

TITRE (Français)	ETUDES MECANISTIQUES DES PROTEINES FLUORESCENTES PHOTOACTIVABLES : UNE APPROCHE COMBINEE PAR CRISTALLOGRAPHIE ET SPECTROSCOPIE
TITRE (English)	MECHANISTIC STUDIES OF PHOTOACTIVATABLE FLUORESCENT PROTEINS: A COMBINED APPROACH BY CRYSTALLOGRAPHY AND SPECTROSCOPY
AUTEUR	Virgile ADAM
UNIVERSITE	Université Joseph Fournier - Grenoble 1
DATE	20 Mai 2009
LABORATOIRE	European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)
DIRECTION DE THESE	Dr. Dominique BOURGEOIS et Dr. Sean McSWEENEY
PARRAINAGE	

Résumé en Français :

Depuis la découverte de la protéine fluorescente verte (GFP) en 1962, de nombreux développements ont permis d'améliorer l'utilisation de cette protéine naturellement luminescente en tant que puissant outil permettant de suivre des protéines ou des organelles d'intérêt dans les cellules ou organismes vivants. Au début du 21^{ème} siècle, la découverte des protéines fluorescentes photoactivables (PAFPs), notamment chez les anthozoaires, a initié une révolution dans le domaine de la technologie des FP. Certaines PAFPs sont capables d'être irréversiblement photoconverties d'une forme fluorescente verte à une forme fluorescente rouge alors que d'autres peuvent être réversiblement commutées entre des formes allumées ou éteintes, selon des longueurs d'onde d'excitation spécifiques. Ces protéines sont intensivement employées pour les techniques de microscopie optique, particulièrement en "nanoscopie", qui permet d'atteindre une résolution optique 10 fois meilleure que la limite théorique d'Abbe. Afin de développer plus en avant ces techniques, notamment en terme de résolution temporelle, la nécessité d'obtenir des sondes fluorescentes plus lumineuses pouvant se photoconvertir ou se photocommuter efficacement est cruciale. Dans un même temps, les marqueurs fluorescents doivent généralement être monomériques et photostables. Afin de mieux comprendre les mécanismes des phototransformations des PAFPs, trois membres de la famille ont été étudiés : EosFP, Dendra2 et IrisFP. Le phénomène de photoconversion du vert au rouge, de photocommutation réversible et de photoblanchiment irréversible ont été étudiés grâce à une combinaison de cristallographie des rayons X et de microspectrophotométrie, en utilisant le laboratoire Cryobench de l'ESRF/IBS. Pris ensemble, les résultats nous ont permis de proposer un mécanisme de photoconversion pour EosFP et Dendra2 et de découvrir et caractériser IrisFP, première PAFP combinant à la fois les propriétés de photoconversion et de photocommutation. Les modifications structurales du chromophore associées { la formation d'un état radicalaire induit par les rayons X, probablement impliqués dans la voie de photoblanchiment des PAFPs, ont aussi été caractérisées.

Résumé en anglais :

Since the discovery of the green fluorescent protein (GFP) in 1962, many developments allowed improving the use of this naturally light-emitting protein as a powerful tool for tracking proteins or organelles of interest within living cells and organisms. At the beginning of the 21st century, the discovery of photoactivatable fluorescent proteins (PAFPs), notably from Anthozoan species, triggered a revolution in the field of FP technology. Some PAFPs are capable of being irreversibly photoconverted from a green- to a red-emitting form while other ones can be reversibly switched on and off, depending on specific excitation wavelengths. These proteins are being extensively used in optical microscopy techniques, particularly in "nanoscopy", which provides optical resolution 10 fold beyond the theoretical Abbe limit. In order to further develop these techniques, notably in term of time-resolution, the need to obtain brighter fluorescent probes that photoconvert or photoswitch efficiently is crucial. At the same time, fluorescent highlighters generally need to be monomeric and photostable. In order to better understand the mechanisms of phototransformations in PAFPs, three members of the family have been studied: EosFP, Dendra2 and IrisFP. The phenomena of green-to-red photoconversion, reversible photoswitching and non-reversible photobleaching have been studied by a combination of X-ray crystallography and microspectrophotometry using the Cryobench laboratory of the ESRF/IBS. Together, the results have allowed us to propose a mechanism for the photoconversion of EosFP and Dendra2 and to discover and characterize IrisFP, the first PAFP combining both properties of photoconversion and photoswitching. The structural modifications of the chromophore associated with an X-ray induced radical state, likely to be involved in the photobleaching pathway of PAFPs, were also characterized.