



Développement d'un nouveau couple de protéines fluorescentes pour le FRET : Validation et application à un biosenseur d'activité kinase A

Dahdjim-Benoît Betolngar

► To cite this version:

Dahdjim-Benoît Betolngar. Développement d'un nouveau couple de protéines fluorescentes pour le FRET : Validation et application à un biosenseur d'activité kinase A. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112068 . tel-01163218

HAL Id: tel-01163218

<https://theses.hal.science/tel-01163218>

Submitted on 12 Jun 2015

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire de Chimie Physique

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Dahdjim-Benoît BETOLNGAR

Développement d'un nouveau couple de protéines
fluorescentes pour le FRET : validation et application à un
biosenseur d'activité kinase A

Date de soutenance : 22/05/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Fabienne MEROLA	Directrice de recherche CNRS, Université Paris Sud, Orsay
Rapporteurs :	Franck SUREAU	Chargé de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Guenhâel SANZ	Chargée de recherche INRA, Jouy en Josas
Examineurs :	Emmanuel MARGEAT	Directeur de recherche CNRS, Montpellier
	Pierre VINCENT	Directeur de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Rachel MEALLET-RENAULT	Professeur, Université Paris Sud, Orsay

à mes parents, pour toutes les épreuves qu'ils ont traversées.

Remerciements

Au terme de ma thèse, je tiens à adresser ici un sincère remerciement à toutes les personnes m'ayant soutenu et aidé à la réalisation de ces travaux de recherche ainsi qu'à la rédaction de ce manuscrit.

En premier lieu, je remercie Guenhaël Sanz et Franck Sureau qui ont accepté de rapporter mon manuscrit. Je remercie également Rachel Meallet-Renault et Emmanuel Margeat de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse Fabienne Mérola. J'ai beaucoup apprécié travailler en ta compagnie et je te remercie de m'avoir guidé et encouragé pendant ces années. Je tiens particulièrement à te dire à quel point j'avais apprécié ton écoute et ton soutien pendant mes périodes d'incertitudes.

Je voudrais maintenant remercier les personnes qui ont participé à la réalisation de ses travaux. Tout d'abord, je remercie Marie Erard de m'avoir accompagné et d'être toujours aussi motivée et pleine d'entrain, je remercie Pierre Vincent pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein son équipe.

Je remercie également Yasmina Bousmah pour son aide très précieuse, nos discussions du matin et surtout pour sa bonne humeur inconditionnelle.

Je remercie Valérie Derrien et Emilie Brun pour l'aide qu'elles m'ont apportée et leurs conseils avisés.

Je remercie aussi Hélène Pasquier ainsi que toute l'équipe du groupe biophysique, Laura Baciou, Sophie Bernad, Tania Bizouarn, Florence Lederer, Delphine Onidas, Filippo Rusconi et Cécile Sicard.

J'adresse également mes remerciements à tous les thésards et post-doctorants croisés au cours de ces années dans ou en-dehors du laboratoire. En particulier, je remercie Cornelia pour sa gentillesse, pour nos discussions aussi variées qu'intéressantes. Merci à Aurélie et Aurélie les collègues de bureau, merci à Alexandre, Cecilia, Ana Laura et Natalie pour les sorties parisiennes de décompression. Merci à Myriam, Vivien, Damien, Rawand, Manon, Eric, Rolando, Laurent, Iyad et Florent. Merci également à Hajer et Aymen.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres de ma famille, mes parents, mes frères, mes cousins, mes amis.

A mes grands-parents, à mon père et à mère, à Etienne et Vincent, à Sylvain l'éphémère colloque et Aline l'Alien, à Baptiste, Julien et Mikaël, les membres des 3 mousquetaires (Je ne vous ferais pas l'affront de vous dire lequel correspond le plus à la description de Porthos), à Erika la lointaine Canadienne, à Richard, Pierre et Côte, à Kamissa, Djim, Kobé, Natou, Moundé et Wallé, à Tatine et Jean-François, à Darnasse, à Lise, Philippe et Clémence à Amélie, Jonathan, Mathieu et Axel les Bourguignons, à Marion, à Emma, , à vous tous : merci de m'avoir changer les idées, merci de m'avoir encouragé, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenu.

Et enfin un énorme merci à Elodie alias « MMMM », je te dois beaucoup.

Table des Matières

Table des Matières.....	7
Abbreviations	10
1. Introduction	11
1.1. La Fluorescence	13
1.1.1 Grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence	14
a Rendement quantique de fluorescence	14
b Durée de vie de fluorescence.....	14
1.1.2 Le transfert d'énergie de type Förster (FRET)	15
a Taux de désexcitation par FRET.....	16
b Efficacité du FRET.....	18
c Méthodes de détection du FRET	19
1.2. Modélisation des signaux dans un système de FRET	21
1.2.1 Principes de la modélisation	21
1.2.2 Expression de l'intensité de fluorescence dans un microscope	22
1.2.3 Modélisation des signaux de fluorescence d'un système FRET	23
1.2.4 Modélisation du signal ratiométrique d'un biosenseur FRET	26
1.3. Modélisation des effets de pH dans un système FRET	29
1.3.1 Principes de la modélisation	29
1.3.2 Modélisation du FLIM en fonction du pH.....	31
1.3.3 Expression de l'efficacité de FRET en fonction du pH	32
1.3.4 Modélisation du signal ratiométrique en fonction du pH	32
1.4. Importance du pH dans l'homéostasie et les fonctions cellulaires	33
1.4.1 Le pH dans les processus biologiques	33
1.4.2 Régulation du pH dans les différents organelles intracellulaires	34
a Régulation du pH cytosolique	34
b Régulation du pH nucléaire	35
c Régulation du pH des voies d'exocytose et d'endocytose	35
1.5. Les Biosenseurs codés génétiquement	37
1.5.1 Apport des Protéines Fluorescentes	37
1.5.2 Les protéines fluorescentes cyan (CFP).....	39
1.5.3 Les protéines fluorescentes jaunes (YFP).....	42
1.5.4 Une protéine fluorescente orange: la TagRFP.....	43
1.5.5 Les Biosenseurs FRET	44
a Principe de fonctionnement des biosenseurs FRET	44
b Les biosenseurs AKAR	45
1.6. La Protéine Kinase A	48
1.6.1 Structure de la PKA	48
1.6.2 Substrats de la PKA.....	49
1.6.3 Contrôle de l'activité de la PKA	49

1.6.4	Comprendre l'activité neuronale de la PKA grâce au biosenseur AKAR.....	50
2.	Résultats expérimentaux.....	53
2.1.	Etudes des protéines fluorescentes purifiées	53
2.1.1	Introduction	53
2.1.2	Sensibilité au pH de la EYFP et de la Citrine	54
a	Sensibilité au pH en absence d'anions monovalents	54
b	Sensibilité au pH en présence d'ions chlorure (Cl ⁻)	57
2.1.3	Sensibilité au pH de la ECFP	61
2.1.4	Photocommutation réversible de la EYFP et de la ECFP	62
2.1.5	La TagRFP : un accepteur de FRET intéressant pour les protéines cyan ?.....	64
2.2.	Variations induites par le pH dans un système FRET	67
2.2.1	Etude FLIM de tandems cytosoliques en fonction du pH.....	67
2.2.2	Modélisation des effets de pH dans les tandems FRET.....	72
2.3.	Propriétés des biosenseurs AKAR	75
2.3.1	Réponses d'AKAR à l'activation de la voie AMP _c /PKA.....	76
a.	Réponses ratiométriques de AKAR2.2 et AKAR4.....	76
b.	Étude FLIM des propriétés basales de AKAR2.2 et AKAR4.....	80
c.	Discussion : les différents mécanismes de réponse d'AKAR.....	83
2.3.2	Effets du pH sur les signaux d'AKAR.....	87
a.	Sensibilité au pH du signal ratiométrique de AKAR2.2	87
b.	Sensibilité au pH du signal ratiométrique de AKAR4	88
c.	Réponses transitoires au pH du signal ratiométrique de la CFP dans AKAR2.2	88
2.3.3	Discussion des résultats et choix du biosenseur à modifier.....	93
2.4.	Construction et étude de versions modifiées d'AKAR.....	95
2.4.1	Etude comparative de ^{CFP} AKAR ^{Citrine} et ^{Aq} AKAR ^{Citrine}	95
a	Signal basal du biosenseur	95
b	Augmentation de la photostabilité grâce à Aquamarine	96
c	Réponses ratiométriques à l'activation.....	98
d	Etude par FLIM du niveau de FRET basal en fonction du pH.....	100
2.4.2	Modélisation des effets de pH dans AKAR	102
a	Modélisation du signal FLIM de AKAR en fonction du pH	102
b	Modélisation du signal ratiométrique de AKAR en fonction du pH	104
c	Comparaison théorie-expérience et discussion des effets de pH	105
d	Conséquences des effets de pH sur l'utilisation d'AKAR.....	106
2.4.3	Etude de ^{Aq} AKAR ^{TagRFP}	109
a	Amélioration de la dynamique de réponse ratiométrique d'AKAR	109
b	Etudes en FLIM : FRET dans l'état basal et au cours de l'activation.....	113
c	Etudes spectrales de l'activation : données préliminaires	115
d	Etude par FLIM de la sensibilité au pH	118
e	Sensibilité au pH du signal ratiométrique	120
f	Discussion des résultats obtenus sur ^{AqE} AKAR ^{TagRFP}	123
3.	Synthèse et Perspectives	125
4.	Matériels et Méthodes	131
4.1.	Biologie Moléculaire : Construction des différents biosenseurs et tandems	131
4.1.1	^{Aq} AKAR ^{Cit} (P27).....	131
4.1.2	^{Cerulean(T65S)} AKAR ^{cpVenus} (P39)	131

4.1.3	CFP AKAR ^{Cit(Y66A)} (P40) et Aq AKAR ^{Cit(Y66A)} (P41)	131
4.1.4	TagRFP avec codon stop (P42)	131
4.1.5	TagRFP-T (P43)	132
4.1.6	Aq AKAR ^{TagRFP} (P45)	132
4.1.7	Aq AKAR ^{TagRFP-T} (P46)	133
4.1.8	Aq AKARmut ^{TagRFP} (P59)	133
4.1.9	Aq ^E AKAR ^{TagRFP} (P60)	133
4.1.10	Tandems CFP-YFP (P73 ; P74 ; P75 ; P76)	138
4.1.11	Tandem CFP-Citrine(Y66A) (P86)	138
4.1.12	Tandem Aquamarine-TagRFP (P89)	138
4.1.13	Listes des amorces utilisées pour la construction des plasmides	139
4.2.	Culture cellulaire	140
4.2.1	Entretien des cellules	140
4.2.2	Transfections	140
4.2.3	Cryoconservation des cellules	141
4.3.	Imagerie	142
4.3.1	Microscope du LCP : Durée de vie de fluorescence	142
a	Matériel d'acquisition des données	142
b	Déroulement classique d'une expérience	143
4.3.2	Microscope du NPA : Ratiométrie	149
a	Matériels d'acquisition des données	149
b	Traitements des images	149
4.4.	Protocoles	150
4.4.1	FLIM	150
a	Etudes FLIM en fonction du pH intracellulaire	150
b	Etudes FLIM de l'activation de la voie AMPc/PKA	151
4.4.2	Ratiométrie	152
a	Evolution du ratio en fonction du pH intracellulaire	152
b	Activation de la voie AMPc/PKA en ratiométrie	152
Annexes		155
Bibliographie		164
Publications		170
I.	Erard et al (2013) Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging	170
II.	Mérola et al (2014) Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging	171
III.	Betolngar et al (2015) Analyzing the pH sensitivity of FRET biosensors carrying cyan and yellow fluorescent proteins	172

Abbreviations

AKAP: A-Kinase Anchor Protein

AKAR: A-Kinase Activity Reporter

AMPC: Adénosine MonoPhosphate cyclique

BHK: Baby Hamster Kidney

CFP: Cyan Fluorescent Protein

FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

FSK: Forskoline

GFP : Green Fluorescent Protein

IBMX : 3-Isobutyl-1-méthylxanthine

PKA : Protéine Kinase AMPC-dépendante

OFP : Orange Fluorescent Protein

YFP : Yellow Fluorescent Protein

TagRFP : TagRed Fluorescent Protein

1. Introduction

La compréhension des phénomènes biologiques à l'échelle de la cellule est un enjeu majeur des sciences modernes, en particulier dans le domaine de la santé où les physiopathologies ont bien souvent pour origine un dérèglement de la machinerie de signalisation cellulaire. L'exemple le plus parlant aujourd'hui est sans doute le nombre croissant de cancers touchant de nombreux types cellulaires différents. Dans ces pathologies, on observe des dérégulations des processus de régulation du cycle cellulaire qui provoquent un dysfonctionnement de la cellule entière. La mise au point des stratégies anticancéreuses passe par la compréhension précise des mécanismes de signalisation, leur fonctionnement normal et l'identification des changements dans les cas pathologiques.

De façon plus générale, il est donc nécessaire d'avoir un outil performant capable de rendre compte de l'état de fonctionnement de la machinerie de signalisation cellulaire et des changements opérés dans les cellules malades. Ce capteur doit nous permettre d'identifier les protéines jouant un rôle clé dans les différentes pathologies. Il doit être facilement manipulable, doit nous permettre de détecter facilement les dérégulations de cette cascade de signalisation dans les cas pathologiques, et doit être accessible financièrement.

Les biosenseurs codés génétiquement répondent particulièrement bien à ces exigences. Etant codés génétiquement, les techniques de biologies moléculaires modernes nous permettent de les modifier, de les fonctionnaliser, de les adresser à des zones d'intérêts de la cellule en changeant la séquence codante du biosenseur. Parmi les biosenseurs, ceux fonctionnant avec une ou plusieurs protéines fluorescentes ont pris une place majeure dans la recherche en biologie cellulaire. En effet, grâce aux protéines fluorescentes et au développement de la microscopie de fluorescence, on est capable d'étudier en temps réel la machinerie cellulaire. L'apport des protéines fluorescentes est indéniable car elles permettent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, de réaliser des criblages de molécules actives et de suivre leur action thérapeutique à des coûts raisonnables.

Cependant la découverte des protéines fluorescentes est encore relativement récente et malgré les nombreuses études faites sur ce sujet, la compréhension de leurs caractéristiques n'est pas encore parfaitement acquise et leur amélioration est toujours d'actualité. En effet, l'amélioration des biosenseurs utilisant ces protéines fluorescentes passent par l'amélioration de leurs caractéristiques spectrales, par exemple en augmentant leur brillance facilitant ainsi leur détection en microscopie, en améliorant leur photostabilité ou encore en réduisant leur sensibilité à l'environnement cellulaire pour obtenir des signaux stables et fiables.

Mes travaux de thèse ont été réalisés dans ce but, à savoir améliorer les caractéristiques de protéines fluorescentes pour améliorer les réponses des biosenseurs. Ces travaux ont été fait particulièrement dans l'optique de mettre au point un nouveau couple de protéine capables d'interagir par Transfert d'Energie de type Förster (FRET) au sein d'un biosenseur sans que la réponse du biosenseur ne soit modifiée par l'environnement cellulaire. En particulier ce couple doit fonctionner aux pH acides rencontrés dans certains compartiments intracellulaires, comme par exemple dans les synapses où des modifications localisées du pH intracellulaire peuvent être observé après l'action de certaines neuromédiateurs.

Dans ce manuscrit je vais rappeler les bases du phénomène de fluorescence et expliquer le fonctionnement du FRET, puis je vais détailler les résultats obtenus sur la mise au point et l'évaluation d'un nouveau couple de protéine cyan/orange. Les travaux sur ce couple ayant été réalisés à la fois en microscopie de durée de vie de fluorescence (FLIM) et en microscopie ratiométrique, je ferai un bref rappel du fonctionnement de ces deux techniques et montrerai qu'elles sont complémentaires pour la compréhension de différents phénomènes que nous avons pu observer. Le biosenseur que nous avons choisi pour l'étude de ce couple cyan/orange est le biosenseur d'activité de la protéine kinase A « AKAR ». Nous l'avons choisi car la protéine kinase A est une protéine majeure de la voie de signalisation AMPc, et on la retrouve dans tous les types cellulaires, impliquée dans une large variété de réponses physiologiques.

1.1. La Fluorescence

Le phénomène de fluorescence est lié à la possibilité qu'ont certains composés de pouvoir absorber de l'énergie sous forme de photons. Cette absorption d'énergie fait passer le composé d'un état d'énergie stable, dit état fondamental S_0 , à un état d'énergie plus élevé S_1 , S_2 ,... Pour retrouver une meilleure stabilité, les composés excités doivent se désexciter et repasser à leur état fondamental S_0 . La fluorescence est une des possibilités de repasser à l'état fondamental, cette désexcitation s'accompagne de l'émission d'un photon dit de fluorescence et constitue le phénomène de désexcitation radiative. La fluorescence est observable dans les cas où la structure des composés présente des systèmes conjugués comme les cycles aromatiques. Ces structures responsables de l'absorption d'énergie sont appelées chromophores et absorbent à des longueurs d'onde bien particulières correspondant à une transition entre leur niveau d'énergie S_0 vers un niveau d'énergie supérieur. Pour chaque chromophore on peut donc définir un spectre d'absorption qui regroupe toutes les longueurs d'onde des rayonnements que le chromophore peut absorber. De la même façon chaque chromophore possède un spectre d'émission de fluorescence qui correspond aux longueurs d'onde des photons émis pour repasser de l'état excité S_1 à l'état fondamental S_0 .

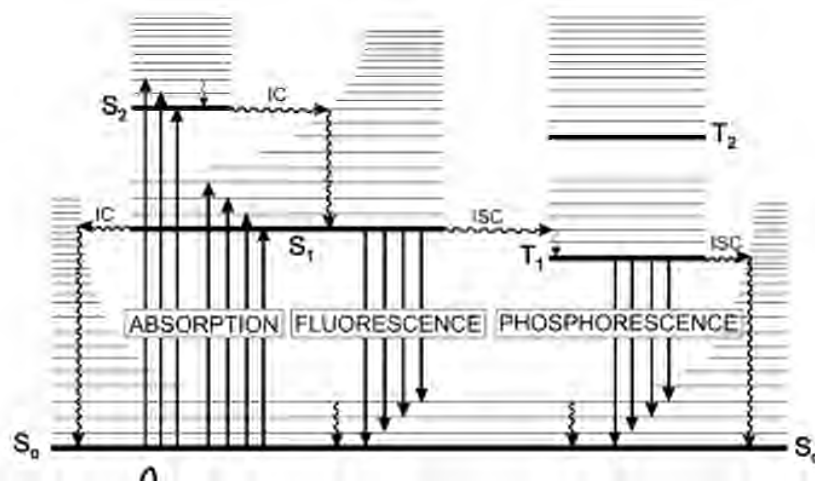


Figure 1-1 : Représentation des différents niveaux d'énergie sur un Diagramme de Jablonsky, exemples de désexcitations possibles (Valeur, 2001)

L'absorption d'énergie sous forme de photons par certains composés les fait passer d'un état fondamental S_0 , à un état excité S_1 . L'énergie absorbée doit être réémise pour permettre au composé de retourner à son état S_0 qui est le plus stable. Parmi les désexcitations possibles, on peut par exemple observer l'émission de photons de fluorescence, ou de phosphorescence. On peut également observer des désexcitations non radiative comme la conversion interne (IC) et la conversion intersystème (ISC).

Parmi les autres phénomènes de désexcitation radiative on peut citer la phosphorescence ; il y a également des phénomènes de désexcitation non radiative comme la conversion interne, le croisement intersystème ou encore le Transfert d'Énergie de Résonance de Förster (FRET). Les diagrammes de Jablonsky permettent de représenter les différents états d'énergie, ainsi que les transitions possibles entre ces états (Figure 1-1).

1.1.1 Grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence

a Rendement quantique de fluorescence

Du fait des nombreuses voies de désexcitation possibles pour un composé dans son état S_1 , on définit le rendement quantique d'émission de fluorescence Φ_f qui quantifie l'efficacité du processus d'émission de fluorescence par rapport à la totalité des phénomènes de désexcitation radiative et non radiative. Φ_f représente la probabilité d'émission d'un photon de fluorescence suite à l'absorption d'un photon et est estimable par le rapport du nombre de photons de fluorescence émis (N_{flu}) sur le nombre de photons absorbés (N_{abs}) :

$$\phi_f = \frac{N_{flu}}{N_{abs}} \quad (1.1)$$

On peut également exprimer Φ_f en fonction des constantes de vitesse des différents processus de désexcitation :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1.2)$$

Où k_r est la constante de vitesse du processus radiatif et k_{nr} est la somme des constantes de vitesse des différents processus non radiatifs.

b Durée de vie de fluorescence

La durée de vie de fluorescence τ est la durée moyenne pendant laquelle un composé va rester à son niveau d'énergie S_1 après avoir été excité. τ est l'inverse de la somme de toutes les constantes de vitesse de désexcitation radiatives k_r et non radiatives k_{nr} :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.3)$$

Expérimentalement, la valeur de la durée de vie de fluorescence est calculée à partir de l'analyse du déclin de l'émission de fluorescence qui suit une loi de décroissance exponentielle :

$$I_{fluor}(t) = k_r \cdot [M^*]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.4)$$

Où $[M^*]_0$ est la quantité de molécules fluorescentes dans leur état excité à l'instant $t=0$.

1.1.2 Le transfert d'énergie de type Förster (FRET)

La désexcitation par FRET résulte d'une interaction résonante entre deux composés, le premier étant le donneur d'énergie et le second l'accepteur d'énergie. Suite à ce transfert d'énergie, le donneur retourne à son état fondamental S_0 et l'accepteur passe à un état excité. L'accepteur va à son tour se désexciter, par exemple en émettant un photon de fluorescence (Figure 1-2).

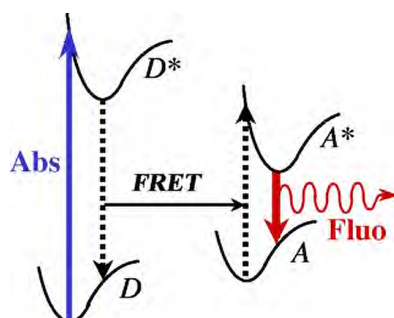


Figure 1-2 : Représentation du Transfert d'Énergie de Résonance de Förster (FRET).

Un donneur dans son état excité D^* transmet son énergie à un accepteur dans son état fondamental A , qui passe ensuite dans son état excité A^* . Ici, A^* repasse dans son état fondamental en émettant un photon de fluorescence.

Pour que le FRET soit possible, le donneur et l'accepteur doivent présenter plusieurs caractéristiques: le donneur doit être une espèce fluorescente ; l'énergie de transition en absorption de l'accepteur doit être proche de l'énergie de transition en émission du donneur, ce qui signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir une partie du spectre d'excitation de l'accepteur ; du fait de la faible portée du FRET, la distance entre le donneur et l'accepteur doit être inférieure à 100 Angströms environ; enfin, il doit y avoir une orientation relative des chromophores appropriée (voir Equation 1.6). Le transfert d'énergie

de résonance est un phénomène non radiatif : il n'y a pas d'émission ni d'absorption de photons. Le phénomène peut être décrit avec une très bonne approximation par une interaction de type dipôle-dipôle entre les moments de transition du donneur et de l'accepteur, à condition qu'ils se trouvent à une distance suffisamment grande ($\geq 10 \text{ \AA}$) pour pouvoir négliger les contributions multipolaires et le recouvrement de leurs orbitales : c'est la théorie développée par Förster (Valeur, 2001).

a Taux de désexcitation par FRET

Förster a démontré que le taux de désexcitation du donneur par FRET, $k_{\text{Förster}}$ peut s'exprimer sous la forme :

$$k_{\text{Förster}} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (1.5a)$$

avec

$$R_0^6 ; 8,7853 \times 10^{-5} \frac{\kappa^2 \Phi_D}{n^4} J \quad (1.5b)$$

et

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.5c)$$

où R est la distance entre le donneur et l'accepteur exprimée en $\text{\AA}$, τ_D est la durée de vie du donneur en absence d'accepteur, κ^2 est le facteur d'orientation pour l'interaction dipôle-dipôle, Φ_D est le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur, n est l'indice de réfraction du milieu, et R_0 est la distance de Förster correspondant à la valeur de R pour laquelle l'efficacité du FRET est diminuée de moitié. J est l'intégrale de recouvrement (en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$) entre le spectre d'émission du donneur $f_D(\lambda)$ normalisé à 1 en surface, et le spectre d'absorption de l'accepteur $\varepsilon_A(\lambda)$ en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. D'après l'équation (1.5), on remarque que la probabilité de FRET est proportionnelle à $1/R^6$, ce qui caractérise une interaction dipôle-dipôle.

Le facteur d'orientation κ^2 est défini selon l'équation (1.6)

$$\kappa_2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (1.6)$$

où θ_T est l'angle entre le moment de transition du donneur et le moment de transition de l'accepteur et où θ_D et θ_A sont les angles entre ces moments de transition et le vecteur joignant les deux molécules (Figure 1-3).

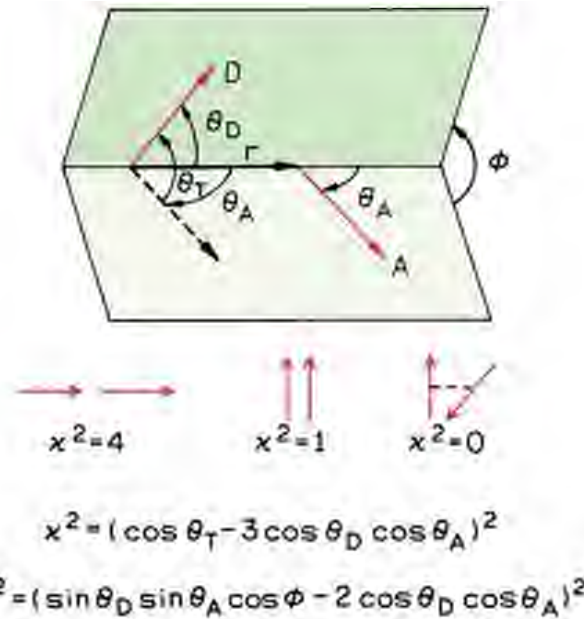


Figure 1-3 : Définition du facteur d'orientation κ^2 (Lakowicz, 2006)

Le facteur d'orientation κ^2 est le paramètre le plus difficile à déterminer dans un système de FRET. En effet les dipôles du donneur et de l'accepteur sont tous les deux dans des processus dynamiques et il est extrêmement compliqué de connaître leur orientation relative exacte puisqu'elle est en permanence en train de changer. κ^2 ne correspond donc pas à une valeur discrète mais plutôt à un ensemble de valeurs qui peuvent être comprises entre 0 (orientation perpendiculaire rendant le FRET impossible) et 4 (orientation parallèle rendant le FRET optimal pour les chromophores considérés). On utilise souvent la valeur $\kappa^2=2/3$: Förster a montré que cette valeur est applicable dans le cas de mouvements isotropes et rapides des deux dipôles pendant la durée de l'état excité du donneur (de l'ordre de quelques nanosecondes). Néanmoins, cette approximation ne correspond pas à la situation d'un chromophore rigidement enfoui dans une protéine fluorescente : le temps de corrélation rotationnel (c'est à dire approximativement la vitesse de réorientation) d'une

macromolécule de la taille d'une GFP est de l'ordre de 15 ns à 20 ns en solution aqueuse, et deux à trois fois plus lente encore dans le cytosol d'une cellule.

b Efficacité du FRET

L'efficacité de FRET est définie de façon analogue au rendement quantique de fluorescence, comme la fraction des molécules donneuses excitées qui transfèrent leur énergie vers l'accepteur, c'est à dire comme la fraction relative de fluorescence du donneur perdue en raison du transfert :

$$E_{FRET} = \frac{F_D - F_{DA}}{F_D} \quad (1.7)$$

De même que pour le rendement de fluorescence, l'efficacité de FRET est aussi égale au rapport du taux de désexcitation du donneur par FRET par le taux de désexcitation totale du donneur en présence de l'accepteur, soit :

$$E = \frac{k_{Förster}}{k_{Förster} + \frac{1}{\tau_D}} \quad (1.8)$$

D'après l'équation (1.5) on a donc :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (1.9)$$

où F_{DA} est la fluorescence du donneur en présence d'accepteur et F_D la fluorescence du donneur quand R tend vers l'infini.

c Méthodes de détection du FRET

- **Par la durée de vie de fluorescence en FLIM**

Le FRET étant un phénomène de désexcitation non radiatif, il a pour effet de diminuer la durée de vie de fluorescence du donneur. L'efficacité de FRET (E_{FRET}) peut donc être obtenue en comparant soit les intensités de fluorescence (Equation 1.7), soit les durées de vie de fluorescence du donneur en présence et en absence de FRET :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1.10)$$

Où τ_D est la durée de vie de fluorescence du donneur en absence d'accepteur et τ_{DA} sa durée de vie en présence d'accepteur.

- **Ratiométrie**

Lors d'un transfert d'énergie entre deux fluorophores, on observe une baisse de la fluorescence du donneur et une augmentation de celle de l'accepteur. En mesurant simultanément l'intensité de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission du donneur et de l'accepteur après avoir excité uniquement le donneur, on peut suivre l'évolution du FRET en calculant le ratio R_{FRET} . Une augmentation du FRET entre deux fluorophores aura pour conséquence d'augmenter ce ratio. Un des principaux avantages des mesures ratiométriques du FRET est de pouvoir éliminer certaines sources d'artéfact liées aux instabilités instrumentales lors des mesures de fluorescence. En effet, un changement de fluorescence peut être causé par des variations de paramètres techniques comme la fluctuation de la puissance d'illumination, une modification du focus du microscope ; ou encore par un changement dans l'échantillon lui-même : lors d'expériences sur cellules vivantes, il n'est pas exemple par rare d'observer des changements du volume des cellules qui modifient les concentrations intracellulaires de fluorophores et donc le signal de fluorescence émis. Lorsqu'on observe une modification de FRET, les signaux de fluorescence du donneur et de l'accepteur évoluent dans des sens contraires alors que les artéfacts impactent les deux signaux de la même façon, en calculant le ratio on annule les variations artéfactuelles pour ne conserver que celles provoquées par le changement de FRET. Un

autre avantage de ce type de mesure est son faible coût relatif puisqu'il ne nécessite en plus du microscope et de la caméra d'acquisition qu'un ensemble de filtres et de miroirs dichroïques permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'émission du couple de fluorophores donneur/accepteur.

La dépendance du ratio R_{FRET} à la valeur de l'efficacité de FRET E_{FRET} est plus complexe que celle établie ci-dessus pour la durée de vie de fluorescence du donneur. C'est pourquoi les expériences de ratiométrie sont en général utilisées pour estimer des variations *relatives* d'efficacité de FRET, au cours de réponses dynamiques par exemple. En posant l'expression détaillée des intensités mesurées dans le canal donneur et le canal accepteur dans une expérience de ratiométrie typique (Chapitre 1.2), nous avons établi la relation analytique entre le ratio R_{FRET} et l'efficacité de FRET (Equation 1.18) , ce qui va permettre d'interpréter plus quantitativement ces expériences (Betolngar et al., 2015).

Les techniques basées sur le FRET sont largement répandues en biologie cellulaire, ce phénomène est notamment au centre de la conception d'un très grand nombre de senseurs permettant d'observer des interactions protéines/protéines ou de mesurer des activités enzymatiques.

1.2. Modélisation des signaux dans un système de FRET

1.2.1 Principes de la modélisation

La modélisation des signaux de fluorescence d'un système FRET permet :

- de comprendre les mécanismes intervenant dans les réponses du système
- de mettre en évidence les paramètres photophysiques et les conditions expérimentales réellement déterminants dans la précision et la sensibilité d'une expérience FRET
- de poser quelques règles utiles concernant l'évolution attendue des signaux
- de mettre en relation quantitative les différentes modalités de détection du FRET : mesures par FLIM, ratiométrie, méthodes à « 3 cubes », analyse spectrale ou « hyperspectrale »... (Zeug et al., 2012)

Notre modélisation est adaptée à la description d'un système de type CFP-YFP, mais peut être étendue à d'autres paires donneur-accepteur. Elle suppose en premier lieu qu'il est possible de collecter la fluorescence du fluorophore donneur I_D en absence de toute contamination par le fluorophore accepteur. Cette condition est remplie dans le cas du couple CFP/YFP, si l'on restreint la détection de l'émission de la CFP à des longueurs d'ondes inférieures ou égales à 500 nm environ. C'est ce qui rend possible la quantification directe du FRET par FLIM (ou encore par photoblanchiment de l'accepteur, pbFRET), et cela va dans une certaine mesure simplifier également la description du signal ratiométrique.

Par contre, il est impossible de collecter la fluorescence pure de l'accepteur YFP « sensibilisé » I_{SA} (c'est à dire excité via l'interaction de FRET avec le donneur CFP) : une contribution due à l'excitation directe de l'accepteur aux longueurs d'onde d'absorption du donneur I_{dA} , ainsi qu'une contribution de fluorescence du donneur (ou « bleedthrough »), dont le spectre d'émission se superpose largement à celui de l'accepteur, I_{bD} sont toujours présentes. Ainsi, le signal ratiométrique peut être exprimé comme (Hoppe et al., 2002; van Rheenen et al., 2004; Zeug et al., 2012):

$$R_{FRET} = \frac{I_2}{I_1} = \frac{I_{bD} + I_{dA} + I_{SA}}{I_D} \quad (1.11)$$

Nous commencerons par une description des signaux de ratiométrie d'un biosenseur en absence de perturbation photophysique des fluorophores autre que le FRET. Nous traiterons ensuite les effets de perturbations induites par le pH sur le signal de FLIM du donneur, puis sur le signal ratiométrique.

1.2.2 Expression de l'intensité de fluorescence dans un microscope

L'intensité de fluorescence détectée sur un échantillon fluorescent homogène de rendement quantique Φ_F peut être exprimée comme suit :

$$I_F = \int_{\Delta\lambda_{exc}} I_{exc}(\lambda) T_{exc}(\lambda) OD_F(\lambda) d\lambda \quad \Phi_F \int_{\Delta\lambda_{em}} f_F(\lambda) T_{em}(\lambda) Q_{det}(\lambda) d\lambda \quad (1.12)$$

Dans cette expression, l'absorption du fluorophore $OD(\lambda)$ est pondérée par le spectre de la lampe $I_{exc}(\lambda)$ et la transmission du filtre d'excitation $T_{exc}(\lambda)$ sur tout le domaine des longueurs d'onde d'excitation $\Delta\lambda_{exc}$, tandis que le spectre d'émission normalisé à surface unité $f_F(\lambda)$ est pondéré par la transmission du filtre d'émission $T_{em}(\lambda)$ et la sensibilité du détecteur $Q_{det}(\lambda)$ sur tout le domaine des longueurs d'onde d'émission détectées $\Delta\lambda_{em}$.

Nous supposerons que dans les domaines de travail utilisés, les spectres de lampe, filtres et détecteurs sont suffisamment plats pour être remplacés par des constantes. Cette approximation permet de séparer les termes purement instrumentaux et ceux liés aux propriétés du fluorophore :

$$I_F = I_{exc} T_{exc} OD_F \int_{\Delta\lambda_{exc}} d\lambda \quad \Phi_F \int_{\Delta\lambda_{em}} T_{em} Q_{det} d\lambda \quad (1.13)$$

Nous avons évalué par intégration numérique les conséquences cette approximation de dans le cas le plus problématique (le spectre de lampe) et avons trouvé qu'elle influait peu sur le résultat final de nos simulations (voir Betolngar et al., 2015, Supplementary Table S2).

1.2.3 Modélisation des signaux de fluorescence d'un système FRET

Les différentes contributions au signal ratiométrique R_{FRET} (Equation 1.11) sont posées ci-dessous en utilisant l'expression de l'intensité de fluorescence (Equation 1.13), et en prenant en compte le transfert par FRET de quanta d'excitation depuis le donneur vers l'accepteur, donné par l'efficacité E_{FRET} (Equation 1.7).

Canal « Donneur » 1:

$$I_D = I_{exc} T_{exc} T_{em1} Q_1 \int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_D(\lambda) d\lambda \Phi_D (1 - E_{FRET}) \int_{\Delta\lambda_1} f_D(\lambda) d\lambda$$

Canal « Accepteur » 2:

Superposition du donneur, ou « donor bleedthrough »

$$I_{bD} = I_{exc} T_{exc} T_{em2} Q_2 \int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_D(\lambda) d\lambda \Phi_D (1 - E_{FRET}) \int_{\Delta\lambda_2} f_D(\lambda) d\lambda$$

Excitation directe de l'accepteur:

$$I_{dA} = I_{exc} T_{exc} T_{em2} Q_2 \int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_A(\lambda) d\lambda \Phi_A \int_{\Delta\lambda_2} f_A(\lambda) d\lambda$$

Excitation sensibilisée par FRET de l'accepteur :

$$I_{sA} = I_{exc} T_{exc} T_{em2} Q_2 \int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_D(\lambda) d\lambda E_{FRET} \Phi_A \int_{\Delta\lambda_2} f_A(\lambda) d\lambda \quad (1.14)$$

$\Delta\lambda_{exc}$ étant le domaine des longueurs d'onde d'excitation, et $\Delta\lambda_1$ et $\Delta\lambda_2$ les domaines de longueurs d'onde d'émission détectées dans les canaux 1 et 2 respectivement.

On pose les définitions suivantes :

- le rapport de sensibilité f_{12} correspond à l'efficacité de détection relative entre les canaux 1 et 2 :

$$f_{12} = \frac{T_{em2} Q_2}{T_{em1} Q_1}$$

- le rapport spectral f_{DD} est la proportion relative de la fluorescence du donneur émise dans les intervalles $\Delta\lambda_2$ et $\Delta\lambda_1$:

$$f_{DD} = \frac{\int_{\Delta\lambda_2} f_D(\lambda) d\lambda}{\int_{\Delta\lambda_1} f_D(\lambda) d\lambda}$$

- le rapport spectral f_{AD} est le rapport des fractions relatives de la fluorescence de l'accepteur et du donneur émises dans l'intervalle $\Delta\lambda_2$:

$$f_{AD} = \frac{\int_{\Delta\lambda_2} f_A(\lambda) d\lambda}{\int_{\Delta\lambda_2} f_D(\lambda) d\lambda}$$

- le rapport d'absorption OD_A/OD_D est le rapport des absorptions de l'accepteur et du donneur intégrées dans le domaine d'excitation $\Delta\lambda_{exc}$:

$$\frac{OD_A}{OD_D} = \frac{\int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_A(\lambda) d\lambda}{\int_{\Delta\lambda_{exc}} OD_D(\lambda) d\lambda}$$

Au cours d'une expérience de FRET dans laquelle la stœchiométrie donneur/accepteur reste constante, les rapports spectraux f_{12} , f_{DD} , f_{AD} , et OD_A/OD_D sont des paramètres caractéristiques du couple donneur/accepteur considéré, qui seront constants si les propriétés photophysiques intrinsèques du donneur et de l'accepteur ne se modifient pas.

D'après ces définitions, on a, pour l'intensité dans le canal « Donneur » 1 :

$$I_1 = I_D = K(1 - E_{FRET}) \quad (1.15)$$

et pour l'intensité dans le canal « Accepteur » 2 :

$$I_2 = I_{bD} + I_{dA} + I_{sA}$$

avec

$$I_{bD} = f_{12} f_{DD} I_D$$

$$I_{dA} = f_{12} f_{AD} f_{DD} \frac{OD_A}{OD_D} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} \frac{1}{(1 - E_{FRET})} I_D$$

$$I_{sA} = f_{12} f_{AD} f_{DD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} \frac{E_{FRET}}{(1 - E_{FRET})} I_D$$

ce qui donne pour le canal « Accepteur » 2 :

$$I_2 = f_{12} f_{DD} K \left[E_{FRET} \left(f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} - 1 \right) + f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} \frac{OD_A}{OD_D} + 1 \right] \quad (1.16)$$

Le signal du canal « Donneur » 1 est donc bien, comme on peut l'attendre, une fonction décroissante de E_{FRET} . On constate également que, malgré les multiples contributions intervenant dans le canal « Accepteur » 2, l'intensité mesurée dans ce canal reste une fonction linéaire de l'efficacité de FRET. Cependant, le signe de la variation du signal en fonction de E_{FRET} dans ce canal dépend du signe du terme

$$f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} - 1$$

Pour que ce terme soit positif, il faut que, en absence de FRET, et pour une excitation équivalente, le signal de fluorescence dû à l'accepteur dans le canal « Accepteur » 2 soit supérieur au signal dû au donneur :

$$\Phi_A \int_{\Delta\lambda_2} f_A(\lambda) d\lambda > \Phi_D \int_{\Delta\lambda_2} f_D(\lambda) d\lambda$$

en d'autres termes, il faut maximiser le rendement quantique de l'accepteur relativement à celui du donneur, et minimiser le « bleedthrough » du donneur.

Par dérivation des expressions (1.15) et (1.16) on peut relier la variation relative d'intensité dans le canal « Accepteur » 2 à la variation relative dans le canal « Donneur » 1, au cours d'une modification du niveau de FRET à partir d'un niveau basal E_{FRET}^0 :

$$\frac{\Delta I_2}{I_2} = -\frac{\Delta I_1}{I_1} \times \frac{(1 - E_{FRET}^0)}{\left(E_{FRET}^0 + \frac{B}{A}\right)}$$

avec

$$\frac{B}{A} = \frac{\left(f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D}\right) \frac{OD_A}{OD_D} + 1}{f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} - 1} \quad (1.17)$$

Le niveau basal de FRET E_{FRET}^0 peut être obtenu, via l'équation 1.10, par des mesures de durée de vie de fluorescence sur le système FRET complet dans son état basal d'une part, et sur un système équivalent ne comportant pas le chromophore accepteur (contrôle « donneur seul »), d'autre part.

1.2.4 Modélisation du signal ratiométrique d'un biosenseur FRET

Les expressions (1.15) et (1.16) conduisent à l'expression suivante pour le signal ratiométrique (Betolngar et al., 2015) :

$$R_{FRET} = f_{12} f_{DD} \left[1 + f_{AD} \frac{\Phi_A \frac{OD_A}{OD_D} E_{FRET}}{\Phi_D (1 - E_{FRET})} \right] \quad (1.18)$$

où les facteurs f_{12} , f_{DD} , f_{AD} et OD_A/OD_D sont les rapports spectraux définis précédemment.

Cette expression montre que le ratio R_{FRET} est une fonction monotone croissante de E_{FRET} et une fonction linéaire de $E_{FRET}/(1-E_{FRET})$:

$$\chi = \frac{E_{FRET}}{1 - E_{FRET}} \quad E_{FRET} = \frac{\chi}{\chi + 1}$$

$$R_{FRET} = f_{12} f_{DD} \left[1 + f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} \left(\frac{E_{FRET}}{1 - E_{FRET}} \left(\frac{OD_A}{OD_D} + 1 \right) + \frac{OD_A}{OD_D} \right) \right] \quad (1.19)$$

Lorsqu'on étudie les variations *relatives* du signal ratiométrique, $\Delta R/R$, le terme ($f_{12} \times f_{DD}$) se simplifie, et les seuls termes qui doivent être précisés pour décrire les variations de R_{FRET} en fonction de l'efficacité de transfert d'énergie E_{FRET} sont

$$OD_A/OD_D \text{ et } f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D}$$

Dans le cas d'une stœchiométrie fixe entre donneur et accepteur (cas de biosenseurs FRET monocaténaires), le rapport d'absorption OD_A/OD_D est proportionnel au rapport des coefficients d'absorption molaires de l'accepteur et du donneur :

$$\frac{OD_A}{OD_D} = \frac{\epsilon_A^{Max} \int_{\Delta\lambda_{exc}} \alpha_A^N(\lambda) d\lambda}{\epsilon_D^{Max} \int_{\Delta\lambda_{exc}} \alpha_D^N(\lambda) d\lambda} = \alpha_{AD} \frac{\epsilon_A^{Max}}{\epsilon_D^{Max}} \quad (1.20)$$

où α_{AD} est un rapport spectral obtenu à partir des spectres d'absorption $\alpha^N(\lambda)$ du donneur et de l'accepteur normalisés à intensité 1 au maximum, intégrés sur le domaine d'excitation $\Delta\lambda_{exc}$.

