x de l'espèce *secondaire_{rouge}* à 20°C et pour des pH compris entre 7,4 et 9,5. Estimation faite à partir des distributions de durées de vie à 20°C et pH 7,4. Sur le domaine de pH s'étendant de 7,4 à 9,5, les distributions de durées de vie de toutes les protéines présentées dans ce tableau ne varient pas significativement.

D.II.2 CAS DE LA ECFP ET DE LA ECFP-H148R.

Par rapport aux cas des dérivés portant la mutation T65S ou une mutation H148X, X=G, A, S, N, D ou E, la ECFP et la ECFP-H148R présentent dans la zone des pH neutre un niveau de complexité supplémentaire avec une dépendance accrue de leur durée de vie avec la longueur d'onde d'émission (au moins pour la ECFP) et une modification de l'allure des spectres d'émission suivant la longueur d'onde d'excitation. Cette dernière observation est le signe de la présence d'une espèce dès l'état fondamental que nous avons dénommé espèce *rouge2_{pH7,4}*, non présente dans le cas des protéines du groupe précédent. De plus, c'est à partir de la comparaison de la variation de la durée de vie moyenne de la ECFP et de la ECFP-H148D que l'identification d'une ou de plusieurs espèces de durée de vie courte et dont le spectre d'émission est déplacé vers les grandes longueurs d'onde avait été faite (8). Il s'agit de l'espèce *rouge1_{pH7,4}* dont la fraction molaire a été estimée, à pH 7,4 et T=20°C, à 25% au minimum (8), supposant de plus que cette espèce n'est pas présente dans le cas de la ECFP-H148D.

L'analyse de la distribution de durée de vie à pH 7,4 et des constantes thermodynamiques de l'équilibre impliqué à pH 9 dans le cas de la ECFP conduit à une fraction molaire de l'espèce *principale* légèrement supérieure à 50% à T=20°C dans la zone des pH neutres^{VI}. En d'autres termes, partant de l'hypothèse que l'espèce *rouge1_{pH7,4}* est éliminée dans le cas de la ECFP-H148D, en plus des espèces *principale* et *rouge1_{pH7,4}*, une ou plusieurs autres espèces, de durée de vie courte et de fraction molaire de l'ordre de 20 à 25 %, contribuent à la photophysique de la ECFP dans la zone des pH neutres. La similitude des distributions de durées de vie de la ECFP avec celles des protéines du groupe mono-mutant notamment de la ECFP-H148D ou encore de la ECFP-H148G et la similitude du comportement (spectrale et temporelle) avec la température de ces protéines à pH 9 laisse supposer qu'elles présentent toutes des propriétés structurales et dynamiques proches. Nous pouvons raisonnablement supposer que l'espèce *secondaire_{rouge}* est également présente dans le cas de la ECFP.

Par ailleurs, la constante de vitesse radiative apparente, rapport du rendement quantique et de la durée de vie moyenne, de la ECFP qui s'élève à 0,16 ns⁻¹ est inférieure à celle de l'Aquamarine, 0,22 ns⁻¹. Ceci indique qu'une ou plusieurs des espèces émissives présentes dans la zone des pH neutres dans le cas de la ECFP a une constante radiative distincte, plus

^{VI} Nous supposons toujours que les grandeurs ϵ , f et k_r sont les mêmes pour toutes les espèces en présence.

faible que celle de l'espèce principale. En d'autres termes, la fraction molaire de ces espèces sera supérieure à celle déduite précédemment des distributions de durées de vie et en conséquence, celle de l'espèce *principale* pourrait être inférieure à 50 %, déjà dans la ECFP.

Enfin, nous ne disposons pas suffisamment de données expérimentales pour mener une analyse similaire dans le cas de la ECFP-H148R. Néanmoins, une conclusion similaire est attendue compte tenu de l'analogie de ses propriétés photophysiques avec celles de la ECFP.

D.II.3 SYNTHÈSE. ESPÈCES PRÉSENTES DANS LA ZONE DES pH NEUTRES

L'ensemble des données expérimentales indique l'existence de plusieurs espèces dans la zone des pH neutres aussi bien dans le cas de la ECFP (voire de la ECFP-H148R) que dans celui des dérivés portant soit la mutation T65S soit une mutation H148X, X=G, A, S, N, D ou E. Outre l'espèce *principale*, plusieurs autres espèces *rouge1_{pH7,4}*, *rouge2_{pH7,4}* et *secondaire_{rouge}* ont été mise en évidence dans la zone des pH neutres. Par ailleurs, ces trois nouvelles espèces présentent une durée de vie plus courte que l'espèce *principale* et des propriétés spectrales, au moins pour l'émission, légèrement déplacées vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celles de l'Aquamarine.

Pour les protéines du groupe mono-mutant, deux espèces, *principale* et *secondaire_{rouge}*, semblent coexister avec une fraction molaire de l'ordre de 70% et 30% respectivement. Pour la ECFP (et la ECFP-H148R), deux espèces supplémentaires participent aux propriétés photophysiques : les espèces *rouge1_{pH7,4}* et *rouge2_{pH7,4}*. La somme des fractions molaires des trois espèces *secondaire_{rouge}*, *rouge1_{pH7,4}* et *rouge2_{pH7,4}* est supérieure à 50% et notamment à celle de l'espèce *principale*.

Une approche plus globale de traitement des données, notamment des spectres obtenus dans différentes conditions physico-chimiques, par des méthodes de décomposition en valeur simple (SVD) par exemple associée à l'élaboration de modèles cinétiques nous permettra d'évaluer de façon plus précise les caractéristiques spectrales et temporelles des trois espèces mises en lumière. Nous avons supposé que l'espèce *rouge1_{pH7,4}* était éliminée suite à la mutation H148X ou T65S, mais rien ne nous permet d'exclure la possibilité (i) qu'elle soit présente dans le cas de ces protéines et (ii) que les espèces *rouge1_{pH7,4}* et *secondaire_{rouge}* ne forment qu'une seule et unique espèce. Ces éventualités devront être prises en compte lors de

la construction des modèles cinétiques et de leur confrontation avec les résultats expérimentaux.

Chapitre D.III LE LONG DE LA TRANSITION ACIDE, D'AUTRES ESPECES APPARAISSENT.

Outre les phénomènes liés à la formation de l'espèce *Acide_{pH2,5}* associée à la dénaturation acide de la protéine à bas pH sur laquelle nous ne reviendrons pas, diverses modifications des propriétés photophysiques des protéines étudiées dans ce travail se produisent le long de la transition acide. Là encore, nous pouvons les classer en 4 catégories selon les changements spectraux constatés au cours de cette transition et dont nous indiquons ici le plus caractéristique :

- Groupe Aquamarine (Aquamarine et dérivés de la ECFP portant simultanément les deux mutations T65S et H148X (X=G, A, S, et D)) : nous avons montré qu'un équilibre entre une forme native, en l'occurrence l'espèce *principale*, et une forme dénaturée, l'espèce *Acide_{pH2,5}*, était compatible avec la transition acide hautement coopérative observée pour ces protéines.
- Groupe H148X et T65S (dérivés de la ECFP portant soit la mutation T65S soit une mutation H148X, X=G, A, S, ou E) : le seul changement spectral identifiable dans le cas de ces protéines semble être le déplacement vers le bleu et la perte de la structure fine des spectres d'émission caractéristiques de la formation de l'espèce *Acide_{pH2,5}*.
- Groupe Cerulean (dérivés de la ECFP portant une mutation H148X, X=D ou N, non couplée avec la mutation T65S) : apparition avec une cinétique lente d'une bande déplacée vers le bleu sur les spectres d'absorption et d'émission à pH acide.
- Groupe ECFP (ECFP et ECFP-H148R) : déplacement vers le rouge du spectre d'émission lors d'une acidification du milieu.

D.III.1 LE GROUPE H148X ET T65S : LES DERIVES DE LA ECFP PORTANT LA MUTATION T65S OU UNE MUTATION H148X, X=G, A, S, E NON COUPLEE AVEC LA MUTATION T65S.

Quatre faits expérimentaux intéressants marquent la transition acide de ces protéines :

- Les changements spectraux sont peu nombreux, c'est la spécificité de toutes ces protéines. Ils se caractérisent principalement par une réduction des épaulements vers 450 nm (spectre

d'absorption) et vers 500 nm (spectre d'émission), puis par un déplacement vers le bleu et une perte de la structure fine des spectres.

- La transition en elle-même ne présente pas le caractère abrupt observé dans le cas de l'Aquamarine et des autres dérivés performants. Un ajustement par une seule transition acido-basique simple ($n=1$ dans l'équation 82), coopérative ($n>1$) ou anti-coopérative ($n<1$) n'est pas satisfaisant. Il est nécessaire d'avoir recourt à un modèle présentant deux transitions pour améliorer l'ajustement.

- Hormis pour la ECFP-H148S (pas de données pour la ECFP-H148E), la perte d'intensité de fluorescence le long de la transition est plus rapide que la perte de durée de vie moyenne ce qui témoigne de la formation d'une population non-fluorescente (Figure 142).

- La distribution de durées de vie subit peu de modifications sur le domaine de pH sondé. Une réduction de l'amplitude relative de la composante de temps long se produit. Pour la ECFP-H148G, la ECFP-H148A et la ECFP-H148S, aucune variation significative de la durée de vie de la composante de temps long n'est observée, contrairement à la ECFP-T65S (Figure 143).

