

par **Joyce Woodhouse**

Institut de Biologie Structurale

Groupe Dynamique et Cinétique des processus moléculaires

Etude d'une protéine fluorescente photo-commutable par cristallographie résolue en temps en utilisant les lasers à électrons libres

Thèse de Doctorat de l'Université de Grenoble

Les protéines fluorescentes photo-commutables (RSFPs) ont la propriété de passer d'un état fluorescent à un état non-fluorescent en réponse à la lumière. Cette propriété en fait des outils de marquage pour la microscopie de super-résolution (ou nanoscopie). Le mécanisme de photo-commutation implique l'isomérisation du chromophore ainsi qu'un changement d'état de protonation de ce dernier. Le mécanisme a été très étudié par différentes approches de spectroscopie et de simulation mais reste encore mal compris, l'ordre séquentiel des événements est notamment encore débattu. Certains de ces événements de la photo-commutation se déroulent à des échelles de temps très courtes, ce qui rend difficile l'étude structurale par cristallographie des rayons X à l'aide des sources synchrotron actuelles dont la résolution temporelle est encore limitée. Les lasers à électrons libres (XFELs) sont une nouvelle source de rayons X produisant des impulsions suffisamment courtes pour permettre l'étude structurale des intermédiaires précoces ou à courte durée de vie qui se forment au cours de la photo-commutation, et suffisamment brillantes pour permettre la collecte de données cristallographiques sur des cristaux de tailles nano- et micrométrique. L'utilisation de ce nouveau genre d'instrument a permis l'émergence de la cristallographie sérielle, une nouvelle approche de la cristallographie des rayons X. Cette approche a depuis été adaptée aux lignes synchrotrons.

Le travail présenté ici se focalise sur l'étude de rsEGFP2, une protéine fluorescente photo-commutable de la famille de la GFP. Il y est décrit la mise au point d'un protocole de microcristallisation permettant l'obtention d'échantillons en vue d'une expérience de cristallographie résolue en temps au XFEL. Un mécanisme de photo-commutation y est proposé à travers le résultat de deux expériences sur les deux XFELs actuellement opérationnels, à des échelles de temps différentes, dévoilant un chromophore « twisté » à l'état excité ainsi qu'un état *cis* protoné de ce dernier. La caractérisation structurale des variants de rsEGFP2 par cristallographie d'oscillation « classique » combinée à la découverte fortuite d'une conformation alternée du chromophore dans l'état non-fluorescent, issue d'expérience de cristallographie sérielle, apporte un complément d'explication des propriétés photophysiques de la protéine.