Les rapports spectraux f_{AD} et α_{AD} peuvent être évalués à partir de spectres déterminés sur les fluorophores en solution (seule méthode possible pour le rapport α_{AD}), ou éventuellement par analyse spectrale sur des systèmes cellulaires exprimant séparément le donneur et l'accepteur (pour f_{AD}). Le rapport des rendements quantiques des fluorophores accepteur et donneur peut être estimé à partir de données en solution, ou à partir de mesures de durée de vie de fluorescence sur des systèmes cellulaires exprimant séparément le donneur et l'accepteur.

1.3. Modélisation des effets de pH dans un système FRET

1.3.1 Principes de la modélisation

Les protéines fluorescentes cyan et jaune présentent de fortes variations de leurs propriétés photophysiques en fonction du pH. La théorie de Förster et la connaissance détaillée des réponses des fluorophores donneur et accepteur en fonction du pH (décrites au Chapitre 2.1), permettent de prédire qualitativement, et même en principe quantitativement, les perturbations induites par le pH dans le système FRET, tous autres paramètres étant supposés constants, et donc d'analyser la contribution potentielle de ces phénomènes dans la détection du FRET.

Dans le cas du couple CFP/YFP, un certain nombre d'approximations semblent suffisantes pour une première approche :

- on décrira les variations de l'intensité de fluorescence de la CFP par une loi de type Henderson-Hasselbalch (éventuellement coopérative) centrée sur son $pK_{\text{exp}} = pK_D$, en supposant constante l'intensité d'absorption. Nous choisissons donc de négliger les perturbations spectrales de la CFP aux pHs acides (Fredj et al., 2012a), qui ne modifient pas significativement ses domaines d'absorption et d'émission (voir chapitre 2.1.3). On suppose également une relation de proportionnalité entre la durée de vie et le rendement quantique de fluorescence de la CFP (Equations 1.2 et 1.3).

- l'effet du pH sur l'accepteur YFP se résume à une baisse de l'absorption de la bande anion (voir chapitre 2.1.2) décrite par une seconde loi de Henderson Hasselbalch avec un $pK_{1/2}$ caractéristique = pK_A . La contribution de la bande neutre comme accepteur de FRET peut être négligée, compte-tenu du très faible recouvrement de cette bande avec l'émission de fluorescence de la CFP. Cette forme neutre étant non fluorescente, on considère aussi que la fluorescence de la YFP excitée directement varie en proportion des variations d'absorption de la seule bande anion.

- la stœchiométrie D:A du système est supposée être 1:1

Une première amélioration du modèle pourrait être apportée par la prise en compte des déformations des spectres d'absorption et de fluorescence de la CFP aux pHs acides. Ceci pourrait être fait grâce aux données spectrales détaillées disponibles sur la ECFP, la Cerulean et d'autres variants CFP (Fredj et al., 2012a), qui permettraient une description plus précise de la dépendance au pH de k_{FRET} , f_{AD} et α_{AD} . Une autre amélioration possible consisterait à prendre en compte la diminution de durée de vie (et donc de rendement quantique) de la YFP/Citrine que nous avons mise en évidence aux pHs acides (Figure 2-2).

Un problème plus difficile à traiter concerne les écarts éventuels de proportionnalité entre durée de vie et rendement quantique expérimentaux, dans la CFP ou la YFP. Bien que la théorie prédise une telle proportionnalité (Equations 1.2 et 1.3), lorsque les mécanismes de quenching dynamique deviennent très efficaces (par exemple à pH très acide), des populations de durée de vie de fluorescence très courte échappent à la détection en FLIM, et constituent des formes quasiment « noires » ne contribuant plus à l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence diminue alors plus rapidement que la durée de vie. L'incidence potentielle de ces formes noires sur l'évolution du signal ratiométrique peut être très importante. Néanmoins, les données disponibles sur ces phénomènes sont trop incomplètes: ces études sont particulièrement difficiles, même sur les protéines fluorescentes purifiées, en raison des faibles niveaux d'intensité de fluorescence et de la plus grande photosensibilité de ces protéines à pH acide. L'apparition de formes « noires » constitue probablement la source majeure d'incertitude dans la description de nos systèmes fluorescents à pH très acide.

1.3.2 Modélisation du FLIM en fonction du pH

Notre modèle suppose des transitions acide-base indépendantes de :

- (i) la durée de vie de fluorescence du donneur CFP entre les valeurs τ_D^{basic} et τ_D^{acid} autour du point de demi-transition pK_D
- (ii) l'intensité d'absorption de l'accepteur YFP, qui diminue d'une valeur maximum à zéro autour du point de demi-transition pK_A .

Chaque système de FRET est également caractérisé par un niveau spécifique de FRET aux pH basiques, qui est déterminé par des mesures de durée de vie de fluorescence du donneur en absence (τ_D^{basic}) et en présence (τ_{DA}^{basic}) de l'accepteur. Cette efficacité de FRET est caractéristique de l'organisation spatiale spécifique de la construction, dont on supposera qu'elle reste inchangée durant la transition acide. Ces principes conduisent aux expressions suivantes (voir Betolngar et al., 2015, Supplementary Materials) :

$$\tau_{DA}(pH) = \frac{1}{\frac{1}{\tau_D(pH)} + k_{FRET}(pH)} \quad (1.21a)$$

with

$$\tau_D(pH) = \frac{\tau_D^{basic} + 10^{n_{Hill}*(pK_D - pH)} \tau_D^{acid}}{1 + 10^{n_{Hill}*(pK_D - pH)}} \quad (1.21b)$$

and

$$k_{FRET}(pH) = \frac{\left(\frac{1}{\tau_{DA}^{basic}} - \frac{1}{\tau_D^{basic}} \right)}{1 + 10^{(pK_A - pH)}} \quad (1.21c)$$

Les valeurs de τ_D^{basic} , τ_D^{acid} , n_{Hill} et pK_D sont obtenues expérimentalement par l'étude en fonction du pH de contrôles « donneur seul ». Ces contrôles « donneur seul » sont obtenus par introduction de la mutation Y66A dans la protéine YFP ou Citrine. Cela modifie leur chromophore rendant les protéines incapables de jouer leur rôle d'accepteur. Une valeur de n_{Hill} différente de 1 a été utilisée uniquement dans le cas de la CFP de AKAR (voir Chapitre 2.4.2). La réponse en pH du système FRET est alors modélisée en introduisant ces valeurs expérimentales dans les équations 1.21a-c pour calculer la valeur théorique de $\tau_{DA}(pH)$ à différents pH.

Pour ces modélisations, on notera qu'aucune information n'est nécessaire concernant le coefficient d'absorption molaire de l'accepteur (seules ses variations relatives sont prises en compte), ainsi que sur ses propriétés d'émission de fluorescence (qui n'interviennent pas dans la mesure).

1.3.3 Expression de l'efficacité de FRET en fonction du pH

Le calcul de $\tau_D(\text{pH})$ et de $k_{\text{FRET}}(\text{pH})$ permet de calculer l'efficacité de transfert d'énergie E_{FRET} au cours du changement de pH :

$$E_{\text{FRET}}(\text{pH}) = \frac{k_{\text{FRET}}}{k_D + k_{\text{FRET}}} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_D(\text{pH}) k_{\text{FRET}}(\text{pH})} + 1} \quad (1.22)$$

1.3.4 Modélisation du signal ratiométrique en fonction du pH

Si l'on néglige les déformations spectrales, l'expression de R_{FRET} (1.18) comporte 3 termes dépendants du pH : l'efficacité de FRET (Equation 1.22), le rapport des rendements quantiques de l'accepteur et du donneur Φ_A/Φ_D , et le rapport de leurs absorbances OD_A/OD_D . La variation de ces deux derniers termes peut être modélisée sur la base des principes déjà posés pour la modélisation du FLIM, en utilisant la proportionnalité théorique entre rendement quantique et durée de vie de fluorescence (Valeur, 2001):

$$\frac{\Phi_A}{\Phi_D} = \frac{\Phi_A}{\Phi_D(\text{pH})} = \frac{\Phi_A^{\text{basic}}}{\Phi_D^{\text{basic}}} \times \frac{\tau_D^{\text{basic}}}{\tau_D(\text{pH})} \quad (1.23a)$$

$$\frac{OD_A}{OD_D} = \alpha_{AD} \frac{\epsilon_A^{\text{basic}}}{\epsilon_D^{\text{basic}}} \times \frac{1}{1 + 10^{(pK_A - \text{pH})}} \quad (1.23b)$$

La modélisation du ratio R_{FRET} nécessite donc seulement, outre les hypothèses et données expérimentales déjà utilisées pour la modélisation du FLIM, une estimation du rapport des rendements quantiques de fluorescence et des coefficients d'absorption molaire de l'accepteur et du donneur à pH basique, ainsi qu'une évaluation des rapports spectraux f_{AD} et α_{AD} considérés comme indépendants du pH.

1.4. Importance du pH dans l'homéostasie et les fonctions cellulaires

1.4.1 Le pH dans les processus biologiques

Le pH a un rôle primordial dans le fonctionnement cellulaire. C'est un paramètre clé de l'homéostasie et sa régulation est indispensable au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. En effet, les protéines n'exercent leur fonction que dans une plage de pH optimale qui leur est propre. Dans le cas de protéines cytosoliques, le pH optimal se situe entre 7,0 et 7,4 (Madhus, 1988). Les cellules sont des structures compartimentalisées où chaque organelle abrite des fonctions qui lui sont propres et dont l'optimisation requiert des conditions environnementales différentes, notamment en termes de pH. C'est la raison pour laquelle on observe de fortes disparités de pH au sein d'une même cellule (fig. 1-4).

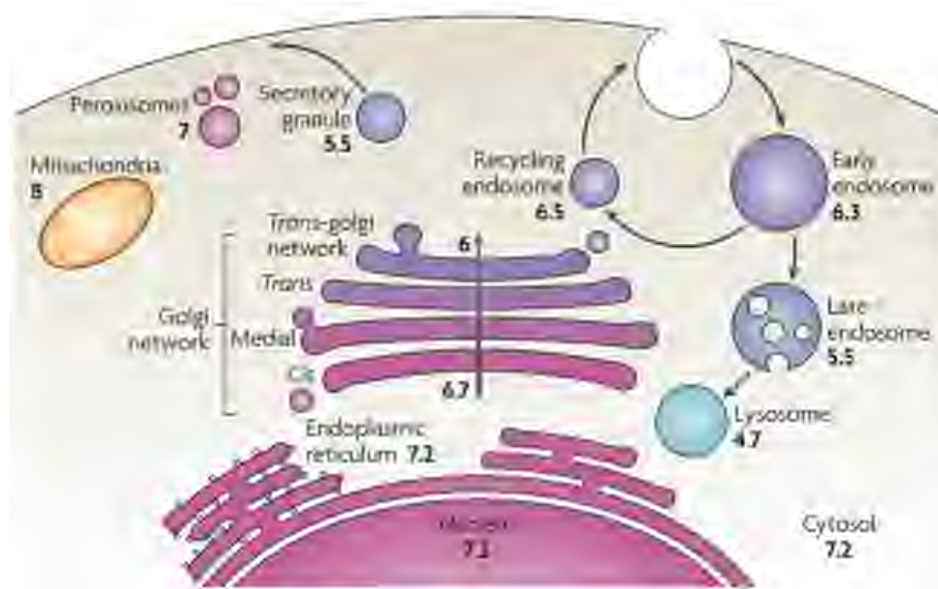


Figure 1-4: pH mesurés dans les différents compartiments cellulaires (d'après Casey et al. 2010)

La structure des protéines impliquées dans les processus biologiques observables dans chaque organelle cellulaire est très largement modifiée par les variations de pH. Une régulation fine de ce paramètre est donc indispensable pour le contrôle et le maintien de nombreuses fonctions physiologiques. En plus du rôle de régulation des structures protéiques, le pH peut avoir un effet direct sur des processus biologiques ; l'adénylate cyclase soluble intervenant dans différentes voies de signalisation cellulaire est par exemple activée en présence d'ions bicarbonate HCO_3^- , ce qui augmente la production d'AMPc et

module les voies de signalisation liées au taux d'AMPc intracellulaire (Zippin et al., 2013); le pH peut également réguler certaines réactions métaboliques comme dans la glycolyse où l'enzyme phosphofructokinase est inhibée par des pH acides ralentissant ainsi la poursuite du cycle métabolique (Erecińska et al., 1995). L'influence du pH sur les fonctions cellulaires peut également se faire au travers du pH extracellulaire, comme c'est le cas pour les récepteurs canaux synaptiques NMDA : suite à l'excitation synaptique, le pH extracellulaire subit une augmentation transitoire qui provoque une baisse de l'influx de Ca^{2+} dans le neurone via les récepteurs canaux NMDA. Le pH constitue ici un mécanisme de feedback permettant de réguler la transmission synaptique et l'homéostasie ionique (Tang et al., 1990).

1.4.2 Régulation du pH dans les différents organelles intracellulaires

L'importance du pH nécessite un contrôle d'éventuelles variations de la quantité d'ion H^+ . Les cellules possèdent des systèmes tampons permettant de contrôler ce paramètre : le principal est le système $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. En effet l'ion HCO_3^- possède un fort pouvoir tampon vis-à-vis des ions H^+ et peut rapidement se protoner pour former l'acide carbonique H_2CO_3 . H_2CO_3 peut ensuite être déshydraté pour former une molécule de CO_2 et une de H_2O selon les réactions suivantes :



Néanmoins ce système n'est pas suffisant pour maintenir l'homéostasie du pH à long terme, pour cela chaque compartiment intracellulaire possède des mécanismes pour réguler finement leur pH.

a Régulation du pH cytosolique

Le pH cytoplasmique est entre 7,0 et 7,4 et est principalement régulé par les échangeurs Na^+/H^+ (NHEs) et les cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCs) situés dans la membrane plasmique. Ces échangeurs permettent d'alcaliniser le cytosol en réponse à la formation d'ions H^+ par les différents processus y prenant place. Les NHEs et NBCs sont contrebalancés par des échangeurs d'anions (AEs) comme les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. D'autres éléments peuvent

acidifier le cytosol en réponse à un stimulus comme les Calcium-ATPase membranaires en réponse à une augmentation intracellulaire du taux de calcium.

b Régulation du pH nucléaire

La régulation du pH nucléaire est supposée être la même que celle du cytosol. En effet, les pores nucléaires sont de l'ordre de 4 à 9nm de diamètre ce qui est suffisant pour permettre le passage de protéines et la diffusion des ions H^+ à travers la membrane nucléaire (Görllich and Kutay, 1999).

c Régulation du pH des voies d'exocytose et d'endocytose

Comme indiqué sur la figure 1-4, le pH va en diminuant au fur et à mesure qu'on avance dans les voies d'exocytose et d'endocytose. Dans les voies d'exocytose, le pH varie de 6,7 dans le cis-Golgi jusqu'à 5,5 dans les granules de sécrétion (Paroutis et al., 2004). Les molécules cargo transportant les glycoprotéines et les lipides récemment synthétisés interagissent avec leur récepteur en fonction du pH de la vésicule dans laquelle elles sont contenues. L'acidification progressive de la vésicule le long de la voie d'exocytose permet de trier et d'adresser la molécule nouvellement formée à l'organelle intracellulaire dans lequel pourra exercer sa fonction.

De façon similaire, les vésicules d'endocytose subissent une acidification, avec un pH de 6,3 dans les endosomes précoces jusqu'à 4,7 dans les lysosomes (Paroutis et al., 2004). Cette augmentation de la concentration en ions H^+ permet comme dans les vésicules d'exocytose la séparation des molécules transportées de leur récepteur. Dans les vésicules de phagocytose elle permet aussi l'activation des protéases.

L'acidification de ces vésicules est principalement due à un transport actif d'ions H^+ par la protéine membranaire V-ATPase. L'acidification est générée et maintenue grâce à l'activité de la V-ATPase qui permet l'entrée des protons dans la vésicule. Cette activité est modulée par les potentiels membranaires et le taux d'efflux des protons. Les transporteurs CIC autorisent la sortie d'un ion H^+ contre l'entrée de deux ions Cl^- dans la vésicule, participant à la régulation de l'entrée de charges positives. Les autres systèmes permettant de contrebalancer l'acidification de la vésicule incluent les Calcium ATPase sarcoplasmique,

endoplasmique et du réticulum (SERCAs), les Calcium ATPase des voies d'exocytose (SPCAs) et des transporteurs NHEs qui augmente l'apport de charges positives et inhibe encore plus l'activité de la V-ATPase (Weisz, 2003).

1.5. Les Biosenseurs codés génétiquement

1.5.1 Apport des Protéines Fluorescentes

L'environnement intracellulaire n'est jamais figé et les fonctions des différents types cellulaires nécessitent une régulation temporelle et spatiale en réponse à tous les stimuli auxquels sont soumises les cellules. Les processus de régulation de la machinerie de signalisation cellulaire incluent des événements tels que des modifications de pH intracellulaire, des changements de niveaux de Ca^{2+} ou encore des variations dans les potentiels de membranes ; les modifications de ces signaux de transductions entraînent à leur tour des variations dans les activités des protéines de signalisation cellulaire. De nombreux outils ont été mis au point pour améliorer notre compréhension du fonctionnement des cascades de signalisation cellulaire mais aucune n'a permis une avancée telle que celle offerte les protéines fluorescentes. En effet, la découverte de la Green Fluorescent Protein (GFP) (Shimomura et al., 1962), le développement des variants de cette protéine fluorescente (Tsien, 1998) associé aux progrès des techniques d'imagerie microscopique ont marqué une avancée spectaculaire en biologie cellulaire. Ces avancées ont été telles que le Prix Nobel de Chimie 2008 a été attribué à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien pour la découverte et le développement de la GFP. On a ainsi pu voir se développer un nombre conséquent de nouveaux biosenseurs permettant de mesurer les dynamiques spatiales et temporelles des signaux de transduction et les activités des protéines de signalisation en cellules vivantes.

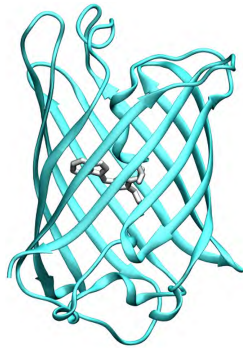


Figure 1-5 : Représentation 3D schématisque de la protéine fluorescente Aquamarine.

La structure tridimensionnelle des protéines fluorescentes se rapproche de celle d'un tonneau. Elles sont constituées de 11 feuillets-β entourant une hélice α centrale sur laquelle se trouve le chromophore formé autocatalytiquement.

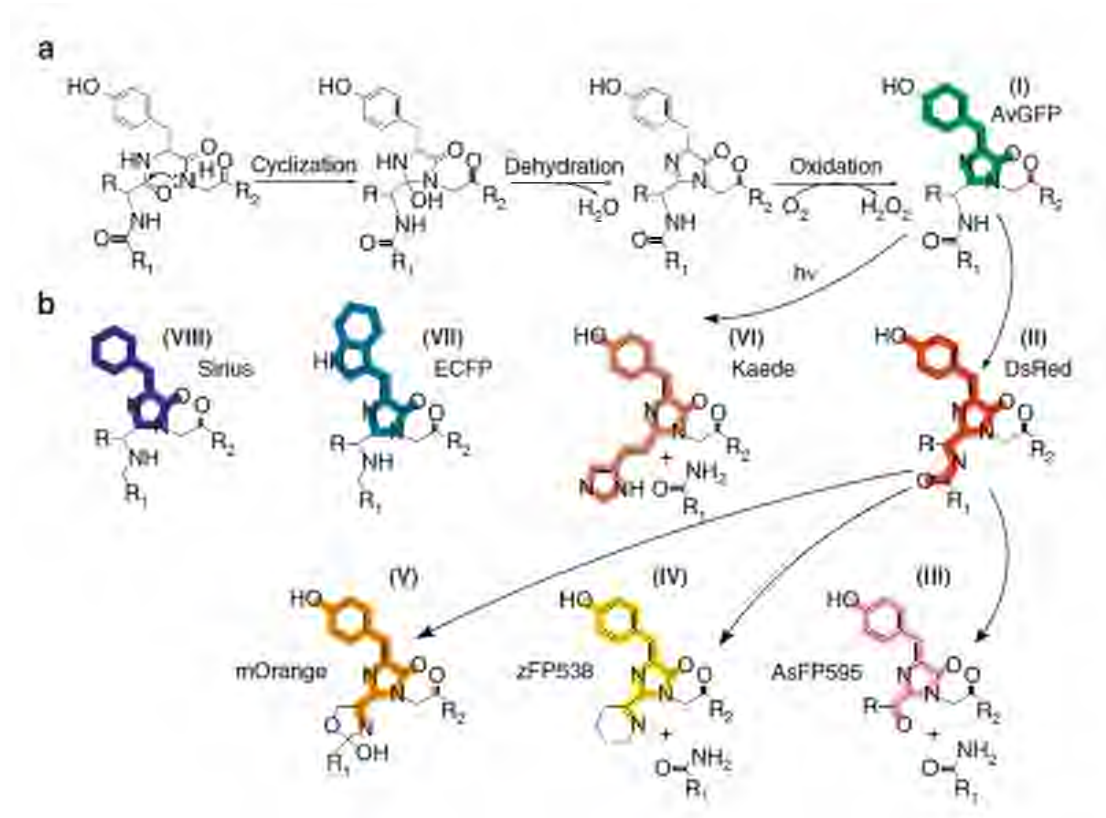


Figure 1-6 : Biosynthèse et diversité structurale et spectrale du chromophore des protéines de la famille des GFP.

(a) Biosynthèse des chromophores émettant dans le vert comme la GFP d'*Aequorea victoria* (AvGFP) (I): l'étape initiale de cyclisation implique l'attaque nucléophile de l'azote de l'amide de Gly67 sur le carbone électrophile du carbonyle du résidu 65 (petite flèche), catalysée par deux résidus strictement conservés, Arg96 et Glu222. Ces protéines rouges peuvent subir divers types de ruptures de leur chaîne peptidique, comme dans des formes naturelles telles que AsFP595 d'*Anemonia sulcata* (III), ou zFP538 du polype marin *Zoanthus* (IV). L'ingénierie de la DsRed a aussi produit de nombreux variants spectraux tels que la mOrange (V). L'illumination UV du précurseur vert de protéines photoconvertibles porteuses d'une histidine en position 65, conduit à d'autres formes rouges comme Kaede (VI). Bien que systématiquement présente dans les protéines fluorescentes naturelles, la tyrosine au cœur du chromophore n'est pas essentielle pour sa biosynthèse: son remplacement par d'autres résidus aromatiques, un tryptophane dans la CFP (VII), ou une phénylalanine dans Sirius (VIII), conduit à des variants respectivement cyan et bleu. R1 et R2 représentent la chaîne peptidique vers le N-terminus et le C-terminus de la protéine respectivement (d'après Merola et al., 2010).

Le principal atout de la GFP est justement le fait que c'est une protéine, et lorsque sa séquence ADN a pu être clonée (Chalfie et al., 1992), les techniques de biologie cellulaire et moléculaire standards ont permis d'introduire le gène codant pour la GFP dans des cellules vivantes. La machinerie cellulaire est alors capable d'interpréter cette séquence d'ADN et de produire elle-même la séquence protéique correspondante et a permis le développement des biosenseurs codés génétiquement. Les molécules d'ADN étant moins fragiles et plus facile à manipuler que les séquences protéiques *in vitro*, le nombre de biosenseurs codés génétiquement et exploitant les propriétés de fluorescence des variants de GFP a augmenté très fortement ces 20 dernières années, avec entre autres la mise au point de constructions capables de mesurer l'activité des protéases (caspase-3 activity sensor, (Xu et al., 1998)), l'activation des petites protéines G (Raichu-RhoA, (Yoshizaki, 2003)), les niveaux de calcium intracellulaire avec les biosenseurs Cameleons (Miyawaki et al., 1997). Les protéines fluorescentes elles-mêmes peuvent être utilisées en tant que biosenseurs pour mesurer par exemple le pH intracellulaire (Poea-Guyon et al., 2013), et des peptides signaux peuvent être intégrés aux biosenseurs pour les adresser à des compartiments intracellulaires tels que le noyau, les mitochondries, les réticulums, ou encore l'appareil de Golgi.

Le nombre de protéines fluorescentes exploitables dans les applications biologiques est aujourd'hui très conséquent (Chudakov et al., 2010), d'importants efforts ont été fournis pour élargir la gamme de protéines fluorescentes émettant dans les différents domaines du visible (Figure 1-6). Nous présenterons seulement les différents variants qui ont été utilisés au cours de cette étude.

1.5.2 Les protéines fluorescentes cyan (CFP)

Parmi les protéines que nous utilisons dans ce travail, l'ECFP (AvGFP-F64L-S65T-Y66W-N146I-M153T-V163A-H231L) fut la première créée, par introduction de la mutation Y66W dans le chromophore de la GFP d'*Aequorea victoria* (Cubitt et al., 1995). En raison du déplacement de ses spectres d'absorption et d'émission vers le bleu, ce variant est celui qu'on retrouve le plus souvent comme donneur d'énergie dans les biosenseurs basés sur le phénomène de FRET. Il est le plus souvent associé à l'EYFP qui joue le rôle d'accepteur. Le

chromophore T65-W66-S67 de la ECFP présente un pic d'absorption à 434 nm et un maximum d'émission à 474 nm. Malgré son utilisation intensive dans de nombreuses applications biologiques, il est connu que l'ECFP n'est pas optimisée de plusieurs points de vue : avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon \approx 30\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et un rendement quantique de fluorescence $\Phi = 0,37$, la brillance de la ECFP n'est pas très élevée. De plus l'émission de fluorescence de l'ECFP est hétérogène à la fois cinétiquement et spectralement : le déclin de fluorescence est décrit par au moins deux temps de décroissance, le majoritaire à 3,6 ns et une série de composantes courtes de durée de vie moyenne 1,3 ns (Tramier et al., 2002; Villoing et al., 2008). La durée de vie moyenne de fluorescence de la ECFP est de 2,5 ns. Ces temps de décroissance multiples découlent de la coexistence de plusieurs états d'émission associés à différents spectres et différentes durées de vie. A cela s'ajoute une forte sensibilité environnementale de l'ECFP. Ainsi, son $\text{pK}_{1/2}$ (pH auquel la protéine perd la moitié de sa fluorescence) est de 5,6, avec des perturbations de sa fluorescence détectables dès les pH neutres. Enfin, la ECFP est peu photostable et présente diverses formes de photoréactions, réversibles (photoswitching ou photocommutation) (Sinnecker et al., 2005a) ou irréversibles (avec une diminution de sa durée de vie de fluorescence sous irradiation) (Tramier et al., 2006).

L'amélioration des caractéristiques de la ECFP s'est faite tout d'abord par une approche de mutagénèse dirigée et a abouti à la protéine appelée Cerulean (Rizzo et al., 2004a). 3 mutations ont été introduites dans la ECFP pour obtenir ce variant amélioré : S72A/Y145A/H148D. Les maxima d'absorption et d'émission de la Cerulean sont de 433 nm et 475 nm respectivement et ne sont donc pas changés par rapport à ceux de la ECFP ; son coefficient d'extinction molaire est similaire à celui de la ECFP ($\epsilon \approx 30\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et son rendement quantique est de $\Phi = 0,67$. Par ailleurs, la décroissance de la durée de vie de fluorescence de ce variant est mieux décrite par une simple exponentielle que celle de l'ECFP. Malgré tout cette décroissance reste complexe, et tout comme la ECFP, la Cerulean souffre d'une faible photostabilité et reste fortement sensible aux variations environnementales avec un $\text{pK}_{1/2}$ de 5,2 (Erard et al., 2013a; Fredj et al., 2012a).

La protéine Aquamarine est un nouveau variant cyan très amélioré qui a été développé et caractérisé au Laboratoire de Chimie Physique. Elle est obtenue par seulement

2 mutations à partir de la ECFP : T65S/H148G (Erard et al., 2013), ce qui permet de modifier des constructions CFP existantes avec une perturbation minimale de leur structure tridimensionnelle et leurs interactions. Ces 2 mutations suffisent cependant à modifier profondément la photophysique de l'Aquamarine : le rendement quantique de l'Aquamarine est $\Phi=0,89$ (avec un coefficient d'extinction molaire similaire à celui de la ECFP). La décroissance de la durée de vie de fluorescence d'Aquamarine suit une loi quasi-monoexponentielle, avec une durée de vie moyenne de 4,1 ns, son $pK_{1/2}$ est de 3,3 et la protéine ne montre pas de réactions de photoswitching (Erard et al., 2013). Grâce à sa brillance élevée, Aquamarine apporte une forte amélioration de sensibilité en imagerie d'intensité de fluorescence, et sa durée de vie de fluorescence monoexponentielle va permettre des exploitations plus quantitatives en imagerie FLIM. De plus sa photostabilité et sa stabilité élevée face à des variations de pH en font un bon candidat pour des expériences de FRET en cellules vivantes.

Plusieurs variants cyan similaires à l'Aquamarine ont été développés dans d'autres laboratoires, comme la mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012) et la mCerulean3 (Markwardt et al., 2011), qui présentent eux aussi une forte amélioration de leurs caractéristiques (rendement quantique, déclin mono-exponentiels, stabilité étendue en pH...). Néanmoins, ces variants sont porteurs d'un plus grand nombre de mutations, et notamment pour la mTurquoise2, d'une mutation en position 146 (I146F) située en surface de la protéine, et susceptible de perturber ses interactions protéine-protéine (Espagne et al., 2011; Kubala et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que des performances quasi-équivalentes à celles de ces nouvelles formes peuvent être conférées à la Cerulean par la mutation unique T65S (Fredj et al., 2012a).

Grâce aux kits commerciaux de mutagenèse dirigée, les mutations T65S et H148G représentent donc un moyen très simple et général d'améliorer sur le plan photophysique toute construction porteuse d'une protéine fluorescente cyan (ECFP, Cerulean, et leurs nombreuses versions légèrement modifiées qu'on rencontre dans divers plasmides de laboratoire ou commerciaux), sans perturber notablement les interactions moléculaires et cellulaires de ces constructions. Tous ces variants sont spectralement identiques, et peuvent

se substituer les uns aux autres sans modification des conditions expérimentales de FRET (Mérola et al., 2014).

1.5.3 Les protéines fluorescentes jaunes (YFP)

Comme nous l'avons dit plus tôt, dans les couples FRET, le variant EYFP (AvGFP-S65G-V68L-S72A-T203Y) est l'un des plus utilisés comme accepteur en association avec la protéine ECFP (Tsien, 1998). Cette protéine dérive sa couleur jaune de la mutation T203Y, où le chromophore interagit par empilement avec la tyrosine en position 203 (« π -stacking »), ce qui conduit à un déplacement vers le rouge de ses transitions électroniques. Par suite, son spectre d'excitation recouvre en grande partie le spectre d'émission des CFP : son pic de maximum d'absorption se situe à 514 nm et le maximum d'émission à 527nm. Son coefficient d'extinction molaire est d'environ 80000 M⁻¹.cm⁻¹ et son rendement quantique $\Phi=0,63$. L'EYFP est très sensible aux photoréactions réversibles (Sinnecker et al., 2005a) et irréversibles (Kirber et al., 2007) et est également fortement sensible aux variations environnementales, notamment au pH et au chlore, puisque son $pK_{1/2}$ passe de 5,5 en absence de chlore à 6,5 en présence de 100 mM de chlore (Wachter and Remington, 1999a).

Les premiers travaux menés pour améliorer la stabilité de l'EYFP vis-à-vis de son environnement ont abouti à la Citrine (Griesbeck et al., 2001). Cette protéine fluorescente présente des spectres caractéristiques semblables à ceux de l'EYFP avec des maxima d'excitation et d'émission situés respectivement à 516nm et 529nm. Par rapport à l'EYFP, le coefficient d'extinction molaire de la Citrine est similaire ($\epsilon \approx 77\,000$ M⁻¹.cm⁻¹) mais son rendement quantique de fluorescence augmente ($\Phi=0,76$). En conséquence, la brillance de la Citrine est légèrement supérieure à celle de l'EYFP. La principale amélioration de la Citrine par rapport à l'EYFP est son $pK_{1/2}$ qui reste à 5,7 quel que soit la concentration en chlore (Griesbeck et al., 2001), la rendant moins sensible aux pH acides mais insuffisamment pour être utilisée dans les compartiments cellulaires les plus acides. Le variant Venus (EYFP-F46L-F64L-Q69K-R79K-M153T-V163A-S175G) porte toute une série de mutations destinées à améliorer sa vitesse et son efficacité de maturation (Nagai et al., 2002a), qui ont eu également pour conséquence une diminution de sa sensibilité vis à vis du pH et du chlore ($pK_{1/2} = 6.0$ en présence de 35 mM de chlore).

Les biosenseurs FRET construits avec des CFP et des YFP (ou des Citrine) ont souvent une faible dynamique de réponse : la détection de la variation du signal émis par le biosenseur suite à la survenue de l'évènement biologique d'intérêt est alors parfois assez peu évidente. Une des approches pour améliorer cette gamme dynamique est de modifier l'orientation relative des chromophores ainsi que la distance qui les séparent dans le biosenseur. Pour cela, des méthodes de biologie moléculaire ont été utilisées pour mettre au point des variants des protéines fluorescentes dits « circulary permuted ». Dans ces variants, on profite du fait que les extrémités N-term et C-term de la protéine fluorescente sont situés à proximité l'une de l'autre, pour les relier par des espaceurs de quelques acides aminés. La chaîne peptidique est démarrée et terminée à un autre endroit de la séquence, et ces modifications ont pour résultat une modification complète de la géométrie d'ancrage de la protéine dans le biosenseur (Baird et al., 1999; Topell et al., 1999). Une série de variants de la protéine Venus (les cpVenus) a été créée de cette façon (Nagai et al., 2004a). Cependant, ces permutations circulaires sont susceptibles d'augmenter significativement la sensibilité en pH des variants obtenus, en déplaçant leur $pK_{1/2}$ vers les pH neutres, voire basiques (Chudakov et al., 2010; Schwarzländer et al., 2011).

1.5.4 Une protéine fluorescente orange: la TagRFP

De nombreux homologues de la GFP ont été clonés à partir d'autres organismes marins que les méduses, dont des variants émettant dans l'orange ou le rouge isolés à partir de coraux et d'anémones de mer. Ces formes naturelles sont cependant difficilement exploitables car ce sont tous des variants dimériques ou tétramériques et donc fortement susceptibles de s'agréger en cellule. L'une d'entre-elle est l'anémone *Entacmaea quadricolor* qui produit naturellement une protéine fluorescente dimérique eqFP578, absorbant et émettant dans la zone orange du spectre (Merzlyak et al., 2007). Le gène de cette protéine a été extrait de *Entacmaea quadricolor* puis cloné et sert de base à des travaux ayant pour but d'étendre la gamme des protéines disponibles vers l'orange, le rouge et le proche infra-rouge. Notamment, cette protéine a été rapidement modifiée par mutagenèse dirigée et semi-aléatoire afin de la rendre monomérique, ce qui a conduit à la TagRFP (excitation/émission 555/584 nm, coefficient d'extinction molaire 100 000 M⁻¹.cm⁻¹,

rendement quantique de fluorescence $\Phi=0,48$). Nous nous sommes intéressés à cette protéine en raison de sa brillance relativement élevée pour une protéine fluorescente rouge, et de son très faible $pK_{1/2}$ inférieur à 4. Malgré un spectre d'absorption déplacé vers le rouge, la TagRFP peut en effet jouer efficacement le rôle d'accepteur d'énergie dans les couples de type cyan/TagRFP (grâce à son coefficient d'absorption molaire élevé), et pourrait donc être exploitable dans des biosenseurs FRET.

Malgré des différences de séquence importantes, la TagRFP présente un repliement tridimensionnel semblable à celui de la GFP, avec la même forme en tonneau (Figure 1-5). Son chromophore, formé initialement à partir des résidus M65-Y66-G67, subit des étapes de maturation spontanées supplémentaires conduisant à une extension de son système conjugué, avec une structure finale du chromophore identique à celui de la DsRed (classe II de la Figure 1-6). Dans le but d'améliorer les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes orange et rouges dérivées de *Entacmaea quadricolor*, Shaner et al. ont mis au point une méthode de screening qui leur a permis d'identifier le TagRFP-T, 9 fois plus photostable que la TagRFP (Shaner et al., 2008). La TagRFP-T diffère de la TagRFP par un seul acide aminé : la Sérine 158 a été remplacée par une Thréonine. Cette mutation ne modifie pas les propriétés spectrales de la protéine et les maxima d'absorption et d'émission sont inchangés. Le coefficient d'extinction molaire de la TagRFP est cependant diminué puisqu'il passe à $\epsilon=81\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, son rendement quantique reste $\Phi=0,41$ rendant la TagRFP-T légèrement moins brillante que la TagRFP. L'augmentation de la photostabilité de cette protéine se fait également au détriment de sa résistance aux conditions acides, puisque son $pK_{1/2}$ augmente à 4,6.

1.5.5 Les Biosenseurs FRET

a Principe de fonctionnement des biosenseurs FRET

La majorité des biosenseurs conçus avec des protéines fluorescentes utilise le phénomène de FRET. Ces biosenseurs possèdent 2 protéines fluorescentes, une jouant le rôle donneur de FRET, l'autre d'accepteur, et l'action de la protéine cible va provoquer des changements de conformation du biosenseur qui vont moduler le niveau de FRET entre les deux protéines fluorescentes. Il est ainsi possible de visualiser des interactions protéines-

protéines ou de suivre les dynamiques d'activation de protéines de signalisation. Il existe de nombreux couples de protéines utilisés dans les biosenseurs FRET, les plus répandus étant des variants spectraux cyans pour donneur associés à des variants jaunes jouant le rôle d'accepteur.

Parmi les biosenseurs fonctionnant avec le FRET, ceux permettant de mesurer les activités d'une protéine d'intérêt possèdent en plus du couple de protéines fluorescentes un peptide substrat de la protéine étudiée. L'action de la protéine d'intérêt sur ce substrat va modifier la conformation spatiale du biosenseur, modulant ainsi le taux de FRET entre les deux protéines fluorescentes. Le biosenseur AKAR (A-Kinase Activity Reporter) permettant de mesurer l'activité de la Protéine Kinase AMPc dépendante (PKA) est conçu sur ce principe.

b Les biosenseurs AKAR

AKAR est une protéine recombinante dans laquelle on peut identifier quatre domaines différents : une séquence consensus substrat spécifique de la PKA, un domaine de liaison d'acide aminé phosphorylé et deux protéines fluorescentes capables d'interagir par FRET. Les domaines substrat et de reconnaissance du substrat phosphorylé sont pris en sandwich entre les deux protéines fluorescentes. Lorsque les PKA sont actives, elles vont pouvoir phosphoryler ce substrat spécifique, qui après action de la PKA pourra être reconnu et lié intramoléculairement par le domaine de liaison du substrat phosphorylé (Figure 1-7). Cela va entraîner des changements de conformation dans l'espace et va rapprocher et réorienter les deux protéines fluorescentes entre elles. En conséquence le niveau de FRET va augmenter et le suivi de l'évolution des signaux de fluorescence et du signal ratiométrique va nous permettre de suivre l'activité de la PKA dans le temps et/ou dans l'espace en fonction du mode d'analyse employé.

Nom du Biosenseur	Donneur	Accepteur	Module Senseur		Référence
AKAR1	CFP tronquée	Citrine	LRRA-S-LP	14-3-3τ	(Zhang et al., 2001a)
AKAR2	CFP tronquée	Citrine	LRRA-I-LVD	FHA1	(Zhang et al., 2005a)
AKAR2.2	mCFP tronquée	mCitrine	LRRA-I-LVD	FHA1	(Zhang et al., 2005a)
AKAR3	mCFP tronquée	cpVenus(E172)	LRRA-I-LVD	FHA1	(Allen and Zhang, 2006)
AKAR4	Cerulean entière	cpVenus(E172)	LRRA-I-LVD	FHA1	(Depry et al., 2011)

Tableau 1-1 : Récapitulatifs des principaux biosenseurs AKAR existants

(voir les séquences exactes des constructions AKAR2.2 et AKAR4 dans la partie Matériel et Méthodes)

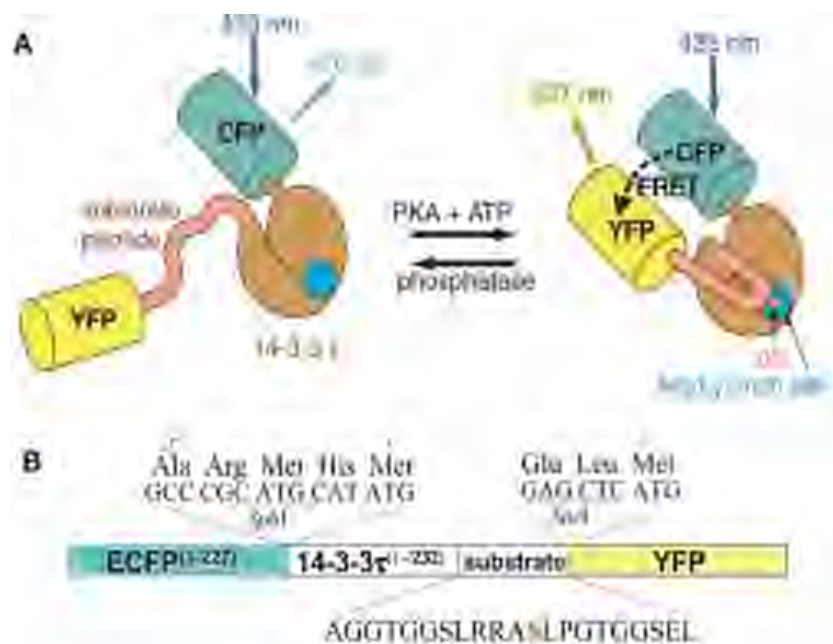


Figure 1-7 : Schéma de la structure du biosenseur AKAR. Le biosenseur composé de deux protéines fluorescentes, d'un domaine de liaison d'acide phosphoaminé et d'un substrat peptidique spécifique de la PKA. En conditions basales, le biosenseur est majoritairement en conformation (A). Après action de la PKA, des modifications de la structure tridimensionnelle du biosenseur aboutissent au rapprochement des deux protéines fluorescentes (B) augmentant le FRET entre elle.

- **AKAR1**

Dans la première version du biosenseur AKAR (Zhang et al., 2001a) le couple de protéines fluorescentes est constitué d'une CFP pour donneur et d'une YFP pour accepteur. Le domaine de liaison au substrat phosphorylé est un domaine 14-3-3 τ . La réponse d'AKAR1 est irréversible du fait de la trop forte affinité entre le domaine 14-3-3 τ et l'acide aminé après l'action de la PKA. La nécessité de pouvoir suivre l'évolution de l'activité de la PKA dans le temps a poussé au développement d'une version d'AKAR dont la réponse serait réversible.

- **AKAR2**

Le domaine 14-3-3 τ a alors été remplacé par un domaine FHA1 qui présente une affinité de liaison moindre pour le domaine de reconnaissance et la version AKAR2 a ainsi été développée (Zhang et al., 2005a). Sa réponse à l'activation de la PKA provoque une augmentation de son signal ratiométrique de 20%.

Les modifications suivantes ont permis de supprimer la tendance qu'ont la CFP et la YFP à dimériser. La mutation A206K permettant de supprimer cette tendance (Zacharias et al., 2002) a été introduite dans les deux protéines fluorescentes créant ainsi la « monomeric CFP » mCFP et la « monomeric Citrine » et le biosenseur AKAR2.2 a été obtenu (Dunn et al., 2006).

- **AKAR3**

Les étapes d'optimisation suivantes ont porté sur l'amélioration de la réponse dynamique du biosenseur AKAR. Pour cela YFP a été remplacé par cpVenusE172. AKAR3 ainsi obtenu a une dynamique de réponse maximale de 40% après activation de la voie AMPc/PKA (Allen and Zhang, 2006).

- **AKAR4**

Puis la mCFP fut remplacée par la Cerulean pour obtenir AKAR4 qui présente une augmentation maximale du signal ratiométrique de 68% après activation de la voie AMPc/PKA (Depry et al., 2011).