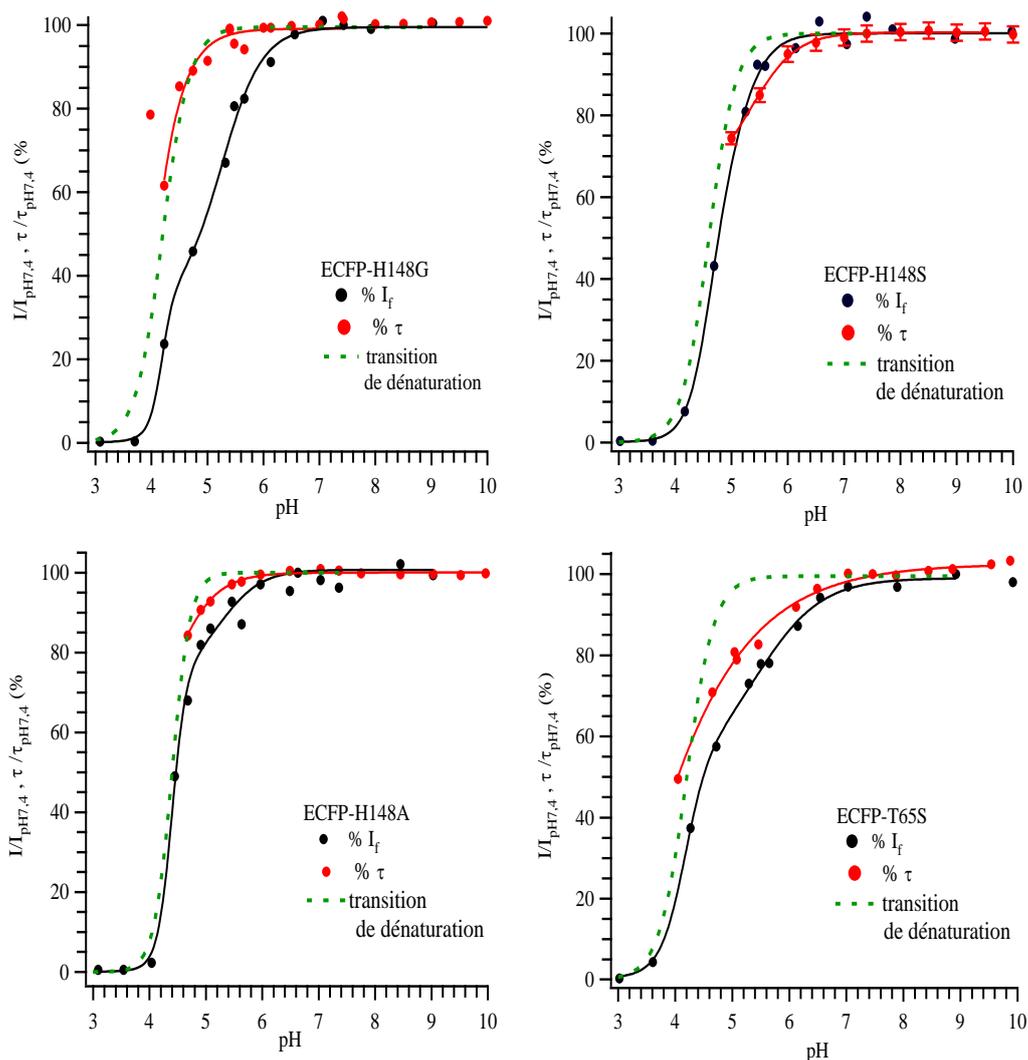


Figure 143 : Comparaison de l'évolution en fonction du pH de la variation d'intensité de fluorescence (points noirs) et de la durée de vie moyenne (points rouges) par rapport aux valeurs correspondantes à pH 7,4 des dérivés ECFP-H148X, X=G, A, et S et ECFP-T65S. En traits pointillés vert est représentée la transition de dénaturation acide calculée à partir de l'équation 80 en prenant $n_{\text{denat}}=1,8$ et comme valeur de pH de demi-dénaturation la valeur de pH_{denat} obtenue pour ces protéines.

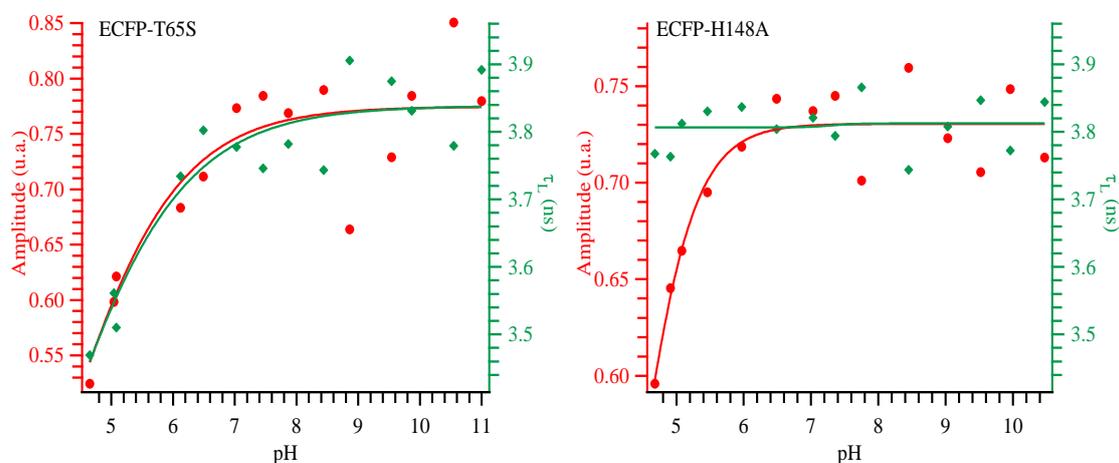


Figure 144 : Evolution en fonction du pH de l'amplitude relative (points rouges) et de la durée de vie (losanges verts) de la composante de temps long de la ECFP-T65S et la ECFP-H148A.

Une première conclusion essentielle peut être tirée de l'analyse fine des propriétés spectrales. En effet, nous pouvons constater que les modifications spectrales se produisent toutes en dessous d'une valeur de pH, $pH_{denat_{fin}}$, au dessus de laquelle il est possible de considérer les effets liés à la dénaturation de la protéine comme négligeables. Ce pH, $pH_{denat_{fin}}$, se situe à une unité pH au dessus de la valeur de pH_{denat} (en prenant un facteur de coopérativité de $1,8^{VII}$) (Figure 140). Par ailleurs, les spectres expérimentaux peuvent être assimilés à une combinaison d'une part linéaire du spectre enregistré à pH 2,5 et correspondant à la forme dénaturée de la protéine (espèce $Acide_{pH2,5}$) et d'autre part du spectre obtenu à pH 7,4 représentatif du mélange des espèces présentes dans la zone des pH neutres (Figure 143). Ces deux éléments révèlent que l'évolution avec le pH des spectres d'absorption et d'émission de ces protéines est associée uniquement à leur dénaturation.

Néanmoins, au dessus de $pH_{denat_{fin}}$, d'autres processus se produisent sans qu'il y ait de modifications spectrales majeures.

Une perte d'intensité de fluorescence plus rapide que celle de la durée de vie moyenne est le signe de l'apparition d'une population non fluorescente. Ce phénomène a été observé dans le cas de la ECFP-H148G, de la ECFP-T65S et de la ECFP-H148A (Figure 143). Ceci est compatible avec l'absence d'altération de la distribution de durée de vie dans le cas de la ECFP-H148G, pour laquelle la formation de cette population semble être le seul phénomène à se produire le long de la transition 2 suite à une réduction du pH. En effet, outre l'absence de perturbations spectrales le long de cette transition, l'évolution avec le pH de la durée de vie moyenne épouse la transition de dénaturation (Figure 142).

Pour la ECFP-H148S, la ECFP-T65S et la ECFP-H148A, une modification de l'allure de la distribution de durées de vie est observée. Elle est associée à une réduction de l'amplitude relative de la composante de temps long à mesure de la réduction du pH. Plusieurs scénarios sont compatibles avec une telle observation :

- Un échange entre l'espèce *principale* et une espèce de durée de vie plus courte, détectable, qui reste à identifier.
- Un échange entre l'espèce *principale* et une espèce non fluorescence alors que la population de l'espèce *secondaire_rouge* reste invariante.

^{VII} 1,8 est la valeur de n_{denat} la plus petite obtenue sur l'ensemble des protéines.