Pour faciliter la compréhension, dans la suite du manuscrit les biosenseurs AKAR seront identifiés de la façon suivante : « ^{donneur}AKAR^{accepteur} » ; AKAR2.2 sera ainsi renommé ^{CFP}AKAR^{Citrine} (les « m » de « mCFP » et « mCitrine » seront sous-entendu.) et AKAR4 sera ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus}.

Après vérification des séquences, il s'est avéré que la CFP portée par AKAR2.2 a subi une délétion de ses 11 derniers acides aminés, et porte en outre les mutations K26R et N164H. Il ne s'agit donc pas en toute rigueur d'une ECFP. Ces caractéristiques sont probablement héritées de AKAR1.

1.6. La Protéine Kinase A

La PKA est une protéine de premier plan dans la compréhension de nombreux processus physiologiques. En effet, elle transmet les signaux en répondant aux variations du taux d'AMPc qui est le second messenger d'un très grand nombre de cascades de signalisation; on la retrouve dans tous les types cellulaires où elle participe à la régulation d'une multitude de fonctions physiologiques différentes. Parmi les réponses cellulaires médiées par la PKA nous pouvons citer la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, les contractions musculaires ou encore son rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire. La PKA a également un rôle fondamental dans les cascades de signalisation neuronale, ainsi elle est responsable de la modulation de certains processus de plasticité synaptique, du contrôle de l'excitabilité neuronale par son action de phosphorylation de canaux transmembranaires.

1.6.1 Structure de la PKA

La PKA est une Sérine/Thréonine kinase, c'est un holoenzyme constitué d'un dimère de sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C) inhibées par les sous-unités R. On trouve deux types de sous-unités R : RI et RII ; les deux sous-unités R d'une même PKA sont toujours du même type et définissent donc deux types de PKA : les PKA de type I et les PKA de type II. Les deux sous-unités régulatrices peuvent lier 2 molécules d'AMPc ce qui va libérer les deux sous unités C, ces dernières vont alors pouvoir exercer les activités de phosphorylation sur les substrats de la PKA.

1.6.2 Substrats de la PKA

La séquence substrat de la PKA a été largement étudiée par Kemp. Ses travaux ont permis de mettre en évidence que les Serines cibles de la PKA sont contenues dans la séquence L-R-R-A-S-L-G aujourd'hui baptisée Kemptide. D'une façon plus générale, les PKA phosphorylent préférentiellement la séquence consensus R-R-X-S/T. (Kemp et al., 1975; Walsh and Van Patten, 1994). Dans les biosenseurs AKAR, il est possible de générer des versions « contrôle » en mutant la Thréonine cible de la PKA. Ainsi, les versions « AKARmut » que nous mettrons en œuvre dans la suite de ce travail portent la mutation T391A (Gervasi et al., 2007). Cette mutation conduit à un biosenseur complètement inactif vis à vis de la PKA, et ce contrôle permet de vérifier l'implication effective de la protéine kinase A dans les réponses observées du biosenseur (Polito et al., 2014).

1.6.3 Contrôle de l'activité de la PKA

Le contrôle de l'activité des PKA se fait également par des interactions avec des protéines d'ancrage AKAP (A-Kinase Anchoring Protein). Les AKAP possèdent une hélice amphiphatique qui a une forte affinité pour la partie N-terminale des sous-unités R de la PKA (Kinderman et al., 2006; Sarma et al., 2010). Chaque sous-unité R possède également un linker flexible qui relie les parties N-terminale et C-terminale de la sous-unité R. Ce linker possède une séquence très similaire au peptide substrat de la PKA; en absence d'AMPC cette séquence inhibitrice est liée à la sous-unité catalytique de la PKA et la maintient dans un état inactif (Taylor et al., 2013).

Les AKAP permettent également de confiner les PKA à différents endroits de la cellule. On trouve différents isoformes d'AKAP dans le noyau, au niveau des membranes cellulaires, dans les vésicules de transport. Des substrats de la PKA sont localisés à proximité des AKAP formant des microdomaines et permettant un fin contrôle spatial de l'activité de la PKA. Dans la proximité des microdomaines, on peut également identifier des phosphodiesterases qui vont réguler l'activité de la PKA en cas de feedback négatif. Leur action est de transformer les molécules d'AMPC en AMP; cela permet aux sous-unités R de la PKA de lier à nouveau les sous-unités C stoppant ainsi l'activité de phosphorylation de la

PKA. Un autre niveau de régulation négative peut-être exercé par les phosphatases qui vont agir directement au niveau des substrats de la PKA. Ces enzymes vont catalyser une réaction d'hydrolyse du phosphate qui avait été ajouté par la PKA annulant ainsi son action.

1.6.4 Comprendre l'activité neuronale de la PKA grâce au biosenseur AKAR

La cascade de signalisation AMPc/PKA étant impliquée dans la régulation d'une multitude de phénomènes physiologiques, elle est inévitablement affectée lorsqu'on observe des dérégulations de ces processus. Ces dérégulations pouvant s'avérer à terme pathologiques, la voie AMPc/PKA est devenue une cible privilégiée de l'industrie pharmaceutique et la compréhension des modes d'actions de régulations de la PKA ainsi que de l'identification de ses substrats ne sont possibles que grâce au développement d'outils pouvant mesurer à la fois les réponses temporelles et spatiales de la PKA à des stimuli extérieurs. Le biosenseur AKAR est un de ces outils.

Pour comprendre le fonctionnement du biosenseur AKAR, nous étudierons tout d'abord les propriétés des protéines fluorescentes cyan et jaune dont il est porteur, sous forme purifiée en solution (Chapitre 2.1). Grâce à l'étude de constructions modèles exprimées en cellule vivante, combinant une protéine cyan et une protéine jaune, et que nous appellerons des « tandems », nous verrons ensuite comment les sensibilités au pH respectives de ces deux fluorophores vont moduler leurs signaux de FRET en cellule (Chapitre 2.2). Enfin, dans le Chapitre 2.3, nous analyserons comment ces différents phénomènes interfèrent avec la détection de l'activité kinase dans le biosenseur AKAR. Dans le chapitre 2.4, nous construirons et étudierons par étapes successives une version améliorée du biosenseur porteuse d'un nouveau couple de protéines fluorescentes pour le FRET : l'Aquamarine et la TagRFP.

A



B



Figure 1-8 : Aspect structural de l'interactions entre les AKAP et les sous-unités R des PKA (d'après Welch et al., 2010) A : L'hélice de l'AKAP (en vert et jaune) interagit avec les domaines de dimérisation/docking des sous-unités régulatrices de la PKA (en rouge et bleu). B : Vue de dessus de l'hélice amphipathique d'AKAP. L'interaction avec la PKA se fait via la face hydrophobe d'AKAP (en jaune).

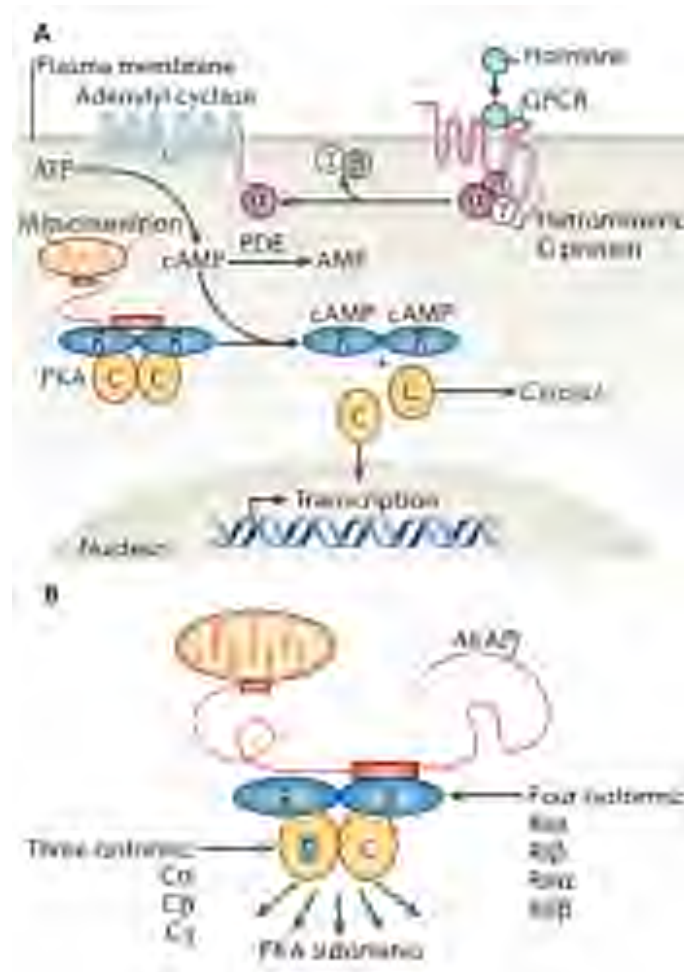


Figure 1-9 : Voie de signalisation de la PKA et structure de la PKA (Taylor et al., 2012). (A) L'activation d'un récepteur membranaire par une hormone entraîne la libération de la sous-unité α d'une protéine G. La sous-unité α va agir sur les adénylates cyclases qui vont augmenter la production intracellulaire d'AMPc. Les molécules d'AMPc produites vont interagir avec les sous-unités régulatrices R de la PKA ce qui va libérer les sous-unités catalytiques C. Les sous-unités C vont alors pouvoir exercer leur activité de phosphorylation sur leurs substrats cytosoliques ou être transportés dans le noyau où elles vont pouvoir moduler l'expression génique en agissant sur des facteurs de transcription. (B) Représentation schématique des interactions entre les sous-unités de la PKA et une AKAP mitochondriale.

2. Résultats expérimentaux

2.1. Etudes des protéines fluorescentes purifiées

2.1.1 Introduction

Les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes cyan et jaune incorporées dans des biosenseurs FRET ont été établies en partie au cours de différents travaux antérieurs.

Notamment, les réponses de la EYFP et de la Citrine au pH et au chlore ont été décrites très tôt dans la littérature (Wachter and Remington, 1999b; Wachter et al., 2000). Ces données ont été vérifiées et complétées au laboratoire, dans le cadre de différents travaux de stage (Aritz Perez, 2012, Awa Diop Sy, 2014). La sensibilité au pH de la ECFP a été étudiée en détails par Hélène Pasquier (Villoing et al., 2008) et lors de la thèse d'Asma Fredj (Fredj et al., 2012).

Par ailleurs, ces protéines présentent des propriétés de photocommutation réversibles (Erard et al., 2013; Fredj et al., 2012; Sinnecker et al., 2005) qui ont une incidence notable sur leur utilisation en FRET.

Afin de permettre l'interprétation des données obtenues sur les différents systèmes FRET étudiés dans la suite, l'ensemble de ces résultats est rappelé dans cette première section.

2.1.2 Sensibilité au pH de la EYFP et de la Citrine

La plupart des protéines fluorescentes porteuses d'un chromophore de type tyrosine (c'est à dire identique à celui de la forme sauvage AvGFP) présentent des modifications très importantes de leurs propriétés d'absorption et de fluorescence en fonction du pH, qui sont bien expliquées par un changement de l'état de protonation de leur chromophore : l'hydroxyle du groupement tyrosine a tendance à se déprotoner aux pH neutres ou basiques.

En particulier, les protéines fluorescentes jaunes obtenues par la mutation T203Y, telles que la EYFP et la Citrine, présentent des transitions marquées dans le domaine des pH modérément acides (>5) à basiques, c'est à dire dans toute la gamme des pH physiologiques. De plus, il a été montré que ces réponses dépendent fortement de la présence de petits anions monovalents tels que Cl^- , ou NO_3^- , dont la concentration intracellulaire peut varier fortement.

a Sensibilité au pH en absence d'anions monovalents

En absence d'anion monovalent dans le milieu, le spectre d'absorption de la EYFP et la Citrine présente deux bandes caractéristiques du chromophore, l'une attribuée au chromophore anionique avec un maximum à 515 nm et l'autre attribuée au chromophore neutre avec un maximum à 400 nm. L'intensité relative de ces deux bandes dépend fortement du pH, avec une diminution de la bande anion et une augmentation de la bande neutre lorsque le pH diminue (Figure 2-1). Cette transition est bien décrite par une loi de Henderson Hasselbalch modifiée, avec un coefficient de coopérativité apparent proche de 1 pour la EYFP, et inférieur à 1 pour la Citrine, et un $\text{pK}_{1/2}$ identique de 5.60 ± 0.05 dans les deux cas (Figure 2-1).

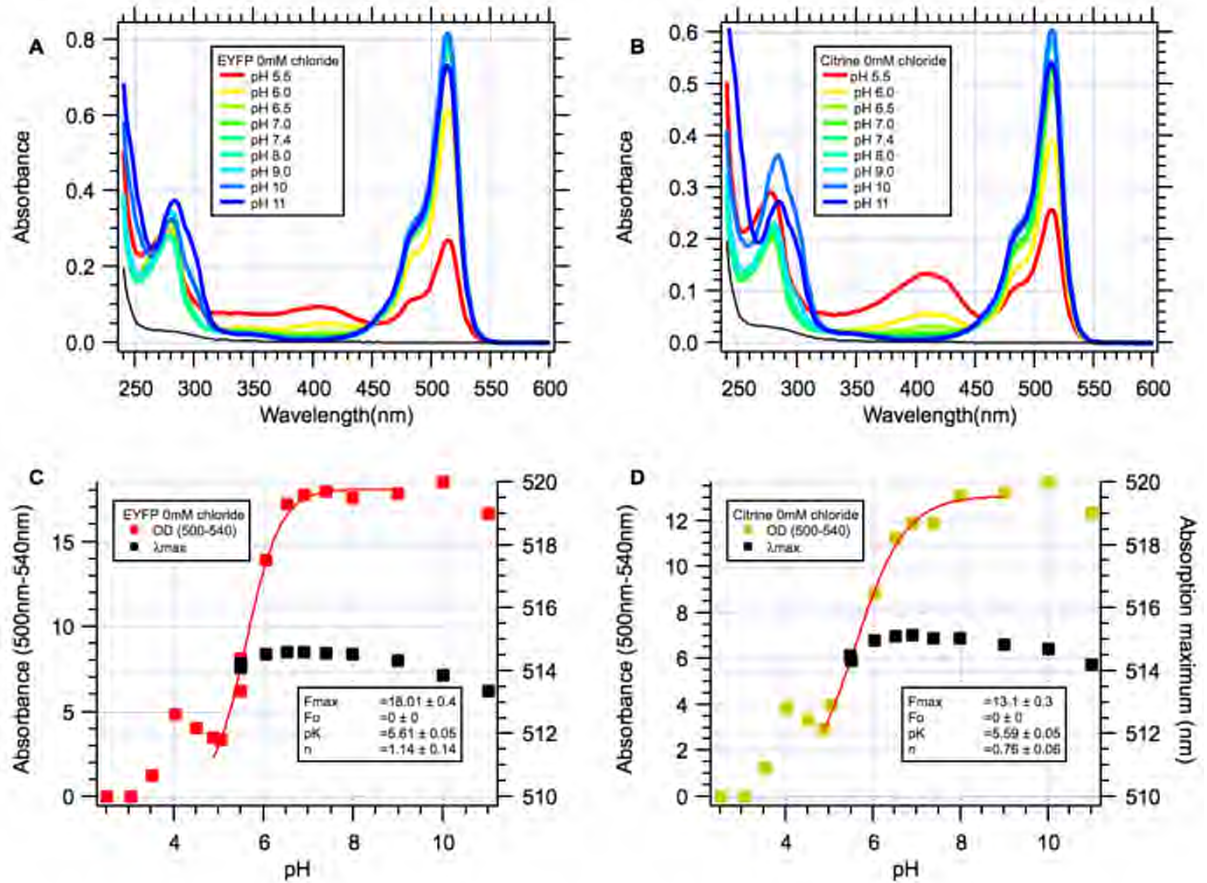


Figure 2-1: Dépendance au pH des spectres d'absorption de la EYFP et de la Citrine purifiées en absence d'anion monovalent. Spectres (A, B) et intensités et maxima d'absorption(C, D), des protéines en tampons Mes-CAPS-Bis-Tris-propane et citrate. Aux alentours de pH 4, une agrégation de la protéine empêche la mesure précise de ses propriétés d'absorbance. (Conditions expérimentales dans Betolngar et al., 2015).

Le spectre d'excitation de la EYFP et de la Citrine ne présente pas de pic à 400nm, montrant qu'une excitation dans la bande neutre ne produit aucune fluorescence et que seule la forme anion est responsable de la fluorescence de ces protéines. On n'observe aucune modification de la forme des bandes électroniques en absorption comme en émission entre pH 5 et pH 10.

La durée de vie de fluorescence de la EYFP et de la Citrine diminue également aux pH acides (Figure 2-2) mais le phénomène se manifeste à des pH approximativement inférieurs d'une unité au $pK_{1/2}$ mesuré pour la disparition de l'anion en absorption (Figure 2-1). Ceci montre que le rendement quantique de fluorescence de l'anion peut être considéré comme constant dans la plus grande partie de la transition en absorption.

Dans la gamme des pH compris entre pH 5.5 et pH 9, l'ensemble des perturbations photophysiques observées dans la EYFP et la Citrine est donc bien décrit, en première approximation, par un simple échange entre les deux états de protonation de leur chromophore, dont le $pK_{1/2}$ effectif est modulé par l'environnement local du chromophore dans la protéine. Une acidification du milieu dans un domaine de pH proche du $pK_{1/2}$ conduit à une disparition de la forme anion, et donc à une perte de l'absorption à 515 nm et de l'émission de fluorescence de la protéine.

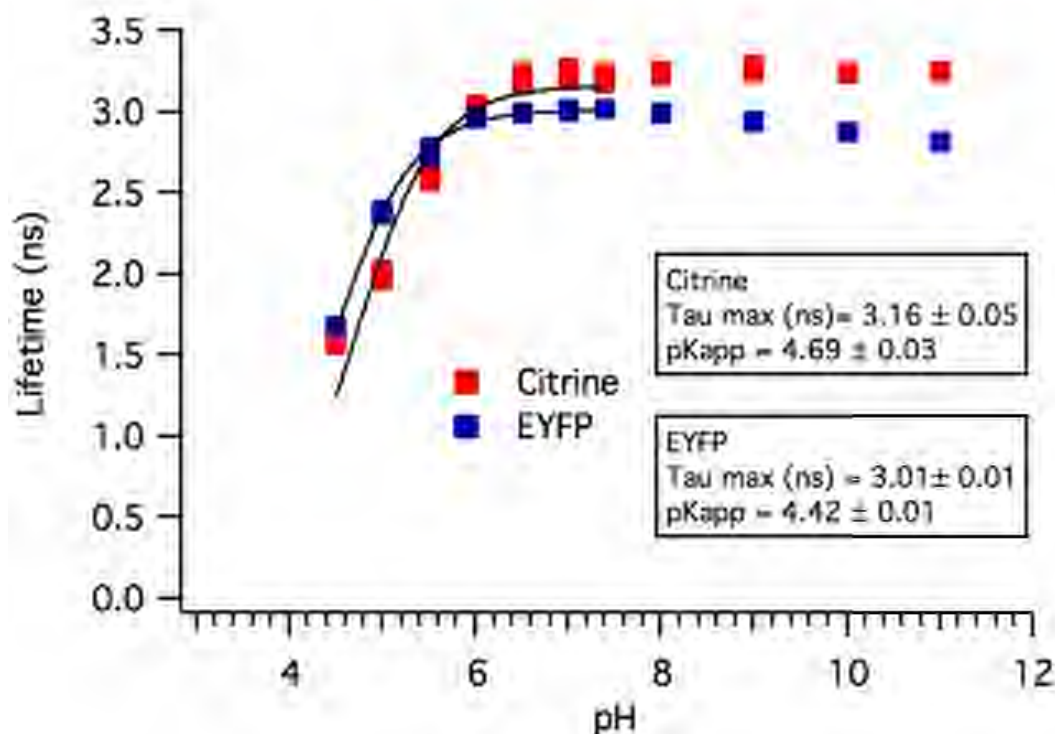


Figure 2-2: Variation de la durée de vie moyenne de fluorescence de la EYFP et de la Citrine purifiées en fonction du pH en absence d'anion monovalent.

Excitation 466nm, Emission > 490nm, 20°C. (Conditions expérimentales dans Betolngar et al., 2015).

b Sensibilité au pH en présence d'ions chlorure (Cl⁻)

A pH neutre, lorsqu'on ajoute des sels d'anions monovalents tels que le chlorure de potassium (KCl), on constate que le spectre d'absorption de la EYFP se modifie, l'intensité relative de la bande anion diminue au profit de la bande neutre (Figure 2-3). Au contraire, le spectre d'absorption de la Citrine n'est pas significativement perturbé (Figure 2-3). Ce phénomène a été décrit en détail dans le cas de la EYFP et de différents mutants (Wachter and Remington, 1999b), et a été expliqué par la liaison d'un atome de chlore à proximité du chromophore dans cette protéine. La charge négative du chlore défavorise la déprotonation du chromophore, et déplace donc son $pK_{1/2}$ vers des valeurs plus basiques.

On observe effectivement une forte dépendance du $pK_{1/2}$ de la EYFP avec la concentration en chlorure, sa valeur tendant vers 7.20 à saturation en chlore, en bon accord avec les résultats antérieurs de Wachter et Remington (Figure 2-3). Nous avons étudié de la même façon le $pK_{1/2}$ de protonation du chromophore de la Citrine en fonction du chlore, qui

n'avait pas été caractérisé de façon systématique, et nous trouvons que cette dépendance est beaucoup moins marquée, mais pas complètement négligeable, le $pK_{1/2}$ tendant vers 6.3 à saturation en chlore (Figure 2-3).

Dans le cas de la EYFP, le $pK_{1/2}$ de protonation varie très rapidement dans le domaine compris entre 0 et 100mM de chlore, qui correspond au domaine des concentrations intracellulaires de cet ion, par exemple au cours de la maturation de neurones. En raison de cette sensibilité au chlore, le $pK_{1/2}$ effectif des protéines fluorescentes jaunes reste donc mal connu dans le milieu cellulaire.

Nous avons vérifié par ailleurs que ni le rendement quantique de fluorescence, ni la forme des spectres d'absorption et de fluorescence ne subissent de perturbation significative en présence de chlore saturant : l'influence du chlore résulte donc essentiellement d'un déplacement électrostatique de l'équilibre de protonation du chromophore, et ne s'accompagne en particulier d'aucun quenching dynamique ou statique détectable de la fluorescence.

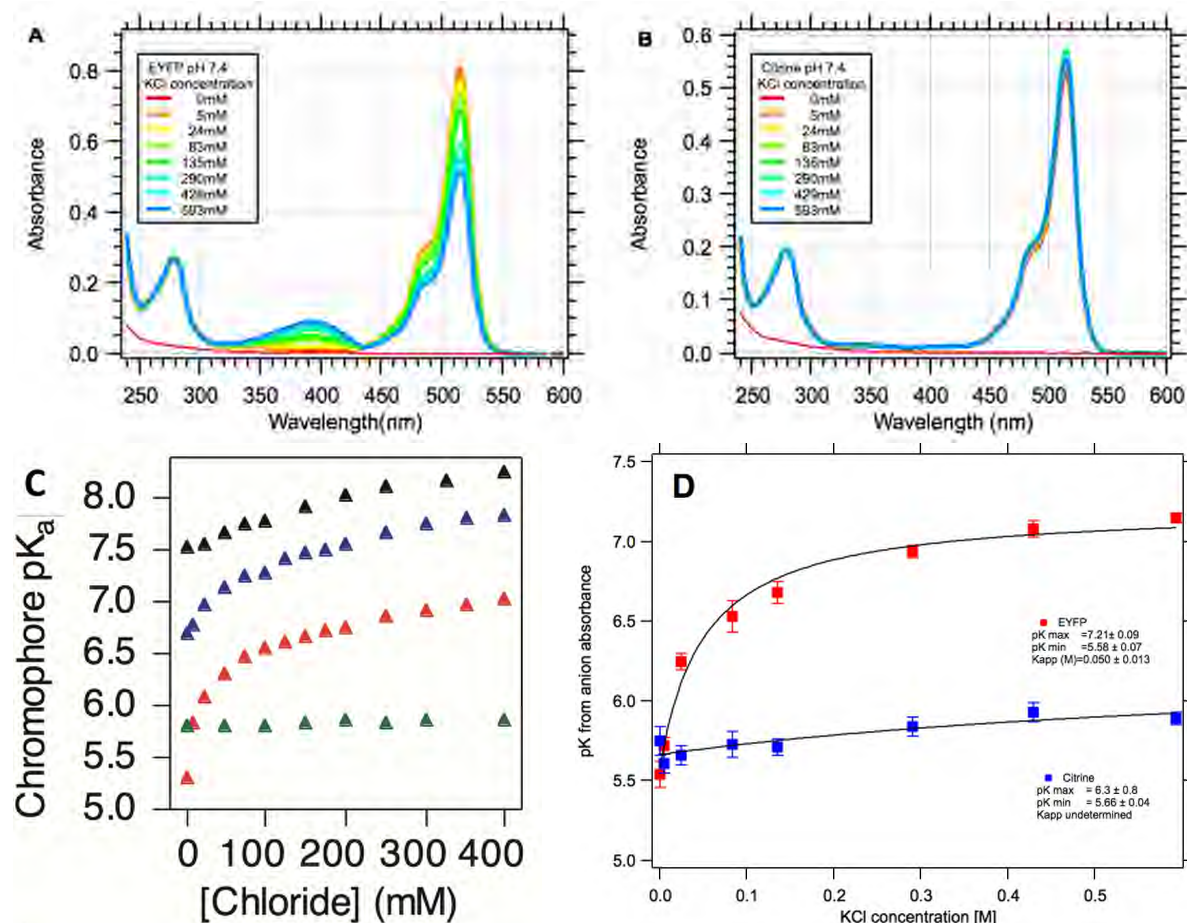
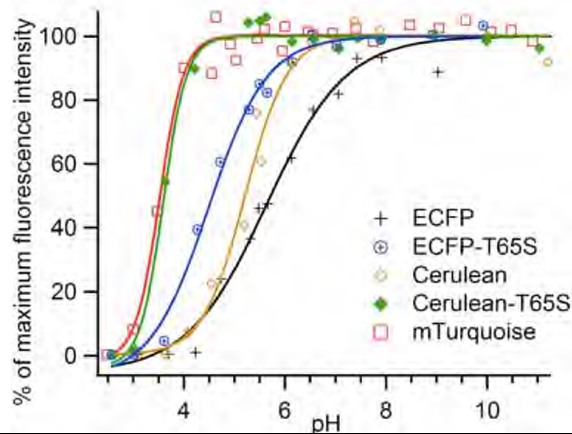


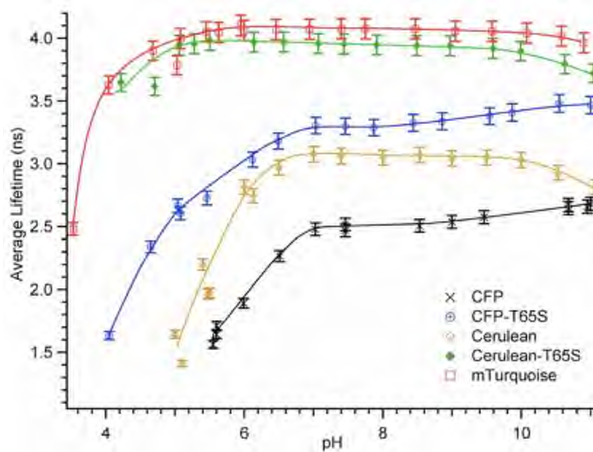
Figure 2-3: Dépendance de l'équilibre de protonation du chromophore de la EYFP et de la Citrine purifiées en fonction du chlore.

Spectres d'absorption de la EYFP (A) et de la Citrine (B) à pH 7.4 au cours d'un titrage par une solution de KCl. Valeur du $pK_{1/2}$ de protonation du chromophore en fonction de la concentration en chlore, données de Wachter et Remington, 1999 (C) obtenues sur différents mutants de la YFP (EYFP, triangles rouges) et données obtenues au laboratoire sur la EYFP et la Citrine (D). (Conditions expérimentales dans Betolngar et al., 2015).

A



B



C

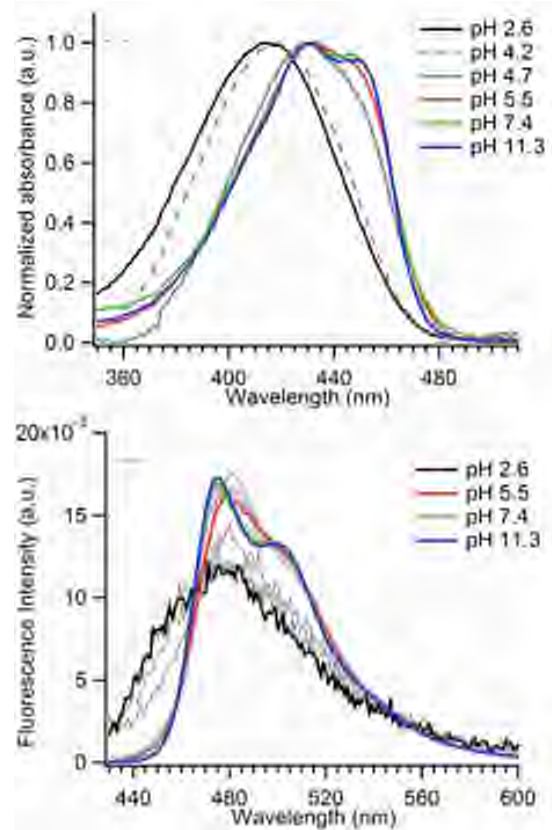


Figure 2-4: Perturbations photophysiques induites par des changements de pH dans la ECFP et ses homologues (d'après Fredj et al., 2012).

(A) Variation de l'intensité de fluorescence. (B) Variation de la durée de vie de fluorescence. (C) Déformations des spectrales d'absorption et de fluorescence. Figures extraites de Fredj et al, 2012. Les propriétés de l'Aquamarine en fonction du pH sont décrites en détail dans Erard et al, 2013.

2.1.3 Sensibilité au pH de la ECFP

Malgré l'absence d'un groupement déprotonable dans le chromophore de la ECFP (où la tyrosine de l'AvGFP a été remplacée par un résidu tryptophane), ses propriétés optiques présentent elles aussi une forte sensibilité au pH. Cette dépendance a été étudiée en détail au laboratoire ces dernières années, à la fois en absorption et en fluorescence, et les principaux résultats de ce travail sont rappelés dans la Figure 2-4.

Aux pH modérément acides ($5 < \text{pH} < 7$), l'intensité de fluorescence et la durée de vie de la ECFP diminuent fortement lorsque le pH diminue, avec un point de demi-transition à $\text{pH } 5.63 \pm 0.07$ pour la perte d'intensité de fluorescence (Figure 2-4). La transition est beaucoup plus étendue que celle prédite par une loi simple de Henderson Hasselbalch ($n_{\text{Hill}} \approx 0.7$), suggérant une séquence complexe d'évènements (Fredj et al., 2012a). De fait, les premières perturbations de la fluorescence se manifestent dès les pH neutres, voire légèrement basiques. Simultanément, le spectre de fluorescence perd une partie de sa structure caractéristique en « double bande », et le maximum d'émission subit un léger déplacement vers le rouge (Figure 2-4).

Dans le même domaine de pH, le spectre d'absorption de la ECFP subit également de légères déformations, conduisant principalement à une perte de la structure en « double bande » (Figure 2-4). L'intensité d'absorption n'est pas significativement modifiée, le coefficient d'absorption molaire de la ECFP native étant de $30000 \pm 3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, et celui de la ECFP dénaturée à pH 2.6 de $34000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ environ.

La perte rapide et complète de l'intensité de fluorescence et la diminution simultanée de la durée de vie de fluorescence, sans perturbation majeure des propriétés d'absorption, indiquent une forte augmentation de l'efficacité des processus d'extinction non-radiative lors de l'acidification, c'est à dire l'apparition d'un quenching dynamique très efficace. Notre équipe a montré que, dans la ECFP, ces perturbations résultent principalement d'une perte de rigidité du chromophore. Dans différents variants tels que l'Aquamarine ou la mTurquoise, mais aussi la Cerulean-T65S, cette rigidité a pu être

restaurée par des mutations ponctuelles bien choisies : dans ce cas, on peut obtenir une remarquable stabilité des signaux de fluorescence aux pH acides, avec des points de demi-transition inférieurs à pH 3.5 (Figure 2-4). Par ailleurs, les propriétés d'absorption et de fluorescence de la ECFP à pH neutre sont insensibles à l'ajout de KCl jusqu'à une concentration de 600 mM.

2.1.4 Photocommutation réversible de la EYFP et de la ECFP

Beaucoup de GFP présentent des propriétés de photocommutation réversible, qui sont la base de méthodes originales d'imagerie à super-résolution grâce aux propriétés de photochromisme qui leurs sont souvent associées (Zhou and Lin, 2013). Des travaux antérieurs ont mis en évidence les propriétés de photocommutation de la EYFP (Dickson et al., 1997), de la Citrine et de la ECFP (Sinnecker et al., 2005a). La photocommutation de la EYFP et de la Citrine est principalement induite par une illumination dans la bande neutre de leur chromophore, tandis que celle de la ECFP est déclenchée par une excitation à son maximum d'absorption. Dans tous les cas, la photocommutation conduit à des pertes transitoires et partielles du signal de fluorescence, qui sont complètement réversibles à l'obscurité.

Le phénomène a été étudié en détail et de façon quantitative au laboratoire dans le cas de la ECFP (Fredj et al., 2012a). Il est bien décrit par un mécanisme de photocommutation réversible entre deux états, conduisant à l'établissement d'un régime stationnaire sous illumination (Figure 2-5). On peut présumer que ce phénomène résulte, dans le cas de la ECFP comme dans celui de nombreuses autres protéines fluorescentes, des propriétés intrinsèques de photoisomérisation *cis-trans* de son chromophore (Voliani et al., 2008). A très faible irradiance ($<0.1\text{W}/\text{cm}^2$), le pourcentage de perte et le niveau de fluorescence atteint dans le régime stationnaire dépendent de l'intensité d'illumination, puis à irradiance moyenne ($\geq 0.1\text{W}/\text{cm}^2$) le régime stationnaire s'établit en quelques secondes, et le niveau atteint devient indépendant de la puissance incidente : il est alors gouverné uniquement par le rapport des constantes de photoisomérisation intrinsèques du chromophore dans les 2 directions (Fredj et al., 2012a).

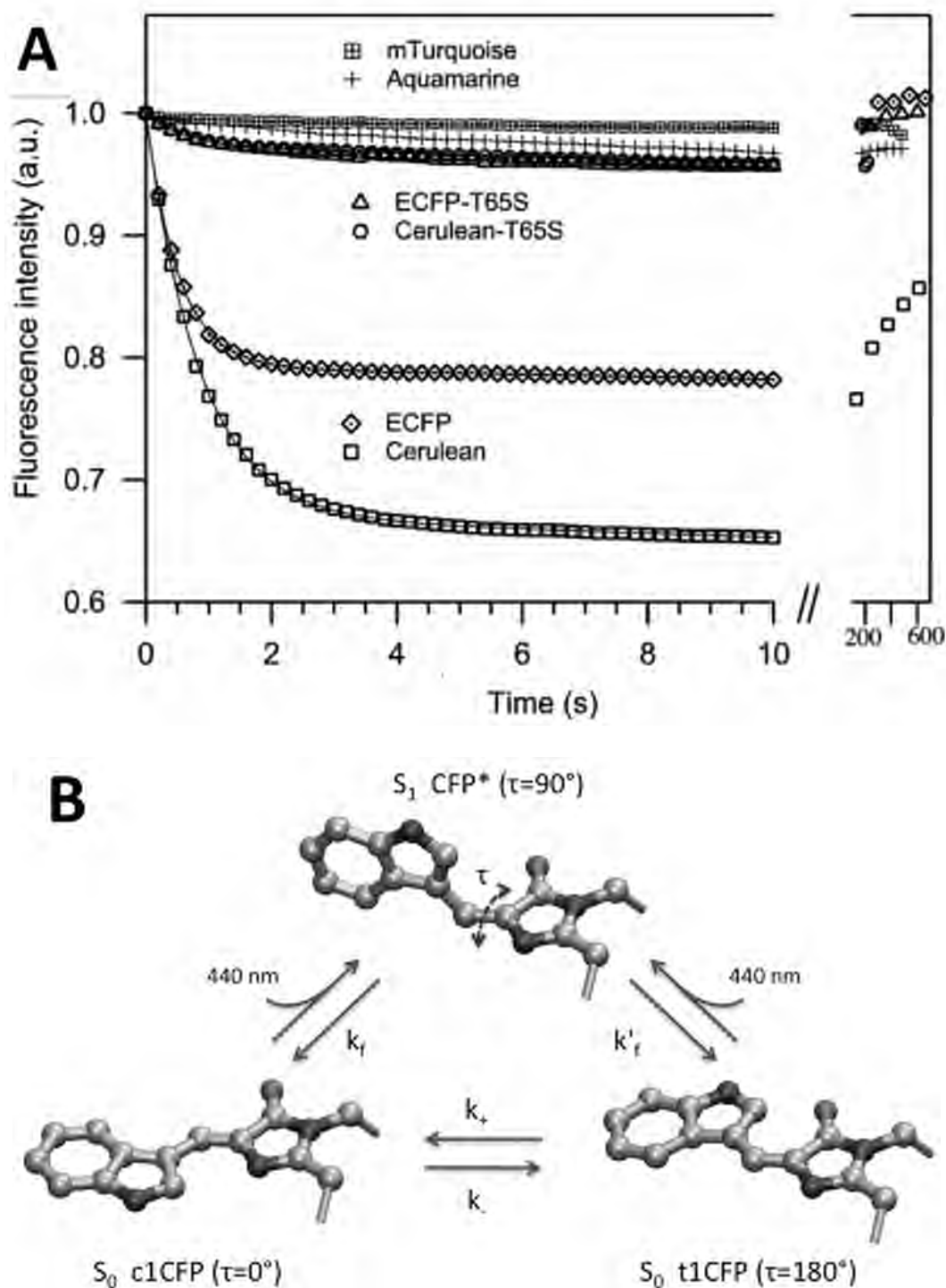


Figure 2-5: Propriétés de photocommutation réversible de la ECFP et de quelques variants.

Perte transitoire de l'intensité de fluorescence sous illumination dans le régime d'irradiance moyenne ($0.2\text{W}/\text{cm}^2$), et retour lent à l'obscurité (A). Mécanisme de photoisomérisation du chromophore CFP potentiellement responsable de la photocommutation: exemple d'isomérisation selon l'angle Tau, nomenclature des isomères d'après Voliani et al, 2008 (B). (Figures extraites de Merola et al., 2014).

A plus forte irradiance, les phénomènes de photobleaching et de photoconversion irréversibles commencent à intervenir : à $0.2\text{W}/\text{cm}^2$, la ECFP perd sa fluorescence avec un temps de demi-vie d'environ 700 s, pour 900 s pour l'Aquamarine et 1300 s pour la mTurquoise. Ceci s'accompagne d'une diminution de leur durée de vie de fluorescence, montrant la formation irréversible de photoproduits fluorescents (Erard et al., 2013).

La photocommutation des protéines fluorescentes a des applications très intéressantes pour l'imagerie à super-résolution, mais peut constituer une nuisance majeure pour la quantification des signaux de fluorescence, notamment en FRET, où ses conséquences ne sont pas encore bien évaluées. Il est intéressant de noter que ces photoréactions réversibles sont particulièrement favorisées aux pH acides, dans la EYFP et la Citrine comme dans la ECFP (Sinnecker et al., 2005a).

2.1.5 La TagRFP : un accepteur de FRET intéressant pour les protéines cyan ?

La forte sensibilité au pH des protéines fluorescentes jaunes, notamment en présence de concentrations physiologiques en chlore, a déjà été à l'origine de plusieurs controverses dans l'interprétation des réponses cellulaires de divers biosenseurs codés génétiquement (Schwarzländer et al., 2011). Après l'amélioration récente des CFP et l'obtention de variants complètement insensibles au pH (ainsi qu'à d'autres paramètres environnementaux), il serait souhaitable d'obtenir des améliorations similaires pour leurs accepteurs. Un programme d'ingénierie des protéines fluorescentes jaunes a été lancé au laboratoire. Dans l'immédiat, nous avons pu identifier dans la littérature une protéine fluorescente susceptible de fonctionner comme un bon accepteur de la CFP, et présentant une très bonne stabilité en pH : la TagRFP (Merzlyak et al., 2007). L'utilisation de cette protéine couplée à l'Aquamarine dans un biosenseur FRET permettrait de faire une première « preuve de concept », et d'évaluer les conséquences de l'utilisation d'une paire de protéines insensibles au pH dans le fonctionnement du biosenseur.

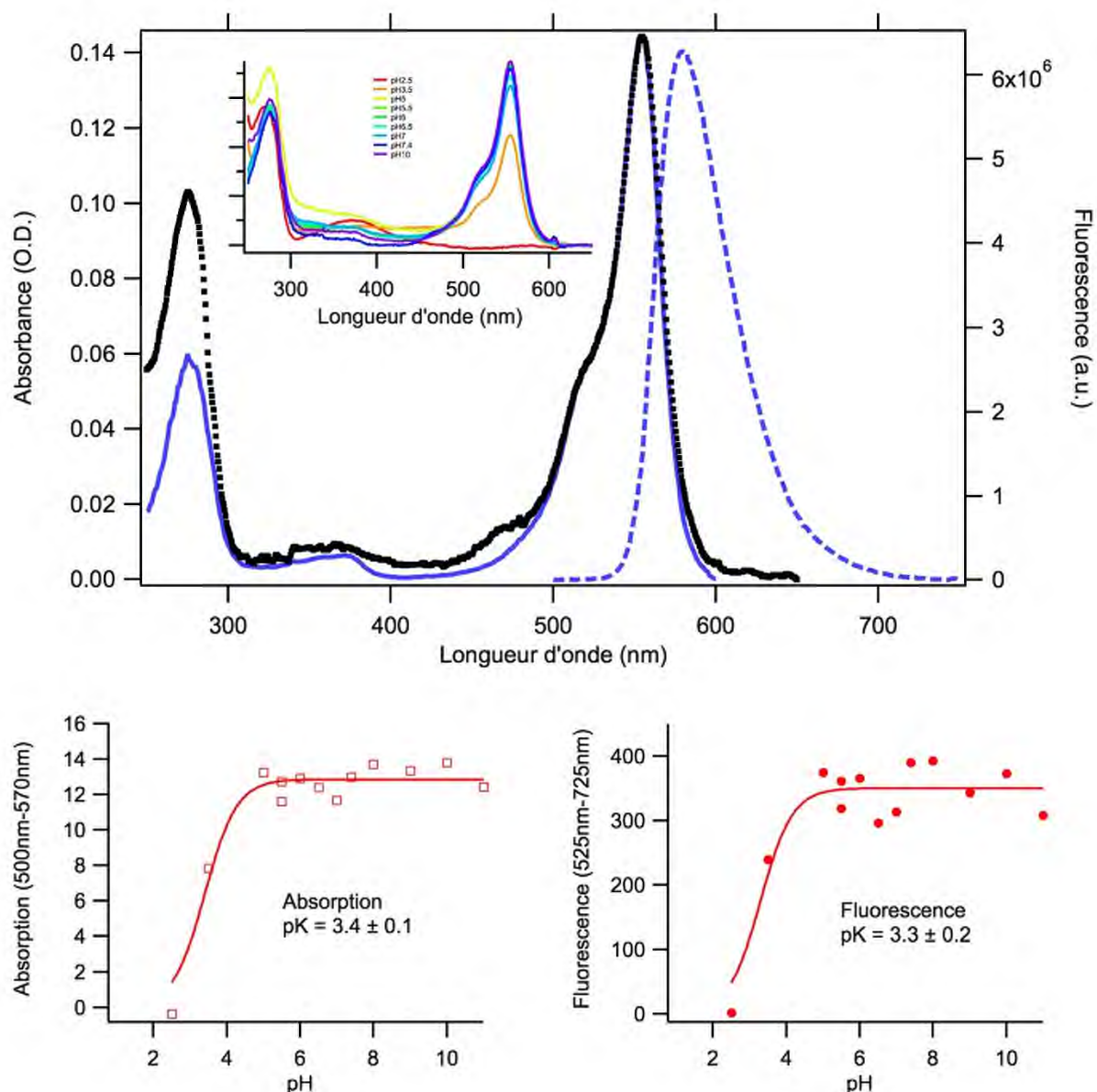


Figure 2-6: Propriétés spectrales de la TagRFP et dépendance au pH.