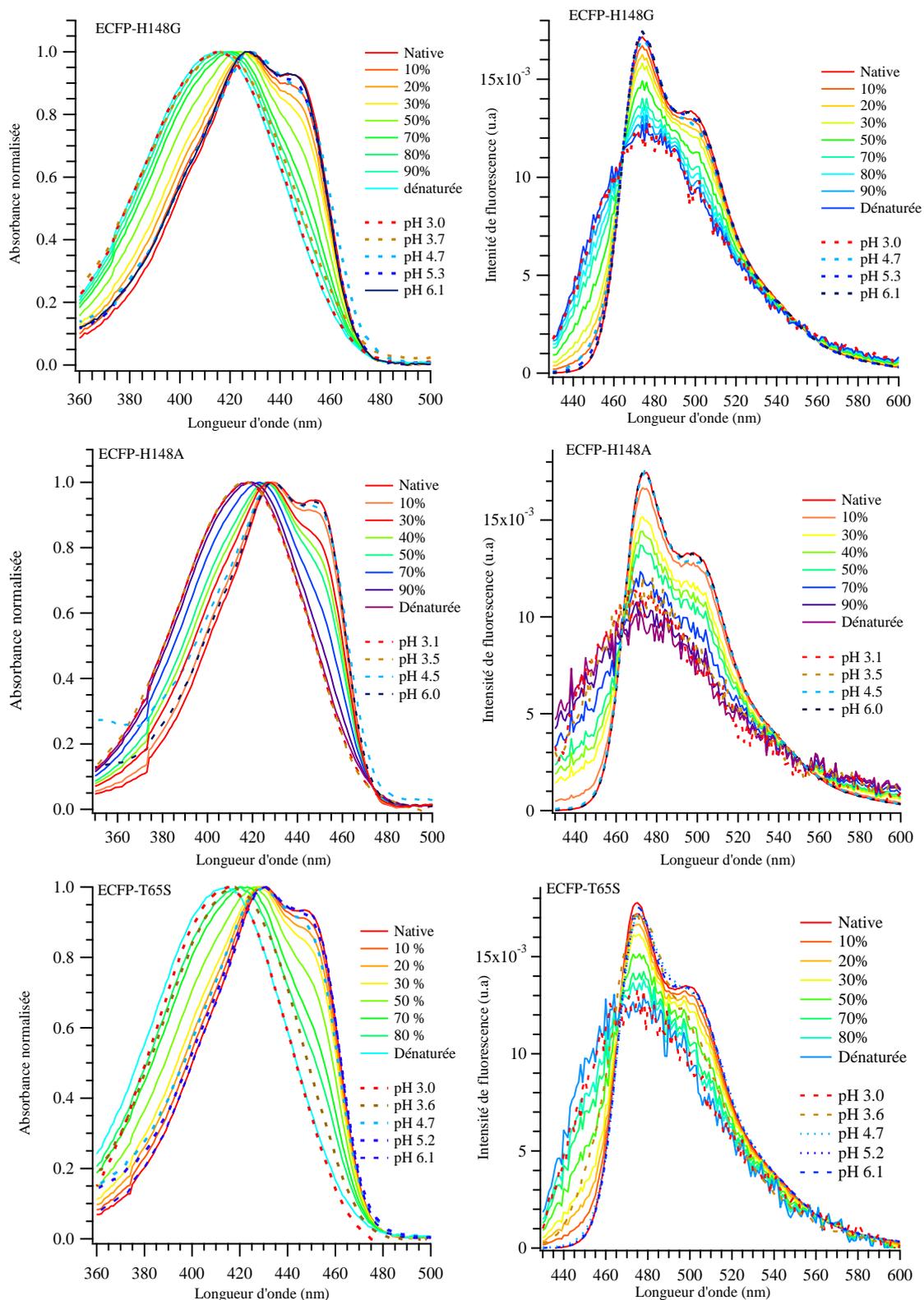


Figure 145 : Comparaison des spectres d'absorption (figures de gauche) et d'émission (figures de droite) obtenus à différents pH avec ceux reconstruits en supposant un équilibre simple entre la forme dénaturée, l'espèce $Acide_{pH2,5}$, de la protéine et une forme native, mélange des espèces présentes dans la zone des pH neutres pour la ECFP-H148G, la ECFP-H148A et la ECFP-T65S.

- Un échange entre, d'un côté, l'espèce *principale* ou l'espèce *secondaire_{rouge}* et de l'autre, une population d'espèce(s) non fluorescente(s). Moyennant, la condition suivante, les vitesses d'échange dans le cas de l'équilibre impliquant l'espèce *principale* sont différentes de celles de l'équilibre impliquant l'espèce *secondaire_{rouge}*, de telle sorte que globalement l'espèce *principale* voit sa population relative réduite.

Pour la ECFP-T65S, nous constatons en supplément une réduction de la durée de vie de la composante de temps long. Ce dernier point suggère que les vitesses d'échange à l'état excité dans les trois scénarios précédents varient avec le pH. D'autres approches, impliquant la prise en compte simultanée des divers paramètres spectraux et cinétiques associées à des simulations utilisant dans un premier temps un modèle simple à deux états, entre autres, seront nécessaires afin de décortiquer plus en détail la nature des espèces mises en jeu lors de ces échanges et les processus impliqués (réactions à l'état excité, transferts de proton photoinduits, ...).

D.III.2 LE GROUPE CERULEAN : LES DERIVES DE LA ECFP PORTANT UNE MUTATION H148X, X=D OU N, NON COUPLEE AVEC LA MUTATION T65S.

Au cours de la transition acide, le phénomène majeur observé dans la Cerulean (par Malo *et al.* (116), confirmé par nos travaux), la ECFP-H148N ou encore la ECFP- H148D (10) est une déformation du côté bleu de leurs spectres d'absorption et d'émission. L'émergence de l'espèce *Em460* caractérisée par un épaulement vers 450-460 nm sur les spectres d'émission associé à une bande d'absorption vers 400 nm se produit à des pH supérieurs à $\text{pH}_{\text{denat}_{\text{fin}}}$ ($\approx \text{pH}_{\text{denat}}+1$) et ne peut donc pas être attribuée à la dénaturation de la protéine. De plus, la modification des spectres suite à un saut de pH, de 7,4 à 5 par exemple, s'effectue sur une échelle de temps de quelques dizaines de minutes ce qui est un argument en faveur d'un processus présentant une barrière de potentiel. Considérant ce dernier aspect et la structure cristallographique de la Cerulean à pH 5, Malo *et al.* attribua l'évolution des spectres à une isomérisation du chromophore qui adopte une configuration

cis, plus exactement la configuration c2CFP d'après la notation employée par Voliani *et al.* (11) (Figure 40).

Au cours de ces travaux, nous avons examiné l'évolution cinétique des spectres d'absorption suite à un saut de pH de 7,4 à 5 de la Cerulean et de la ECFP-H148N offrant l'occasion de

caractériser plus en détail les aspects cinétiques. De plus, nous avons constaté quelques variantes entre ces deux protéines que nous allons discuter.

D.III.2.1 LA CERULEAN.

En plus du déplacement des spectres d'absorption et de la modification de leur allure, deux faits intéressants, en accord avec les résultats de Malo *et al.*(116), méritent une attention particulière à partir de l'examen de l'évolution au cours du temps des spectres d'absorption de la Cerulean suite à un saut de pH de 7,4 à 5 (Figure 109) :

- l'augmentation globale de l'absorbance
- l'observation d'un point isobestique net à 450 nm.

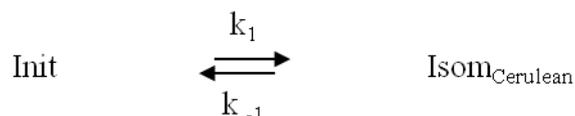
A cela s'ajoute la réduction avec le pH de l'amplitude relative de la composante de temps long, alors que sa durée de vie reste invariante.

Le premier point indique que la forme finale isomérisée présente une capacité à absorber (pour des longueurs d'onde inférieures à 450 nm) supérieure au mélange initial. Le second est le reflet d'une réaction impliquant deux espèces sans passage par un état intermédiaire. Néanmoins, nous avons précédemment montré que dans la zone des pH neutres au moins deux espèces coexistent : l'espèce *principale* et l'espèce *secondaire_{rouge}*. De fait, l'observation d'un point isobestique implique une des trois hypothèses suivantes :

- Un échange entre l'espèce *principale* et la forme isomérisée, la fraction molaire de l'espèce *secondaire_{rouge}* ne variant pas au cours du temps.
- La disparition avec la même vitesse des espèces *principale* et *secondaire_{rouge}* au profit de la forme isomérisée.
- La disparition avec des vitesses distinctes des espèces *principale* et *secondaire_{rouge}* au profit de la forme isomérisée, ce qui suppose que les propriétés d'absorption de l'espèce *secondaire_{rouge}* soient identiques, à la rigueur très similaires, à celles de l'espèce *principale*.

Ces trois hypothèses sont compatibles avec l'évolution des distributions de durées de vie avec le pH qui ont été obtenues sur des solutions à l'équilibre, à savoir lorsque la réaction d'isomérisation était terminée. La baisse de l'amplitude relative de la composante de temps long lors de l'acidification du milieu témoigne au minimum de la réduction de la population relative de l'espèce *principale*.

Compte tenu de ce qui précède, nous pouvons schématiser l'isomérisation du chromophore selon la réaction :



Où Init désigne soit l'espèce *principale* soit le mélange des espèces *principale* et *secondaire_{rouge}*, k_1 et k_{-1} désignent les constantes de vitesse, respectivement, d'apparition et de disparition de la forme isomérisée, $\text{Isom}_{\text{Cerulean}}$.

Les équations différentielles régissant l'évolution des concentrations des deux espèces en fonction du temps s'écrivent :

$$\frac{d[\text{Init}]}{dt} = -k_1 \cdot [\text{Init}] + k_{-1} \cdot [\text{Isom}_{\text{Cerulean}}] \quad \text{Équation 83}$$

$$\frac{d[\text{Isom}_{\text{Cerulean}}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{Init}] - k_{-1} \cdot [\text{Isom}_{\text{Cerulean}}] \quad \text{Équation 84}$$

En prenant comme conditions initiales, $[\text{Init}]_0 = C_0$ et $[\text{Isom}_{\text{Cerulean}}]_0 = 0$, la résolution des équations différentielles à deux inconnues aboutit aux expressions suivantes des concentrations en fonction du temps des deux espèces :

$$[\text{Init}](t) = \frac{C_0 \cdot [k_{-1} + k_1 \cdot e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t}]}{k_1 + k_{-1}} \quad \text{Équation 85}$$

$$[\text{Isom}_{\text{Cerulean}}](t) = -\frac{C_0 \cdot k_1 \cdot [e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t} - 1]}{k_1 + k_{-1}} \quad \text{Équation 86}$$

L'évolution en fonction du temps de l'absorbance totale, somme à chaque longueur d'onde λ des absorbances des diverses espèces du système, s'écrit alors :

$$A_{\text{Tot}}(\lambda, t) = \frac{\ell \cdot C_0}{k_1 + k_{-1}} \cdot \left\{ \begin{array}{l} \varepsilon_{\text{Init}}(\lambda) \cdot [k_{-1} + k_1 \cdot e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t}] \\ - \varepsilon_{\text{Isom}_{\text{Cerulean}}}(\lambda) \cdot k_1 \cdot [e^{-(k_1+k_{-1}) \cdot t} - 1] \end{array} \right\} \quad \text{Équation 87}$$

Où $\varepsilon_{\text{Init}}(\lambda)$ et $\varepsilon_{\text{Isom}_{\text{Cerulean}}}(\lambda)$ représentent les coefficients d'absorption molaire des espèces Init et $\text{Isom}_{\text{Cerulean}}$ respectivement, et ℓ la longueur du trajet optique. A l'aide du logiciel Igor, Wavemetrics, nous avons mené l'analyse globale des variations temporelles de l'absorbance à différentes longueurs d'onde entre 400 nm et 480 nm par pas de 10 nm (Figure 145). Ceci nous a permis d'extraire les constantes de vitesse d'apparition k_1 et de disparition k_{-1} de

l'espèce isomérisée dont les valeurs s'élèvent à $6,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $3,6 \cdot 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ respectivement. La constante de temps d'isomérisation, inverse de k_1 , est de 24,7 min.

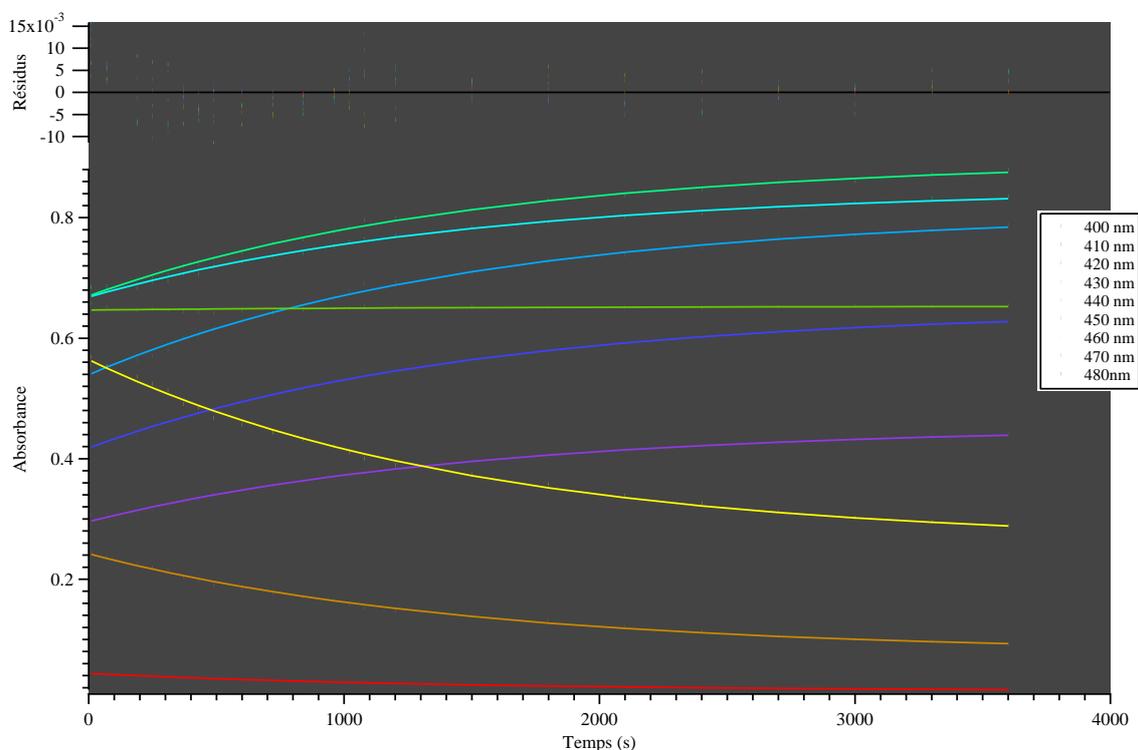


Figure 146 : Analyse globale de l'évolution temporelle de l'absorbance à différentes longueurs d'onde de la Cerulean suite à un saut de pH de 7,4 à 5 à l'aide de l'équation 87. Les constantes k_1 et k_1 sont mises en commun pour toutes les analyses. Les traits pleins représentent les courbes ajustées et les résidus correspondants sont indiqués en haut du graphe.

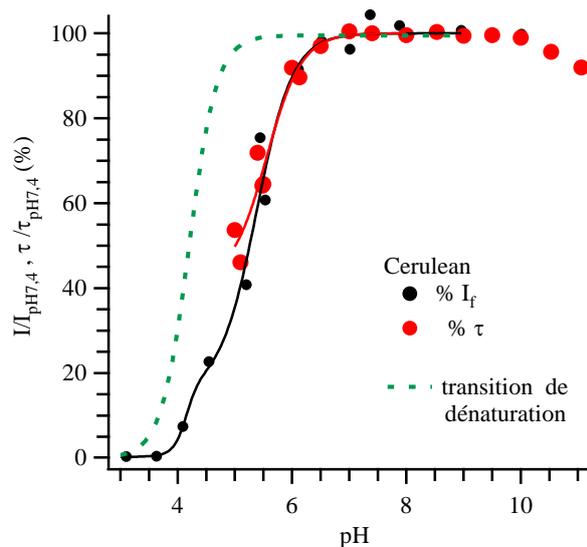


Figure 147 : Comparaison de l'évolution en fonction du pH de la variation d'intensité de fluorescence (points noirs) et de la durée de vie moyenne (points rouges) par rapport aux valeurs correspondantes à pH 7,4 de la Cerulean. En trait pointillé vert est représentée la transition de dénaturation acide calculée à partir de l'équation 80 en prenant $n_{\text{denat}}=1,8$ et comme valeur de pH de demi-dénaturation 4,2 (Tableau 32).

Par ailleurs, le parallélisme dans le cas de la Cerulean entre la dépendance en fonction du pH de l'intensité de fluorescence et celle de la durée de vie témoigne de l'absence de formation

d'une population d'espèces non fluorescentes le long de la transition 2 (Figure 146). La forme isomérisée présente des propriétés d'émission qui sont à l'origine de l'épaule vers 450-460 nm observé sur le spectre d'émission et la réduction de la durée de vie moyenne au cours de cette transition^{VIII} indique que sa durée de vie est plus courte que celle de l'espèce *principale*.

D.III.2.2 LA ECFP-H148N.

L'évolution au cours du temps des spectres d'absorption de la ECFP-H148N suite à un saut de pH de 7,4 à 5 présente deux différences majeures par rapport à la Cerulean : les spectres ne se coupent plus en un point isobestique net (Figure 114) et le spectre d'absorption final est d'allure distincte et est déplacé vers le bleu par rapport à celui obtenu pour la Cerulean (Figure 115). L'absence de point isobestique est le reflet d'un processus d'isomérisation plus complexe que celui se produisant dans la Cerulean. Il pourrait être causé par la disparition avec des vitesses distinctes des espèces *principale* et *secondaire_rouge* au profit de la forme isomérisée. Néanmoins, il est aisé de montrer que ceci conduirait à l'obtention de deux zones temporelles qui présenteraient chacune au moins un point isobestique net. Ce n'est pas ce que nous observons. Par contre, le passage par un intermédiaire, absorbant ou non, peut conduire à l'absence de point isobestique. Une analyse des aspects à la fois spectraux et temporelles de nos données sera nécessaire afin de préciser le mécanisme mis en jeu et d'estimer les constantes de vitesse des divers processus élémentaires.

Par ailleurs, le fait que le spectre final soit distinct de celui de la Cerulean suggère que la forme isomérisée dans le cas de la ECFP-H148N diffère de celle de la Cerulean. L'obtention d'un mécanisme d'isomérisation distinct est un élément supplémentaire confortant cette hypothèse. Cette forme isomérisée pourrait être attribuée à la configuration trans t1CFP du chromophore (Figure 40). En effet, l'autre configuration trans, t2CFP, est très peu stable donc peu probable d'après les calculs de Voliani *et al.* compte tenu des fortes gênes stériques qu'elle implique entre les deux groupes aromatiques du chromophore. Des études structurales en cristallographie, à pH acide, devraient permettre de déterminer la configuration du chromophore dans cette protéine.

^{VIII} Avec le pH, il n'y a pas de variation de la durée de vie associée à la composante de temps long mais une réduction de son amplitude relative.

D.III.3 LE GROUPE ECFP : LA ECFP ET LA ECFP-H148R.

L'analyse des données obtenues à divers pH pour la ECFP et la ECFP-H148R nous amènent aux remarques ci-après. Ne disposant pas de données cinétiques pour la ECFP-H148R, nous discuterons uniquement sur la base de celles obtenues pour la ECFP.