(A) Spectres de la TagRFP 2uM, pH 7.4, tampon MES:CAPS:Bis-Tris propane (MCBTP) 33mM, ou Citrate 50mM : spectre d'absorption (dots), spectre d'excitation pour une émission à 580 nm (bleu, continu), spectre d'émission pour une excitation à 555 nm (bleu, tirets); insert: modifications du spectre d'absorption en fonction du pH. L'aggrégation transitoire de la protéine purifiée aux alentours de pH 5 provoque une perte de transmittance par diffusion dans tout le domaine UV : néanmoins, aux pH acides supérieurs à 3.5, on ne constate pas d'apparition du pic d'absorption à 450 nm, caractéristique de la bande neutre du chromophore (Y. Tran, rapport de stage de Licence ENS, 2013). (B) Dépendance au pH de l'intensité d'absorption de la bande anion du chromophore TagRFP. (C) Dépendance au pH de l'intensité de fluorescence de la TagRFP excitée à 555nm.

Notre choix s'est orienté sur la TagRFP (Chapitre 1.5.4) qui est une protéine fluorescente monomérique orange (maximum d'absorption 555 nm, maximum d'émission 584 nm) et présente un $pK_{1/2}$ inférieur à 4 (Shaner et al., 2008). Nous avons vérifié ces caractéristiques au laboratoire, et trouvons des performances en bon accord avec les données de la littérature (Figure 2-6): en absence de chlore, l'intensité d'absorption de la bande anion de la TagRFP à 555 nm diminue avec un $pK_{1/2} = 3.4$. La fluorescence diminue suivant la même transition (Figure 2-6), et n'est accompagnée d'aucune déformation spectrale, montrant que la sensibilité au pH de la TagRFP résulte essentiellement, comme pour les protéines jaunes, d'une protonation de son chromophore à pH acide. L'effet du chlore sur les propriétés optiques de la TagRFP n'a pas encore été étudié. Par ailleurs, nous avons déterminé que la TagRFP purifiée présente une photostabilité comparable à celle de l'Aquamarine (demi-vie de blanchiment d'environ 900s sous une illumination de $0.2W/cm^2$), et des propriétés de photocommutation réversible modérées (5 à 15% de perte transitoire et réversible d'intensité de fluorescence).

En raison du déplacement vers le rouge du spectre d'absorption de la TagRFP, le recouvrement spectral avec l'émission des CFP n'est pas aussi bon qu'avec les YFP. Néanmoins, grâce au coefficient d'absorption élevé de la TagRFP, la distance caractéristique de Förster pour le couple CFP-TagRFP est de 47 Å, voisine de celle du couple CFP-YFP (49 Å): l'efficacité du transfert d'énergie reste donc comparable pour ces deux couples de fluorophores. Ce déplacement vers le rouge permet aussi de réduire considérablement la proportion d'excitation directe de l'accepteur et de « bleedthrough » du donneur dans le canal « Accepteur » 2 en ratiométrie. En principe, d'après l'Equation (1.18), ceci devrait augmenter l'amplitude de réponse du ratio R_{FRET} lors de variations de l'efficacité de FRET E_{FRET} , et donc augmenter la dynamique et la sensibilité des mesures ratiométriques.

2.2. Variations induites par le pH dans un système FRET

2.2.1 Etude FLIM de tandems cytosoliques en fonction du pH

La sensibilité au pH des protéines fluorescentes cyan et jaunes portées par la plupart des biosenseurs FRET est largement établie *in vitro*. Néanmoins, il n'existe pas d'étude visant à évaluer les conséquences de ces phénomènes sur les mesures de FRET en cellule vivante. Pour aborder ces questions, nous avons construit tout d'abord des « tandems » FRET couplant une CFP et une YFP via une courte chaîne peptidique de 27 acides aminés (Grailhe et al., 2006). Nous avons exprimé ces constructions modèles dans le cytosol de cellules BHK (Baby Hamster Kidney) et nous avons étudié leurs durées de vie de fluorescence par FLIM lors de changements imposés du pH cytosolique. Pour modifier le pH du cytosol, nous avons utilisé une méthode déjà validée dans la littérature et bien maîtrisée par notre équipe (Erard et al., 2013; Poëa-Guyon et al., 2013), basée sur l'emploi d'un ionophore, la nigrécine (qui est un antiporteur H^+/K^+), et de tampons extracellulaires ajustés aux différents pH. Nous avons ensuite mesuré par FLIM la durée de vie de fluorescence de la protéine cyan pour une série de pH compris entre pH 5 et pH 8. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans la Figure 2-7.

En ce qui concerne la ECFP et l'Aquamarine exprimées seules dans le cytosol, les résultats sont qualitativement conformes à ceux attendus pour les protéines fluorescentes purifiées: à pH neutre, la durée de vie de fluorescence de la ECFP est de 2.45 ± 0.04 ns ($n=5$), tandis que celle de l'Aquamarine est de 3.97 ± 0.04 ns ($n=26$), des valeurs proches de celles mesurées sur les mêmes protéines purifiées à pH neutre ou dans le cytosol d'autres cellules (Erard et al., 2013; Grailhe et al., 2006; Villoing et al., 2008). La durée de vie de la ECFP diminue aux pH acides, tandis que celle de l'Aquamarine reste approximativement inchangée sur toute la gamme des pH étudiés (3.91 ns $\pm$ 0.06 ns). Cependant, la diminution de la durée de vie de la ECFP cytosolique aux pH acides intervient à des pH plus élevés ($pK_{ECFP}=6.3 \pm 0.2$) que pour la protéine en solution.

Nous avons ensuite étudié un tandem porteur de la ECFP et d'une EYFP mutée en position 66 (Y66A). Cette mutation consiste au remplacement de la Tyrosine 66 par une Alanine et supprime la majeure partie du système conjugué responsable des propriétés optiques de la protéine. Il n'y a plus ni absorption, ni émission de fluorescence par la YFP, qui devient incapable de jouer son rôle d'accepteur de FRET avec la protéine cyan. La construction obtenue ECFP-EYFP(Y66A) nous permet tout d'abord d'analyser l'impact de l'intégration de la ECFP dans le tandem sur ses propriétés, et d'autre part nous fournit le contrôle dit « donneur seul » nécessaire pour une quantification de l'efficacité de FRET selon l'Equation 1.10 (Grailhe et al., 2006). La durée de vie de fluorescence de la ECFP dans cette construction contrôle (2.46 ± 0.07 ns, $n=24$) est identique dans les barres d'erreur à celle de la ECFP cytosolique, et évolue avec le pH de façon très similaire (Figure 2-7). Une fois encore, le pK de transition est significativement plus élevé que pour la ECFP purifiée ($pK_{1/2} = 6.10 \pm 0.07$).

A pH 7.4, la durée de vie de fluorescence de la ECFP dans le tandem complet ECFP-EYFP (1.67 ± 0.11 ns, $n=20$) est clairement diminuée par rapport au contrôle ECFP-EYFP(Y66A), ce qui permet de calculer une efficacité de FRET de 32% dans cette construction, en bon accord avec des déterminations antérieures (Grailhe et al 2006). De façon étonnante, la durée de vie de fluorescence dans le tandem ECFP-EYFP change très peu lorsque le pH diminue, avec une durée de vie de 1.59 ± 0.05 ns ($n=6$) mesurée à pH 4.9 (Figure 2-7). Néanmoins, une comparaison avec la construction contrôle montre qu'à ce pH, l'efficacité de FRET est pratiquement nulle.

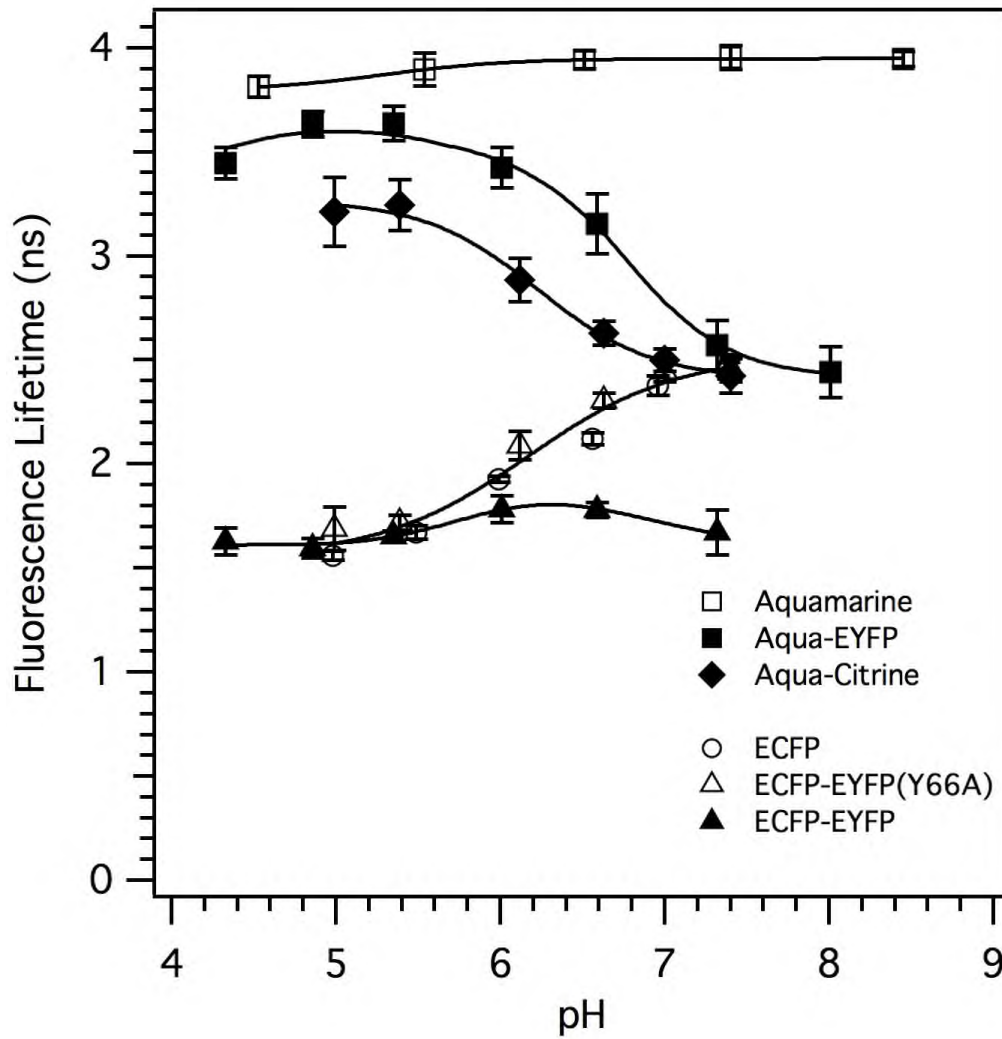


Figure 2-7: Variations de la durées de vie de fluorescence de la ECFP et de l'Aquamarine exprimées seules ou en tandems dans le cytosol de cellules BHK, en fonction du pH cytosolique.

Les durées de vie ont été déterminées par FLIM à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, le pH étant modifié par des changements du milieu extracellulaire en présence de nigéricine (voir Matériels et Méthodes). Chaque point est une moyenne de 6 à 15 mesures sur des cellules différentes.

A pH neutre, la durée de vie de l'Aquamarine est de $2,57 \pm 0,12$ ns ($n=22$) dans le tandem Aqua-EYFP et de $2,42 \pm 0,08$ ns ($n=15$) dans le tandem Aqua-Citrine, soit des efficacités de FRET de 35% et 39% respectivement. Le comportement en pH de ces tandems porteurs d'un donneur Aquamarine est remarquablement différent de celui de ECFP-EYFP (Figure 2-7). Cette fois, la durée de vie de fluorescence du donneur dépend fortement du pH, avec une augmentation marquée aux pH acides. Si l'on admet que l'Aquamarine dans ces tandems se comporte comme l'Aquamarine cytosolique (le contrôle Y66A n'a pas été fait dans ce cas), cette dépendance en pH peut être raisonnablement attribuée à la réponse en pH de la protéine jaune. De fait, la transition se situe à des pH plus acides dans le cas de la Citrine ($pK_{Cit}=6.23 \pm 0.10$) que dans celui de la EYFP ($pK_{EYFP}=6.72 \pm 0.09$). Dans l'ensemble, ces transitions apparaissent à nouveau déplacées vers les pH neutres par rapport à celles observées pour les protéines purifiées.

Ces résultats montrent que les réponses en pH du donneur et de l'accepteur d'un système CFP/YFP contribuent simultanément et en sens opposé à l'évolution de la durée de vie de fluorescence : lorsqu'on diminue le pH, la durée de vie de la CFP tend intrinsèquement à diminuer. Néanmoins, si l'absorption de l'accepteur jaune diminue dans le même domaine de pH, et si le niveau de FRET à pH neutre est significatif, ceci va au contraire conduire à une augmentation de la durée de vie du donneur aux pH acides, par suppression du FRET. Les deux mécanismes peuvent éventuellement se compenser, conduisant à une apparente stabilité de la durée de vie de fluorescence (cas du tandem ECFP-EYFP).

2.2.2 Modélisation des effets de pH dans les tandems FRET

Des simulations de la durée de vie de fluorescence $\tau_{DA}(\text{pH})$ à différents pH ont été faites sur la base du modèle posé en Introduction (chapitre 1.3.2) pour décrire les propriétés en FLIM du tandem ECFP-EYFP et des tandems Aquamarine-EYFP/Citrine. Le résultat de ces simulations est présenté sur la Figure 2-8. Le comportement du donneur cyan est modélisé en prenant en compte les informations apportées par l'étude des constructions contrôles « donneur seul », et une série de pK est testée pour l'accepteur jaune. Dans le cas du tandem ECFP-EYFP, nous avons testé des pK_A s de l'accepteur successivement inférieurs, proches, puis supérieurs à celui du donneur ($pK_D=6.2$): quand $pK_A < pK_D$, la durée de vie du donneur passe par un minimum lorsque le pH diminue, tandis que lorsque $pK_A > pK_D$, on observe au contraire un maximum. Dans le cas d'un donneur comme Aquamarine avec un $pK_D=3.3$ très acide, on a toujours $pK_A > pK_D$ et donc un maximum marqué est observé dans tous les cas.

L'ensemble de ces simulations donne des résultats très similaires aux données expérimentales obtenues, avec néanmoins un écart théorie-expérience plus important aux pH acides.

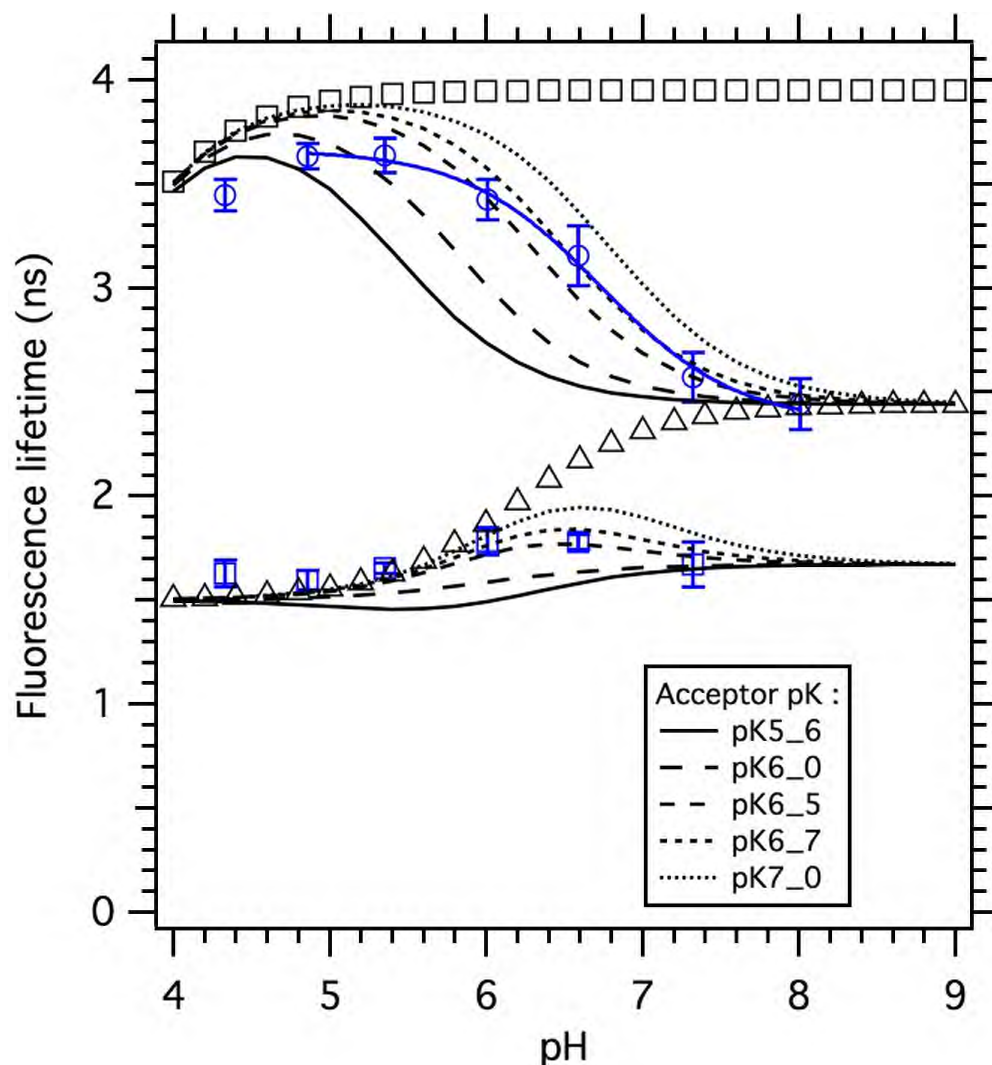


Figure 2-8: Simulations numériques des durées de vie de fluorescence du donneur dans un système FRET à différents pH.

Les propriétés du donneur seul, obtenues par fit des données expérimentales de la Figure 2-7, sont représentées par des triangles (ECFP) et des carrés noirs (Aquamarine). Différents pKs de l'accepteur compris entre 5.6 et 7.0 ont été testés (lignes continues et discontinues). Les données expérimentales obtenues pour ECFP-EYFP (carrés bleus) et pour Aquamarine-EYFP (cercles bleus) sont reproduites pour mémoire de la Figure 2-7. Tous les paramètres utilisés pour les simulations sont précisés dans la Table S2 de Betolngar et al.

2.3. Propriétés des biosenseurs AKAR

Comme nous le présentions en introduction, le biosenseur AKAR est particulièrement intéressant car c'est un biosenseur capable de mesurer l'activité de la protéine kinase AMPc dépendante, un centre d'intérêt majeur car cette protéine fait partie de la machinerie de régulation de la cascade de signalisation AMPc/PKA que l'on trouve dans tous les types cellulaires et qui est impliquée dans une large variété de processus physiologiques.

Notre travail s'est donc orienté vers l'étude détaillée du mécanisme de fonctionnement du biosenseur AKAR. Pour cela, la caractérisation photophysique approfondie des protéines fluorescentes isolées, ou insérées dans un tandem FRET ne suffit pas : il est nécessaire d'étudier le comportement de ces mêmes protéines dans le biosenseur lui-même. Nous avons vu également que ces propriétés peuvent être modifiées par l'environnement cellulaire, avec par exemple un déplacement des transitions en pH. C'est pourquoi une analyse photophysique du biosenseur directement dans les conditions cellulaires où il est normalement utilisé semble l'approche la plus pertinente.

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord caractérisé les propriétés des biosenseurs AKAR2.2 et AKAR4 non modifiés exprimés dans des cellules BHK (Chapitre 2.3). Dans le chapitre suivant, nous avons introduit l'Aquamarine en donneur dans AKAR2.2 (Chapitre 2.4.1), et nous avons ensuite remplacé son accepteur jaune par la TagRFP (Chapitre 2.4.2). La comparaison de ces différentes constructions, appuyée sur des modélisations photophysiques et l'étude de divers contrôles, fournit des informations précieuses sur les mécanismes de réponses du biosenseur.

2.3.1 Réponses d'AKAR à l'activation de la voie AMP_c/PKA

Dans un premier temps, nous allons présenter les réponses ratiométriques des versions ^{CFP}AKAR^{Citrine} (AKAR2.2) et ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4) à l'activation de la voie AMP_c/PKA. Puis toujours en ratiométrie nous soumettrons ces biosenseurs à des pH intracellulaires acides proches de ceux observés dans certains compartiments intracellulaires. Nous étudierons également les conséquences de ces changements de pH sur la durée de vie de fluorescence du donneur mesuré en FLIM en absence d'activation. Nous avons également étudié une construction contrôle ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} « donneur seul » dans laquelle la Citrine de AKAR2.2 a été mutée dans son chromophore.

a. Réponses ratiométriques de AKAR2.2 et AKAR4

Le biosenseur AKAR est utilisé pour détecter l'activation de la protéine kinase AMP_c dépendante (PKA) en cellule vivante. L'activation expérimentale de cette kinase est obtenue via l'utilisation de la Forskoline (FSK) et du 3-Isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) (voir la partie Matériel et Méthodes pour plus de détails sur le protocole expérimental.) La FSK active les adénylate cyclases et augmente donc la quantité d'AMP_c intracellulaire ; l'IBMX est un inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases dont le rôle est la dégradation des molécules d'AMP_c. L'utilisation combinée de ces deux drogues nous permet d'analyser la dynamique de réponse maximale des biosenseurs AKAR au sein de chaque cellule analysée. Un des biosenseurs AKAR les plus utilisés est la version ^{CFP}AKAR^{Citrine} (AKAR2.2), il comporte un des couples de protéines fluorescentes les plus répandus parmi les biosenseurs actuellement disponibles. Nous allons comparer sa réponse à la FSK et à l'IBMX avec celle d'un des derniers biosenseurs AKAR conçus : ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4). La Cerulean est spectralement identique à la ECFP, tandis que la cpVenus est une forme permutée circulairement de Venus, un variant jaune spectralement très similaire à la Citrine.

Les filtres utilisés pour les expériences de FRET ratiométrique sont présentés sur la Figure 2.9. Un filtre d'excitation centré sur la bande d'absorption de la CFP permet l'excitation de la fluorescence dans l'échantillon, et la fluorescence émise est tout d'abord filtrée par un filtre dichroïque rejetant la lumière d'excitation et laissant passer toutes les

longueurs d'ondes >450nm. Ensuite, deux filtres d'émission sont utilisés pour collecter alternativement la fluorescence du « donneur » (F480) et la fluorescence de « l'accepteur » (F535). La superposition des spectres d'absorption et d'émission de la CFP et de la Citrine montre que le canal F480 correspond bien à une détection exclusive de l'émission du donneur, alors que le canal F535 est une superposition de fluorescences du donneur (« bleedthrough ») et de l'accepteur (excité directement ou via le FRET).

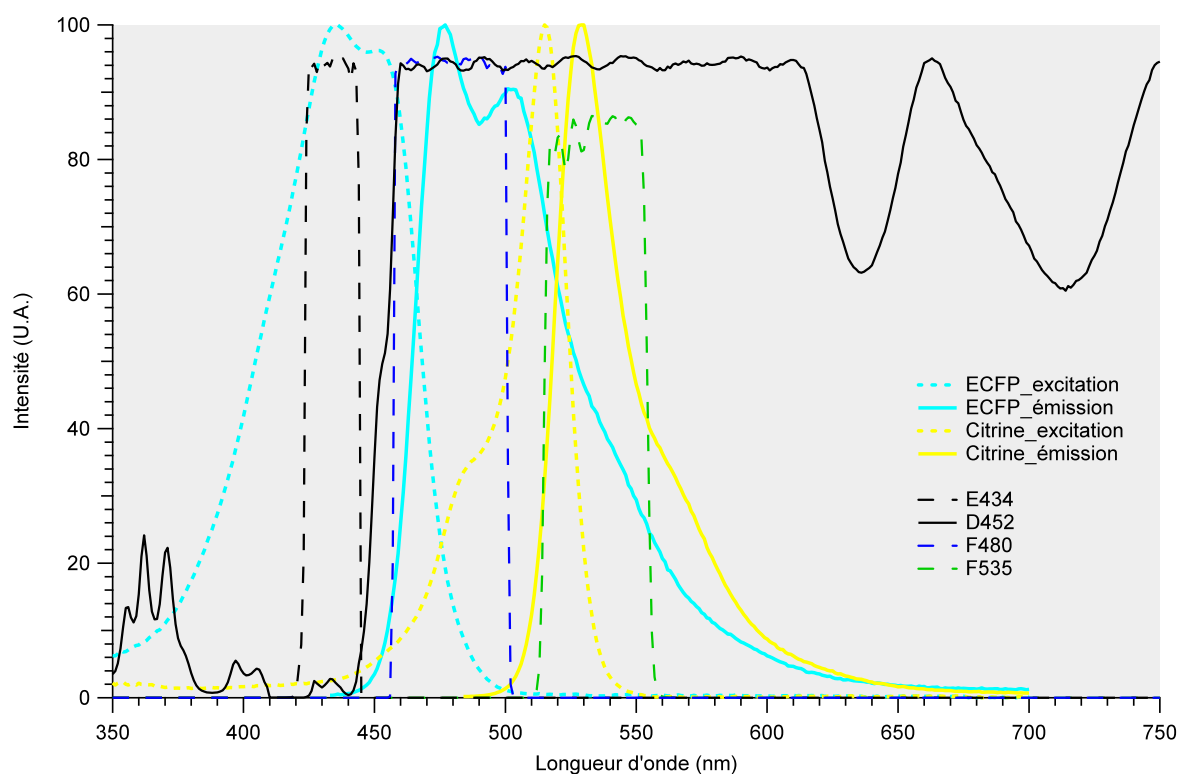


Figure 2-9: Filtres utilisés en ratiométrie pour la mesure de la fluorescence de la CFP et de la Citrine.

A cause de la proximité des spectres d'émission de la FCP et de la Citrine, à travers le filtre F535 nous mesurons les signaux de fluorescence provenant des deux protéines fluorescentes étudiées.

Dans une expérience type d'activation d'AKAR en ratiométrie (figure 2-10), nous pouvons identifier trois étapes différentes. La première consiste à déterminer le signal ratiométrique basal du biosenseur, c'est-à-dire en absence d'activateur artificiel de la voie AMPc/PKA, et à attendre qu'il se stabilise (de $t=-5$ min à $t=0$ min). Le signal ratiométrique est directement calculé à partir des mesures d'intensité de fluorescence des protéines donneur et accepteur contenues dans AKAR. On observe donc souvent un ratio stable alors que les deux signaux de fluorescence subissent encore des variations. Ces variations peuvent être observées à tout moment de l'expérience et dans la majorité des cas, elles ne traduisent pas

un évènement impliquant la cascade de signalisation cellulaire mais ont pour origine un léger décalage du focus des images, ou une variation du volume cellulaire qui modifierait la concentration des biosenseurs dans la cellule et donc les niveaux d'intensité de fluorescence mesurés. En réajustant le focus nous modifions les signaux d'intensités mesurés, cela se retrouve sur les traces d'intensités (par exemple à t=4 min sur les panels **a** et **b**) mais pas dans le signal ratiométrique (à t=4 min sur le panel **c**) grâce à son mode de calcul qui compense ces petites fluctuations. Pour obtenir un signal ratiométrique basal exploitable l'étape de mesure des signaux de base dure environ 5 min pendant laquelle des acquisitions des intensités de fluorescence des deux protéines fluorescentes du couple FRET sont faites toutes les 30 secondes.

La deuxième étape est celle d'activation de la voie AMPc/PKA par utilisation de la FSK et d'IBMX (de t=0 min à t=5 min sur la figure 2-10). Le setup est construit de façon à ce que l'échantillon analysé soit sous perfusion pour avoir un renouvellement permanent du milieu d'observation. Différents milieux sont préparés à l'avance dont celui contenant les deux drogues d'activation maximale de la voie AMPc/PKA ; après l'étape de stabilisation, il suffit de modifier la perfusion pour faire passer ce milieu sur les cellules. La réaction au changement de perfusion est visible après quelques minutes, temps nécessaire pour que la nouvelle solution de perfusion parvienne jusqu'à l'échantillon : les intensités de fluorescence des deux protéines fluorescentes ainsi que le signal ratiométrique sont modifiés. Au bout de 2 à 3 minutes, le ratio atteint un plateau correspondant à la dynamique de réponse maximale de l'AKAR étudié. Tant que le milieu de perfusion contient de la FSK et de l'IBMX ce plateau se maintient.

Pour déterminer si la réponse du biosenseur étudié est réversible, il est nécessaire de passer à la troisième étape qui est celle de lavage. Pour déclencher cette troisième étape il suffit de rebasculer la perfusion vers le milieu d'observation initial ne contenant ni FSK, ni IBMX. Dans le cas des biosenseurs à réponse réversible, on va alors observer une nouvelle modification des signaux d'intensité et le signal ratiométrique retrouve son niveau basal. Le retour du ratio au niveau basal ne se déclenche pas immédiatement au début de l'étape de lavage : on observe encore le plateau pendant 5 à 8 min puis le ratio baisse progressivement.

Le retour est relativement lent et cette étape peut durer 15 à 20 min pendant lesquelles les phosphatases agissent.

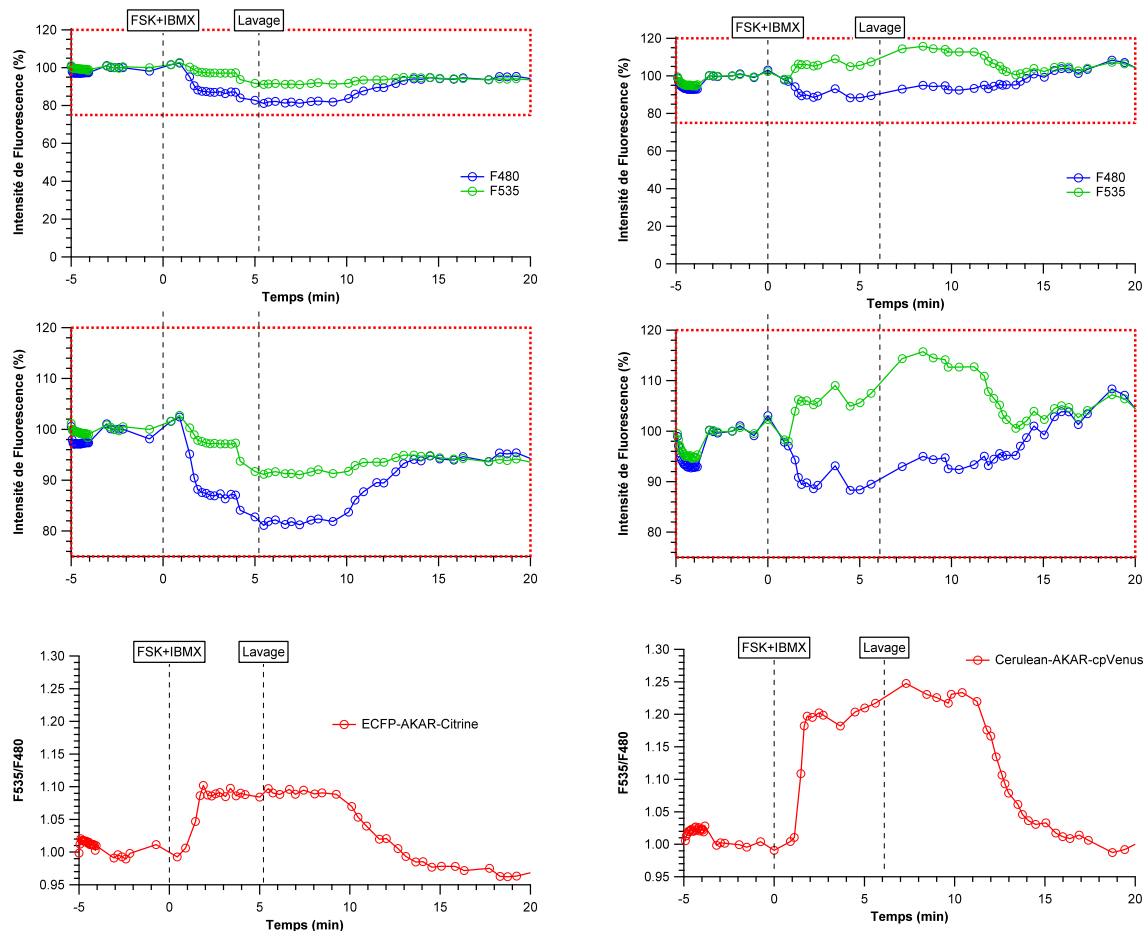


Figure 2-10: Comparaison des réponses de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ (a, b et c) et de $^{Cerulean}AKAR^{cpVenus}$ (d, e, f) à une activation par la forskoline en ratiométrie (2012-06-20e et 2012-06-21e)

Sur les panels a et b on peut observer à t=4min une chute simultanée des signaux mesurés dans les canaux F480 et F535. Cet évènement est provoqué par une modification du focus de l'objectif pendant l'acquisition et constitue typiquement le genre d'accident que la ratiométrie permet de corriger. En effet le signal ratiométrique à cet instant ne subit aucun changement car à cet instant la chute des signaux de fluorescence n'est pas provoquée par une modification de l'activité de la PKA.

Dans le cas de ^{CFP}AKAR^{Citrine}, l'intensité de fluorescence mesurée (panels **a** et **b**) dans le canal F480 (traces bleues) baisse de $-12,2\% \pm 3,2\%$ et celle mesurée dans le canal F535 (traces vertes) baisse également de $-3,7\% \pm 2,9\%$. Ces variations ont pour conséquence une augmentation du signal ratiométrique de $+9,3\% \pm 0,8\%$ (n=6) (panel **c**). Pour ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus}, l'intensité de fluorescence mesurée (panels **d** et **e**) dans le canal F480 (traces bleues) baisse de $-12,8\% \pm 4,1\%$ et celle mesurée dans le canal F535 (traces vertes) augmente de $+9,0\% \pm 5,1\%$, donnant une augmentation du signal ratiométrique de $+21,2\% \pm 4,9\%$ (n=7) (panel **f**). On remarque que ces amplitudes de réponse sont notablement inférieures à celles rapportées par Zhang et al (Depry et al., 2011; Dunn et al., 2006), ce qui peut être dû à des différences de protocole expérimental (voir Discussion au Chapitre 2.3.3). Nous avons notamment observé que l'amplitude de réponse du biosenseur est d'autant plus grande que le niveau d'expression du biosenseur dans la cellule est élevé.

b. Étude FLIM des propriétés basales de AKAR2.2 et AKAR4

Les durées de vie de fluorescence des donneurs cyan dans les biosenseurs AKAR ont été mesurées par FLIM avec le microscope BIFLUOR, à 20°C, en conditions de pH physiologique et en absence d'activation de la voie AMPc/PKA. Pour cela, les images FLIM (Figure 2-11) sont collectées dans des conditions minimales d'illumination : les mesures se font dans le noir et l'échantillon est illuminé le moins possible en dehors des phases d'acquisitions de données. (voir le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes).

La durée de vie de fluorescence de la CFP mesurée dans le biosenseur ^{CFP}AKAR^{Citrine} (AKAR2.2) dans son état basal est de $1,92 \text{ ns} \pm 0,05 \text{ ns}$ (n=12). Pour rappel, nous avons mesuré une durée de vie de $2,46 \text{ ns} \pm 0,07 \text{ ns}$ pour la ECFP dans le tandem cytosolique CFP-Cit(Y66A). Nous avons également construit et étudié une version d'AKAR dépourvue d'accepteur, ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)}. La durée de vie de fluorescence mesurée pour cette construction cytosolique est de $2.37 \pm 0,03 \text{ ns}$ (n=5), ce qui permet de calculer une efficacité de FRET basal de 19% dans le biosenseur AKAR2.2.

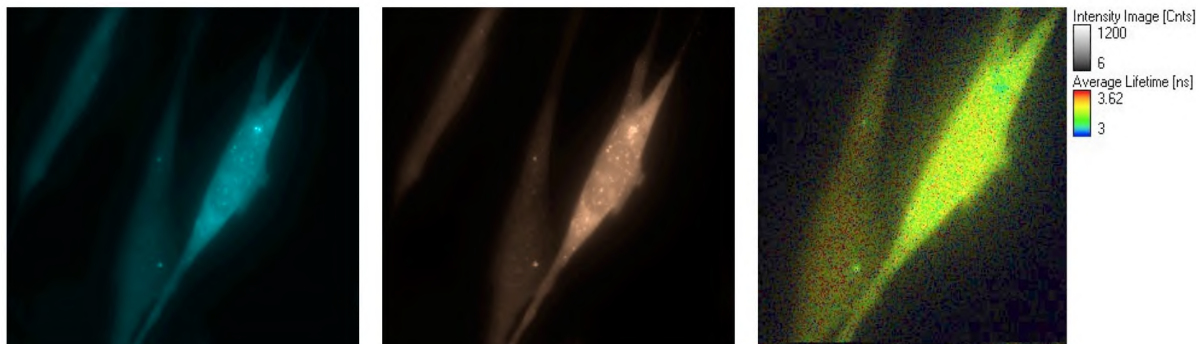


Figure 2-11 : Exemple d'images de cellules BHK réalisées sur le microscope BIFLUOR.

Cellules BHK exprimant le biosenseur Aqua-AKAR-TagRFP (voir Chapitre 2.4.3). Lors des expériences sur BIFLUOR nous réalisons tout d'abord des images d'intensités grâce à la caméra du microscope (à gauche fluorescence de l'Aquamarine, au milieu fluorescence de la TagRFP, niveaux de gris en fausses couleurs). Ces images permettent de quantifier les concentrations intracellulaires en fluorophore. Des mesures de durées de vie de fluorescence du donneur cyan sont réalisées ensuite par TCSPC et balayage laser sur le même champ d'observation, pour reconstituer l'image FLIM (à droite). Cette image composite représente la durée de vie de fluorescence moyenne, estimée en chaque pixel par un algorithme rapide, et codée par une échelle de couleurs pondérée par l'intensité totale de fluorescence en chaque pixel. Les durées de vie moyennes présentées dans les figures de ce manuscrit sont obtenues en intégrant tous les photons collectés dans des régions d'intérêt suffisamment étendues pour générer un déclin de quelques millions de coups. La durée de vie moyenne est alors obtenue à partir d'une analyse multiexponentielle de ce déclin, comme décrit au chapitre 4.3.1.

Dans le biosenseur ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4), la durée de vie de fluorescence de la Cerulean est de $2,26 \text{ ns} \pm 0,08 \text{ ns}$ ($n=17$), ce qui est cohérent avec la durée de vie de fluorescence en principe plus élevée de la Cerulean (Rizzo et al., 2004a). En admettant que la Cerulean non quenchée dans AKAR4 cytosolique a la même durée de vie de fluorescence que la Cerulean purifiée (nous n'avons pas fait le contrôle Y66A), soit 3.06 ns (Erard et al., 2013), ceci permet d'estimer le niveau de FRET basal à 26% dans AKAR4.

Il s'est avéré impossible de détecter une variation significative de la durée de vie de fluorescence de la CFP lors de tentatives d'activation d'AKAR2.2 par la forskoline et l'IBMX sur le microscope BIFLUOR. Ceci peut être attribué à plusieurs causes. Tout d'abord, la variation de FRET (et donc de durée de vie) induite par l'activation du biosenseur est peut-être trop faible pour être détectable dans la précision de nos mesures (l'incertitude relative sur nos mesures de durée de vie en cellule étant d'environ 5%). Ensuite, l'absence sur BIFLUOR de système de perfusion permettant la modification du milieu d'incubation sans intervention mécanique rend ces expériences d'activation très délicates. Notamment, en raison du pipetage manuel du milieu d'incubation, il est très difficile de réaliser des images FLIM successives pour les 3 phases de l'activation (signal basal, signal activé, signal retour) sur le *même* individu cellulaire, comme c'est le cas en routine sur le montage ratiométrique de Pierre Vincent à Jussieu. Pour réussir ces expériences, il serait souhaitable à l'avenir d'équiper BIFLUOR avec une chambre de perfusion. Enfin, nous avons vu que l'amplitude de réponse du biosenseur en ratiométrie varie d'une cellule à l'autre, et diminue fortement dans les cellules à faible niveau d'expression. Afin d'éviter le phénomène de FRET de proximité, et garantir une parfaite reproductibilité des mesures FLIM, le protocole expérimental sur BIFLUOR met en œuvre une pré-sélection des cellules à faible niveau d'expression (voir Matériels et Méthodes), ce qui va conduire à sélectionner une sous-population donnant des réponses FRET diminuées.

c. Discussion : les différents mécanismes de réponse d'AKAR

L'activation du biosenseur AKAR2.2 conduit à une diminution de -12% environ du signal donneur, tandis le signal du canal « accepteur » diminue légèrement de -4%. Au contraire, l'activation d'AKAR4 conduit à une diminution de -13% du signal donneur et une augmentation de +9% du signal « accepteur ». Nous avons vu en Introduction (Chapitre 1.2.3) qu'en raison de contributions multiples, le signal dans le canal accepteur peut effectivement dans certains cas diminuer, alors même que le niveau de FRET augmente (Equation 1.16). Il est en principe possible d'estimer, à l'aide des Equations 1.15, 1.16 et 1.17 les variations relatives d'intensité attendues dans chacun des deux canaux lors d'une modification du niveau de FRET.

Tout d'abord, pour observer une *diminution* dans le canal accepteur alors que le FRET augmente, il faut que le terme $[f_{AD}*(\Phi_A/\Phi_D)-1]$ soit négatif (Equation 1.16), f_{AD} étant le recouvrement relatif des spectres normalisés de fluorescence du donneur et de l'accepteur dans le canal « accepteur », et Φ_A/Φ_D le rapport de leurs rendements quantiques de fluorescence. A partir des rendements quantiques (Griesbeck et al., 2001), Betolngar et al), et des spectres de fluorescence des protéines ECFP et Citrine purifiées, on obtient les estimations $f_{AD} \approx 3.65$, et $\Phi_A/\Phi_D=0.76/0.37 \approx 2.0$, soit $f_{AD}*(\Phi_A/\Phi_D) \approx 7.50$. Sachant que la durée de vie de fluorescence de la CFP, et donc en principe son rendement quantique, ne sont pas significativement modifiés dans le biosenseur dans son état basal, en comparaison de la ECFP cytosolique ou purifiée, un terme $[f_{AD}*(\Phi_A/\Phi_D)-1]$ négatif impliquerait, soit que le rendement quantique de la Citrine dans AKAR cytosolique soit très anormalement bas ($\Phi_A < 0.1$ environ), soit que la Citrine ou la CFP ont subi des perturbations spectrales majeures suite à leur incorporation dans le biosenseur. Une forte diminution du rendement quantique de la Citrine dans AKAR, si elle résulte d'un quenching dynamique, devrait être accompagnée par une diminution similaire de sa durée de vie de fluorescence qui pourrait être évaluée par FLIM: cette expérience de contrôle reste à faire. D'autre part, nos premiers résultats d'analyse spectrale n'indiquent pas de perturbation majeure des spectres d'émission de la CFP et de la Citrine dans le biosenseur cytosolique non activé, par rapport aux protéines cytosoliques ou purifiées.

L'Equation 1.17 (rappelée ci-dessous) permet d'aller plus loin, en calculant la variation relative attendue dans le canal « accepteur » pour une variation relative donnée dans le canal donneur, dans le cas d'un simple changement de FRET :

$$\frac{\Delta I_2}{I_2} = -\frac{\Delta I_1}{I_1} \times \frac{(1 - E_{FRET}^0)}{\left(E_{FRET}^0 + \frac{B}{A}\right)}$$

avec

$$\frac{B}{A} = \frac{\left(f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D}\right) \frac{OD_A}{OD_D} + 1}{f_{AD} \frac{\Phi_A}{\Phi_D} - 1}$$

Ce calcul nécessite, outre les valeurs de f_{AD} et Φ_A/Φ_D , une connaissance du niveau initial de FRET, E_{FRET}^0 , ainsi qu'une estimation des absorbances relatives OD_A/OD_D . Dans le cas de AKAR2.2, nous avons déterminé $E_{FRET}^0=19\%$ par FLIM, et à partir des spectres d'absorption des protéines purifiées, en supposant une stœchiométrie 1:1 entre donneur et accepteur, nous obtenons $OD_A/OD_D \approx 7\%$. Ces estimations permettent de calculer qu'en principe, une diminution de 12% du signal donneur devrait s'accompagner d'une augmentation de 23% du signal dans le canal « accepteur » de AKAR2.2.