Les modifications de l'allure du spectre d'absorption, induites par le pH, s'effectuent pour des pH inférieurs à $\text{pH}_{\text{denat}_{\text{fin}}}$ ($\approx 5,7$ pour la ECFP, Figure 147). Elles peuvent être attribuées à la dénaturation de la protéine comme pour les protéines du groupe H148X et T65S.

Pour des pH supérieurs à $\text{pH}_{\text{denat}_{\text{fin}}}$, l'acidification du milieu se caractérise tout d'abord, au moins pour la ECFP, par la formation d'une population d'espèces non-fluorescentes comme en témoigne la baisse plus rapide de l'intensité de fluorescence par rapport à la durée de vie moyenne (Figure 147). Elle se caractérise également par un déplacement d'une dizaine de nanomètres vers les grandes longueurs d'onde du spectre d'émission associé à la perte de son caractère bimodal alors que les spectres d'absorption ne subissent aucune perturbation de leur allure. Dans le cas de la ECFP, ceci est concomitant avec la réduction de l'amplitude relative de la composante de temps long, la valeur de sa durée de vie restant inchangée. Ce dernier point indique que l'espèce *principale* reste présente mais que sa population relative diminue au profit d'une espèce de durée de vie plus courte. L'espèce que nous avons nommée *rouge* I_{pHacide} présente donc des propriétés d'émission déplacée vers les grandes longueurs d'onde et une durée de vie courte. Par contre, l'absence significative de perturbations au niveau des spectres d'absorption peut avoir deux origines : cette espèce présente les mêmes propriétés d'absorption que l'espèce principale ou il s'agit d'une espèce formée à l'état excité avec des vitesses d'échange rapides par rapport aux durées de vie de chaque espèce.

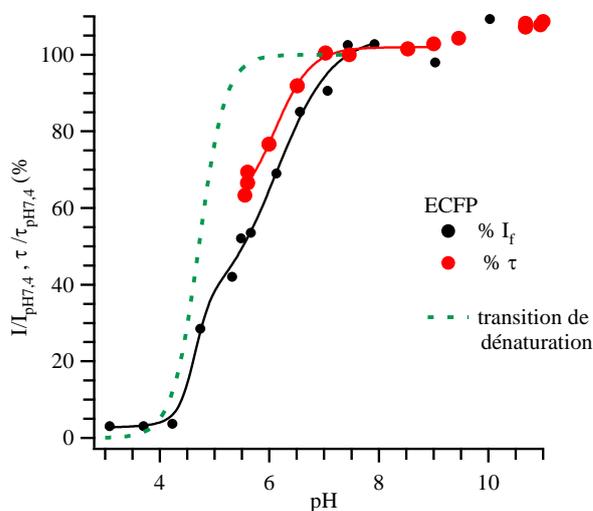


Figure 148 : Comparaison de l'évolution en fonction du pH de la variation d'intensité de fluorescence (points noirs) et de la durée de vie moyenne (points rouges) par rapport aux valeurs correspondantes à pH 7,4 de la ECFP.

En trait pointillé vert est représentée la transition de dénaturation acide calculée à partir de l'équation 80 en prenant $n_{\text{denat}}=1,8$ et comme valeur de pH de demi-transition 4,7 (Tableau 32).

Si nous supposons que, vis-à-vis des espèces fluorescentes qui sont les seules à contribuer au signal de déclin d'émission de fluorescence, l'espèce *rougeI_{pHacide}* est la seule à être formée le long de la transition 2, sa fraction molaire à différents pH dans le cas de la ECFP peut être estimée à partir de la variation de l'amplitude relative de la composante de temps long par rapport à l'amplitude obtenue à pH 7,4. En d'autres termes, nous attribuons la perte de population de l'espèce principale pour des pH inférieurs à 7,4 à la formation de l'espèce *rougeI_{pHacide}*. En l'absence de caractérisations plus précises des propriétés spectrales et cinétiques de cette espèce, nous avons supposé que ces propriétés étaient similaires à celles de l'espèce *principale*. Dans ces conditions, la fraction molaire de l'espèce *rougeI_{pHacide}* est d'au minimum 60% à pH 5,5. De fait, si cette espèce est présente à l'état fondamental, elle devrait donc être a priori tout à fait détectable en cristallographie à pH acide afin de déterminer à quelle conformation elle correspond.

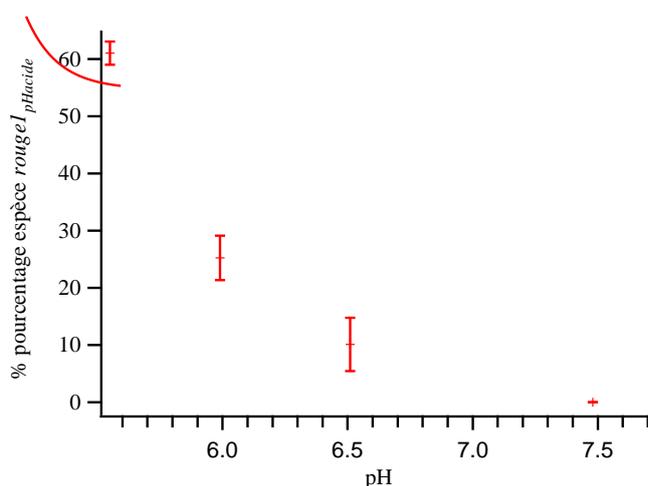


Figure 149 : Evolution en fonction du pH de la fraction molaire de l'espèce *rougeI_{pHacide}* dans le cas de la ECFP estimée à partir des distributions de durées de vie et en supposant que cette espèce est la seule espèce fluorescente à se former le long de la transition 2.

D.III.4 REFLEXION AUTOUR DES ESPECES ROUGES.

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence l'existence de diverses espèces dont plusieurs présentaient des propriétés d'émission déplacées vers le rouge. Il s'agit des espèces *rougeI_{pHacide}*, *rougeI_{pH7,4}*, *rouge2_{pHacide}*, *rouge2_{pH7,4}* et *secondaire_{rouge}*. Hormis pour les espèces *rouge2_{pHacide}* et *rouge2_{pH7,4}* pour lesquelles quelques informations sur leurs propriétés d'absorption ont été obtenues (elles sont toutes les deux détectables pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 470 nm), nous n'avons en revanche aucune information sur les propriétés d'absorbance des autres espèces. Ceci nous oblige à envisager que pour ces

dernières, elles puissent être aussi bien présentes à l'état fondamental que formées à l'état excité.

De l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux, il ressort qu'une corrélation existe entre l'observation (la non-observation) de l'espèce *rouge2_{pH7,4}* et l'observation (la non-observation) de l'espèce *rouge2_{pHacide}*. De plus, la manifestation de ces deux espèces est similaire, à savoir un déplacement vers le rouge du spectre d'émission pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 470 nm. Ces deux éléments suggèrent que les deux espèces *rouge2_{pH7,4}* et *rouge2_{pHacide}* ne forment qu'une seule et unique espèce, que nous pouvons appeler espèce *rouge2*. Cette espèce serait présente dans le cas de la ECFP et de la ECFP-H148R et absente dans tous les autres mutants de la ECFP.

Il est également curieux de constater qu'il existe une corrélation entre l'observation (ou l'absence) du déplacement vers le rouge des spectres d'émission à pH acide, manifestant la présence (ou l'absence) de l'espèce *rougeI_{pHacide}* avec l'observation (ou la non observation) de l'espèce *rouge2*. Nous devons donc envisager la possibilité qu'il puisse s'agir également de la même espèce.

Enfin, une dernière corrélation est à signaler. La dépendance en fonction de la longueur d'onde d'émission de la durée de vie moyenne de la ECFP-H148D(8, 10), de la ECFP-H148G ou encore de la ECFP-T65S est fortement réduite suggérant que la population de l'espèce *rougeI_{pH7,4}* à pH 7,4 dans ces protéines est diminuée voire éliminée, ce que nous avons précédemment supposé. En parallèle, nous avons constaté, pour ces trois dérivés de la ECFP, l'absence des manifestations expérimentales liées aux deux autres espèces *rouge2* et *rougeI_{pHacide}*. A l'inverse, pour la ECFP, nous observons aussi bien la manifestation de l'espèce *rougeI_{pH7,4}*, que des deux autres. Là encore, il pourrait s'agir d'une seule et unique espèce.

Nous n'avons pas ici d'éléments pour trancher. Ces interrogations soulignent de nouveau le besoin crucial de faire appel à des approches multivariées afin d'identifier les diverses espèces présentes, leurs caractéristiques spectrales et cinétiques et d'établir un modèle cinétique cohérent permettant de décrire la photophysique de la ECFP et de ses dérivés.

SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont eu pour objectif principal la génération par mutagenèse dirigée de dérivés de la Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) performants en termes de propriétés photophysiques, insensibles au pH et comportant le minimum de mutations par rapport à la ECFP. Deux sites de mutation jouant un rôle déterminant dans les propriétés d'émission et la sensibilité au pH de la ECFP ont été identifiés : il s'agit des positions 65 et 148. Grâce à l'étude détaillée d'un panel de mutants portant une mutation sur une seule de ces deux positions stratégiques, puis une mutation sur chacun de ces sites, nous avons montré que deux mutations sont suffisantes pour produire une protéine fluorescente cyan ayant des performances photophysiques et une sensibilité au pH quasi-idéales. En effet, l'introduction des mutations T65S et H148X, avec X=G, S, D ou E, dans la séquence peptidique de la ECFP génère des dérivés avec un rendement quantique pouvant avoisiner 0,9, un déclin d'émission pour ainsi dire mono-exponentiel, une durée de vie moyenne pouvant atteindre 4,1 ns et une insensibilité de ses propriétés d'émission sur le domaine de pH accessible en milieu cellulaire, caractérisée par un pH de demi-transition acide inférieur à 4. La présence d'une glycine en position 148 apparaît être l'optimum. En effet, les performances les plus importantes en termes de propriétés photophysiques ont été acquises grâce à la combinaison des deux mutations T65S et H148G, générant l'Aquamarine (ECFP-T65S, H148G). L'Aquamarine-S72A, A206K présente, quant à elle, une insensibilité au pH exceptionnelle avec un $pH_{1/2}$ descendu à 3,1. L'absence de chaîne latérale avec un résidu glycine semble permettre une optimisation de la rigidité du chromophore et de son environnement contrecarrant les hétérogénéités liées à l'introduction au niveau du chromophore d'un résidu tryptophane plus volumineux que la tyrosine native. Enfin, ces résultats ouvrent la voie prometteuse à l'amélioration rapide de toutes les constructions basées sur la ECFP ou la Cerulean. En effet, ceci nécessite l'introduction de deux ou une mutation, respectivement, dans la séquence peptidique de ces protéines afin de produire une nouvelle construction performante et insensible au pH.

En second lieu, ces travaux offrent l'opportunité d'obtenir des éléments supplémentaires sur la compréhension des processus à l'origine des propriétés complexes de la ECFP. La génération de dérivés aux propriétés photophysiques très diverses, dont la complexité est

échelonnée entre, d'un côté, un comportement en première approximation très simple, avec l'Aquamarine et les doubles mutants et, à l'autre extrême, le comportement le plus complexe avec la ECFP ou la ECFP-H148R, nous a permis de poser de premières hypothèses sur les diverses espèces émissives présentes selon le pH.

Nous avons montré que tous les dérivés de la ECFP, indépendamment de leurs performances, se comportent de façon identique à très bas pH. Ils sont caractérisés par un rendement quantique de l'ordre de $3 \cdot 10^{-3}$ et des propriétés spectrales spécifiques, typiques du chromophore solubilisé dans un solvant, hors de sa structure protéique. D'après les études de dichroïsme circulaire, les pH très acides induisent une déstructuration de la protéine avec une perte très partielle de sa structure secondaire. Les résultats convergents, d'une part, rapportés dans la littérature sur des dérivés de la GFP_{av} et, d'autre part, obtenus au cours de ces travaux sur la ECFP, ses dérivés et la EYFP indiquent que les perturbations structurales induites à très bas pH sont communes à toutes les protéines fluorescentes dérivées de la GFP_{av}. L'analyse de la transition acide nous a permis d'estimer, pour tous les dérivés de la ECFP générés, la valeur du pH de demi-dénaturation, une mesure de la stabilité de la protéine. Nos résultats montrent que cette dernière est fortement améliorée grâce au couplage des deux mutations en position 65 et 148.

La stabilisation de la protéine est concomitante avec la simplification des propriétés d'émission (homogénéités spectrale et cinétique) et l'augmentation des performances (photophysiques et insensibilité au pH). Nous avons en effet montré que pour l'Aquamarine et les autres doubles mutants, la dénaturation acide de la protéine était le principal processus à l'origine de la transition acide observée pour ces protéines. Pour les autres protéines, dont la stabilité au travers de la valeur du pH de demi-dénaturation était plus faible, en supplément de la transition coopérative de dénaturation, divers intermédiaires fluorescents ou non apparaissent le long de la transition acide dont la nature dépend en particulier de la nature de la chaîne latérale incorporée en position 148 :

(i) Une acidification du milieu favorise l'isomérisation du chromophore lorsque la chaîne latérale du résidu 148 présente une taille adéquate et une fonction acide carboxylique ou amide (148D ou 148N) afin de stabiliser via un réseau de liaisons hydrogène la forme isomérisée. Nous avons montré que l'augmentation de la taille de la chaîne latérale suffisait pour supprimer cette interaction stabilisante (148E). De façon plus subtile, il apparaît que le mécanisme d'isomérisation et la configuration de l'isomère formé dépend lui aussi de la

nature du résidu en position 148. Les deux formes isomérisées identifiées au cours de ces travaux dans la Cerulean, d'une part, et dans la ECFP-H148N, d'autre part, présentent toutes les deux une durée de vie courte et des propriétés spectrales déplacées vers le bleu par rapport à l'espèce *principale* présente à pH neutre. Au moins pour le spectre d'absorption, nos résultats indiquent que l'amplitude de ce déplacement et son allure sont caractéristiques de l'isomère formé.

(ii) La présence d'une histidine ou d'une arginine en position 148 favorise l'émergence le long de la transition acide d'une espèce (espèce *rouge* $I_{pH\text{acide}}$) ayant des propriétés d'émission déplacée vers le rouge et une durée de vie courte par rapport à l'espèce *principale* présente à pH neutre. Nous avons estimé la fraction molaire de cette espèce à 60%, au minimum, à pH 5,5.

(iii) Enfin, l'introduction de résidus de petite taille, glycine, alanine et serine ou encore l'introduction d'un acide glutamique permet de supprimer les deux types d'intermédiaires précédents. Pour autant, ces mutations ne permettent pas toutes d'empêcher la formation d'espèces non-fluorescentes. Nous avons montré que ces protéines sont caractérisées le long de la transition acide par des perturbations spectrales uniquement induites par leur dénaturation acide. Des conséquences similaires ont été obtenues grâce à l'introduction de la mutation T65S seule.

Ainsi, au regard de nos données, la nature de la chaîne latérale du résidu en position 148 joue un rôle crucial à la fois sur les performances photophysiques et sur la sensibilité au pH des dérivés de la ECFP. Ceci était espéré mais il est surprenant et intéressant de constater que le comportement des protéines portant un tryptophane au niveau du chromophore diverge de celui des protéines avec une tyrosine. En effet, alors que l'ajout d'une glycine en position 148 permet de réduire la sensibilité en pH de la ECFP, l'effet est inverse dans la EYFP ou la EGFP(83, 84), la glycine permettant d'ouvrir un canal rendant ces dernières plus sensibles au solvant, en particulier au pH(82).

Dans la zone des pH neutres, nous avons pu identifier l'existence de plusieurs espèces émissives (espèces *principale*, *rouge* $I_{pH7,4}$, *rouge2* et *secondaire_rouge*) à l'origine de la photophysique complexe de la ECFP et de la plupart de ces dérivés. Nous avons apporté quelques informations quant aux caractéristiques spectrales et temporelles de ces espèces. L'analyse fine des distributions de durées de vie, entre autres, indique que leur population

relative est modulée suite à l'introduction de la mutation T65S et/ou d'une mutation en position 148. Nous avons montré que seul le couplage de la T65S avec une mutation H148X permet de rigidifier le chromophore et son environnement stabilisant une seule conformation de la protéine.

Ces travaux constituent une première étape vers la compréhension, le décryptage de la photophysique complexe de la ECFP et de ses dérivés et la caractérisation spectrale et cinétique des diverses espèces émissives contribuant à la photophysique de ces protéines. Diverses approches devront à l'avenir être menées afin de concilier l'ensemble des informations acquises par différentes techniques, la cristallographie, la RMN, la spectroscopie d'émission de fluorescence et la spectroscopie d'absorption. Deux pistes sont ici évoquées.

Un premier volet indispensable est une approche structurale par cristallographie avec un objectif multiple. L'obtention de la structure par diffraction des rayons X de la ECFP et de certains dérivés pertinents permettra d'apporter des informations sur l'existence dès l'état fondamental de conformations spécifiques, en particulier à pH acide. Conjuguée à l'obtention de données spectrales et cinétiques sur les cristaux, l'attribution au moins de certaines des diverses espèces émissives mises en évidence dans ces protéines pourra être envisagée. En particulier, il pourrait être intéressant d'identifier l'isomère formé dans le cas de la ECFP-H148N d'apporter des éléments sur le mécanisme impliqué et de confronter ces résultats structuraux avec ceux obtenus par spectroscopie d'émission de fluorescence. Cette approche structurale par cristallographie permettra également de mieux comprendre l'influence de la nature des résidus en position 148 et de la mutation T65S dans la modulation des propriétés photophysiques et de la sensibilité au pH. Il serait souhaitable de comparer les structures de protéines se différenciant par une seule mutation afin de bien caractériser l'apport de cette dernière. Cette approche est peu développée dans le cas des protéines fluorescentes. Néanmoins l'approche précédente ne peut pas être appliquée à des espèces présentes en faible proportion ou formées à l'état excité. Il sera donc nécessaire d'ajouter un volet impliquant une analyse de l'ensemble de nos données spectrales et cinétiques par des méthodes globales de traitement de données. L'objectif ici est de pouvoir identifier et caractériser les diverses espèces mises en jeu dans la photophysique de ces protéines ainsi que les processus impliqués le long de la transition acide en pH. L'ensemble de ces approches contribuera à une meilleure