Un calcul similaire, mais probablement encore plus approximatif, est possible pour AKAR4, dont le niveau de FRET basal est estimé à $E_{FRET}^0=26\%$. Si l'on admet que la cpVenus présente des propriétés photophysiques similaires à la Citrine, et sachant que la Cerulean est spectralement quasi-identique à la CFP, mais présente un rendement quantique de 0.67 (Fredj et al., 2012a), on a $f_{AD} \approx 3.65$ et $OD_A/OD_D \approx 7\%$ inchangés, tandis que $\Phi_A/\Phi_D = 0.76/0.67 \approx 1.13$. Dans ces conditions, une diminution de 13% de l'intensité du donneur devrait être accompagnée d'une augmentation de 14% de l'intensité dans le canal « accepteur », ce qui est approximativement compatible avec nos observations expérimentales ($+9\% \pm 5\%$).

Les Equations 1.16 et 1.17 ont été dérivées sans poser d'hypothèse concernant la stœchiométrie relative du donneur et de l'accepteur, néanmoins, le rapport OD_A/OD_D a été ensuite calculé en supposant une stœchiométrie 1:1. Cette hypothèse suppose une expression et une maturation complète et simultanée des deux protéines fluorescentes dans le biosenseur, et l'absence de protéolyse significative ultérieure, des points qui ne sont pas encore clairement établis pour la plupart des constructions FRET codées génétiquement. Un déficit en donneur pourrait réduire la réponse au FRET dans le canal « accepteur » en augmentant le rapport OD_A/OD_D , (Equation 1.17), mais ne peut en aucun cas conduire à une variation *négative* de l'intensité dans ce canal en réponse à une augmentation de FRET (Equation 1.16). D'un autre côté, un déficit en accepteur devrait conduire, en diminuant le rapport OD_A/OD_D , à une variation relative plus importante, au contraire, dans le canal « accepteur »: ainsi, dans la limite où OD_A/OD_D tendrait vers 0, et en supposant tous les autres paramètres inchangés pour AKAR2.2, la variation relative attendue dans le canal « accepteur » deviendrait +28%. Le comportement particulier d'AKAR2.2, caractérisé par une réponse faible ou négative dans le canal accepteur, ne peut donc pas s'expliquer par une stœchiométrie relative du donneur et de l'accepteur significativement différente de 1:1.

Ces différentes considérations suggèrent donc fortement que, dans le cas particulier de AKAR2.2, une partie importante de la réponse à la forskoline du biosenseur ne résulte pas d'une variation de FRET et que des perturbations photophysiques majeures sont intervenues dans la CFP ou la Citrine lors de l'activation. Il est possible par exemple que la fluorescence intrinsèque de la CFP subisse, pendant l'activation, une forte extinction par un mécanisme indépendant du FRET. Un tel mécanisme pourrait être établi par l'étude en FLIM et en ratiométrie de l'activation du biosenseur contrôle AKAR2.2(Y66A). L'analyse spectrale du biosenseur dans ses états basal et activé permettrait également d'établir le facteur spectral f_{AD} dans ces deux conditions, et directement sur la construction AKAR en cellule, et donc d'affiner la modélisation des signaux ratiométriques.

2.3.2 Effets du pH sur les signaux d'AKAR

a. Sensibilité au pH du signal ratiométrique de AKAR2.2

Nous avons ensuite étudié la sensibilité des signaux ratiométriques des biosenseurs AKAR2.2 et AKAR4 à des variations du pH cytosolique. Dans ces expériences, les traces ratiométriques des biosenseurs sont suivies comme pour une expérience d'activation (Chapitre 2.3.1), tandis que le milieu d'incubation est modifié à l'aide de tampons de différents pH en présence de l'ionophore nigéricine, comme pour les études de tandems en fonction du pH (Chapitre 2.2.1). La Figure 2-12 présente les traces enregistrées sur les deux biosenseurs lors de sauts de pH entre pH 7.4 et pH 5 environ.

Pour $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ (AKAR2.2) nous avons constaté que le passage de pH 7.4 à pH 5 provoquait une diminution très importante et quasi-simultanée des intensités mesurées à 480nm et 535nm (Figure 2-12, colonne de gauche). Les diminutions observées sont de $-55,5\% \pm 9,9\%$ pour la CFP et de $-70,7\% \pm 4,7\%$ ($n=3$) pour la Citrine (Figure 2-12). Elles ont lieu très peu de temps après la modification du pH du milieu d'observation. La conséquence sur le signal ratiométrique est une diminution moyenne de $-36,0\% \pm 6,5\%$ ($n=9$). Des expériences identiques de modification du pH cytosolique ont été réalisées sur des cellules exprimant un tandem ECFP-Citrine. De façon similaire à ce qui est observé pour AKAR2.2, le signal ratiométrique diminue de $-40\% \pm 5\%$ environ ($n=18$) (données non présentées).

b. Sensibilité au pH du signal ratiométrique de AKAR4

Les résultats d'expériences de changement de pH faites sur ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4) sont présentés sur la figure 2-12 (colonne de droite). On observe lors du passage à pH 5,27 une baisse moyenne d'intensité de fluorescence dans le canal 480nm de $-52,4\% \pm 11,0\%$ ainsi qu'une baisse plus importante dans le canal 535nm de $-71,7\% \pm 6,7\%$. Le signal ratiométrique présente alors une variation de $-31,6\% \pm 8,1\%$ ($n=12$), et le retour à un pH physiologique s'accompagne d'une augmentation des intensités de fluorescence et du signal ratiométrique à des niveaux proches des niveaux de départ. Les changements d'intensité et de ratio en réponse aux sauts de pH sont nettement plus lents que dans le cas de AKAR2.2, particulièrement dans le canal à 480 nm correspondant à la fluorescence de la Cerulean. Ceci pourrait résulter d'une relaxation lente de la Cerulean aux pH acides, qui a déjà été décrite antérieurement (Malo et al., 2007). Cette relaxation, caractérisée par un temps de réponse de 50 min à température ambiante, pourrait être due à un processus d'isomérisation pH-induit de son chromophore (Malo et al., 2007).

c. Réponses transitoires au pH du signal ratiométrique de la CFP dans AKAR2.2

Dans AKAR2.2, on observe de façon systématique, des variations transitoires très rapides du ratio (Figure 2-12) juste après chaque changement de pH. Des réponses transitoires similaires sont observées lorsqu'un changement de pH est appliqué sur un biosenseur contrôle ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} dépourvu d'accepteur (Figure 2-13): après le passage à pH 5,02, les signaux de fluorescence baissent dans les deux canaux d'environ $-70\% \pm 5\%$ dans le canal 480nm et de $-71\% \pm 6\%$ dans le canal 535nm ($n=2$), tandis que signal ratiométrique baisse transitoirement, puis retourne à son niveau basal alors que le pH du milieu est toujours acide. Lorsqu'on repasse au pH physiologique, nous observons à nouveau une augmentation transitoire du ratio. Ces variations transitoires du signal ratiométrique reflètent des perturbations spectrales transitoires de la CFP en réponse au pH, qui modifient le rapport des intensités de sa fluorescence collectées respectivement dans le canal à 535nm et dans le canal à 480nm.

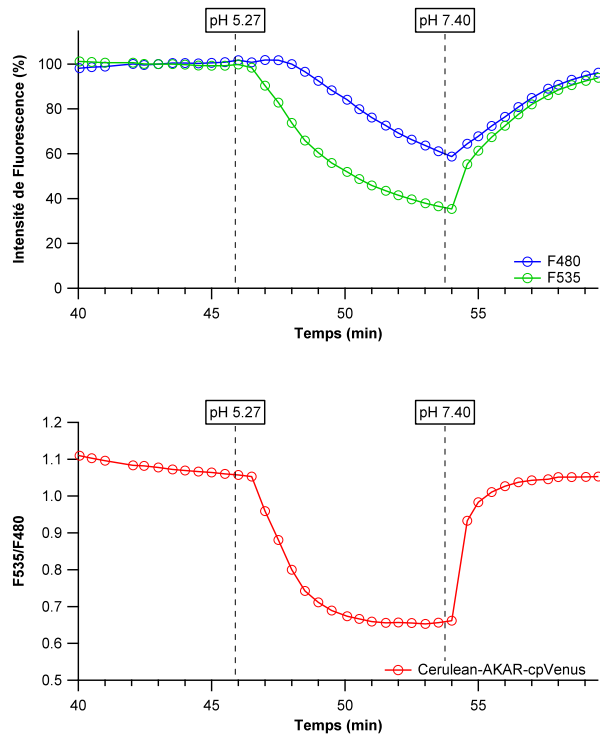
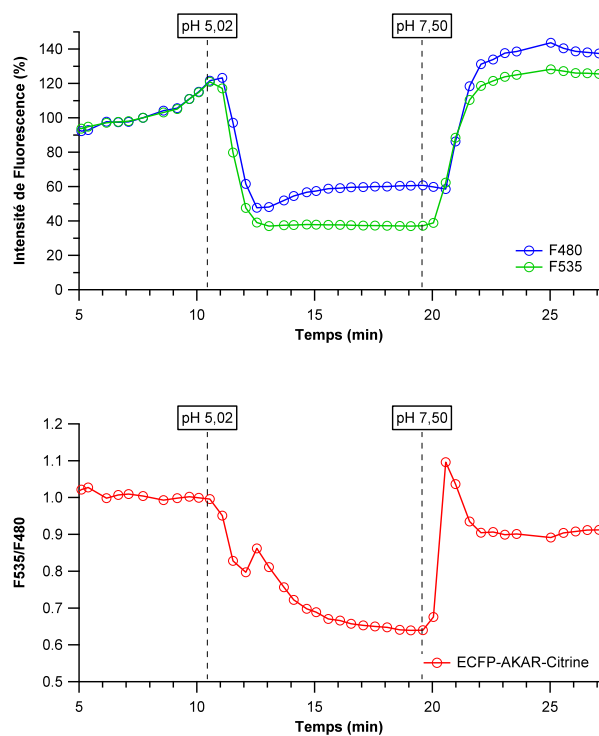


Figure 2-12: Traces représentatives des réponses de ^{CFP}AKAR^{Citrine} (2014-02-28m) à un passage à pH acide en ratiométrie et de ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (2013-12-20q) à un passage à pH acide en ratiométrie

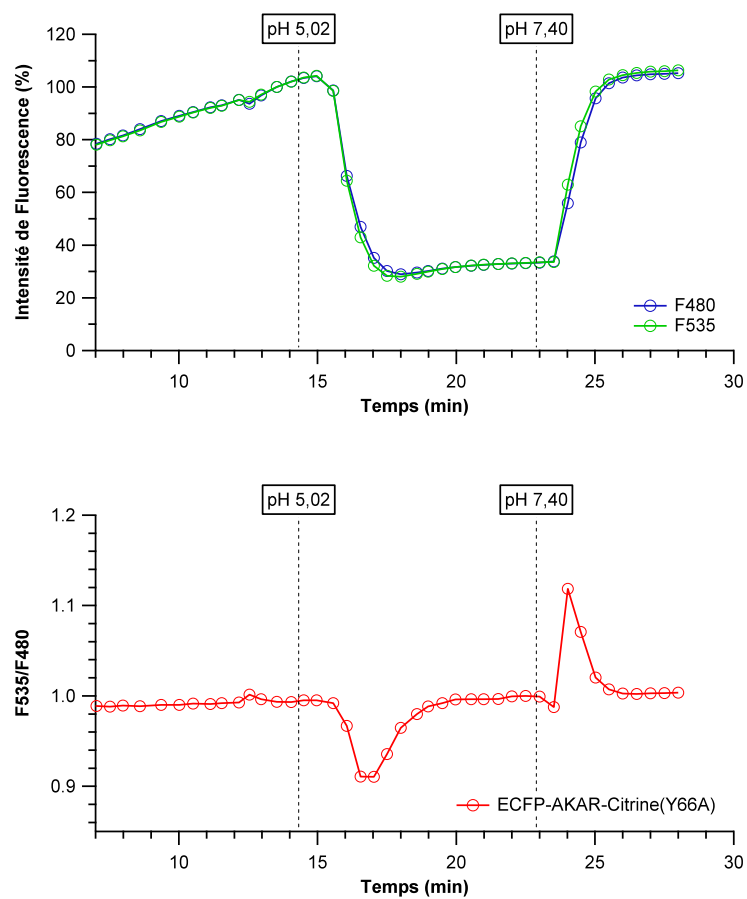


Figure 2-13: Traces représentatives de la réponse de ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} à un passage à pH acide en ratiométrie (2014-02-27o)

Plus précisément, il s'agirait d'un déplacement transitoire vers le bleu lors de l'acidification, et d'un déplacement transitoire vers le rouge lors de la neutralisation du pH. On notera que la réponse à des sauts de pH similaires d'un tandem ECFP-Cit(Y66A) est différente : si l'on observe bien également une forte baisse de l'intensité de fluorescence dans les deux canaux, la trace ratiométrique *augmente* de façon durable d'environ +10% (n=2) pendant toute la durée du passage à pH 5.0, indiquant cette fois un déplacement net du spectre d'émission de la ECFP vers le rouge (données non présentées). Ce résultat est en bon accord avec les déplacements spectraux vers le rouge observés pour la protéine ECFP purifiée à pH acide (Fredj et al., 2012a).

Les variations transitoires rapides observées dans les traces ratiométriques d'AKAR2.2 reflètent donc des réponses intrinsèques et spécifiques de la CFP portée par ce biosenseur à pH acide.

2.3.3 Discussion des résultats et choix du biosenseur à modifier

Dans ce chapitre nous avons constaté que la réponse ratiométrique de AKAR2.2 et AKAR4 à l'activation de la voie AMPc/PKA provient de très faibles variations des niveaux de fluorescence mesurés dans les canaux F480 et F535, de l'ordre d'environ 10%. De plus, les variations correspondantes de la durée de vie de fluorescence du donneur dans ^{CFP}AKAR^{Citrine} n'ont pas pu être détectées en FLIM, ce qui montre que ce biosenseur va être très difficile à exploiter avec ce mode de détection. Enfin, l'acidification du pH cytosolique conduit à des perturbations majeures et réversibles, des signaux de fluorescence et du signal ratiométrique des biosenseurs, avec des diminutions de l'ordre de 50%-70% pour les intensités de fluorescence et de 30% pour le signal ratiométrique. Enfin, nous avons mis en évidence un mode de fonctionnement particulier du biosenseur AKAR2.2 qui ne serait pas simplement basé sur des variations de FRET, et qui reste à comprendre.

Il est important de noter que les expériences d'activation des biosenseurs AKAR présentent une très forte variabilité, notamment des réponses entre individus cellulaires. Les causes de cette variabilité sont mal comprises actuellement, et probablement multiples. Notamment, dans toutes nos mesures d'activation, et ce quel que soit le biosenseur étudié, nous avons observé des réponses ratiométriques beaucoup plus importantes dans les cellules où les niveaux de fluorescence étaient les plus intenses. D'autres facteurs peuvent être sources de variabilité, certains liés au biosenseur lui-même comme d'éventuelles différences de maturation entre le donneur et l'accepteur, et d'autres liés à la machinerie cellulaire, comme par exemple les niveaux d'activités de la PKA et des phosphatases.

Les forts changements de signaux ratiométriques observés lors d'un passage à pH acide montrent que le pH peut-être une source de perturbation majeure dans l'emploi de ces biosenseurs. Ces fortes perturbations sont observées également dans un tandem ECFP-Citrine, et résultent très probablement des dépendances en pH intrinsèques de l'ECFP, de la Citrine, de la Cerulean et de la cpVenus, décrites par différents points de demi-transition ou $pK_{1/2}$. Pour tenter d'améliorer les caractéristiques du biosenseur AKAR il serait souhaitable

d'y introduire un couple de protéines fluorescentes insensibles au pH et capables d'interagir par FRET: les protéines Aquamarine et TagRFP qui, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, sont toutes les deux insensibles au pH dans les plages que l'on peut retrouver en cellules vivantes. L'utilisation de ce couple apportera un autre avantage : du fait d'une meilleure séparation spectrale il y aura moins de « bleedthrough » de la fluorescence du donneur dans le canal de l'accepteur.

L'analyse de l'ensemble des données de ratiométrie suggère que le fonctionnement et les performances des biosenseurs AKAR reposent sur des mécanismes complexes. Pour comprendre ces mécanismes, nous avons choisi de procéder à des modifications progressives et contrôlées d'un biosenseur de référence, en analysant étape par étape les conséquences de chaque modification. La protéine Aquamarine étant obtenue par la mutation minimale de la ECFP (ECFP-T65S-H148G), nous avons choisi d'introduire ces deux mutations dans le biosenseur ^{CFP}AKAR^{Citrine} (AKAR2.2) porteur de la CFP et d'un accepteur jaune bien caractérisé, la Citrine, et d'étudier les conséquences de cette première modification sur ses propriétés. Nous avons également construit et étudié des versions contrôle ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} et ^{Aq}AKAR^{Citrine(Y66A)}, qui donnent accès au comportement du chromophore donneur dans le biosenseur et permettent de quantifier la composante de FRET.

2.4. Construction et étude de versions modifiées d'AKAR

2.4.1 Etude comparative de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ et $^{Aq}AKAR^{Citrine}$

a Signal basal du biosenseur

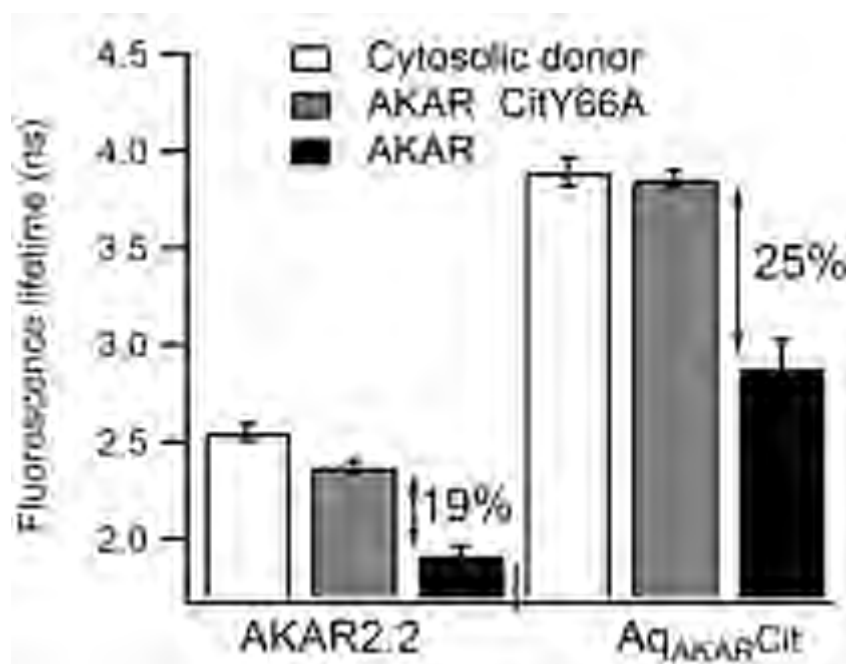


Figure 2-14 : Durées de vie de fluorescence de la CFP et d'Aquamarine dans les constructions AKAR en association avec la Citrine.

Dans les constructions contrôles dans lesquelles la Citrine a subi la mutation Y66A et rappel des durées de vie de fluorescence des protéines cytosoliques. Figure extraite de Erard et al 2013.

La figure 2-14 compare les durées de vie de fluorescence mesurées sur notre microscope dans des conditions physiologiques de pH et sans activation artificielle de la voie AMPc/PKA. Les données concernant $^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)}$ ont déjà été présentées précédemment, et conduisent à une estimation de l'efficacité de FRET de 19% dans AKAR2.2. L'insertion d'Aquamarine dans le biosenseur AKAR ne change pas significativement la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine: $3,92 \pm 0,08$ ns ($n=18$) pour la construction $^{Aq}AKAR^{Citrine(Y66A)}$ contre $3,97 \pm 0,04$ ns pour la protéine cytosolique. La durée de vie moyenne de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ est de $2,83 \pm 0,16$ ns ($n=35$). Nous obtenons ainsi 28% de FRET basal dans le cas du nouveau biosenseur $^{Aq}AKAR^{Citrine}$, soit un niveau de FRET significativement augmenté, ce qui est attendu dans le cadre de la théorie de Förster lorsque le rendement quantique de

fluorescence du donneur augmente (NB: la valeur publiée dans l'article Erard et al 2013 est légèrement différente car elle a été obtenue sur un nombre plus restreint de mesures).

b Augmentation de la photostabilité grâce à Aquamarine

Le signal ratiométrique du biosenseur $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ présente des variations significatives lorsque la fréquence de collection des images, et donc d'illumination des cellules, est modifiée (figure 2-15). Ce phénomène bien connu des utilisateurs de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ (P. Vincent, comm. personnelle) est réversible après quelques minutes au noir et résulte très probablement des propriétés de photocommutation des protéines fluorescentes portées par le biosenseur (voir Chapitre 2.1.4). Comme nous l'avons vu précédemment, le protocole d'acquisition impose parfois de modifier la fréquence de prise d'images, et les modifications induites dans les signaux de fluorescence vont contribuer à la variabilité des réponses mesurées.

L'introduction de la mutation T65S dans l'Aquamarine a permis d'améliorer la photostabilité de la protéine et de réduire fortement l'amplitude de sa photocommutation (Fredj et al., 2012a). Dans la construction $^{Aq}AKAR^{Citrine}$, le signal de fluorescence de l'Aquamarine suivi à 480nm est maintenant stable quelle que soit la fréquence d'illumination (Figure 2-15), tandis que le signal dans le canal F535 diminue encore légèrement lorsqu'on augmente la fréquence d'illumination. Néanmoins, ceci n'impacte pas significativement le signal ratiométrique, qui reste approximativement stable (Figure 2-15). Nous avons donc amélioré le biosenseur AKAR du point de vue de la photostabilité grâce aux propriétés de l'Aquamarine. Des résultats similaires ont été obtenus en introduisant la mutation T65S dans la Cerulean du biosenseur AKAR4 (données non présentées).

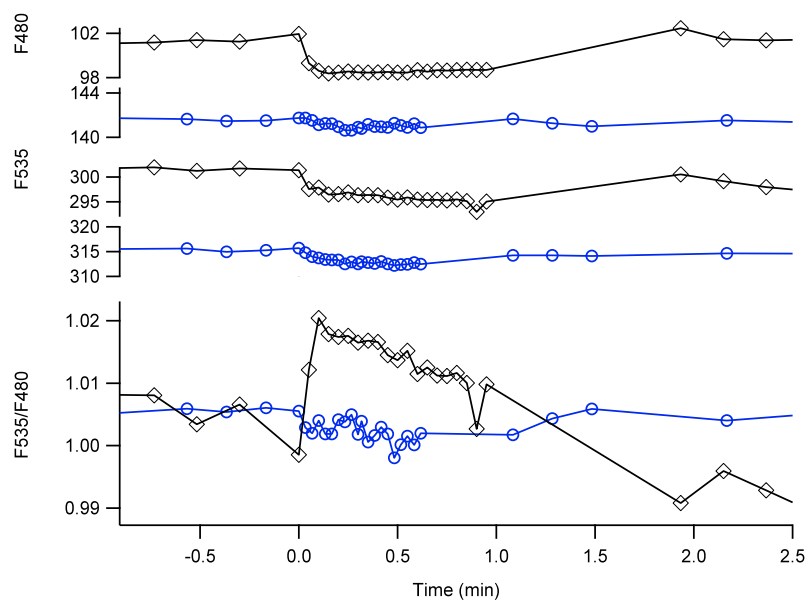


Figure 2-15 : Effet de la modification de la fréquence d'illumination sur ^{CFP}AKAR^{Citrine} (Traces noires) et sur ^{Aq}AKAR^{Citrine} (Traces bleues) (Erard et al., 2013)

c Réponses ratiométriques à l'activation

Nous avons ensuite étudié la dynamique d'activation de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ et nous l'avons comparée à celle de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$. Pour cela nous suivons les signaux dans les mêmes conditions que précédemment avant et après ajout de FSK et d'IBMX. Nous rappelons que nous avons déterminé une dynamique de réponse maximale de $+9,3\% \pm 0,8\%$ en réponse à l'activation de la voie AMPc/PKA pour le biosenseur $^{CFP}AKAR^{Citrine}$, résultant d'une diminution simultanée du signal dans les canaux F480 et F535 (Figure 2-16, colonne de droite).

Les traces représentatives d'une activation de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ par la FSK sont présentées sur la figure 2-16 (colonne de gauche): la FSK provoque à nouveau une baisse de l'intensité de fluorescence d'Aquamarine mesurée à 480nm de $-5,7\% \pm 2,6\%$. Simultanément à cette baisse, on observe une très légère augmentation de la fluorescence de la Citrine de $+0,4\% \pm 3,2\%$. Ces variations conduisent à une augmentation du ratio de $+6,4\% \pm 3,4\%$ ($n=9$). Cette réponse est réversible puisque lorsqu'on lave le milieu d'observation pour retirer la FSK et l'IBMX le signal ratiométrique diminue progressivement jusqu'à atteindre celui qu'il avait avant l'activation de la PKA.

Le biosenseur $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ est donc capable de détecter l'activité PKA avec une dynamique comparable à celle de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ aux erreurs de mesures près, et la vitesse de la réponse à l'activation de la PKA est la même pour les 2 biosenseurs. Compte-tenu des barres d'erreur, la variation du signal dans les deux canaux apparaît très similaire dans les deux biosenseurs. Selon des hypothèses équivalentes à celles utilisées pour $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ au chapitre 2.3.1, nous calculons que pour une diminution de 6% d'intensité dans le canal donneur, l'augmentation attendue dans le canal accepteur de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ serait de +5%: nous observons donc une fois encore (mais de façon moins marquée), un « déficit » d'amplitude de réponse de l'accepteur (ou un « excès » de réponse du donneur) pour cette nouvelle version du biosenseur.

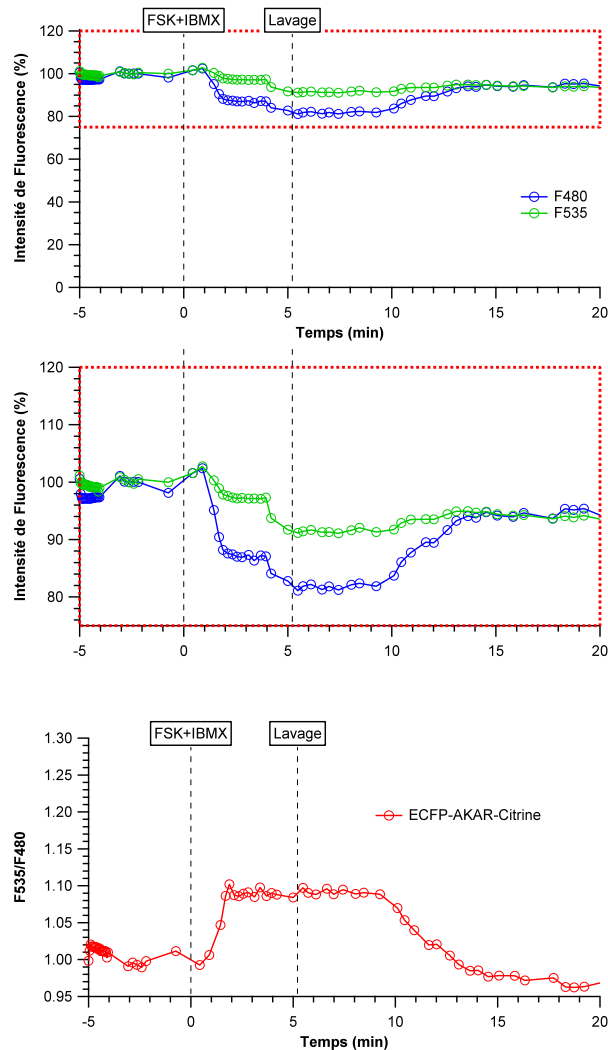
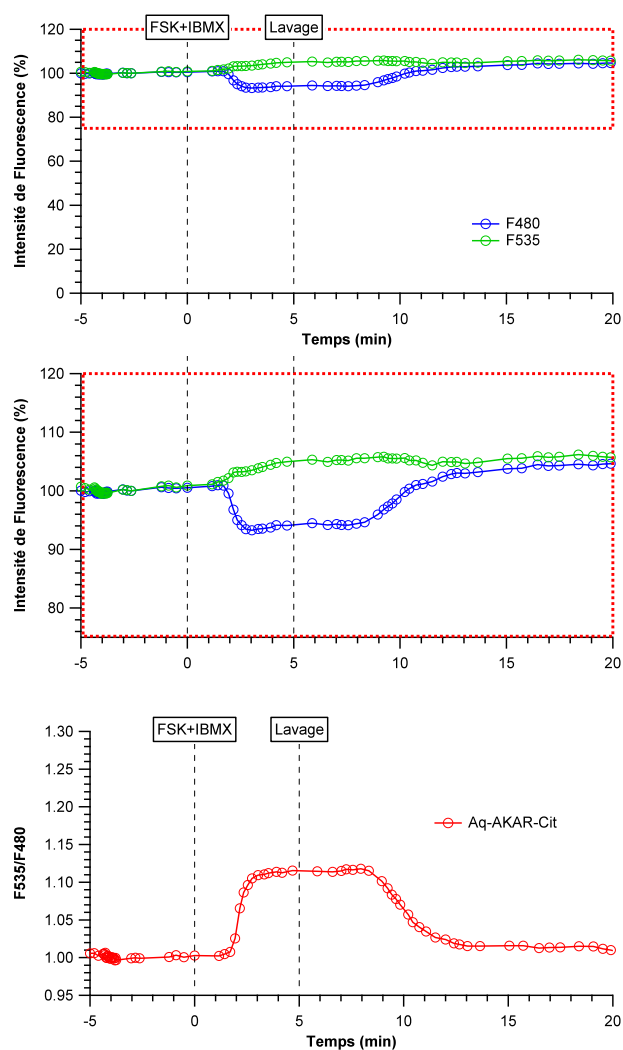


Figure 2-16 : Traces représentatives de la réponse de $AqAKAR^{Citrine}$ à une activation par la forskoline (à gauche) (2012-06-20f). A droite, rappel des résultats obtenus avec le biosenseur $ECFP-AKAR^{Citrine}$

d Etude par FLIM du niveau de FRET basal en fonction du pH

Nous avons ensuite étudié par FLIM la sensibilité au pH des biosenseurs ^{CFP}AKAR^{Citrine} et ^{Aq}AKAR^{Citrine} suivant le même protocole que celui utilisé pour les tandems (Chapitre 2.2.1). Nous avons également étudié par FLIM la sensibilité au pH de ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} et d'une version modifiée ^{Cerulean(T65S)}AKAR^{cpVenus}. En effet, nous avons montré que cette mutation ponctuelle permet de transformer la Cerulean en un donneur cyan insensible au pH et de performances équivalentes à celles de l'Aquamarine et de la mTurquoise (Fredj et al., 2012a). L'ensemble des résultats obtenus sur ces différentes versions d'AKAR et leurs contrôles « donneur seul » (Y66A) sont comparés dans la Figure 2-17.

Dans ^{CFP}AKAR^{Citrine}, la durée de vie de fluorescence de la CFP baisse fortement et rapidement de 40% entre pH 7,4 et pH 5,5 (n=13). Cette diminution est progressive et démarre dès pH 7.0. D'autre part, la construction contrôle ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} présente une diminution rapide assez similaire de 43% (n=5). Ce comportement est notablement différent de celui de la ECFP cytosolique ou de la construction tandem ECFP-Cit(Y66A) décrits précédemment (Chapitre 2.2.1). En ce qui concerne la réponse en pH de la CFP seule dans la construction ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)}, elle peut être décrite par une transition coopérative ($n_{Hill}=1.7 \pm 0.2$) centrée sur $pK_{1/2}=6.58 \pm 0.02$. Lorsque la CFP est remplacée par l'Aquamarine dans le biosenseur, les réponses au pH du système sont profondément modifiées. En absence d'accepteur (^{Aq}AKAR^{Citrine(Y66A)}), la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine est de 3.90 ± 0.03 ns sur toute la gamme comprise entre pH 8.5 et pH5, une valeur très proche de celle mesurée pour l'Aquamarine cytosolique (Chapitre 2.2.1).

Ceci montre que les propriétés photophysiques de l'Aquamarine ne sont pas sensibles à l'incorporation dans le biosenseur AKAR, et que la protéine fluorescente reste bien, en particulier, complètement insensible au pH dans les domaines physiologiques. Cependant, dans le biosenseur ^{Aq}AKAR^{Citrine}, la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine en présence de l'accepteur Citrine augmente à pH acide (Figure 2-17).

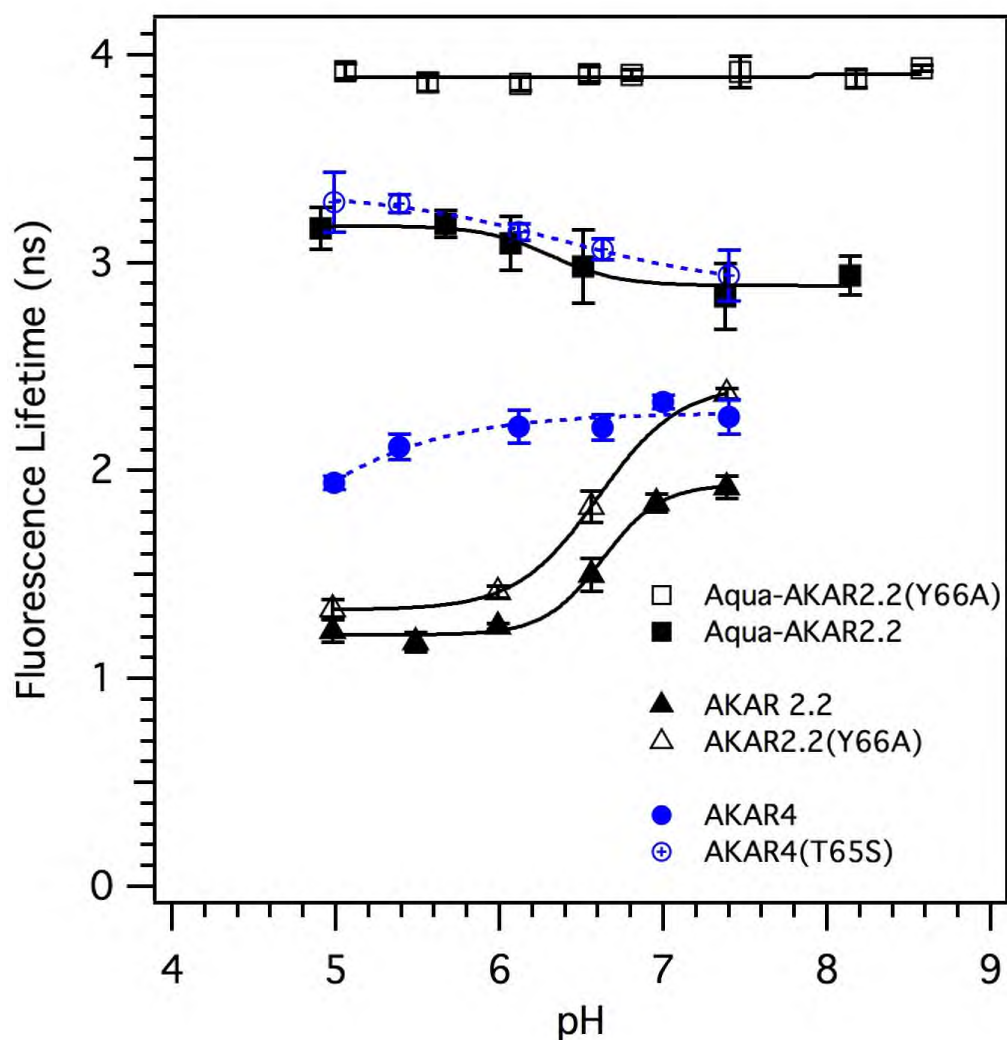


Figure 2-17 : Variations des durées de vie de fluorescence de la CFP et de l'Aquamarine dans des biosenseurs AKAR en fonction du pH cytosolique.

Les durées de vie ont été déterminées sur les biosenseurs exprimés dans le cytosol de cellules BHK, par FLIM à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, le pH étant modifié par des changements du milieu extracellulaire en présence de nigéricine (voir Matériels et Méthodes). Chaque point est une moyenne de 5 à 15 mesures sur des cellules différentes.

Ce phénomène reflète très probablement la protonation de l'accepteur et donc la sensibilité en pH de la Citrine. Néanmoins, on constate également que la durée de vie de fluorescence de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ reste très significativement réduite à pH5, relativement au contrôle $^{Aq}AKAR^{Cit(Y66A)}$, ce qui suggère qu'un niveau important de FRET persiste à ces pH acides.

Pour la construction $^{Cerulean}AKAR^{cpVenus}$ (AKAR4), le profil de la courbe des durées vie de fluorescence en fonction du pH est différent : on observe qu'entre pH 7,4 et 6,0 la durée de vie de fluorescence n'est pas significativement modifiée. Elle baisse ensuite de 6% à pH 5,4 (n=10) et de 14% à pH 5,0 (n=7). Après introduction de la mutation T65S, le comportement de $^{Cerulean(T65S)}AKAR^{cpVenus}$ (AKAR4-T65S) est très similaire à celui de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$.

2.4.2 Modélisation des effets de pH dans AKAR

a Modélisation du signal FLIM de AKAR en fonction du pH

Nous avons modélisé le comportement attendu pour la durée de vie de fluorescence du donneur CFP ou Aquamarine en fonction du pH dans AKAR2.2 dans le cadre du modèle déjà utilisé pour les tandems CFP/YFP (Chapitre 2.2.2). Les résultats pour les différentes versions de AKAR sont présentés dans la figure 2-18. La sensibilité en pH de la CFP dans AKAR2.2(Y66A) est modélisée par une transition coopérative ($n_{Hill}=1.7$) autour du $pK_D \approx 6.6$, tandis qu'une série de valeurs de $pK_{1/2}$ est testée pour l'accepteur Citrine. Ces différentes valeurs donnent des courbes modèles $\tau_{DA}(pH)$ très proches, ce qui ne permet pas de tirer de conclusion quant à la valeur du $pK_{1/2}$ de la Citrine dans le biosenseur. Dans le cas de $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ les données expérimentales ne sont pas correctement décrites par notre modèle simple, quelle que soit la valeur supposée pour le $pK_{1/2}$ de la Citrine (Figure 2-18).

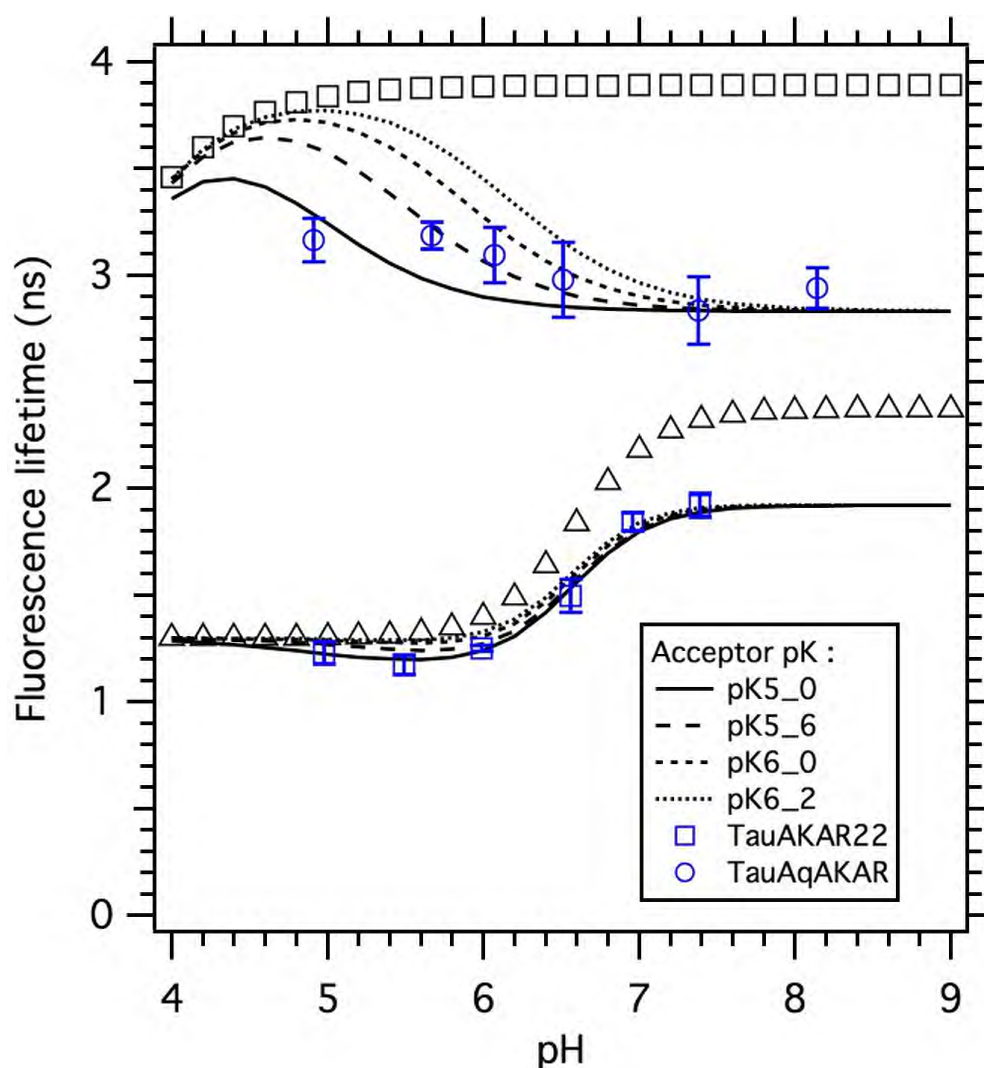


Figure 2-18 : Simulations numériques des durées de vie de fluorescence du donneur CFP ou Aquamarine de AKAR à différents pH.

Les propriétés du donneur seul, obtenues par fit des données expérimentales de la Figure 2-17, sont représentées par des triangles (CFP) et des carrés noirs (Aquamarine). Différents pKs de l'accepteur jaune compris entre 5.6 et 7.0 ont été testés (lignes continues et discontinues). Les données expérimentales obtenues $^{CFP}_{AKAR^{Citrine}}$ (carrés bleus) et $^{Aq}_{AKAR^{Citrine}}$ (cercles bleus) sont reproduites pour mémoire de la Figure 2-17. Tous les paramètres utilisés pour les simulations sont précisés dans la Table S2 de Betolngar et al.

b Modélisation du signal ratiométrique de AKAR en fonction du pH

Nous avons également tenté d'estimer l'évolution attendue du signal ratiométrique d'un biosenseur en cas d'acidification, grâce à l'extension de notre modèle développée au chapitre 1.3.4. Sur la base des Equations 1.21, 1.22 et 1.23, nous avons calculé le signal ratiométrique théorique de la paire CFP/Citrine dans AKAR2.2 à différentes valeurs de pH et pour différentes valeurs du $pK_{1/2}$ de la Citrine (Figure 2-19). Ces simulations montrent que dans l'ensemble, une forte baisse du signal ratiométrique est attendue dans tous les cas aux pH acides. Cependant, la réponse ratiométrique peut dans certains cas évoluer de façon complexe, et non-monotone en fonction du pH (voir courbe correspondant à $pK_A = 5.0$ sur la Figure 2-19).

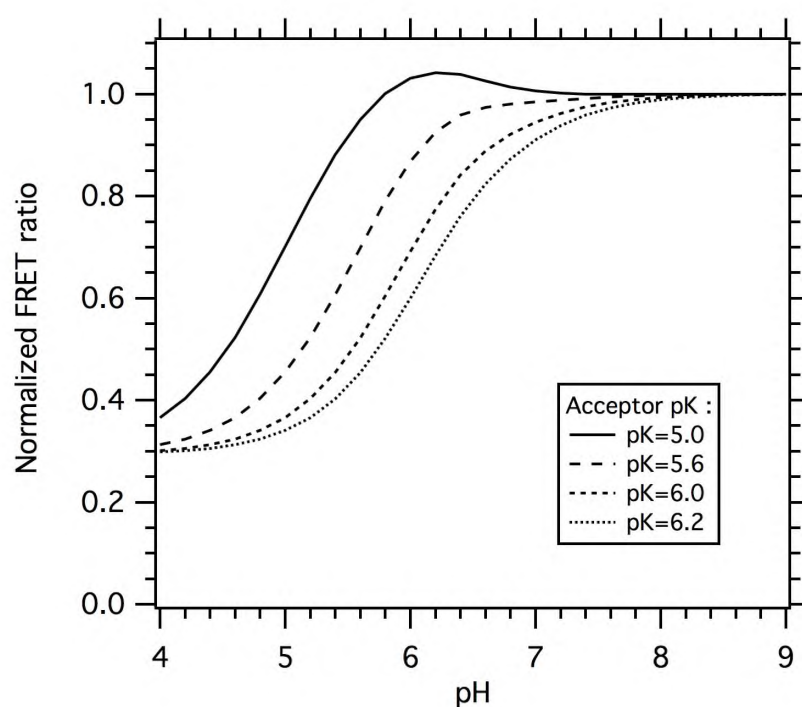


Figure 2-19 : Simulations numériques du signal ratiométrique de $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ (AKAR2.2) en fonction du pH. Le modèle décrit au Chapitre 1.3.4 a été utilisé. Différents pKs de l'accepteur jaune compris entre 5.0 et 6.2 ont été testés (lignes continues et discontinues). Tous les paramètres expérimentaux utilisés pour ces simulations sont précisés dans la Table S2 de Betolngar et al.

c Comparaison théorie-expérience et discussion des effets de pH

Dans nos différentes simulations (FLIM ou ratiométrie), le meilleur accord théorie-expérience est obtenu en supposant que le pK de la Citrine dans le biosenseur est devenu très acide, proche de 5. Une première explication pourrait être que l'insertion de la Citrine dans le biosenseur AKAR conduit à des perturbations majeures de l'équilibre de protonation de son chromophore. Cependant, une stabilisation aussi marquée de la forme anionique du chromophore, en dessous du pK mesuré pour la protéine purifiée en absence de chlore (5.6), est un phénomène qui n'a jamais été observé pour aucune autre protéine fluorescente jaune. De plus, cette interprétation paraît peu compatible avec l'observation que le pK de la Citrine est au contraire fortement déplacé vers les pH neutres (6.2) dans notre tandem cytosolique (Figure 2-7). Une autre explication pourrait être que des phénomènes plus complexes et distincts du simple équilibre de protonation de la Citrine interviennent à pH acide.

Nous avons déjà noté dans le cas des tandems que l'accord théorie-expérience devenait moins satisfaisant aux pH acides (Chapitre 2.2.2). La fiabilité de nos simulations est certainement moins bonne dans ces conditions, où un certain nombre des hypothèses et des approximations posées devraient être reconsidérées (voir Chapitre 1.3.1). Il faudrait aussi prendre en compte la difficulté particulière des expériences de mesures de durée de vie à ces pH acides (voir Matériels et Méthodes), notamment en raison des faibles signaux de fluorescence et de la plus grande photosensibilité des protéines fluorescentes à ces pH. Néanmoins, nous avons mis en place des protocoles expérimentaux censés éliminer ces sources d'erreur (voir Matériels et Méthodes).

Il est important aussi de rappeler que les réponses cellulaires lors d'une acidification générale et non physiologique du cytosol à pH 5 restent largement inconnues : outre des modifications importantes et évidentes de la morphologie cellulaire, on constate dans le cas de l'expression du biosenseur la formation réversible de granules fluorescents très intenses (suggérant une ségrégation du biosenseur dans des compartiments ou organites de dégradation). Ces granules disparaissent en grande partie lorsque le pH est rétabli à une

valeur neutre. Le phénomène n'a pas été détecté dans le cas des tandems. En raison de la très haute densité en fluorophore dans ces régions, la formation de ces granules pourrait conduire à l'apparition d'une contribution de FRET de proximité (Grailhe et al., 2006), c'est à dire un FRET *intermoléculaire* entre les biosenseurs ou tandems. Une autre explication possible pourrait être un changement de conformation du biosenseur induit par les pH acides, conduisant à une augmentation du niveau de FRET *intramoléculaire*.

Dans les deux cas, cette contribution supplémentaire de FRET, en diminuant la durée de vie du donneur et en augmentant le signal ratiométrique du biosenseur aux pH acides, pourrait rendre compte de l'écart actuel entre notre modèle et les résultats expérimentaux. L'étude d'un biosenseur équipé d'une paire de fluorophores complètement insensible au pH pourrait contribuer à mieux mettre ce phénomène en évidence.

d Conséquences des effets de pH sur l'utilisation d'AKAR

On notera que suivant le biosenseur et le mode de détection employé pour suivre les réponses cellulaires (FLIM ou ratiométrie), les observations (et les conclusions) vont sensiblement différer en présence d'une acidification locale : la baisse du signal ratiométrique des biosenseurs à pH acide pourra être interprétée comme un « faible » niveau de FRET, alors que la diminution de la durée de vie de fluorescence aux mêmes pH dans le cas de ^{CFP}AKAR^{Citrine} (AKAR2.2) sera interprétée au contraire comme un niveau de FRET « élevé ».

L'étude de versions contrôles peut permettre de faire la distinction entre ces effets de pH et des variations effectives de l'activité PKA intracellulaire. Il peut s'agir de contrôles « non FRET » comme ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)}, ou de versions du biosenseur non actives comme ^{CFP}AKARmut^{Citrine}, dans lesquelles la thréonine de la séquence substrat de la PKA a été mutée (mutation T391A, qui supprime le site de phosphorylation de la PKA sur le biosenseur) (Gervasi et al., 2007). Néanmoins, ces contrôles restent encore très rarement mis en œuvre, notamment lorsqu'on travaille sur des cultures primaires, des échantillons *ex vivo* ou des animaux transgéniques, pour lesquels les techniques de transgénèse sont plus complexes et coûteuses.

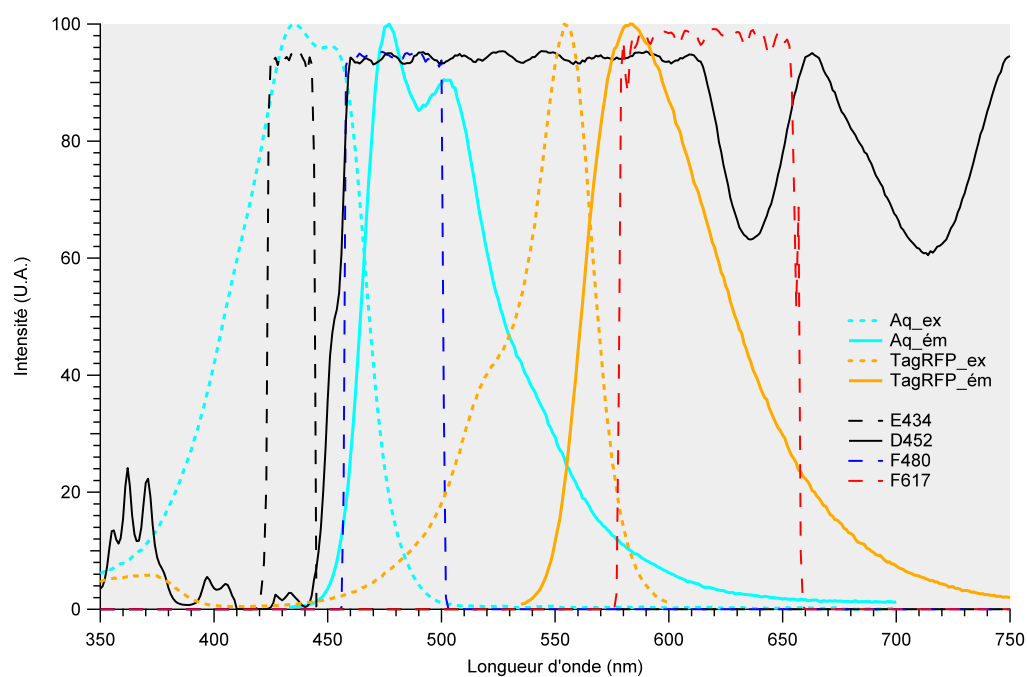


Figure 2-20: Filtres utilisés en ratiométrie pour la mesure de la fluorescence de l'Aquamarine et de la TagRFP.

2.4.3 Etude de $AqAKAR^{TagRFP}$

a Amélioration de la dynamique de réponse ratiométrique d'AKAR

Nous avons ensuite remplacé l'accepteur Citrine de $AqAKAR^{Citrine}$ par une protéine orange insensible au pH, la TagRFP (Chapitre 2.1.5), donnant la version $AqAKAR^{TagRFP}$. L'utilisation de cette protéine orange nécessite une adaptations des conditions spectrales de détection en ratiométrie, avec la modification du filtre utilisé pour la collection des images dans le canal 2 « Accepteur » (Figure 2-20). Comme on le voit sur la Figure 2-20, ce nouveau couple permet de réduire à des niveaux quasi-négligeables l'excitation directe de l'accepteur, et diminue également très fortement le recouvrement de l'émission du donneur et de l'accepteur (« donor bleedthrough »). Nous avons tout d'abord étudié la dynamique de réponse de cette nouvelle version du biosenseur.

La figure 2-21 (colonne de gauche) présente la réponse du biosenseur $AqAKAR^{TagRFP}$ à l'activation de la PKA par utilisation de FSK et d'IBMX. Au cours de l'activation de la voie AMPc/PKA, l'intensité de fluorescence de l'Aquamarine baisse de $-6,4\% \pm 7,5\%$. Simultanément, l'intensité de la TagRFP augmente de $+5,1\% \pm 7,7\%$ ($n=39$). La variation du signal ratiométrique qui en résulte est de $+12,1\% \pm 4,6\%$. Malgré l'introduction de fluorophores plus brillants et robustes, et une meilleure séparation spectrale, la réponse ratiométrique obtenue pour $AqAKAR^{TagRFP}$ reste donc de l'ordre de celles observées pour $CFP^{AKAR^{Citrine}}$ et la version intermédiaire $AqAKAR^{Citrine}$. On constate également une plus grande dispersion des amplitudes de réponse avec ce biosenseur.

Nous avons donc cherché tout d'abord à améliorer cette dynamique de réponse, qui est un paramètre très important pour les performances du biosenseur en imagerie FRET. Dans les différentes versions antérieures du biosenseur AKAR, la plus forte augmentation de la dynamique du biosenseur a été observée entre ^{CFP}AKAR^{cpVenus} (AKAR3) et ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4) (Depry et al., 2011). Entre ces 2 versions, la modification de séquence du biosenseur correspond au passage d'une CFP tronquée (ECFP délétée de ses 11 derniers acides aminés) à une Cerulean entière. (Voir l'alignement de séquences sur la figure 3-7 dans la partie Matériel et Méthodes). Les derniers acides aminés des GFP ne participent pas à la formation des éléments de structure secondaire de la protéine, et leur organisation est souvent mal définie en cristallographie de rayons X. Il est donc généralement supposé qu'ils ne jouent pas de rôle dans la stabilité et la fonction des protéines fluorescentes, et cette séquence est tronquée dans de nombreux biosenseurs. Néanmoins la suppression de cette séquence modifie l'ancrage de la protéine fluorescente dans le système FRET, ce qui est susceptible d'avoir une influence majeure sur l'efficacité de FRET, *via* des changements de distance et de facteur d'orientation (Equations 1.5 et 1.6). Nous avons donc réintroduit cette séquence dans l'Aquamarine de ^{Aq}AKAR^{TagRFP} (cette version sera notée dans la suite AqE pour « Aquamarine entière »), et nous avons étudié l'impact de cette modification sur la photophysique et la dynamique du biosenseur.

Nous avons tout d'abord analysé la réponse à l'activité PKA de cette nouvelle version en ratiométrie (figure 2-21, colonne de droite). Dans le nouveau biosenseur ^{AqE}AKAR^{TagRFP}, l'intensité de fluorescence dans le canal donneur diminue de $-6,5\% \pm 10,7\%$ et augmente dans le canal accepteur de $+16,9\% \pm 14,2\%$. Cela provoque une augmentation moyenne du signal ratiométrique de $+25,1\% \pm 10,0\%$ ($n=21$), soit une dynamique de réponse maintenant équivalente à celle de ^{Cerulean}AKAR^{cpVenus} (AKAR4), le meilleur biosenseur AKAR développé à ce jour. On note cependant à nouveau une très grande variabilité des résultats obtenus. Compte-tenu de l'amélioration majeure obtenue dans la dynamique de réponse de ^{AqE}AKAR^{TagRFP}, nous avons concentré la suite de nos travaux sur cette version.

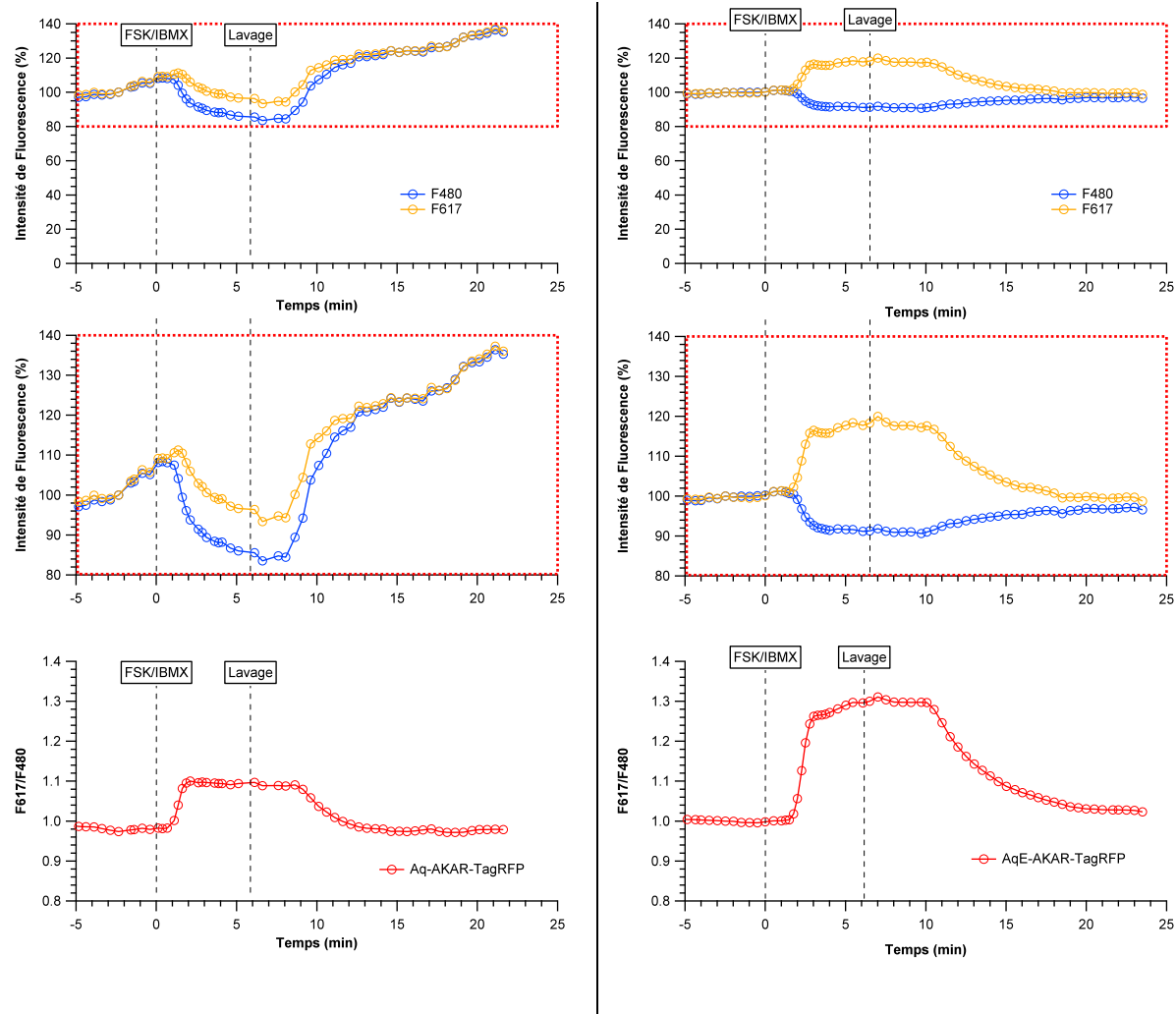


Figure 2-21: Réponses représentatives de $AqAKAR^{TagRFP}$ (2013-03-22n) à gauche et de $AqEAKAR^{TagRFP}$ (2013-03-22o) à droite une activation par la Forskoline en ratiométrie.

Des expériences de contrôle ont été faites sur la version mutée du biosenseur $^{AqE}AKAR^{mutTagRFP}$, dans laquelle nous avons introduit la mutation T391A, qui supprime le site de phosphorylation de la PKA sur le biosenseur. Dans cette version contrôle, la conformation du biosenseur ne peut donc plus être modifiée par une éventuelle activité PKA dans la cellule. Les résultats montrent qu'après activation de la PKA, la variation mesurée dans le canal Aquamarine est $+6,0\% \pm 8,1\%$ et de $+5,8\% \pm 7,7\%$ dans le canal TagRFP. Par conséquent le signal ratiométrique ne varie pas : $-0,1\% \pm 0,4\%$ ($n=5$), ce qui montre que la réponse ratiométrique observée avec le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ est bien due spécifiquement à une augmentation de l'activité PKA.

b Etudes en FLIM : FRET dans l'état basal et au cours de l'activation

Nous avons tout d'abord étudié par FLIM la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine dans nos nouveaux biosenseurs en absence d'activation à pH neutre. Pour la version $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$, nous obtenons une durée de vie de fluorescence moyenne de $3,37 \pm 0,09$ ns ($n=29$), et pour le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ une durée de vie moyenne de $3,48 \pm 0,07$ ns ($n=17$). En admettant que le biosenseur $^{Aq}AKAR^{Cit(Y66A)}$ constitue un contrôle valable des propriétés du donneur seul dans nos biosenseurs, et sur la base de la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine dans cette construction contrôle ($3,92 \pm 0,08$ ns, voir Chapitre 2.4.1 et Figure 2.17), nous estimons une efficacité de FRET basal de 11% environ pour le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ et de 14% pour le biosenseur $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$, des valeurs clairement inférieures à l'efficacité de FRET déterminée dans le biosenseur $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ (28%).

Ceci montre que la diminution de recouvrement spectral entre l'Aquamarine et son nouvel accepteur orange TagRFP n'a pas été complètement compensée par l'absorbance plus élevée de la TagRFP, comme nous l'espérions. Ceci pourrait résulter d'une valeur erronée de son coefficient d'absorption molaire, d'un équilibre de protonation diminuant la proportion de forme anion (il n'existe notamment aucune étude de la sensibilité de la TagRFP au chlore, ces expériences devront être réalisées), ou d'un défaut de maturation conduisant à l'absence d'accepteurs TagRFP dans une fraction des biosenseurs. Par ailleurs, la légère différence de niveau de FRET entre les versions Aquamarine tronquée et entière ne peut pas être considérée comme significative compte-tenu des barres d'erreur. Ceci suggère que la réintroduction de la séquence terminale manquante ne modifie pas de façon majeure la configuration du biosenseur en termes d'efficacité de FRET basal.

Lors de l'activation par la forskoline, l'intensité de fluorescence du donneur Aquamarine diminue de 6% en moyenne dans $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ comme dans $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$, c'est à dire pratiquement 2 fois moins que la CFP dans le biosenseur AKAR2.2, ou la Cerulean dans le biosenseur AKAR4. Néanmoins, grâce à la durée de vie de fluorescence plus longue de l'Aquamarine, nous pourrions espérer détecter des variations relatives plus faibles, et nous avons donc à nouveau tenté de détecter par FLIM l'activation de ces biosenseurs. Bien qu'une diminution de la durée de vie de l'Aquamarine soit le plus souvent observée après activation, cette diminution reste de quelques % seulement (jusqu'à 10-12% dans quelques cas). Elle reste donc statistiquement non significative compte-tenu de la forte variabilité des mesures. La possibilité de détection de l'activation des biosenseurs AKAR par FLIM reste conditionnée à l'amélioration de la répétabilité des mesures et la mise en place d'un dispositif expérimental plus adapté sur BIFLUOR (voir Chapitre 2.3.1b et Matériel et Méthodes).

Sur la base de l'efficacité de FRET déterminée par FLIM pour les biosenseurs dans leur état basal, et des mêmes principes de modélisation que ceux précédemment utilisés aux Chapitres 2.3.1 et 2.4.1 pour les biosenseurs $^{CFP}AKAR^{Citrine}$ et $^{Aq}AKAR^{Citrine}$, il est possible de prédire les réponses ratiométriques des biosenseurs $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$ et $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$, dans l'hypothèse où elles résulteraient seulement de modifications du niveau de FRET. Nous calculons ainsi que, lors de l'activation du biosenseur, une diminution de 6.5% d'intensité dans le canal donneur de l'Aquamarine devrait s'accompagner d'une augmentation dans le canal 2 « Accepteur » de 34% pour $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$. Pour $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$, un calcul similaire indique que l'augmentation attendue serait de 28% dans le canal 2 « Accepteur »: dans cette version du biosenseur, nous observons donc une fois encore (et malgré la grande dispersion des résultats expérimentaux), un « déficit » très significatif d'amplitude de réponse de l'accepteur (ou un « excès » de réponse du donneur), par rapport à ce qui est attendu en théorie pour une simple variation du niveau de FRET.

c Etudes spectrales de l'activation : données préliminaires

Nous avons tenté de corroborer par des analyses spectrales l'activation du biosenseur Aq^EAKAR^{TagRFP} telle que nous la réalisons sur notre montage de FLIM. Ces acquisitions sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectra Suite 2000) relié par fibre optique au microscope (cf. Matériels et Méthodes pour les précisions sur le montage du spectrophotomètre et le traitement des spectres). Ces variations s'accompagnent de modifications faibles mais significatives des spectres d'émission du biosenseur, avec une baisse du signal dans le domaine d'émission de l'Aquamarine et une augmentation dans le domaine de la TagRFP (Figure 2-22).

Sur les spectres acquis de cette façon, nous avons calculé des équivalents ratiométriques en intégrant les signaux entre les longueurs d'onde 460-500 nm et entre 580.5-635.5 nm qui correspondent respectivement à la région spectrale d'émission de l'Aquamarine et de la TagRFP collectée dans nos expériences de ratiométrie.

Le ratio $I(Aq)/I(TagRFP)$ calculé pour cette expérience ($n=3$) est de 0,24 avant activation de la PKA; après activation de la PKA, ce ratio est de 0,31 soit une augmentation de 28% suite à l'activation de la voie AMPc/PKA, ce qui correspond approximativement à l'augmentation de ratio mesuré sur le microscope dédié à la ratiométrie (Figure 2-21). On notera que la mesure des variations d'intensité dans chaque canal spectral séparé n'est pas possible, car il est très difficile de suivre cette activation sur BIFLUOR dans des conditions de stabilité suffisantes (activation et observation de la même cellule, sans aucune modification du focus): seul le rapport entre deux canaux spectraux peut être suivi de façon fiable. Une analyse des spectres du biosenseur par des méthodes de décomposition spectrale, sur la base des spectres types du donneur et de l'accepteur séparés et collectés avec le même spectromètre (méthode de « spectral unmixing »), devrait permettre une exploitation plus quantitative de ces données, et notamment de remonter à l'efficacité de FRET avant et après activation.

Ainsi, l'activation du biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ conduit à des variations de signaux FLIM, ratiométriques et spectraux approximativement compatibles entre eux et cohérents avec une augmentation du niveau de FRET dans le biosenseur: en combinant les informations de durée de vie et de ratiométrie, l'efficacité de FRET dans $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ passerait d'environ 11% dans l'état basal à 17% dans l'état activé. Ces résultats restent néanmoins préliminaires et devront être reproduits. La suite de cette étude passera par la mise en place des équipements nécessaires sur le microscope BIFLUOR pour l'analyse photophysique complète et statistiquement significative du biosenseur au cours d'expériences d'activation (système de perfusion et imagerie FLIM sur un champ plus large, permettant de collecter plusieurs évènements d'activation simultanés, analyses spectrales).

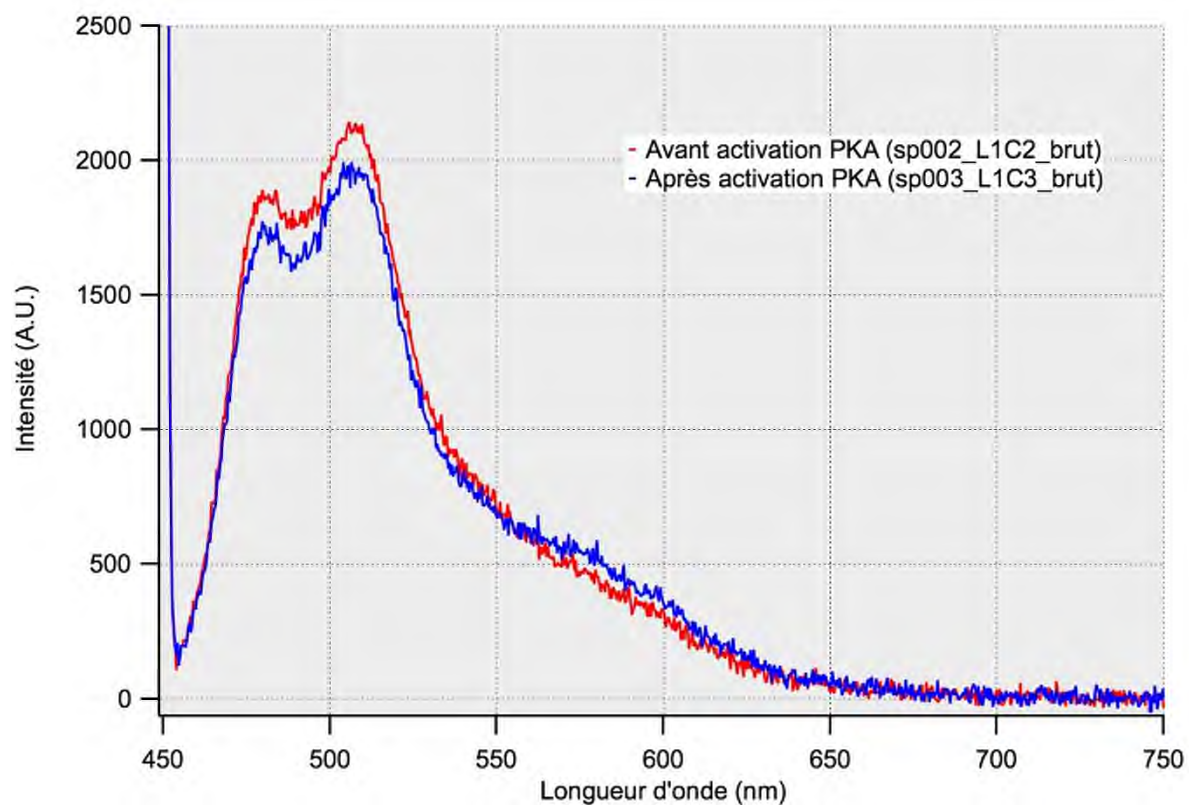


Figure 2-22: Spectres d'émission de fluorescence du biosenseur AqE AKAR^{TagRFP} exprimé en cellules BHK, avant et après activation par la forskoline. (2013-07-23 – L1C2 et L1C3).

d Etude par FLIM de la sensibilité au pH

Les biosenseurs $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$ et $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ sont en principe porteurs de fluorophores insensibles au pH. Nous avons donc analysé le comportement de ces nouveaux biosenseurs en fonction du pH en mesurant tout d'abord la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine en conditions basales, c'est-à-dire sans activer la voie AMPc/PKA. Nous avons également construit et étudié pour comparaison un tandem contrôle AqE-TagRFP. Les résultats regroupés sur la figure 2-23 indiquent que, dans le tandem Aq-TagRFP comme dans les biosenseurs $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$ et $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$, la durée de vie de fluorescence d'Aquamarine n'est pas modifiée aux erreurs de mesure près jusqu'à pH 5.5. A pH 5, on note une légère baisse de la durée de vie des biosenseurs à la limite des barres d'erreur (Figure 2-23). Nous savons que la durée de vie d'Aquamarine n'est pas significativement modifiée à pH 5 lorsqu'elle est dans le biosenseur AKAR (Figure 2-17), et donc cette baisse serait due à une perturbation induite par la TagRFP. On note également, à nouveau, une grande variabilité des mesures de FLIM, avec une dispersion des résultats nettement plus importante que dans le cas des tandems ou des biosenseurs AKAR porteurs d'une Citrine.

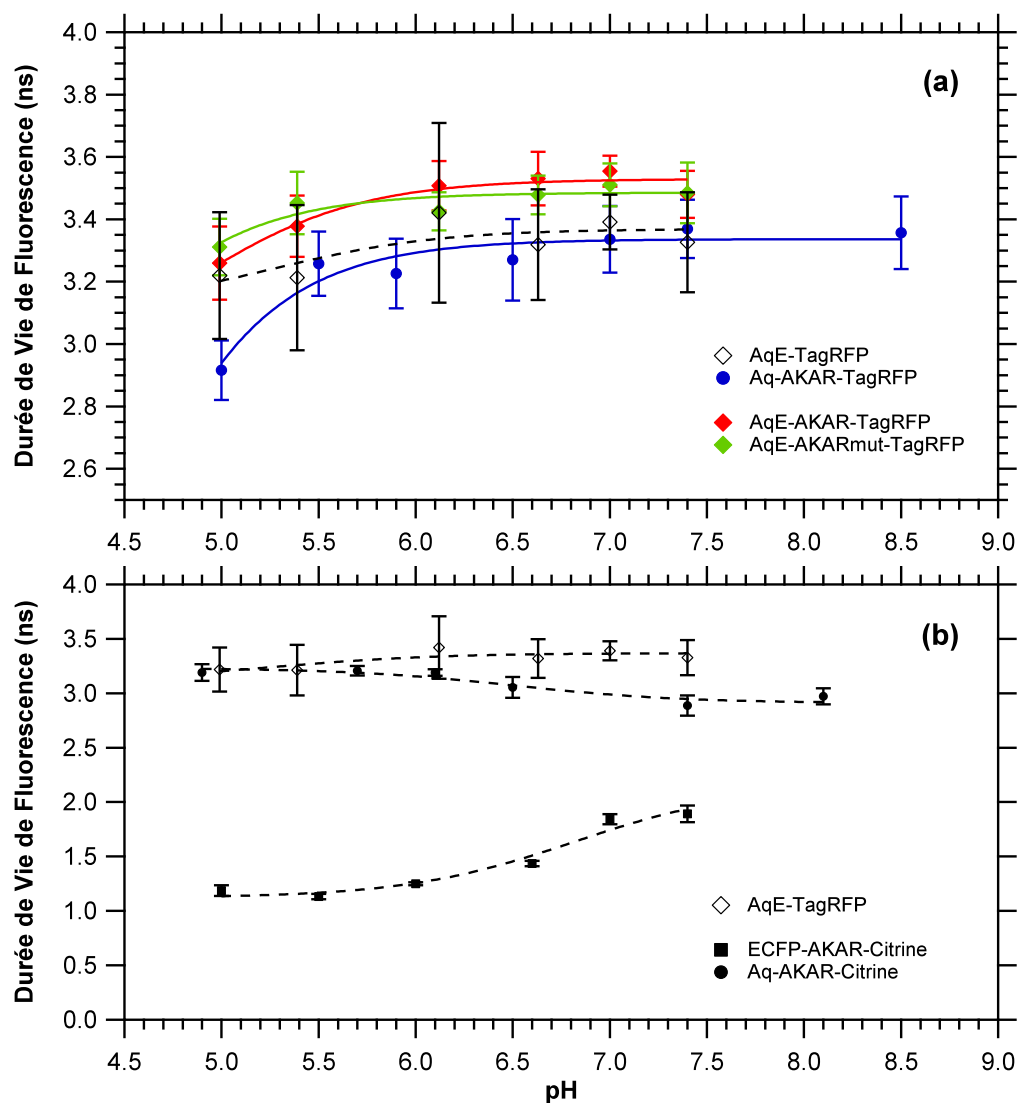


Figure 2-23: Evolution des durées de vie de fluorescence en fonction du pH des variants AKAR possédant un couple Aquamarine/TagRFP (a) et rappels des données concernant les constructions $^{CFP}AKAR^{Citrine}$; $^{Aq}AKAR^{Citrine}$ et AqE-TagRFP (b)

e Sensibilité au pH du signal ratiométrique

Le comportement du biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ face à des modifications de pH a ensuite été testé en ratiométrie (Figure 2-24, colonne de gauche). En modifiant le pH du milieu d'observation de pH 7,53 à pH 5,56, nous observons que le signal de fluorescence dans le canal F480 n'est pas modifié aux erreurs de mesure près ($+2,70\% \pm 11,07\%$), alors que le signal de fluorescence dans le canal F617 augmente très sensiblement de $+33,0\% \pm 16,2\%$, il en résulte une augmentation du signal ratiométrique très importante, de $+28,3\% \pm 10,0\%$ ($n=21$).

Des expériences de contrôle ont été menées dans des conditions identiques sur le biosenseur $^{AqE}AKARmut^{TagRFP}$. La figure 2-24 (colonne de droite) montre les résultats obtenus sur cette construction : au cours d'un changement du pH de 7.5 à 5.5, nous observons que l'intensité dans le canal F480 reste quasiment stable, avec une variation moyenne de $-2,40\% \pm 12,18\%$ alors que celle mesurée dans le canal F617 augmente de $+19,5\% \pm 17,8\%$. Le signal ratiométrique est ainsi augmenté de $+22,5\% \pm 9,6\%$ ($n=8$). Ces résultats sur la construction $^{AqE}AKARmut^{TagRFP}$ nous montrent que les modifications du signal ratiométrique provoquées par le passage à pH acide sont en majeure partie indépendantes de l'activité de la PKA.

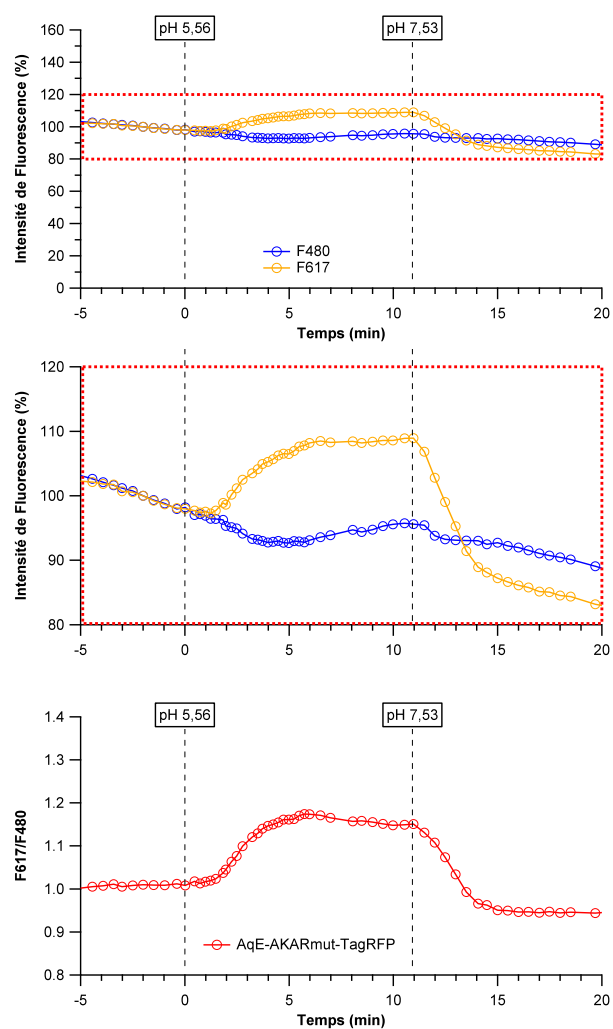
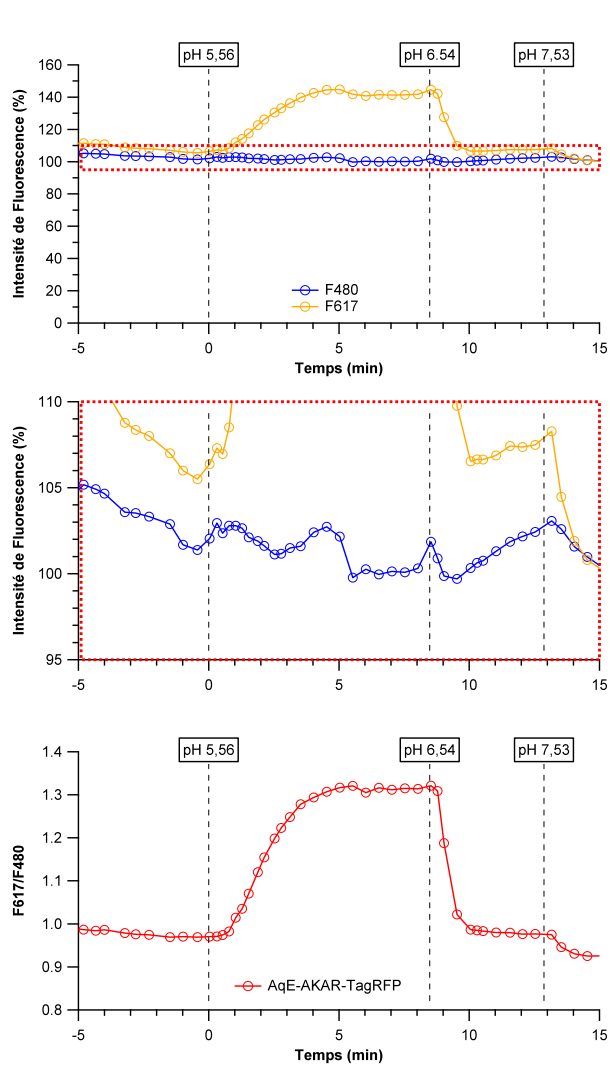


Figure 2-24: Traces représentatives des réponses de $\text{AqE-AKAR}^{\text{TagRFP}}$ (2013-03-27r), colonne de gauche et de $\text{AqE-AKARmut}^{\text{TagRFP}}$ (2013-03-27p) colonne de droite en réponse à un passage à pH acide en ratiométrie.

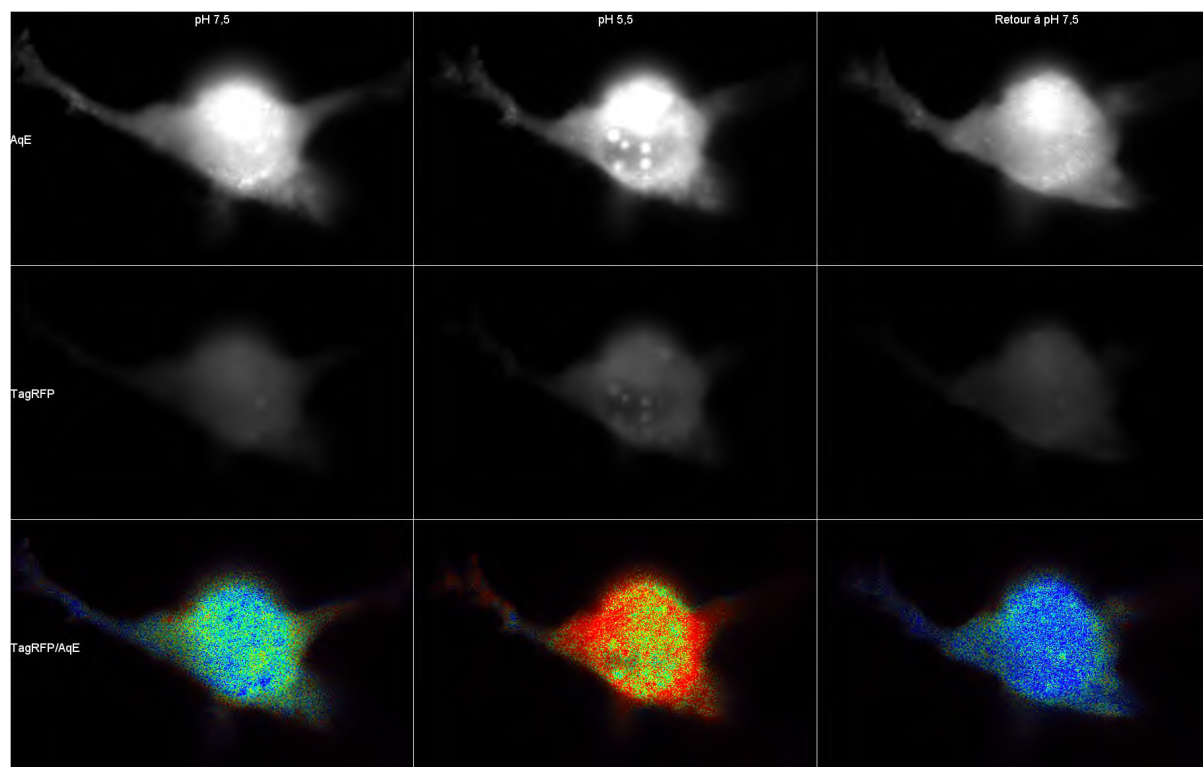


Figure 2-25: Effet d'un changement de pH sur les cellules BHK transfectées avec le biosenseur ^{AqE}AKAR ^{TagRFP} en ratiométrie (2013-03-27p)

f Discussion des résultats obtenus sur $AqEAKAR^{TagRFP}$

Avec $AqEAKAR^{TagRFP}$, nous avons développé un biosenseur d'activité kinase A dont la dynamique de réponse $\Delta R/R$ est équivalente à celle du meilleur biosenseur AKAR disponible à ce jour (AKAR4). Notre nouveau biosenseur est équipé d'un donneur environ 1.5 fois plus brillant que celui d'AKAR4 (la Cerulean) et de durée de vie de fluorescence nettement plus longue (3.4 ns dans l'état basal pour $AqEAKAR^{TagRFP}$ contre 2.3 ns pour AKAR4), ce qui pourrait le rendre intéressant en imagerie FLIM *in vivo*, où les méthodes de FRET ratiométrique peuvent être difficiles à mettre en œuvre. Les expériences de FLIM sur le biosenseur $AqAKAR^{Citrine(Y66A)}$ en fonction du pH, nous ont confirmé que la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine reste bien inchangée entre pH neutre et pH 5, et donc que la protéine conserve son excellente résistance aux pH acides après incorporation dans le biosenseur, et ce malgré la troncature de ses 11 derniers acides aminés.

Cependant, notre nouveau biosenseur $AqEAKAR^{TagRFP}$ donne tout d'abord des signaux FLIM et ratiométriques anormalement dispersés, et cette variabilité importante ne résulte clairement pas d'incertitudes de mesure, ni d'une variation des propriétés photophysiques intrinsèques de l'Aquamarine, puisque le biosenseur $AqAKAR^{Citrine}$ ne présente pas une telle variabilité. Cette variabilité semble donc résulter de la présence de la TagRFP. Cette protéine fluorescente est encore assez mal caractérisée sur le plan de ses utilisations en imagerie cellulaire: plusieurs mécanismes pourraient conduire à une variabilité de ses signaux, notamment des photoréactions réversibles ou irréversibles, ou un processus de maturation incomplet de son chromophore rouge.

Nous observons par ailleurs une augmentation très importante à pH 5.5 du signal ratiométrique de $AqEAKAR^{TagRFP}$, et de son contrôle $AqEAKAR^{mut^{TagRFP}}$, montrant que, malgré l'introduction de fluorophores insensibles au pH, nous n'avons pas réussi à développer un biosenseur FRET véritablement résistant aux conditions de pH acides. En absence d'accepteur, la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine dans le biosenseur AKAR reste inchangée jusqu'à pH 5 (Figure 2-17). C'est le cas également, dans la limite des barres d'erreur, pour le tandem modèle Aq-TagRFP (Figure 2-23). En présence de la TagRFP, dans le

biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$, l'imprécision des mesures de FLIM nous permet seulement de conclure que la diminution de la durée de vie de l'Aquamarine à pH 5.5 est dans tous les cas inférieure à environ 10% (Figure 2-23). En ratiométrie à ce même pH, les données indiquent également une baisse d'intensité du donneur relativement faible, mais accompagnée d'une forte augmentation du signal dans le canal accepteur.