compréhension de la relation structure-photophysique-dynamique de la ECFP et de ces dérivés, que des études théoriques par dynamique moléculaire permettraient de compléter.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zimmer, M. (2009) *Chem Soc Rev* 38, 2823-32.
2. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) *Nature* 388, 882-7.
3. Frommer, W. B., Davidson, M. W., and Campbell, R. E. (2009) *Chemical Society Reviews* 38, 2833-2841.
4. Paroutis, P., Touret, N., and Grinstein, S. (2004) *Physiology* 19, 207-215.
5. Shaner, N. C., Patterson, G. H., and Davidson, M. W. (2007) *J Cell Sci* 120, 4247-60.
6. Day, R. N., and Davidson, M. W. (2009) *Chemical Society Reviews* 38, 2887-2921.
7. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2010) *Physiological Reviews* 90, 1103-1163.
8. Villoing, A., Ridhoir, M., Cinquin, B., Erard, M., Alvarez, L., Vallverdu, G., Pernot, P., Grailhe, R., Merola, F., and Pasquier, H. (2008) *Biochemistry* 47, 12483-92.
9. Vallverdu, G., Demachy, I., Merola, F., Pasquier, H., Ridard, J., and Levy, B. (2010) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78, 1040-1054.
10. Ridhoir, M. (2007), Université Paris-Sud XI.
11. Voliani, V., Bizzarri, R., Nifosi, R., Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., and Beltram, F. (2008) *J Phys Chem B* 112, 10714-22.
12. Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M. A., Vischer, N. O., Jalink, K., and Gadella, T. W., Jr. (2010) *Nat Methods* 7, 137-9.
13. Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M. A., van Weeren, L., Gadella, T. W. J., and Royant, A. (2012) *Nature Communications* 3, 751.
14. Markwardt, M. L., Kremers, G. J., Kraft, C. A., Ray, K., Cranfill, P. J., Wilson, K. A., Day, R. N., Wachter, R. M., Davidson, M. W., and Rizzo, M. A. (2011) *PLoS One* 6, e17896.
15. Valeur, B. (2006) *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.*, 3rd ed., Wiley-VCH.
16. BIRKS, J. B. (1970) *Photophysics of aromatic molecules*, Wiley-Interscience, London.
17. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles Of Fluorescence Spectroscopy*, 2d. ed., Kluwer Academic Pub.
18. Merola, F. (1995), Université Paris-Sud, Orsay.
19. Pasquier, H. (2009), Université Paris-Sud, Orsay.
20. Tsien, R. Y. (1998) *Annu Rev Biochem* 67, 509-44.
21. Tsien, R. Y. (2009) *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5612-26.
22. Tsien, R. Y. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, SS16-21.
23. Zimmer, M. (2002) *Chem Rev* 102, 759-81.
24. Pakhomov, A. A., and Martynov, V. I. (2008) *Chemistry & Biology* 15, 755-764.
25. Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005) *Nat Methods*. 2, 905-9.
26. Merola, F., Levy, B., Demachy, I., and Pasquier, H. (2010) in *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology" Vol I Fundamentals and Molecular Design. Springer Series on Fluorescence.* (Demchenko, A. P., Ed.) pp 347-383, Springer.
27. Morris, M. C. (2010) *Cell Biochem Biophys* 56, 19-37.
28. Miyawaki, A. (2005) *Neuron* 48, 189-199.
29. Arosio, D., Ricci, F., Marchetti, L., Gualdani, R., Albertazzi, L., and Beltram, F. (2010) *Nature Methods* 7, 516-U44.

30. Ashby, M. C., Ibaraki, K., and Henley, J. M. (2004) *Trends in Neurosciences* 27, 257-261.
31. Meyer, A. J., and Dick, T. P. (2010) *Antioxidants & Redox Signaling* 13, 621-650.
32. Bregestovski, P., Waseem, T., and Mukhtarov, M. (2009) *Front Mol Neurosci* 2, 15.
33. Vincent, P., Gervasi, N., and Zhang, J. (2008) *Brain Cell Biol* 36, 3-17.
34. Hell, S. W. (2007) *Science* 316, 1153-8.
35. Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12501-4.
36. Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bodi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I., and Sakakibara, S. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13549-54.
37. Labas, Y. A., Gurskaya, N. G., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A., and Matz, M. V. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4256-61.
38. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) *Science* 296, 913-6.
39. Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11984-9.
40. Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962) *J Cell Comp Physiol* 59, 223-39.
41. Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., Winant, J., and Saiga, Y. (1974) *Biochemistry* 13, 2656-62.
42. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992) *Gene* 111, 229-233.
43. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) *Science* 263, 802-5.
44. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004) *Nat Biotechnol.* 22, 1567-72. Epub 2004 Nov 21.
45. Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2006) *Nat Protoc.* 1, 1057-65.
46. Nicolas, M. T., and Moreau, M. (2008) *Med Sci (Paris).* 24, 983-4.
47. Salamero, J. (2008) *Med Sci (Paris).* 24, 987-8.
48. Pasquier, H. (2008) *Med Sci (Paris)* 24, 985-6.
49. Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999) *Nat Biotechnol.* 17, 969-73.
50. Mishin, A. S., Subach, F. V., Yampolsky, I. V., King, W., Lukyanov, K. A., and Verkhusha, V. V. (2008) *Biochemistry* 47, 4666-4673.
51. Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996) *Science* 273, 1392-5.
52. Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N., Jr. (1996) *Nat Biotechnol* 14, 1246-51.
53. Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M., and Tsuji, F. I. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13617-22.
54. Ward, W. W., Prentice, H. J., Roth, A. F., Cody, C. W., and Reeves, S. C. (1982) *Photochem. Photobiol.* 35, 803-808.
55. Ward, W. W. (1998) in *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols.* (Chalfie, M., Kain, S. R., Ed.) pp 45-75, Wiley-Liss, Inc., New-York.
56. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., and Tsien, R. Y. (1995) *Trends Biochem Sci* 20, 448-55.
57. Sniegowski, J. A., Lappe, J. W., Patel, H. N., Huffman, H. A., and Wachter, R. M. (2005) *J Biol Chem.* 280, 26248-55. Epub 2005 May 10.
58. Reid, B. G., and Flynn, G. C. (1997) *Biochemistry* 36, 6786-91.
59. Wood, T. I., Barondeau, D. P., Hitomi, C., Kassmann, C. J., Tainer, J. A., and Getzoff, E. D. (2005) *Biochemistry.* 44, 16211-20.

60. Zhang, L., Patel, H. N., Lappe, J. W., and Wachter, R. M. (2006) *J Am Chem Soc* 128, 4766-72.
61. Schultz, C. (2009) *Chem Biol*. 16, 107-11.
62. Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., and Piston, D. W. (1997) *Biophys J* 73, 2782-90.
63. Bokman, S. H., and Ward, W. W. (1981) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101, 1372-1380.
64. Chatteraj, M., King, B. A., Bublitz, G. U., and Boxer, S. G. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8362-7.
65. Lossau, H., Kummer, A., Heinecke, R., Pollinger-Dammer, F., Kompa, C., Bieser, G., Jonsson, T., Silva, C. M., Yang, M. M., Youvan, D. C., and Michel-Beyerle, M. E. (1996) *Chemical Physics* 213, 1-16.
66. Creemers, T. M., Lock, A. J., Subramaniam, V., Jovin, T. M., Volker, S., and Subramaniam, V. V. (1999) *Nat Struct Biol*. 6, 557-60.
67. Winkler, K., Lindner, J. R., Subramaniam, V., Jovin, T. M., and Vohringer, P. (2002) *Physical Chemistry Chemical Physics* 4, 1072-1081.
68. Bell, A. F., Stoner-Ma, D., Wachter, R. M., and Tonge, P. J. (2003) *J Am Chem Soc*. 125, 6919-26.
69. van Thor, J. J., Pierik, A. J., Nugteren-Roodzant, I., Xie, A., and Hellingwerf, K. J. (1998) *Biochemistry* 37, 16915-21.
70. van Thor, J. J., Gensch, T., Hellingwerf, K. J., and Johnson, L. N. (2002) *Nat Struct Biol* 9, 37-41.
71. Kummer, A. D., Kompa, C., Niwa, H., Hirano, T., Kojima, S., and Michel-Beyerle, M. E. (2002) *The Journal of Physical Chemistry B* 106, 7554-7559.
72. Mandal, D., Tahara, T., and Meech, S. R. (2004) *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 1102-1108.
73. Toniolo, A., Olsen, S., Manohar, L., and Martinez, T. J. (2004) *Faraday discussions* 127.
74. Olsen, S., and Smith, S. C. (2008) *Journal of the American Chemical Society* 130.
75. Polyakov, I. V., Grigorenko, B. L., Epifanovsky, E. M., Krylov, A. I., and Nemukhin, A. V. (2010) *Journal of Chemical Theory and Computation* 6, 2377-2387.
76. Jonasson, G., Teuler, J.-M., Vallverdu, G., Meřrola, F., Ridard, J., Leřvy, B., and Demachy, I. (2011) *Journal of Chemical Theory and Computation* 7, 1990-1997.
77. Vallverdu, G., Demachy, I., Ridard, J., and Levy, B. (2009) *Journal of Molecular Structure-Theochem* 898, 73-81.
78. Vallverdu, G. (2009), Université Paris-Sud XI.
79. Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y. (1995) *Nature* 373, 663-4.
80. Delagrave, S., Hawtin, R. E., Silva, C. M., Yang, M. M., and Youvan, D. C. (1995) *Biotechnology (N Y)*. 13, 151-4.
81. Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2006) *Methods Biochem Anal* 47, 83-120.
82. Wachter, R. M., Elsliger, M. A., Kallio, K., Hanson, G. T., and Remington, S. J. (1998) *Structure* 6, 1267-77.
83. Elsliger, M. A., Wachter, R. M., Hanson, G. T., Kallio, K., and Remington, S. J. (1999) *Biochemistry* 38, 5296-301.
84. Hanson, G. T., McAnaney, T. B., Park, E. S., Rendell, M. E., Yarbrough, D. K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S. G., Montrose, M. H., and Remington, S. J. (2002) *Biochemistry* 41, 15477-88.

85. Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R. M., Remington, S. J., and Verkman, A. S. (2000) *J Biol Chem* 275, 6047-50.
86. Ganesan, S., Ameer-Beg, S. M., Ng, T. T., Vojnovic, B., and Wouters, F. S. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 4089-94. Epub 2006 Mar 6.
87. Ai, H. W., Henderson, J. N., Remington, S. J., and Campbell, R. E. (2006) *Biochem J* 400, 531-40.
88. Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., and Piston, D. W. (2004) *Nat Biotechnol* 29, 29.
89. Heim, R., and Tsien, R. Y. (1996) *Current Biology* 6, 178-182.
90. Espagne, A., Erard, M., Madiona, K., Derrien, V., Jonasson, G., Levy, B., Pasquier, H., Melki, R., and Merola, F. (2011) *Biochemistry* 50, 437-439.
91. Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996) *Gene* 173, 33-38.
92. Seifert, M. H., Ksiazek, D., Azim, M. K., Smialowski, P., Budisa, N., and Holak, T. A. (2002) *Journal of the American Chemical Society* 124, 7932-7942.
93. Bae, J. H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M. H. J., Azim, M. K., Kim, J. S., Zumbusch, A., Holak, T. A., Moroder, L., Huber, R., and Budisa, N. (2003) *Journal of Molecular Biology* 328, 1071-1081.
94. Lelimosin, M., Noirclerc-Savoye, M., Lazareno-Saez, C., Paetzold, B., Le Vot, S., Chazal, R., Macheboeuf, P., Field, M. J., Bourgeois, D., and Royant, A. (2009) *Biochemistry*.
95. Brejc, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M., and Remington, S. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2306-11.
96. Villoing, A. (2003), Université Paris-Sud.
97. Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) *Analytical Biochemistry* 182, 319-326.
98. Visser, N. V., Borst, J. W., Hink, M. A., van Hoek, A., and Visser, A. J. (2005) *Biophys Chem* 116, 207-12.
99. Boye, S. V., Nielsen, I. B., Nielsen, S. B., Krogh, H., Lapierre, A., Pedersen, H. B., Pedersen, S. U., Pedersen, U. V., and Andersen, L. H. (2003) *Journal of Chemical Physics* 119, 338-345.
100. Ai, H. W., Olenych, S. G., Wong, P., Davidson, M. W., and Campbell, R. E. (2008) *BMC Biol* 6, 13.
101. Visser, N. V., Hink, M. A., Borst, J. W., van der Krogt, G. N., and Visser, A. J. (2002) *FEBS Lett* 521, 31-5.
102. Demachy, I., Ridard, J., Laguitton-Pasquier, H., Durnerin, E., Vallverdu, G., Archirel, P., and Levy, B. (2005) *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*. 109, 24121-33.
103. Tramier, M., Gautier, I., Piolot, T., Ravalet, S., Kemnitz, K., Coppey, J., Durieux, C., Mignotte, V., and Coppey-Moisan, M. (2002) *Biophys J* 83, 3570-7.
104. Millington, M., Grindlay, G. J., Altenbach, K., Neely, R. K., Kolch, W., Bencina, M., Read, N. D., Jones, A. C., Dryden, D. T., and Magennis, S. W. (2007) *Biophys Chem*. 127, 155-64. Epub 2007 Feb 1.
105. Grailhe, R., Merola, F., Ridard, J., Couvignou, S., Le Poupon, C., Changeux, J. P., and Laguitton-Pasquier, H. (2006) *Chemphyschem* 7, 1442-54.
106. Becker, W., Bergmann, A., Hink, M. A., König, K., Benndorf, K., and Biskup, C. (2004) *Microsc Res Tech*. 63, 58-66.
107. Habuchi, S., Cotlet, M., Hofkens, J., Dirix, G., Michiels, J., Vanderleyden, J., Subramaniam, V., and De Schryver, F. C. (2002) *Biophys J* 83, 3499-506.
108. Cinquin, B. (2007), Université Paris-Sud.

109. Sinnecker, D., Voigt, P., Hellwig, N., and Schaefer, M. (2005) *Biochemistry* 44, 7085-7094.
110. Sawano, A., and Miyawaki, A. (2000) *Nucleic Acids Res* 28, E78.
111. Miyawaki, A., and Tsien, R. Y. (2000) *Methods Enzymol* 327, 472-500.
112. Cubitt, A. B., Woollenweber, L. A., and Heim, R. (1999) *Methods Cell Biol* 58, 19-30.
113. Kremers, G. J., Goedhart, J., van Munster, E. B., and Gadella, T. W., Jr. (2006) *Biochemistry* 45, 6570-80.
114. Sarkar, P., Koushik, S. V., Vogel, S. S., Gryczynski, I., and Gryczynski, Z. (2009) *Journal of Biomedical Optics* 14, 034047-9.
115. Walther, K. A., Papke, B., Sinn, M. B., Michel, K., and Kinkhabwala, A. (2011) *Mol* 7, 322-36. Epub 2011 Jan 10.
116. Malo, G. D., Pouwels, L. J., Wang, M., Weichsel, A., Montfort, W. R., Rizzo, M. A., Piston, D. W., and Wachter, R. M. (2007) *Biochemistry* 46, 9865-73.
117. Borst, J. W., Willemsse, M., Slijkhuis, R., van der Krogt, G., Laptенок, S. P., Jalink, K., Wieringa, B., and Franssen, J. A. (2010) *PLoS* 5, e13862.
118. Metrich, E. (2009), Université Paris-Sud.
119. Rekas, A., Alattia, J. R., Nagai, T., Miyawaki, A., and Ikura, M. (2002) *J Biol Chem* 277, 50573-8. Epub 2002 Oct 4.
120. Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11241-6.
121. Patterson, G., Day, R. N., and Piston, D. (2001) *J Cell Sci* 114, 837-8.
122. Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., and Tsien, R. Y. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6803-8.
123. Wachter, R. M., and Remington, S. J. (1999) *Current Biology* 9, R628-R629.
124. Kremers, G. J., Goedhart, J., van den Heuvel, D. J., Gerritsen, H. C., and Gadella, T. W., Jr. (2007) *Biochemistry* 46, 3775-83.
125. von Stetten, D., Noirclerc-Savoie, M., Goedhart, J., Gadella, T. W., Jr., and Royant, A. (2012) *Acta* 68, 878-82. Epub 2012 Jul 26.
126. Munro, A. W., Lindsay, J. G., Coggins, J. R., Kelly, S. M., and Price, N. C. (1994) *Febs Letters* 343, 70-74.
127. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1751, 119-139.
128. Bulheller, B. M., Rodger, A., and Hirst, J. D. (2007) *Physical Chemistry Chemical Physics* 9, 2020-2035.
129. Lewis, J. W., Goldbeck, R. A., Kliger, D. S., Xie, X. L., Dunn, R. C., and Simon, J. D. (1992) *Journal of Physical Chemistry* 96, 5243-5254.
130. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2004) *Numerical Computer Methods, Pt D* 383, 318-351.
131. Goldbeck, R. A., KimShapiro, D. B., and Kliger, D. S. (1997) *Annual Review of Physical Chemistry* 48, 453-479.
132. Krittanai, C., and Johnson Jr., W. C. (1997) *Analytical Biochemistry* 253, 57-64.
133. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) *Biochim Biophys Acta*. 1751, 119-39.
134. Wallace, B. A., and Janes, R. W. (2001) *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 567-571.
135. Wallace, B. A., and Janes, R. W. (2010) *Biochemical Society Transactions* 38, 861-873.
136. Miles, A. J., and Wallace, B. A. (2006) *Chem Soc Rev*. 35, 39-51. Epub 2005 Nov 14.
137. Greenfield, N. J. (2006) *Nat Protoc*. 1, 2876-90.
138. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) *Biochemistry*. 20, 33-7.
139. Manavalan, P., and Johnson, W. C., Jr. (1987) *Anal Biochem*. 167, 76-85.

140. Johnson, W. C. (1999) *Proteins*. 35, 307-12.
141. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) *Anal Biochem*. 287, 252-60.
142. Wallace, B. A., and Janes, R. W. (2010) *Biochem* 38, 861-73.
143. Manning, M. C., Illangasekare, M., and W. Woody, R. (1988) *Biophysical Chemistry Satellite Symposium Papers 9th International Biophysics Congress* 31, 77-86.
144. Enoki, S., Maki, K., Inobe, T., Takahashi, K., Kamagata, K., Oroguchi, T., Nakatani, H., Tomoyori, K., and Kuwajima, K. (2006) *J Mol Biol*. 361, 969-82. Epub 2006 Aug 4.
145. Enoki, S., Saeki, K., Maki, K., and Kuwajima, K. (2004) *Biochemistry*. 43, 14238-48.
146. Huang, J. R., Craggs, T. D., Christodoulou, J., and Jackson, S. E. (2007) *J Mol Biol* 370, 356-71.
147. Huang, J. R., Hsu, S. T., Christodoulou, J., and Jackson, S. E. (2008) *Hfsp J* 2, 378-87.
148. Whitten, S. T., and Garcia-Moreno, E. B. (2000) *Biochemistry*. 39, 14292-304.