Le modèle de signal ratiométrique développé au Chapitre 1.2.3, et notamment l'Equation 1.17, nous permettent de montrer que, en raison précisément de la très bonne séparation spectrale entre l'Aquamarine et la TagRFP ($OD_A/OD_D \approx 0$), les variations de FRET entre ces deux protéines vont effectivement s'accompagner de variations relatives nettement plus importantes dans le canal de l'accepteur que pour le biosenseur AKAR2.2. Ainsi, en appliquant notre modèle au biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$, nous calculons qu'une baisse de 3% seulement de l'intensité dans le canal donneur devrait s'accompagner d'une augmentation de 17% de l'intensité dans le canal de l'accepteur. Les modifications de signaux ratiométrique et FLIM observées dans le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ à pH acide sont donc, dans l'ensemble, compatibles avec une augmentation du FRET pH-induite, par exemple suite à une modification conformationnelle ou à une relocalisation du biosenseur dans des granules de haute densité (voir Figure 2-25), comme nous l'avons déjà envisagé dans le cas de AKAR2.2 (Chapitre 2.4.2). Cependant, cette conclusion nécessiterait des expériences complémentaires permettant d'exclure formellement tout mécanisme alternatif lié à des perturbations photophysiques directes de la TagRFP à pH acide.

3.Synthèse et Perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en place divers outils moléculaires et protocoles expérimentaux destinés à analyser les processus biophysiques intervenant dans les réponses de biosenseurs FRET directement en cellule vivante. Nous avons également développé une description analytique de leurs signaux de fluorescence, fondée sur des principes photophysiques et des paramètres expérimentaux explicites et bien définis. Sur la base de la connaissance approfondie acquise au laboratoire concernant les propriétés des protéines fluorescentes cyan et jaune portées par ces biosenseurs (Chapitre 2.1), notre modèle permet de prédire et de mettre en relation quantitative leurs réponses FLIM et ratiométriques lors de changements de l'efficacité de FRET ou du pH. Ce modèle relativement simple pourra être appliqué à d'autres biosenseurs utilisés en imagerie, et pourra être amélioré au besoin par des mesures plus précises des différents paramètres du modèle, réalisées directement dans le système cellulaire étudié lorsque cela est possible.

Nous avons ensuite analysé à l'aide de ces données et de ces concepts le fonctionnement de deux biosenseurs très utilisés en imagerie, AKAR2.2 et AKAR4. Il est à noter que, malgré ses performances plus limitées, le biosenseur AKAR2.2 est encore intensivement utilisé pour l'imagerie en neurone vivant dans des tranches de cerveau. Il est donc d'une part important de bien connaître son fonctionnement, et d'autre part urgent d'identifier les meilleures stratégies à adopter en vue de son amélioration. Grâce à l'analyse quantitative permise par le FLIM et l'étude de versions de contrôle « donneur seul » telles que ^{CFP}AKARCitrine^(Y66A), nous avons mis en évidence un mécanisme de réponse complexe de AKAR2.2 lors de l'activation, qui implique très probablement une perturbation photophysique directe de l'un et/ou l'autre de ses fluorophores lors du changement conformationnel du biosenseur.

Ce mécanisme « intrinsèque » se manifeste par un excès de réponse dans le canal donneur et un déficit de réponse dans le canal de l'accepteur lors de l'activation, par rapport à ce qui est attendu pour une simple augmentation de l'efficacité de FRET. Un mécanisme de quenching dans la CFP, induit par le changement conformationnel du biosenseur, est actuellement le scénario le plus vraisemblable. Cette idée est étayée tout d'abord par la découverte récente de biosenseurs AKAR et GCaMP dépourvus d'accepteur et capables néanmoins de donner des réponses utilisables en imagerie FLIM et d'intensité (Bonnot et al., 2013). D'autre part, nos résultats suggèrent que ce mécanisme « intrinsèque » est plus prononcé dans les constructions AKAR où le donneur cyan (CFP ou Aquamarine) a été tronqué de ses 11 derniers acides aminés (AKAR2.2, ^{Aq}AKAR^{TagRFP}).

D'une façon générale, la photophysique de la CFP portée par le biosenseur AKAR2.2 apparaît notablement différente de celle de la ECFP purifiée en solution : sa durée de vie de fluorescence à pH neutre est légèrement diminuée, son pK est fortement déplacé vers les pH neutres avec une transition fortement coopérative. Nous avons identifié plusieurs causes à ces perturbations : outre un effet direct sur les pKs lié au milieu cytosolique lui-même, l'insertion de la CFP dans le biosenseur et/ou sa troncature ont une influence majeure. Malgré l'amélioration de sa stabilité et de sa rigidité, l'Aquamarine, de même que les protéines fluorescentes jaunes ou orange utilisées comme accepteurs, n'échappent peut-être pas à des perturbations similaires lorsqu'elles sont intégrées dans des protéines de fusion. Ces perturbations devraient pouvoir être caractérisées plus en détail par des analyses FLIM et spectrales réalisées dans l'état basal et lors de l'activation de biosenseurs contrôles tels que ^{CFP}AKAR^{Citrine(Y66A)} et ^{Aq}AKAR^{Citrine(Y66A)}. Dans tous les cas, ceci démontre la nécessité de réaliser ces analyses biophysiques *in situ*, si l'on veut parvenir à une exploitation quantitative des signaux intracellulaires de biosenseurs FRET.

Les mécanismes responsables de la forte amélioration dans la dynamique de réponse ratiométrique entre ^{Aq}AKAR^{TagRFP} et ^{AqE}AKAR^{TagRFP} restent encore mal compris à ce jour : il s'agit d'une question complexe, car elle peut impliquer d'une part des effets d'orientation et/ou de distance donneur-accepteur à la fois dans la configuration basale et la configuration activée du biosenseur, mais d'autre part aussi les changements dans la composante de réponse « intrinsèque » discutée ci-dessus. Ici encore, la mesure directe par FLIM de

l'efficacité de FRET dans l'état basal et activé des deux biosenseurs, combinée à une caractérisation précise de ces réponses intrinsèques, permettra d'identifier les causes majeures de cette amélioration.

Notre modèle permet de rendre compte qualitativement du comportement de nos tandems et de nos biosenseurs en fonction du pH, avec cependant un écart théorie-expérience qui devient assez important à pH acide. Ceci semble en partie au moins lié à une contribution additionnelle de FRET intervenant à ces pH, un phénomène qui est mieux mis en évidence lorsque AKAR est équipé d'une paire de fluorophores intrinsèquement insensibles au pH tels que l'Aquamarine et la TagRFP. Nous avons évoqué, pour les tandems comme pour le biosenseur AKAR, l'éventualité de changements conformationnels induits par le pH. Une autre explication pourrait être liée à notre méthode non physiologique de manipulation du pH intracellulaire, qui s'accompagne d'une redistribution très nette du biosenseur AKAR dans des granules de haute densité, susceptibles de conduire à une composante de FRET de proximité (Grailhe et al., 2006). Même si les images de fluorescence n'en fournissent aucune évidence, un mécanisme analogue n'est pas exclu dans le cas des tandems, si la relocalisation des fluorophores est peu prononcée et/ou se fait dans des microstructures ou agrégats qui ne seraient pas discernables en imagerie plein champ. De fait, le biosenseur AKAR surexprimé en cellule forme des agrégats intracellulaires y compris dans des conditions normales de culture (Polito et al., 2014). Ce phénomène pourrait contribuer notablement à la variabilité intercellulaire, à la fois du niveau de FRET basal et de l'amplitude de réponse ratiométrique du biosenseur. Pour s'affranchir de ces problèmes, il est possible de réaliser le même type d'expérience sur des extraits cellulaires obtenus à partir des cellules fluorescentes (Salonikidis et al., 2011), dans des conditions où la densité en fluorophore peut être abaissée suffisamment pour exclure toute contribution de FRET de proximité. L'étude FLIM et spectrale de ces extraits cellulaires en fonction du pH devrait permettre d'évaluer l'importance de ces problèmes de FRET de proximité, et/ou de démontrer clairement l'existence d'éventuels changements conformationnels de AKAR aux pH acides.

Outre les informations mécanistiques apportées via les modifications successives du biosenseur AKAR au cours de cette thèse, la combinaison de l'Aquamarine et de la TagRFP a permis de développer et valider une nouvelle version $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$, utilisable pour la détection d'activité kinase A, et qui présente certaines améliorations par rapport aux versions antérieures, et notamment la meilleure d'entre elles, AKAR4. Tout en présentant une dynamique de réponse équivalente à celle d'AKAR4, le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ présente une plus grande séparation spectrale entre donneur et accepteur (ce qui peut faciliter les quantifications), et il est équipé d'un donneur plus brillant (ce qui est un avantage pour la détection FLIM). Si le signal ratiométrique de $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ varie fortement lorsqu'on effectue un saut à pH 5, montrant qu'il n'est pas suffisamment robuste pour une utilisation dans des organites acides, il resterait à étudier la stabilité de ce signal pour des variations plus modérées du pH, conditions dans lesquelles le couple Aquamarine/TagRFP pourrait apporter malgré tout une meilleure stabilité de mesure que le couple Cerulean/cpVenus de AKAR4. Cependant, la réponse de $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ à l'activation reste à la limite de la détection en FLIM, et on note également une variabilité importante de toutes les mesures faites avec les constructions TagRFP, quel que soit la modalité employée. Ce dernier problème est probablement le symptôme de mécanismes photophysiques complexes dans cette nouvelle protéine fluorescente.

Une caractérisation plus complète de la TagRFP sera donc nécessaire pour mener à bien cette partie de notre programme. La protéine devra être étudiée de façon plus approfondie, à la fois sous forme purifiée (notamment en ce qui concerne l'effet du chlore, qui n'a pas été étudié) et sous forme cytosolique. Les photoréactions de la TagRFP en conditions d'imagerie plein champ et confocale devront être évaluées, et si nécessaire supprimées en la remplaçant par la TagRFP-T. Les données spectrales, combinées à des traitements de décomposition selon des spectres type (« spectral unmixing »), devraient permettre de caractériser les éventuels problèmes de maturation de la protéine. Enfin, l'effet sur ces diverses propriétés de son incorporation dans des protéines de fusion ou des biosenseurs tels qu'AKAR devra être étudié. Ces étapes sont des préalables indispensables à l'utilisation de la TagRFP pour l'imagerie quantitative.

Une meilleure compréhension du fonctionnement des biosenseurs FRET devrait au final contribuer à guider leur amélioration. Ce travail de thèse a posé de premiers jalons importants dans cette direction, et a montré la complexité potentielle des mécanismes sous-jacents. Il a aussi permis d'identifier une série d'approches expérimentales qui devront être mises en œuvre à l'avenir pour explorer cette complexité.

4. Matériels et Méthodes

4.1. Biologie Moléculaire : Construction des différents biosenseurs et tandems

4.1.1 ^{Aq}AKAR^{Cit} (P27)

Le plasmide ^{Aq}AKAR^{Cit} a été obtenu par introduction de 2 mutations ponctuelles dans le plasmide codant pour AKAR2.2 (P24). La première de ces deux mutations effectuées est la mutation T65S (obtention du plasmide P26). Cette mutation est introduite par PCR en utilisant les amorces T65S forward et T65S reverse. Le plasmide P26 est ensuite soumis à la deuxième mutagenèse dirigée par PCR en utilisant les amorces H148G reverse et H148G forward pour obtenir le plasmide P27 codant pour le biosenseur ^{Aq}AKAR^{Cit}.

4.1.2 Cerulean(T65S)AKAR^{cpVenus} (P39)

La construction AKAR4(T65S) est obtenue par mutation ponctuelle dirigée par PCR du plasmide codant pour le biosenseur AKAR4 (P38) et en utilisant les amorces T65S forward et T65S reverse.

4.1.3 CFP^{AKAR}^{Cit(Y66A)} (P40) et ^{Aq}AKAR^{Cit(Y66A)} (P41)

P40 et P41 sont deux constructions contrôles obtenues par mutation respective des plasmides P24 et P27. La mutation Y66A est introduite par PCR grâce aux amorces Y66A forward et Y66A reverse (S. Dupré).

4.1.4 TagRFP avec codon stop (P42)

Le plasmide TagRFP vendu par Evrogen (P30) présente une séquence située à l'extrémité 3' du cadre de lecture de la séquence TagRFP et codant pour 26 acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale de la protéine une fois exprimée. Pour supprimer cette queue à la TagRFP nous avons introduit un codon STOP dans P30 par mutation ponctuelle.

4.1.5 TagRFP-T (P43)

La protéine TagRFP-T est obtenue par mutation ponctuelle via PCR en utilisant les amorces S158T FOR et S158T REV.

4.1.6 ^{Aq}AKAR^{TagRFP} (P45)

La réalisation de ce plasmide a nécessité trois étapes de clonage par restriction/ligation successive.

La première a été la construction du plasmide B63. Il a été obtenu par ligation des plasmides B3 et P27 après leur digestion par les enzymes de restrictions HindIII et SacI. B3 est un plasmide d'expression procaryote pPROEX et ne sert ici que d'intermédiaire. Il ne contient pas de séquence codante d'un biosenseur ou d'une protéine fluorescente. P27 contient la séquence codante du biosenseur ^{Aq}AKAR^{Cit}. En le digérant par HindIII et SacI puis en faisant une migration sur gel d'agarose, on peut isoler un fragment d'ADN de 1320pb correspondant à la séquence codant une Aquamarine liée au module senseur AKAR. Après l'électrophorèse sur gel d'agarose ce fragment est purifié puis subit une étape de ligation avec le plasmide B3 préalablement digéré par HindIII et SacI.

La seconde étape pour la construction de P45 est le plasmide B64. Il contient la séquence codante complète du biosenseur ^{Aq}AKAR^{TagRFP} et est obtenu par digestion ligation du plasmide B63 et d'une séquence codant la protéine TagRFP. Cette séquence est construite grâce à une amplification par PCR en utilisant le plasmide P42 codant pour la TagRFP et aux amorces TagRFP_SacI et TagRFP_EcoRI. Ces amorces permettent d'introduire un site de restriction SacI à l'extrémité 5' de l'amplicon et un site EcoRI en 3' tout en respectant le cadre de lecture de la future séquence codant ^{Aq}AKAR^{TagRFP}. Après l'étape de PCR, l'amplicon est purifié et digéré par SacI et EcoRI puis lié au plasmide B63 qui a lui-même été digéré par ces deux enzymes.

La dernière étape de ce clonage est de transférer la séquence codante de ^{Aq}AKAR^{TagRFP} dans un vecteur d'expression eucaryote. Pour ceci nous avons choisi les plasmides P23 qui est un vecteur pCDNA3. Les enzymes de restriction utilisées pour extraire la séquence ^{Aq}AKAR^{TagRFP} de B64 sont EcoRI et HindIII. Après cette digestion une électrophorèse sur gel d'agarose est effectuée pour isoler le fragment de 2040pb correspondant à la séquence codant du

biosenseur $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$. Ce fragment est purifié puis on réalise l'étape de ligation avec P23 qui aura été lui aussi digéré par EcoRI et HindIII. Nous obtenons ainsi le plasmide P45 qui est un vecteur permettant d'exprimer le biosenseur $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$ en cellules eucaryotes.

4.1.7 $^{Aq}AKAR^{TagRFP-T}$ (P46)

$^{Aq}AKAR^{TagRFP-T}$ est obtenu par mutation ponctuelle de la TagRFP du biosenseur. Cette mutation est faite par PCR à partir du plasmide P45 codant $^{Aq}AKAR^{TagRFP}$ en utilisant les amorces S158T FOR et S158T REV.

4.1.8 $^{Aq}AKARmut^{TagRFP}$ (P59)

La construction $^{Aq}AKARmut^{TagRFP}$ est constitutivement inactive. Elle est mutée de façon à ne pas pouvoir être phosphorylé par la PKA. Cette mutation est la mutation T391A, la thréonine cible de phosphorylation de la PKA est remplacée par une alanine. Cette mutation est introduite par PCR dans le plasmide P45 en utilisant les amorces P45_T391A_FOR et P45_T391A_REV.

4.1.9 $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ (P60)

Dans le plasmide P60 nous avons construit la séquence de nucléotides permettant d'exprimer le biosenseur $^{AqE}AKAR^{TagRFP}$ dans lequel l'Aquamarine est entière. 4 étapes de restriction/ligation ont été nécessaires pour obtenir cette séquence sans modifier le module senseur AKAR ou modifier le cadre de lecture.

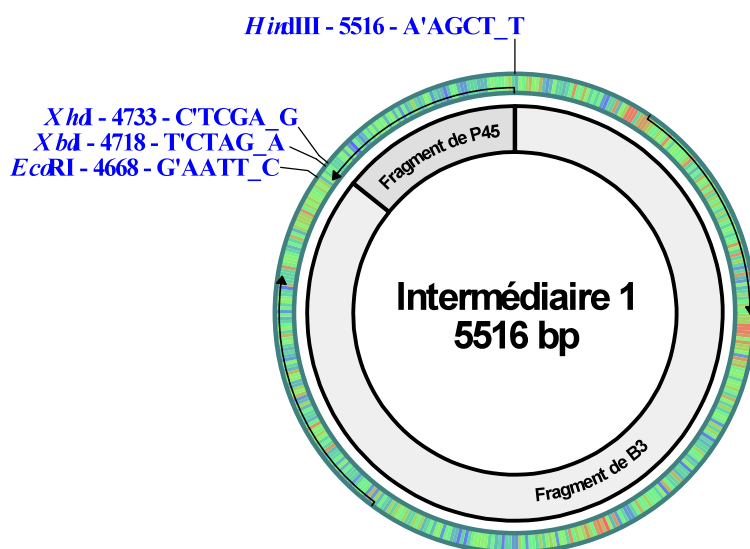


Figure 4-1: Construction de AqE-AKAR-TagRFP_1er intermédiaire (B70)

La première étape a été de construire le plasmide B70 à partir du plasmide B3 (vecteur pPROEX) et du plasmide P45 contenant le biosenseur ^{Aq}AKAR^{TagRFP} dans lequel Aquamarine est tronquée. Un fragment de P45 est amplifié par PCR en utilisant les amorces AmpP45_5395 et AmpP45_6186_XhoI. En utilisant ces amorces, l'amplicon se retrouve borné par un site de restriction HindIII en 5' et par un site XhoI en 3'. Le motif de restriction HindIII n'est pas codé dans l'amorce car il est déjà présent dans P45. B3 et cet amplicon sont ensuite digérés par HindIII et EcoRI, puis ils subissent une ligation permettant d'obtenir B70.

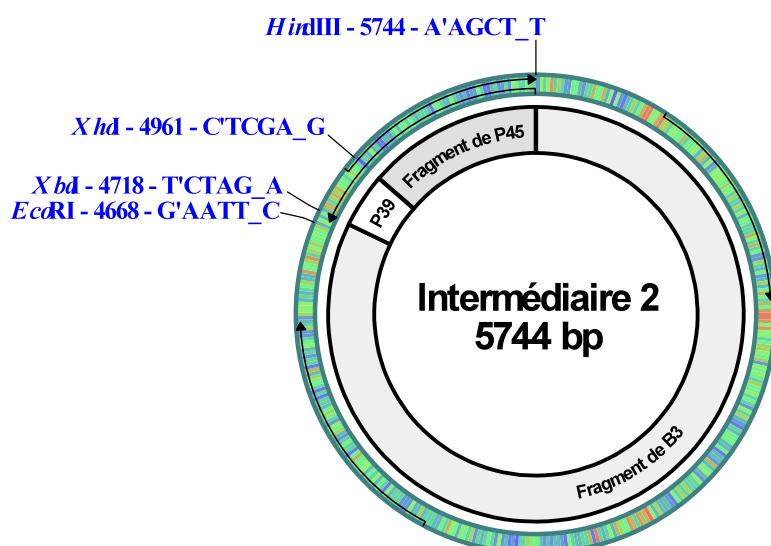


Figure 4-2 : Construction de AqE-AKAR-TagRFP_2e intermédiaire (B71)

Le deuxième clonage permet de construire B71 à partir de B70 et d'un fragment de P39 qui code AKAR4(T65S). Ce fragment de P39 nous permet de récupérer une partie du module senseur AKAR tout en pouvant ajouter une Aquamarine entière dans le bon cadre de lecture lors de la troisième étape de la construction de P60. Le fragment est toujours amplifié par PCR, cette fois en utilisant les amorces AmpP39_765_XhoI et AmpP39_1018_XbaI qui ajoute les sites de restrictions XhoI et XbaI respectivement en 5' et en 3' de la séquence amplifiée. B70 et l'amplicon sont liés après avoir été digérés par les enzymes de restriction XhoI et XbaI, nous obtenons B71 qui va être utilisé dans la troisième étape.

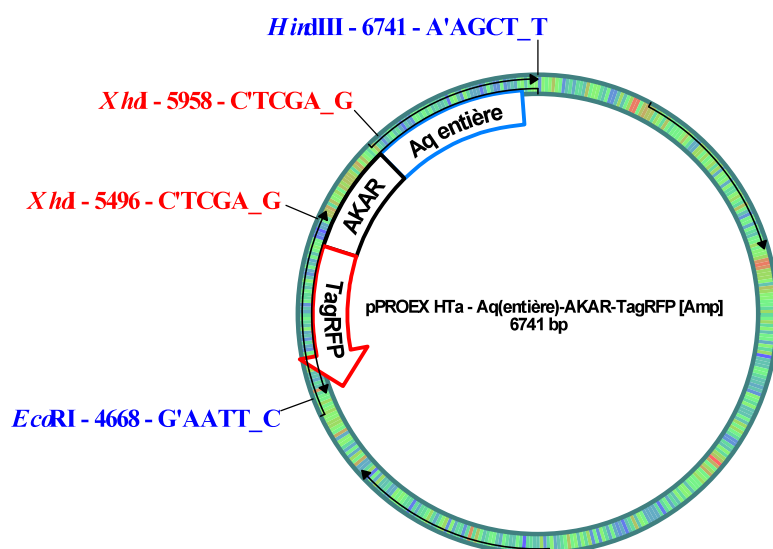


Figure 4-3 : Construction de AqE-AKAR-TagRFP_3e intermédiaire (B72)

Cette troisième étape aboutie au plasmide B72 qui code pour le biosenseur complet $AqE^{AKAR^{TagRFP}}$ dans un vecteur d'expression procaryote. Elle nécessite la ligation du plasmide B71 avec un amplicon de P45 après leur digestion par XbaI et EcoRI. L'amplicon est produit grâce à l'amorce AmpP45_6389_XbaI qui ajoute un motif XbaI en 5' de l'amplicon et à l'amorce AmpP45_6. On retrouve également un site de restriction EcoRI à l'autre extrémité de l'amplicon puisque ce site est déjà présent dans P45.

NB : cette troisième étape de restriction/ligation a introduit une mutation ponctuelle silencieuse dans la séquence codante. Lors de nos vérifications par séquençage, nous avons constaté que le site de restriction de XbaI n'était plus présent dans le plasmide B72. La mutation constatée a changé un codon TCT en codon TCA qui codent tous les deux une Sérine. Etant donné que la séquence d'acides aminés du biosenseur n'est pas modifiée par cette mutation nous avons conservé ce plasmide.

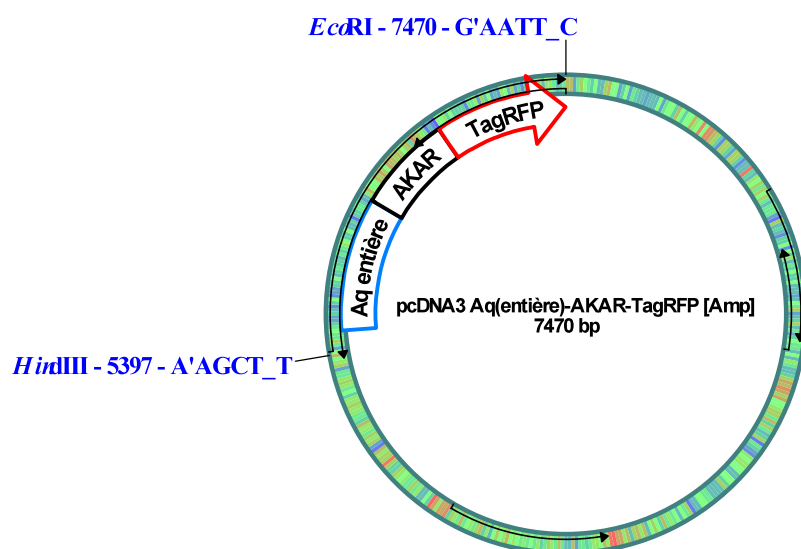


Figure 4-4 : Construction de AqE-AKAR-TagRFP_Produit final (P60)

La dernière étape a été de réintroduire la séquence codante de $AqE^{AKAR^{TagRFP}}$ dans un vecteur d'expression procaryote. Comme précédemment nous avons choisi le vecteur pcDNA3 et utilisé le plasmide P23 et les enzymes de restriction EcoRI et HindIII. Pour de meilleur rendement la séquence codante d'intérêt est isolée par électrophorèse sur gel d'agarose après la digestion de B72 par les enzymes de restriction.

4.1.10 Tandems CFP-YFP (P73 ; P74 ; P75 ; P76)

Ces quatre plasmides ont été conçus pour étudier les interactions FRET entre différentes CFP et YFP en nous affranchissant de l'impact de tout autre critère que la nature du couple de protéines fluorescentes. En particulier, dans ces quatre tandems, le linker entre le donneur et l'accepteur est strictement le même. Pour les construire nous avons travaillé sur la base de nos plasmides P7 et P20 qui codent respectivement un tandem CFP-YFP et un tandem Aquamarine-YFP qui possèdent des mutations que nous voulons supprimer ainsi qu'une queue en C-terminale de la YFP.

Pour faire les plasmides codant nos nouveaux tandems CFP-YFP (P74) et Aquamarine-YFP (P75) les amplicons nécessaires sont obtenus par PCR faite sur le plasmide P14 possédant la séquence codante de la YFP et en utilisant les amorces AmpP14_682_EcoRI_FOR et AmpP14_1403_KpnI_REV. L'amplicon contient ainsi, en plus de la séquence YFP, un site de restriction EcoRI en 5' de la séquence YFP et un site de restriction KpnI en 3'. Cet amplicon est digéré par ces 2 enzymes, purifié puis une étape de ligation est nécessaire avec les plasmides P7 et P20 auparavant digérés avec les mêmes enzymes pour obtenir respectivement P74 codant le tandem CFP-YFP et P75 codant Aquamarine-YFP.

Les tandems CFP-Citrine (P76) et Aquamarine-Citrine (P73) sont construits de la même façon à la seule différence que l'étape d'amplification par PCR se fait sur le plasmide P31 codant une Citrine. Les mêmes amorces sont utilisées car les séquences codantes de P14 et de P31 sont très similaires.

4.1.11 Tandem CFP-Citrine(Y66A) (P86)

Ce tandem est construit par mutation ponctuelle à partir du plasmide P76. Les amorces Citrine_Y66A_R et Citrine_Y66A_F sont utilisées pour la PCR.

4.1.12 Tandem Aquamarine-TagRFP (P89)

Suite à des problèmes d'optimisation lors des essais effectués au LCP pour la construction du plasmide P89 codant pour le tandem Aquamarine-TagRFP, sa construction a été confiée à la société Genecust. Le principe de construction de ce tandem est strictement identique à la réalisation des plasmides P73 à P76 : un amplicon codant la TagRFP est

construit par PCR en ajoutant les sites de restrictions EcoRI et KpnI respectivement en 5' et 3' de la séquence TagRFP. Cet amplicon est ensuite lié au plasmide P20 qui a été auparavant prédigérés par EcoRI et KpnI.

4.1.13 Listes des amorces utilisées pour la construction des plasmides

Nom de l'amorce	Séquence
T65S_FOR	5'-CGTGACCACCCTGAGCTGGGGCGTGCAGTGC-3'
T65S_REV	5'-GCACTGCACGCCCCAGCTCAGGGTGGTCACG-3'
H148G_FOR	5'-CAACTACATCAGCGGCAACGTCTATATCACC-3'
H148G_REV	5'-GGTGATATAGACGTTGCCGCTGATGTAGTTG-3'
Citrine_Y66A_FOR	5'-CGTGACCACCTTCGGCGCCGGCCTGATGTGC-3'
Citrine_Y66A_REV	5'-GCACATCAGGCCGCGCCGAAGGTGGTCACG-3'
TagRFP_STOP_FOR	5'-GGGCACAACTTAATTAAAGGACTCAGATCTCG-3'
TagRFP_STOP_REV	5'-CGAGATCTGAGTCCTTAATTAAGTTTGTGCCC-3'
S158T_FOR	5'-GCCTGGAAGGCAGAACCGACATGGCCCTC-3'
S158T_REV	5'-CAGGGCCATGTCGGTTCTGCCTTCCAGGC-3'
P45_T391A_FOR	5'-GGGCCTGCGTCGCGCCGCCCTGGTGGACGG-3'
P45_T391A_REV	5'-CCGTCCACCAGGGCGGCGCGACGCAGGCCC-3'

Tableau 4-1 : Séquences des amorces utilisées pour les mutations ponctuelles. Les codons présentés en rouge sont ceux introduisant les mutations recherchées.

Nom de l'amorce	Séquence
TagRFP_SacI	5'-ATTAGAGCT CATGGTGTCTAAGGGGAA-3'
TagRFP_EcoRI	5'-ATAATG AATTCTTAATTAAGTTTGTGCCCC-3'
AmpP45_5395	5'-CCAAGCTTGC GGCCGCCACCATGG-3'
AmpP45_6186_XhoI	5'-AC TCGAGCAGGACCATGTGATCGCG-3'
AmpP39_765_XhoI	5'-GCTCGAGTTCGTGACCGCCGC-3'
AmpP39_1018_XbaI	5'-TT CTAGACTTTTGTGCCATTAAACCAGGTCCC-3'
AmpP45_6389_XbaI	5'-TT CTAGACTGTCAAATAAGCATTTCC-3'
AmpP45_6	5'-AGAATTCTTAATTAAGTTTGTGCCCC-3'
AmpP14_682_EcoRI_FOR	5'-AAAAAG AATTCATGGTGAGCAAGGGCG-3'
AmpP14_1403_KpnI_REV	5'-AAGGTACCGTCGCGGCCGC-3'
AmpP42_613_EcoRI_FOR	5'-AAAAAG AATTCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGC-3'
AmpP42_1326_KpnI_REV	5'-AAGGTAC CTTAATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTGC-3'

Tableau 4-2 : Séquences des amorces utilisées pour les amplifications par PCR.

Les bases présentées en vert sont les sites de restrictions correspondant à l'enzyme identifiée dans le nom de l'amorce. Les barres verticales rouges marquent le site de coupure de l'enzyme de restriction.

4.2. Culture cellulaire

4.2.1 Entretien des cellules

Les cellules utilisées sont des BHK-21, fournies par P. Vincent du laboratoire des Processus adaptatifs de l'Université Pierre et Marie Curie. Ces cellules sont cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Media) avec Glutamax (Invitrogen, réf. 32561) complété à 5% de SVF (sérum de veau fœtal ; Invitrogen, réf. 10437) et sont maintenues à 37°C et 5% de CO₂. Elles sont passées lorsqu'elles atteignent 90% de confluence soit tous les 4 à 5 jours : le milieu est jeté, les cellules sont rincées en utilisant du DPBS pH 7.4 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ; Lifetechnologies, réf. 14190), l'agent de dissociation utilisé est la Trypsine (Lifetechnologies, réf. 25200), elle est mise dans la boîte de culture cellulaire, puis la boîte est placée à 37°C jusqu'au décollement et la dissociation des BHK. La trypsine est ensuite inactivée par ajout de DMEM à 5% de SVF. Les cellules sont ensuite comptées etensemencées dans une nouvelle boîte de culture cellulaire.

4.2.2 Transfections

Pour les expériences de microscopie FLIM, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre. La quantité de cellules à ensemencer sur les lamelles est fonction du nombre de jours séparant l'ensemencement de la transfection : les cellules doivent être entre 70 et 80% de confluence lors de l'étape de transfection pour que le rendement de cette étape soit convenable. Pour les cellules BHK-21, si la transfection est faite à J+1 ; J+2 ou J+3 après l'ensemencement, les quantités de cellules à déposer sont respectivement 6.10^5 ; 2.10^5 et 1.10^5 cellules.

Les cellules sont transfectées 24h avant d'être analysées sous microscope. L'agent de transfection utilisé est la lipofectamine 2000 (Lifetechnologie, réf. 11668), les plasmides à transférer sont préparés suivant le protocole fourni par Lifetechnologie. L'étape la plus critique pour avoir un bon taux de transfection est la confluence des cellules au moment de l'ajout du mélange plasmide/lipofectamine.

4.2.3 Cryoconservation des cellules

Des stocks de cellules sont faits et conservés dans un tank à azote liquide. Les aliquots doivent contenir une grande quantité de cellules pour une reprise efficace de la culture cellulaire à partir de ces échantillons. Chaque aliquot contient 1 mL de milieu à 4 à 10.10^6 cellules par millilitre.

Lors de la préparation des aliquots, les cellules doivent être à la fin de la phase de croissance logarithmique, ce qui correspond à une confluence d'environ 90%. Cette phase est celle où les cellules sont dans leur meilleur état ; si la préparation est faite en dehors de cette phase, la remise en culture de cellules contenues dans les aliquots sera plus difficile et n'est pas garantie. Le milieu de culture doit-être changé 24h avant de récolter les cellules pour les congeler. Le jour J, les cellules sont mises en suspension en suivant les mêmes étapes que celles réalisées lors d'un passage (voir ci-dessus).

Après l'étape d'inactivation de la Trypsine, la suspension est centrifugée à 100g pendant 5 à 6 min, le surnageant est éliminé et les cellules sont remise en suspension dans du DMEM à 5% de SVF. La suspension doit être à une concentration 2x supérieure à celle voulue dans les aliquots. Cette suspension est ensuite mélangée à volume égal d'une solution de DMEM contenant 20% de DMSO stérile.

4.3. Imagerie

4.3.1 Microscope du LCP : Durée de vie de fluorescence

a Matériel d'acquisition des données

Le microscope du LCP permet d'acquérir à la fois les images d'intensités de fluorescence et les durées de vie de fluorescence de différents fluorophores. Il est construit sur la base d'un microscope inversé Nikon TE2000 doté d'une lampe Hg pour la prise d'images d'épi-fluorescence grand champ. Le microscope est équipé d'une tourelle contenant les cubes contenant les filtres et miroirs dichroïques nécessaires pour la capture d'image de fluorescence de CFP, de YFP et de OFP. Ces cubes sont les suivants : les images CFP sont prises avec un cube contenant un filtre d'excitation ET436/20x (Chroma), un filtre d'émission 480AF30 (Omega) et d'un dichroïque 455DCLP (Omega) ; les images YFP sont prises avec un cube contenant un filtre d'excitation 500AF25 (Omega), un filtre d'émission 530ALP (Omega) et d'un dichroïque 515DXRLP (Omega) ; les images OFP sont prises avec un cube contenant un filtre d'excitation FF01-543/22 (Semrock), un filtre d'émission FF01-593/40 (Semrock) et d'un dichroïque FF562-Di03 (Semrock) ; nous pouvons également prendre des images FRET entre des CFP et des YFP grâce à un cube contenant un filtre 440AF21 (Omega) en excitation, un filtre 535/10 en émission et un miroir dichroïque T455lp (Chroma).

Pour la microscopie de durée de vie de fluorescence (FLIM) nous utilisons la technique de Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) ou comptage de photons uniques corrélé en temps. Pour cela, le microscope est équipé d'un objectif à immersion à eau de grossissement x60 et d'ouverture numérique 1,2 (Nikon). La lumière d'excitation est une diode laser pulsée LDH440 émettant à 442nm à une fréquence de 80MHZ pour une largeur de 80 ps à la moitié du maximum du pic d'excitation (PicoQuant). Une tête de balayage C1 (Nikon) est couplée par fibre optique à la diode LDH440, le signal traverse dans l'ordre : la tourelle contenant les filtres d'épi-fluorescence où on peut placer des densités neutres si nécessaire, puis traverse l'objectif pour atteindre l'échantillon. La tête de balayage

Nikon permet d'observer un champ de 100x100 μm maximum avec l'objectif x60 avec un temps de balayage par pixel de 61,44 μs . Les photons émis par l'échantillon sont déviés par un miroir dichroïque (SWP-500, Lambda Research Optics). Ils traversent une lentille de focalisation ($f=20\text{cm}$, Thorlabs), un filtre pour sélectionner les longueurs d'ondes d'émission des CFP (480AF30, Omega), deux filtres de suppression des longueurs d'onde d'excitation (458nm Razor Edge LongPass, Semrock), puis atteignent un détecteur MCP-PMT (Hamamatsu). Le signal est ensuite amplifié par un préamplificateur (Philips Scientific) puis dirigé vers un module TCSPC PicoHarp 300 (PicoQuant).

b Déroulement classique d'une expérience

Mise en place

Chaque expérimentation débute par la mesure de la puissance de l'illumination à travers les cubes d'observation et d'acquisition de l'intensité de fluorescence. Ces valeurs seront utilisées lors de l'acquisition pour évaluer l'intensité des cellules observées et lors du traitement post acquisition pour la normalisation des mesures.

Sélection de cellules

Pour éviter au maximum l'altération de la fluorescence des cellules observées, l'illumination de la lame est la plus courte possible et si nécessaire, l'intensité de la lampe est atténuée par l'utilisation de densités optiques. La sélection de cellules se fait via le cube CFP.

Les cellules choisies doivent répondre à 2 exigences en termes d'intensité. La première est que nous devons nous affranchir des effets de l'autofluorescence cellulaire. En effet, dans les cellules transfectées dont l'intensité de fluorescence est trop faible, on observe une diminution de la durée de vie de fluorescence du biosenseur à cause de cette autofluorescence. Pour éviter cette contamination, nous excluons les cellules dont l'intensité de fluorescence est inférieure à un seuil de sécurité. La valeur de ce seuil a été déterminée à partir de mesures de durée de vie de fluorescence dans des cellules transfectées avec de faibles quantités d'Aquamarine. Nous avons établis une courbe de la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine en fonction de l'intensité de fluorescence de la ROI sélectionnée et nous avons déterminé l'intensité à partir de laquelle la durée de vie de l'Aquamarine est modifiée par l'autofluorescence cellulaire. Pour éviter les effets de

l'autofluorescence, nous avons décidé de travailler avec les cellules dont l'intensité de fluorescence est au moins 2 fois supérieure à celle où on commence à observer la baisse de la durée de vie de fluorescence de l'Aquamarine (figure 4-5).

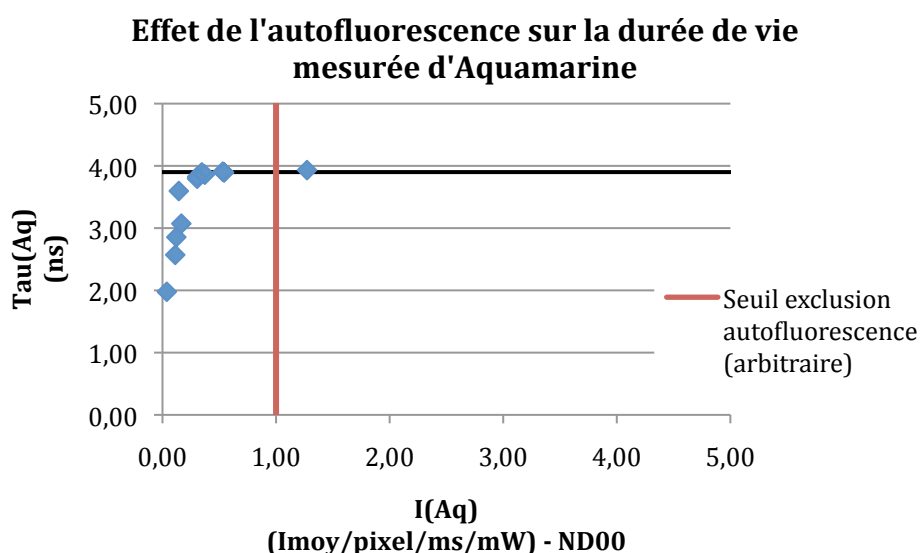


Figure 4-5 : Seuil d'exclusion de l'autofluorescence cellulaire

La 2^e exigence concerne les effets de proximité qui peuvent être observés dans les cellules dans lesquelles le taux de transfection est trop élevé provoquant des phénomènes de FRET intermoléculaire pouvant fausser les analyses. Pour éviter l'impact de ces effets sur nos calculs nous nous autorisons une erreur de 5% sur la valeur de durée de vie de fluorescence mesurée. Pour chaque condition expérimentale nous obtenons ainsi une valeur d'intensité au-dessus de laquelle nous n'exploitons pas les résultats.

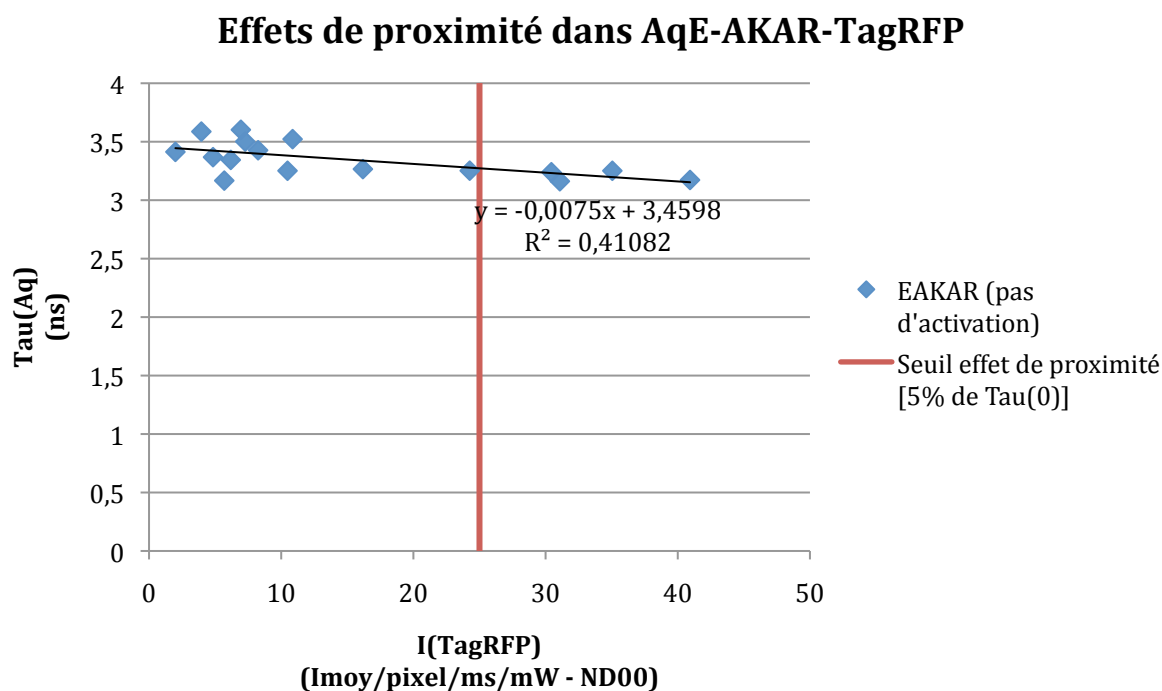


Figure 4-6 : Seuil d'exclusion des effets de proximité dans $AqE-AKAR-TagRFP$

Acquisitions

Les cellules choisies sont placées au centre du champ du microscope et plusieurs images de fluorescence sont prises. La première image est prise à travers le cube dit « CFP » du microscope. Ce cube nous permet d'exciter la protéine donneur de FRET et de mesurer sa fluorescence. Pour la deuxième image nous utilisons le cube « YFP » ou « OFP » en fonction du biosenseur utilisé pour l'expérience. Ces cubes permettent d'exciter directement la protéine accepteur et de mesurer son signal de fluorescence. Les filtres utilisés dans ces cubes sont indiqués dans le Tableau 4-3. Ces images sont prises en choisissant une exposition permettant une brève excitation lumineuse de l'échantillon (de l'ordre de 500ms).

L'intensité des cellules nous permet d'estimer s'il est nécessaire d'utiliser des densités neutres pour maintenir le taux de coups TCSPC sous 100 000 coups/sec de façon à ne pas endommager le détecteur. Le cas échéant, la densité neutre est placée sur le chemin optique et un scan test est effectué. Lors de ce test, avant la mise en route du laser, le taux de comptage doit rester sous 10 coups/sec, si ce taux y est supérieur, il faut augmenter la

densité optique utilisée. Après cette étape, un scan unique est effectué pour ajuster le champ d'observation TCSPC aux cellules choisies.

Lorsque la densité optique la plus adaptée a été choisie et que le champ d'observation est correctement délimité, on procède à l'acquisition. Le nombre de scan de l'acquisition doit être suffisant pour permettre le post-traitement des données.

Immédiatement après la mesure, une estimation des durées de vie de fluorescence de la protéine donneur est faite à l'aide du logiciel Symphotime.

Traitements des données

Les données sont ensuite exportées et retraitées à l'aide d'une procédure développée dans IgorPro. Cette procédure réalise un fit multiexponentiel du déclin sous l'approximation d'une excitation infiniment brève et d'une détection instantanée des photons de fluorescence. La largeur de la fonction d'appareil de notre instrument étant de 100ps environ (qui correspond à la durée réelle des deux processus d'excitation et de détection précédents), cette approximation est vérifiée si l'on n'exploite les données qu'à partir d'une centaine de picosecondes après le maximum de cette fonction d'appareil, ce qui conduit à n'exploiter le déclin qu'à partir (ou au-delà) de son maximum (procédure dite de « tail-fitting »). Ceci pose une limite à la résolution temporelle des données obtenues. Notamment des composantes de temps très courtes <100 ps ne seront pas détectées avec cette méthode (une exploitation plus précise des déclins peut être réalisée en effectuant une déconvolution par la fonction d'appareil, mais cette méthode très lourde n'a pas été utilisée au cours de ce travail, car incompatible avec le grand volume de données à traiter).

Le programme détermine automatiquement les limites du fit et nous permet de fitter l'histogramme TCSPC obtenu lors de la mesure avec une expression à 2, 3 ou 4 exponentielles. L'équation à 2 exponentielles est décrite ci-dessous :

$$f(t) = y_0 + a_1 * e^{\left(-\frac{t-t_0}{\tau_1}\right)} + a_2 * e^{\left(-\frac{t-t_0}{\tau_2}\right)}$$

Les paramètres numériques de cette fonction sont optimisés par le programme pour décrire au mieux le déclin expérimental. Ils sont ensuite utilisés pour recalculer la durée de vie moyenne de fluorescence, définie par :

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i a_i \tau_i}{\sum_i a_i}$$

Chaque résultat de fit est accompagné d'un test du χ^2 et l'analyse des résidus nous permet d'évaluer la convergence du fit. Si les résidus ne sont pas répartis aléatoirement et symétriquement autour de 0, un nouveau fit est effectué avec un modèle présentant un nombre de termes exponentiels supérieur.

Les images de fluorescence prise en début d'acquisition sont également traitées. Les intensités de fluorescence mesurées sont normalisées et exprimées en intensité moyenne/pixel/ms/mW. Pour chaque expérience, il est donc nécessaire de mesurer la puissance d'illumination à travers tous les cubes du microscope utilisés pour les prises d'images de fluorescence.

Pour certaines images de fluorescence nous avons utilisé des densités neutres pour atténuer la lumière transmise. La transmission de l'intensité lumineuse à travers des densités neutres suit la fonction :

$$d = -\log_{10} (I/I_0)$$

où d est la valeur de la densité neutre, I est l'intensité lumineuse mesurée après le filtre et I_0 est l'intensité lumineuse incidente, c'est-à-dire non atténuée. Dans les cas où des densités neutres ont été utilisées, les intensités normalisées sont donc ramenées à une densité neutre de 0 grâce à cette fonction.

Microscope	Filtre	Bande passante (en nm)	Fabricant	Adapté pour	Cube
BIFLUOR (LCP-UPSUD)	ET436/20x	426 - 446	Chroma	Excitation des CFP	CFP
	440AF21	429,5 - 450,5	Omega	Excitation des CFP	FRET
	480AF30	465 - 495	Omega	Fluorescence des CFP	CFP
	500AF25	487,5 - 512,5	Omega	Excitation des YFP	YFP
	535/10	525 - 545	???	Fluorescence des YFP	FRET
	530ALP	530 <	Omega	Fluorescence des YFP	YFP
	FF01-543/22	532 - 554	Semrock	Excitation des OFP	OFP
	FF01-593/40	573 - 613	Semrock	Fluorescence des OFP	OFP
Poste FRET1 (UPMC)	D436/20	426 - 446	Chroma	Excitation des CFP	
	H480-10	475 - 485	Chroma	Fluorescence des CFP	
	D535/40	515 - 555	Chroma	Fluorescence des YFP	
	FF02-617/73	580,05 - 653,5	Chroma	Fluorescence des OFP	

Tableau 4-3 : Récapitulatifs des filtres utilisés dans les microscopes de fluorescence.

Microscope	Miroir dichroïque	Bande passante (en nm)	Fabricant	Cube
BIFLUOR (LCP-UPSUD)	455DCLP	455 <	Omega	CFP
	515DXRLP	515 <	Omega	YFP
	FF562-Di03	562 <	Semrock	OFP
	T455lp	455 <	Chroma	FRET
Poste FRET1 (UPMC)	455dxct	455 <	Chroma	

Tableau 4-4 : Récapitulatifs des miroirs dichroïques utilisés dans les microscopes de fluorescence.

4.3.2 Microscope du NPA : Ratiométrie

a Matériels d'acquisition des données

Les images plein champ sont acquises grâce à un microscope Olympus BX51WI équipé d'un objectif de grossissement x40 d'ouverture numérique 0,8 et d'un objectif x60 d'ouverture numérique de 0,9 ; les deux étant des objectifs à immersion à eau. La platine est montée sur un piézoélectrique (P-721 PIFOC, Physik Instrumente GmbH) et le focus de l'image peut donc être corrigé en cours d'expérience. La caméra d'acquisition est une caméra CCD ORCA-AG (Hamamatsu). La chambre d'observation est perfusée en permanence avec le milieu d'observation nécessaire à l'analyse effectuée (voir Protocoles) à une vitesse de 2 mL.min⁻¹. L'installation dispose de 5 réservoirs différents permettant d'ajouter des drogues au milieu d'observation sans toucher à l'échantillon. L'excitation de fluorescence est faite grâce à une lampe halogène, un shutter (Uniblitz, Vincent Associates) et grâce à un filtre D436/20 en excitation, ainsi qu'un miroir dichroïque 455dcxt. La fluorescence émise par les CFP est collectée grâce à un filtre HQ480/10 ; celle des YFP grâce à un filtre D535/40 ; celle des OFP grâce à un filtre FF02-617/73 ; Les filtres et miroirs dichroïques utilisés ont tous été achetés chez Chroma Technology, ils sont placés dans une roue à filtre (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Tous les éléments du setup sont pilotés grâce au logiciel iVision (Biovision).

b Traitements des images

Les images acquises sont immédiatement traitées sous IgorPro (Wavemetrics) grâce à la procédure Raplounf développée par Pierre Vincent. Le traitement des images est le suivant : les décalages de la caméra sont corrigés, toutes les valeurs d'intensité sont divisées par la durée d'exposition, l'ombrage est corrigé pour chaque canal de fluorescence utilisé. Pour cela nous prenons les images d'une solution fluorescente uniforme de Coumarine 343 à 100 mol.L⁻¹ contenue dans un hémacytomètre dans chacun des canaux utilisés. Les données acquises sont divisées par ces images d'ombrage acquises aux longueurs d'onde correspondantes. Cela permet d'une part de corriger la non-uniformité du microscope, car la brillance est plus importante au centre de l'image qu'en ses bords, et d'autre part de pouvoir comparer les valeurs de ratio obtenus sur différentes installations. En effet, puisque

les images prises dans chaque canal sont divisées par leur image ombrage respective, le ratio de la solution ombrage est par définition égal à 1. La correction d'ombrage définit donc le ratio 1 pour le chromophore d'ombrage utilisé, ici la Coumarine 343. Après l'application de la correction d'ombrage, les images sont corrigées pour le signal du background ; pour les éventuels déplacements de l'échantillon ; enfin les ratios sont calculés pixel par pixel en divisant les images de fluorescence de l'accepteur par les images de fluorescence du donneur (YFP/CFP ou OFP/CFP suivant la construction analysée). Les images sont présentées en pseudo couleurs codant la fluorescence en intensité et les valeurs de ratio en teinte. Deux graphiques représentant l'évolution des signaux au cours du temps sont tracés. Le premier regroupe l'évolution des signaux de fluorescence mesurés dans les canaux donneur et accepteur, le second représente l'évolution du signal ratiométrique au cours de l'expérience.

4.4. Protocoles

4.4.1 FLIM

a Etudes FLIM en fonction du pH intracellulaire

Le microscope dispose de bagues où nous plaçons les lamelles sur lesquelles nous avons fait pousser les cellules BHK que nous avons transfectées avec le plasmide d'intérêt. La lamelle est recouverte d'une solution tampon constituée de MES (15 mmol.L^{-1}), d'HEPES (15 mmol.L^{-1}) et de KCl (140 mmol.L^{-1}). Le pH de cette solution tampon est ajusté lors de sa préparation à l'aide de NaOH et de H_2SO_4 concentrés. Juste avant de déposer la solution tampon sur la lamelle, nous y ajoutons de la nigrécine. Ce composé est un ionophore K^+/H^+ permettant d'équilibrer les pH intracellulaire et extracellulaire. Il est soluble dans l'éthanol, pour ne pas endommager les cellules il est donc nécessaire de diluer le plus possible la solution de nigrécine dans la solution tampon tout en travaillant à une concentration finale de nigrécine de $13 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Pour la première partie des acquisitions, le pH de la solution tampon est de 7,4. Lorsque l'échantillon est en place, nous procédons à la sélection du champ de cellules à étudier. Pour cela, l'échantillon est regardé à travers le cube « CFP », nous permettant d'exciter le donneur et d'observer sa fluorescence. Pendant cette étape de sélection du champ d'intérêt, nous travaillons de façon à illuminer l'échantillon le moins possible. Pour

cela nous disposons de densités neutres nous permettant d'atténuer la lumière transmise à l'échantillon. Le microscope est également équipé d'un shutter manuel nous permettant de rapidement arrêter l'excitation de l'échantillon. Lorsqu'un champ a été choisi nous prenons dans cet ordre : une image de fluorescence du donneur après son excitation directe ; une image de fluorescence de l'accepteur après son excitation directe ; une image de fluorescence de l'accepteur après excitation du donneur. Nous procédons ensuite à la mesure de durée de vie de fluorescence du donneur et lorsque c'est nécessaire à une mesure du spectre d'émission de l'échantillon après excitation du donneur grâce au spectrophotomètre USB2000 (Ocean Optics).

Après que ces premières acquisitions aient été réalisées nous procédons au changement de pH. Pour cela nous retirons les 2 mL de milieu d'observation que nous remplaçons immédiatement par 2 mL de milieu MES/HEPES au pH voulu et contenant $13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de nigéricine. Après avoir constaté que le champ d'observation n'est pas modifié, nous procédons à une deuxième étape d'acquisitions de données dans le même ordre que la première. Pour chaque lamelle un seul changement de pH est effectué.

b Etudes FLIM de l'activation de la voie AMPc/PKA

Le milieu HEPES utilisé pour ces études est constitué de NaCl (140 mmol.L^{-1}), KCl (5 mmol.L^{-1}), MgCl_2 (1 mmol.L^{-1}), CaCl_2 (2 mmol.L^{-1}), HEPES (10 mmol.L^{-1}) et de glucose ajouté au milieu le jour de l'expérience (10 mmol.L^{-1}). Le milieu contenant du glucose ne se conserve pas et doit être jeté en fin d'expérience. Le pH de cette solution est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH et H_2SO_4 concentré.

Les étapes d'acquisition sont les mêmes que dans le paragraphe précédent. La seule différence concerne l'étape de changement de milieu lors de laquelle nous procédons à l'activation de la voie AMPc/PKA. Pour cela, nous retirons 1 mL de milieu HEPES que nous remplaçons immédiatement par 1mL de milieu HEPES contenant de la Forskoline (FSK) (concentration finale $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et du 3-Isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) (concentration finale $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). La FSK est un composé qui augmente la quantité intracellulaire d'AMPc en activant les adénylate cyclases. Son effet est maximisé par l'utilisation de l'IBMX, un inhibiteur non spécifique des phosphodiésterases responsables de la dégradation des molécules d'AMPc. L'activation de la cascade de signalisation AMPc/PKA par ces deux

composés est assez rapide et la deuxième étape d'acquisition peut être démarrée après 5 minutes d'incubation de l'échantillon à température ambiante. Là encore nous nous assurons de procéder à la seconde étape d'acquisition après avoir vérifié que le champ d'observation n'est pas changé et que l'échantillon n'a pas été déplacé.

4.4.2 Ratiométrie

a Evolution du ratio en fonction du pH intracellulaire

Pour les expériences d'analyses du signal ratiométrique nous utilisons les mêmes solutions que pour l'étude du comportement en fonction du pH en FLIM, à savoir des solutions contenant MES (15 mM), HEPES (15 mM) et KCl (140 mM) ajustées à différents pH avec NaOH et H₂SO₄. Un réservoir différent de l'installation est utilisé pour chaque pH étudié et la nigéricine est ajoutée dans le réservoir à une concentration de 13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

La première étape d'acquisition des données basales est faite en utilisant la solution MES/HEPES ajustée à pH 7,4 et dure 5 à 10 minutes.

Nous déclenchons la deuxième étape en basculant l'alimentation de la chambre d'observation sur le réservoir contenant la solution MES/HEPES ajustée au pH acide voulu. Les variations observées sur les signaux et leur stabilisation suite à un changement de pH sont rapidement observables et cette deuxième étape ne dure en général pas plus de 10 minutes.

Pour terminer l'expérience nous rebasculons sur le réservoir contenant la solution MES/HEPES à pH neutre, et nous faisons durer cette étape les temps que les signaux se stabilisent soit 5 à 10 min.

b Activation de la voie AMPc/PKA en ratiométrie

Le milieu d'observation utilisé est constitué de NaCl (125 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), NaH₂PO₄ (1,25 mM), NaHCO₃ (26 mM) et de glucose (25 mM). La solution est saturée en CO₂ (5%) et en O₂ (95%). Une solution stock 10x contenant du NaCl, du NaH₂PO₄ et du NaHCO₃ est maintenue à 4°C. Le CaCl₂, le MgCl₂ et le glucose sont ajoutés à la solution 1x le jour de l'expérimentation.

Nous alimentons la chambre d'observation avec cette solution qui est versée régulièrement dans un des réservoirs de l'installation. La préparation des paramètres après la mise en place de la lamelle à étudier est faite en utilisant cette solution, elle sert également à la première étape pendant laquelle nous mesurons les niveaux de fluorescence de la protéine donneur et de la protéine accepteur en conditions basales. Nous pouvons ainsi déterminer le niveau de FRET basal et le signal ratiométrique en absence d'activation forcée de la voie AMPc/PKA. Cette étape dure 10 à 15 minutes pendant lesquelles nous faisons des acquisitions des images de fluorescence du donneur et de l'accepteur toutes les 30 secondes.

La deuxième étape de ces expériences est l'étape d'activation. La solution utilisée pour cette étape a la même composition que celle de la première étape à la différence qu'elle contient de la FSK (12,5 μ M) et de l'IBMX (100 μ M). Ce milieu est placé dans un second réservoir, le déclenchement de la deuxième étape se fait simplement en basculant le système d'alimentation de la chambre d'observation sur ce deuxième réservoir. L'étape d'activation dure une vingtaine de minutes, le temps d'observer les variations des signaux d'intensité et du signal ratiométrique. Lorsque le ratio est stabilisé, nous procédons à la troisième étape, l'étape de lavage.

Le lavage est déclenché en rebasculant le système sur le premier réservoir pour purger la chambre d'observation de la FSK et de l'IBMX. Cette étape nous permet d'analyser la réversibilité de l'activation. Le retour aux lignes de base des différents signaux est plus progressif que les variations observables lors de l'étape d'activation et l'étape de lavage est en conséquence un peu plus longue : elle dure une vingtaine de minutes, le temps d'obtenir un signal ratiométrique stabilisé à son niveau basal.

Annexes

Protéine Fluorescente	Source	Pic d'Excitation (nm)	Pic d'Emission (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	QY	Brillance	pKa	Références
ECFP	<i>A. victoria</i>	439	476	32 500	0,4	13 000	5,6	(Cubitt et al., 1995)
mTurquoise	<i>A. victoria</i>	434	474	30 000	0,84	25 200	3,4	(Goedhart et al., 2010)
Cerulean	<i>A. victoria</i>	433	475	43 000	0,62	26 660	5,2	(Rizzo et al., 2004)
Aquamarine	<i>A. victoria</i>	439	476	26 000	0,89	23 140	3,3	(Erard et al., 2013)
AvGFP	<i>A. victoria</i>	475	504	25 000	0,79	19 750	4,5	(Patterson et al., 1997; Tsien, 1998)
EYFP	<i>A. victoria</i>	514	527	83 400	0,61	50 874	6,2	(Miyawaki et al., 1999)
Venus	<i>A. victoria</i>	515	528	92 200	0,57	52 554	6,0	(Nagai et al., 2002; Shaner et al., 2007)
cpVenus	<i>A. victoria</i>	515	528	92 200	0,57	52 554	6,0	(Nagai et al., 2004)
Citrine	<i>A. victoria</i>	515	527	82 000	0,76	62 320	5,7 ou 5,9	(Mank et al., 2006; Shaner et al., 2007)
mCitrine	<i>A. victoria</i>	516	529	77 000	0,76	58 520	5,7	(Griesbeck, 2001)
TagRFP	<i>E. quadricolor</i>	555	584	100 000	0,48	48 000	< 4.0	(Merzlyak et al., 2007)
TagRFP-T	<i>E. quadricolor</i>	555	584	81 000	0,41	33 210	4,6	(Shaner et al., 2008)

Annexe 1 : Caractéristiques des protéines fluorescentes utilisées dans ces travaux

Nom du biosenseur	Numéro du plasmide	Donneur	Accepteur	Module Senseur	Référence
AKAR1		CFP tronquée	Citrine	LRRA- <u>S</u> -LP	(Zhang et al., 2001)
AKAR2		CFP tronquée	Citrine	LRRA- <u>T</u> -LVD	(Zhang et al., 2005)
AKAR2.2	P24	mCFP tronquée	mCitrine	LRRA- <u>T</u> -LVD	(Zhang et al., 2005)
AKAR3	P25	mCFP tronquée	cpVenus	LRRA- <u>T</u> -LVD	(Allen and Zhang, 2006)
AKAR4	P38	Cerulean entière	cpVenus	LRRA- <u>T</u> -LVD	(Depry et al., 2011)
^{Aq} AKAR ^{Cit}	P27	Aquamarine Tronquée	mCitrine	LRRA- <u>T</u> -LVD	(Erard et al., 2013)
^{Cerulean(T65S)} AKAR ^{cpVenus}	P39	Cerulean(T65S) entière	cpVenus	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{ECFP} AKAR ^{Cit(Y66A)}	P40	CFP tronquée	non absorbant	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{Aq} AKAR ^{Cit(Y66A)}	P41	Aquamarine Tronquée	non absorbant	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{Aq} AKAR ^{TagRFP}	P45	Aquamarine Tronquée	TagRFP	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{Aq} AKARmut ^{TagRFP}	P59	Aquamarine Tronquée	TagRFP	LRRA- <u>A</u> -LVD	
^{Aq} AKAR ^{TagRFP(T)}	P46	Aquamarine Tronquée	TagRFP-T	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{AqE} AKAR ^{TagRFP}	P60	Aquamarine entière	TagRFP	LRRA- <u>T</u> -LVD	
^{AqE} AKARmut ^{TagRFP}	P61	Aquamarine entière	TagRFP	LRRA- <u>A</u> -LVD	

Annexe 2 : Caractéristiques des biosenseurs AKAR utilisés dans ces travaux

1-AKAR-Cit	1	31	31	31	41
1-AKAR-Cit(Y56A)	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
IKAR-Cit	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
IKAR-Cit(Y56A)	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
1-AKAR-Cit	51	61	71	81	91
1-AKAR-Cit(Y56A)	T G K L P V P W P T	L V T T L Y W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
IKAR-Cit	T G K L P V P W P T	L V T T L Y W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
IKAR-Cit(Y56A)	T G K L P V P W P T	L V T T L Y W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
1-AKAR-Cit	101	111	121	131	141
1-AKAR-Cit(Y56A)	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S H N
IKAR-Cit	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S H N
IKAR-Cit(Y56A)	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S G N
1-AKAR-Cit	151	161	171	181	191
1-AKAR-Cit(Y56A)	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
IKAR-Cit	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
IKAR-Cit(Y56A)	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
1-AKAR-Cit	201	211	221	231	241
1-AKAR-Cit(Y56A)	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
IKAR-Cit	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
IKAR-Cit(Y56A)	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
1-AKAR-Cit	251	261	271	281	291
1-AKAR-Cit(Y56A)	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
IKAR-Cit	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
IKAR-Cit(Y56A)	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
1-AKAR-Cit	301	311	321	331	341
1-AKAR-Cit(Y56A)	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q R V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
IKAR-Cit	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q R V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
IKAR-Cit(Y56A)	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q R V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
1-AKAR-Cit	351	361	371	381	391
1-AKAR-Cit(Y56A)	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T I V D G G T G G S
IKAR-Cit	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T I V D G G T G G S
IKAR-Cit(Y56A)	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T I V D G G T G G S
1-AKAR-Cit	401	411	421	431	441
1-AKAR-Cit(Y56A)	E L M V S K G E E L	F T G V V P I L V E	L D G D V N G H K F	S V S G E G E G D A	T Y G K L T L K F I
IKAR-Cit	E L M V S K G E E L	F T G V V P I L V E	L D G D V N G H K F	S V S G E G E G D A	T Y G K L T L K F I
IKAR-Cit(Y56A)	E L M V S K G E E L	F T G V V P I L V E	L D G D V N G H K F	S V S G E G E G D A	T Y G K L T L K F I
1-AKAR-Cit	451	461	471	481	491
1-AKAR-Cit(Y56A)	C T T G K L P V P W	P T L V T T F G Y G	L M C F A R Y P D H	M K Q H D F F K S A	M P E G Y V Q E R T
IKAR-Cit	C T T G K L P V P W	P T L V T T F G Y G	L M C F A R Y P D H	M K Q H D F F K S A	M P E G Y V Q E R T
IKAR-Cit(Y56A)	C T T G K L P V P W	P T L V T T F G Y G	L M C F A R Y P D H	M K Q H D F F K S A	M P E G Y V Q E R T
1-AKAR-Cit	501	511	521	531	541
1-AKAR-Cit(Y56A)	I F F K D D G N Y K	T R A E V K F E G D	T L V N R I E L K G	I D F K E D G N I L	G H K L E Y N Y N S
IKAR-Cit	I F F K D D G N Y K	T R A E V K F E G D	T L V N R I E L K G	I D F K E D G N I L	G H K L E Y N Y N S
IKAR-Cit(Y56A)	I F F K D D G N Y K	T R A E V K F E G D	T L V N R I E L K G	I D F K E D G N I L	G H K L E Y N Y N S
1-AKAR-Cit	551	561	571	581	591
1-AKAR-Cit(Y56A)	H N V Y I M A D K Q	K N G I K V N F K I	R H N I E D G S V Q	L A D H Y Q Q N T P	I G D G P V L L P D
IKAR-Cit	H N V Y I M A D K Q	K N G I K V N F K I	R H N I E D G S V Q	L A D H Y Q Q N T P	I G D G P V L L P D
IKAR-Cit(Y56A)	H N V Y I M A D K Q	K N G I K V N F K I	R H N I E D G S V Q	L A D H Y Q Q N T P	I G D G P V L L P D
1-AKAR-Cit	601	611	621	631	641
1-AKAR-Cit(Y56A)	N H Y L S Y Q S K L	S K D P N E K R D H	M V L L E F V T A A	G I T L G M D E L Y	K
IKAR-Cit	N H Y L S Y Q S K L	S K D P N E K R D H	M V L L E F V T A A	G I T L G M D E L Y	K
IKAR-Cit(Y56A)	N H Y L S Y Q S K L	S K D P N E K R D H	M V L L E F V T A A	G I T L G M D E L Y	K

Annexe 3: Alignement de séquences des biosenseurs ayant un couple ECFP-Citrine ou Aquamarine-Citrine

q-AKAR-Cit	1	11	21	31	41
q-AKAR-TagRFP	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
q-AKAR-TagRFP(S158T)	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
q-AKARmut-TagRFP	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y	G K L T L K F I C T
q-AKAR-Cit	51	61	71	81	91
q-AKAR-TagRFP	T G K L P V P W P T	L V T T L S W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
q-AKAR-TagRFP(S158T)	T G K L P V P W P T	L V T T L S W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
q-AKARmut-TagRFP	T G K L P V P W P T	L V T T L S W G V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
q-AKAR-Cit	101	111	121	131	141
q-AKAR-TagRFP	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S G N
q-AKAR-TagRFP(S158T)	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S G N
q-AKARmut-TagRFP	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H	K L E Y N Y I S G N
q-AKAR-Cit	151	161	171	181	191
q-AKAR-TagRFP	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
q-AKAR-TagRFP(S158T)	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
q-AKARmut-TagRFP	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
q-AKAR-Cit	201	211	221	231	241
q-AKAR-TagRFP	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
q-AKAR-TagRFP(S158T)	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
q-AKARmut-TagRFP	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A R M	H K F S Q E Q I G E	N I V C R V I C T T
q-AKAR-Cit	251	261	271	281	291
q-AKAR-TagRFP	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
q-AKAR-TagRFP(S158T)	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
q-AKARmut-TagRFP	G Q I P I R D L S A	D I S Q V L K E K R	S I K K V W T F G R	N P A C D Y H L G N	I S R L S N K H F Q
q-AKAR-Cit	301	311	321	331	341
q-AKAR-TagRFP	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q K V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
q-AKAR-TagRFP(S158T)	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q K V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
q-AKARmut-TagRFP	I L L G E D G N L L	L N D I S T N G T W	L N G Q K V E K N S	N Q L L S Q G D E I	T V G V G V E S D I
q-AKAR-Cit	351	361	371	381	391
q-AKAR-TagRFP	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T L V D G G T G G S
q-AKAR-TagRFP(S158T)	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T L V D G G T G G S
q-AKARmut-TagRFP	L S L V I F I N D K	F K Q C L E Q N K V	D R S A G K P G S G	E G S T K G L R R A	T L V D G G T G G S
q-AKAR-Cit	401	411	421	431	441
q-AKAR-TagRFP	E L M V S K G E E L	F T G V V P I L V E	L D G D V N G H K F	S V S G E G E G D A	T Y G A L T L K F I
q-AKAR-TagRFP(S158T)	E L M V S K G E E L	I K E N M H M K I Y	M E G T V N N H H F	K C T S E G E G K P	Y E G T Q T M R I K
q-AKARmut-TagRFP	E L M V S K G E E L	I K E N M H M K I Y	M E G T V N N H H F	K C T S E G E G K P	Y E G T Q T M R I K
q-AKAR-Cit	451	461	471	481	491
q-AKAR-TagRFP	- C T T G K L P V P	W P T L V T T F L V	G L M C F A R Y P D	H M K Q H D F F K S	A M P E G Y V Q E R
q-AKAR-TagRFP(S158T)	V V E G G R L P F A	F D I L A T S F M F	G S R T F I N H T -	- Q G I P D F F K Q	S F P E G F T W E R
q-AKARmut-TagRFP	V V E G G R L P F A	F D I L A T S F M F	G S R T F I N H T -	- Q G I P D F F K Q	S F P E G F T W E R
q-AKAR-Cit	501	511	521	531	541
q-AKAR-TagRFP	T I F F K D D G N Y	K T R A E V K F E G	D T L V N R I E L K	G I D F K E O G N I	L G H K L - E Y N Y
q-AKAR-TagRFP(S158T)	V T T Y E D G G V L	T A T Q D T S L Q D	G C L I Y N V K I R	G V N F P S N G P V	M Q K K T L G W E A
q-AKARmut-TagRFP	V T T Y E D G G V L	T A T Q D T S L Q D	G C L I Y N V K I R	G V N F P S N G P V	M Q K K T L G W E A
q-AKAR-Cit	551	561	571	581	591
q-AKAR-TagRFP	N S H N V Y I M A D	K Q K N G I K V N F	K I R H N I E D G S	V - - - Q L A D H Y	Q Q N T P I G D G P
q-AKAR-TagRFP(S158T)	N T E M L Y P A D G	G L E G R S D M A L	- - - - K L V G G G	H L I C N F K T T Y	R S K K P A K - - N
q-AKARmut-TagRFP	N T E M L Y P A D G	G L E G R S D M A L	- - - - K L V G G G	H L I C N F K T T Y	R S K K P A K - - N
q-AKAR-Cit	601	611	621	631	641
q-AKAR-TagRFP	V L L P D N H Y L S	Y Q S K L S K D P N	- - - - E K R D H M	V L L E F - - V T	A A G I T L G M D E
q-AKAR-TagRFP(S158T)	L K M P G V Y Y V D	H R L E R I K E A D	K E T Y V E Q H E V	A V A R Y C D L P S	K L G H K L N - - -
q-AKARmut-TagRFP	L K M P G V Y Y V D	H R L E R I K E A D	K E T Y V E Q H E V	A V A R Y C D L P S	K L G H K L N - - -
q-AKAR-Cit	651				
q-AKAR-TagRFP	L Y K				
q-AKAR-TagRFP(S158T)					
q-AKARmut-TagRFP					

Annexe 4: Séquences des biosenseurs après le remplacement de la citrine par une TagRFP

IKAR-TagRFP	1	15	29	43
AKAR-TagRFP	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y
AKARmut-TagRFP	M V S K G E E L F T	G V V P I L V E L D	G D V N G H R F S V	S G E G E G D A T Y
IKAR-TagRFP	51	65	79	93
AKAR-TagRFP	T G K L P V P W P T	L V T T L S W Q V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P
AKARmut-TagRFP	T G K L P V P W P T	L V T T L S W Q V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P
IKAR-TagRFP	101	115	129	143
AKAR-TagRFP	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H
AKARmut-TagRFP	F K D D G N Y K T R	A E V K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F K E D G N I L G H
IKAR-TagRFP	151	165	179	193
AKAR-TagRFP	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G
AKARmut-TagRFP	V Y I T A D K Q K N	G I K A H F K I R H	N I E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G
IKAR-TagRFP	201	215	229	243
AKAR-TagRFP	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A - -	- - - - - R
AKARmut-TagRFP	Y L S T Q S K L S K	D P N E K R D H M V	L L E F V T A A G I	T L G M D E L Y R
IKAR-TagRFP	251	265	279	293
AKAR-TagRFP	E N I V C R V I C T	T G Q I P I R D L S	A D I S Q V L K E K	R S I K K V W T F G
AKARmut-TagRFP	E N I V C R V I C T	T G Q I P I R D L S	A D I S Q V L K E K	R S I K K V W T F G
IKAR-TagRFP	301	315	329	343
AKAR-TagRFP	N I S R I S N K H F	Q I L L G E D G N L	L L N D I S T N G T	W L N G Q K V E K N
AKARmut-TagRFP	N I S R I S N K H F	Q I L L G E D G N L	L L N D I S T N G T	W L N G Q K V E K N
IKAR-TagRFP	351	365	379	393
AKAR-TagRFP	I T V G V G V E S D	I L S L V I F I N D	K F K Q C L E Q N K	V D R S A G K P G S
AKARmut-TagRFP	I T V G V G V E S D	I L S L V I F I N D	K F K Q C L E Q N K	V D R S A G K P G S
IKAR-TagRFP	401	415	429	443
AKAR-TagRFP	A T L V D G G T G G	S E L M V S K G E E	L I K E N M H M K L	Y M E G T V N N H H
AKARmut-TagRFP	A T L V D G G T G G	S E L M V S K G E E	L I K E N M H M K L	Y M E G T V N N H H
IKAR-TagRFP	451	465	479	493
AKAR-TagRFP	P Y E G T Q T M R I	K V V E G G P L P F	A F D I L A T S E M	Y G S R T F I N H T
AKARmut-TagRFP	P Y E G T Q T M R I	K V V E G G P L P F	A F D I L A T S E M	Y G S R T F I N H T
IKAR-TagRFP	501	515	529	543
AKAR-TagRFP	F P E G F T W E R V	T T Y E D G G V L T	A T O D T S L Q D G	C L I Y N V K I R G
AKARmut-TagRFP	F P E G F T W E R V	T T Y E D G G V L T	A T O D T S L Q D G	C L I Y N V K I R G
IKAR-TagRFP	551	565	579	593
AKAR-TagRFP	Q K K Y L G W E A N	T E M L Y P A D G G	L E G R S D M A L K	L V G G G H L I C N
AKARmut-TagRFP	Q K K Y L G W E A N	T E M L Y P A D G G	L E G R S D M A L K	L V G G G H L I C N
IKAR-TagRFP	601	615	629	643
AKAR-TagRFP	A R N L K M P G V Y	Y V D H R L E R I K	E A D K E T Y V E Q	H E V A V A R Y C D
AKARmut-TagRFP	A R N L K M P G V Y	Y V D H R L E R I K	E A D K E T Y V E Q	H E V A V A R Y C D

Annexe 5: Réintroduction d'une Aquamarine entière dans AKAR

OF-EVFP	1	31	21	31	41
OF-EVFP	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
OF-CX	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
OF-CH(MSA)	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
de-EVFP	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
de-EVFP	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
de-CX	M V S R G E E L F T	G V V P I L V S L D	G D V N G R K F S V	S G E G E C D A T Y	G K L T A K F I C T
OF-EVFP	151	151	251	351	451
OF-EVFP	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
OF-CX	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
OF-CH(MSA)	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
de-EVFP	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
de-EVFP	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
de-CX	T G R L P V F W R T	L V T T L I K V V Q	C F S R Y P D H M K	Q H D F F K S A M P	E G Y V Q E R T I F
OF-EVFP	191	191	291	391	491
OF-EVFP	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
OF-CX	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
OF-CH(MSA)	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
de-EVFP	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
de-EVFP	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
de-CX	F K D D G N Y X T R	A E F K F E G D T L	V N R I E L K G I D	F R E D G N I L G H	X L E N Y I S G N
OF-EVFP	231	231	331	431	531
OF-EVFP	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
OF-CX	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
OF-CH(MSA)	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
de-EVFP	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
de-EVFP	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
de-CX	V Y I T A D R Q R N	G I R A N F X I B H	N E D G S V Q L A	D H Y Q Q N T P I G	D G P V L L P D N H
OF-EVFP	271	271	371	471	571
OF-EVFP	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
OF-CX	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
OF-CH(MSA)	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
de-EVFP	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
de-EVFP	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
de-CX	F L S T Q S A L S K	D P N C K R D H M V	L L C F V T A A G I	T L G M D S L Y K S	G L R S A S V D T M
OF-EVFP	311	311	411	511	611
OF-EVFP	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
OF-CX	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
OF-CH(MSA)	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
de-EVFP	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
de-EVFP	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
de-CX	G R D L Y D D D D K	D P P A S T M V S K	G E C L F T G V V P	I L V E L D G D V N	G H K F S V S G E Q
OF-EVFP	351	351	451	551	651
OF-EVFP	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
OF-CX	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
OF-CH(MSA)	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
de-EVFP	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
de-EVFP	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
de-CX	E G D A T Y G R L T	L K F I C T T G R L	P V W P T L V T T	T G Y G L Q C F A R	T P D H M K Q H D F
OF-EVFP	391	391	491	591	691
OF-EVFP	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
OF-CX	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
OF-CH(MSA)	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
de-EVFP	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
de-EVFP	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
de-CX	F R S A M P E G Y V	Q E R T I F F R D D	G N Y E T A E V R	F E G D T L V N R I	E L K G I D F R E D
OF-EVFP	431	431	531	631	731
OF-EVFP	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q
OF-CX	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q
OF-CH(MSA)	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q
de-EVFP	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q
de-EVFP	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q
de-CX	G N I L G H R L E Y	N Y N S H N Y Y I M	A D R Q E N G I R V	N F R I R H N I E D	G S V Q L A D H Y Q

Annexe 6 (1/2): Alignement des séquences des tandems étudiés

	451	461	471	481	491
ECFP-EYFP*	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T G M
ECFP-EYFP	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T L G M
ECFP-Cit	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T L G M
ECFP-Cit(Y66A)	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T L G M
AqE-EYFP*	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T G M
AqE-EYFP	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T L G M
AqE-Cit	Q N T P I G D G P V	L L P D N H Y L S Y	Q S A L S K D P N E	K R D H M V L L E F	V T A A G I T L G M

	501	511	521
ECFP-EYFP*	D E L Y K	C G R K L R I L Q S T V F R A	R D F F D L D H
ECFP-EYFP	D E L Y K	- - - - -	- - - - -
ECFP-Cit	D E L Y K	- - - - -	- - - - -
ECFP-Cit(Y66A)	D E L Y K	- - - - -	- - - - -
AqE-EYFP*	D E L Y K	C G R K L R I L Q S T V F R A	R D F F D L D H
AqE-EYFP	D E L Y K	- - - - -	- - - - -
AqE-Cit	D E L Y K	- - - - -	- - - - -

Annexe 6 (2/2): Alignement des séquences des tandems étudiés

Les tandems dont le nom est suivi d'une étoile * sont les tandems dit de Régis, et n'ont pas été étudiés ici. Ils ont servis de base pour la constructions des autres tandems où nous avons supprimé la queue C-terminale (surlignée en marron) et des mutations parasites (surlignées en rouge).

Bibliographie

- Allen, M.D., and Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 716–721.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11241–11246.
- Beltolngar, D.-B., Erard, M., Pasquier, H., Bousmah, Y., Diop-Sy, A., Guiot, E., Vincent, P., and Mérola, F. (2015). pH sensitivity of FRET reporters based on cyan and yellow fluorescent proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 1–11.
- Bonnot, A., Guiot, E., Hepp, R., Cavellini, L., Tricoire, L., and Lambolez, B. (2013). Single-fluorophore biosensors based on conformation-sensitive GFP variants. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1375–1385.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1992). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 263, 802.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* 90, 1103–1163.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 448–455.
- Depry, C., Allen, M.D., and Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol. Biosyst.* 7, 52–58.
- Dickson, R.M., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y., and Moerner, W.E. (1997). On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388, 355–358.
- Dunn, T.A., Wang, C.-T., Colicos, M.A., Zaccolo, M., DiPilato, L.M., Zhang, J., Tsien, R.Y., and Feller, M.B. (2006). Imaging of cAMP Levels and Protein Kinase A Activity Reveals That Retinal Waves Drive Oscillations in Second-Messenger Cascades. *J. Neurosci.* 26, 12807–12815.
- Erard, M., Fredj, A., Pasquier, H., Beltolngar, D.-B., Bousmah, Y., Derrien, V., Vincent, P., and Merola, F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol. Biosyst.* 9, 258.
- Erecińska, M., Deas, J., and Silver, I.A. (1995). The Effect of pH on Glycolysis and Phosphofructokinase Activity in Cultured Cells and Synaptosomes. *J. Neurochem.* 65, 2765–2772.
- Espagne, A., Erard, M., Madiona, K., Derrien, V., Jonasson, G., Lévy, B., Pasquier, H., Melki, R., and Mérola, F. (2011). Cyan Fluorescent Protein Carries a Constitutive Mutation That Prevents Its Dimerization. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 437–439.

- Fredj, A., Pasquier, H., Demachy, I., Jonasson, G., Levy, B., Derrien, V., Bousmah, Y., Manoussaris, G., Wien, F., Ridard, J., et al. (2012). The Single T65S Mutation Generates Brighter Cyan Fluorescent Proteins with Increased Photostability and pH Insensitivity. *PLoS ONE* 7, e49149.
- Gervasi, N., Hepp, R., Tricoire, L., Zhang, J., Lambolez, B., Paupardin-Tritsch, D., and Vincent, P. (2007). Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2744–2750.
- Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M.A., Vischer, N.O.E., Jalink, K., and Gadella, T.W.J. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods* 7, 137–139.
- 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). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 3, 751.
- Görlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607–660.
- Grailhe, R., Merola, F., Ridard, J., Couvignou, S., Le Poupon, C., Changeux, J.P., and Laguitton-Pasquier, H. (2006). Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the Cyan Fluorescent Protein. *ChemPhysChem* 7, 1442–1454.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D. a, and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276, 29188–29194.
- Hoppe, A., Christensen, K., and Swanson, J.A. (2002). Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Stoichiometry in Living Cells. *Biophys. J.* 83, 3652–3664.
- Kemp, B.E., Bylund, D.B., Huang, T.-S., and Krebs, E.G. (1975). Substrate specificity of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3448–3452.
- Kinderman, F.S., Kim, C., von Daake, S., Ma, Y., Pham, B.Q., Spraggon, G., Xuong, N.-H., Jennings, P.A., and Taylor, S.S. (2006). A Novel and Dynamic Mechanism for AKAP Binding to RII Isoforms of cAMP-dependent Protein Kinase. *Mol. Cell* 24, 397–408.
- Kirber, M.T., Chen, K., and Keaney, J.F. (2007). YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species. *Nat. Methods* 4, 767–768.
- Kubala, M.H., Kovtun, O., Alexandrov, K., and Collins, B.M. (2010). Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex. *Protein Sci.* 19, 2389–2401.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition* (Springer, New York).
- Madshus, I.H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.* 250, 1.
- Malo, G.D., Pouwels, L.J., Wang, M., Weichsel, A., Montfort, W.R., Rizzo, M.A., Piston, D.W., and Wachter, R.M. (2007). X-ray structure of Cerulean GFP: a tryptophan-based chromophore useful for fluorescence lifetime imaging. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 9865–9873.

- Mank, M., Reiff, D.F., Heim, N., Friedrich, M.W., Borst, A., and Griesbeck, O. (2006). A FRET-Based Calcium Biosensor with Fast Signal Kinetics and High Fluorescence Change. *Biophys. J.* *90*, 1790–1796.
- Markwardt, M.L., Kremers, G.-J., Kraft, C.A., Ray, K., Cranfill, P.J.C., Wilson, K.A., Day, R.N., Wachter, R.M., Davidson, M.W., and Rizzo, M.A. (2011). An Improved Cerulean Fluorescent Protein with Enhanced Brightness and Reduced Reversible Photoswitching. *PLoS ONE* *6*, e17896.
- Merola, F., Levy, B., Demachy, I., and Pasquier, H. (2010). Photophysics and Spectroscopy of Fluorophores in the Green Fluorescent Protein Family. *Springer Ser. Fluoresc.* *8*, 347–383.
- Mérola, F., Fredj, A., Betolngar, D.-B., Ziegler, C., Erard, M., and Pasquier, H. (2014). Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnol. J.* *9*, 180–191.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W.J., et al. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* *4*, 555–557.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* *382*.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 2135–2140.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* *20*, 87–90.
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10554–10559.
- Paroutis, P., Touret, N., and Grinstein, S. (2004). The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology* *19*, 207–215.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., and Piston, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* *73*, 2782–2790.
- Poea-Guyon, S., Pasquier, H., Mérola, F., Morel, N., and Erard, M. (2013). The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 3983–3987.
- Polito, M., Vincent, P., and Guiot, E. (2014). Biosensor imaging in brain slice preparations. In *Fluorescent Protein-Based Biosensors*, (Springer), pp. 175–194.
- Van Rheenen, J., Langeslag, M., and Jalink, K. (2004). Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence resonance energy transfer by sensitized emission. *Biophys. J.* *86*, 2517–2529.

- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* 22, 445–449.
- Salonikidis, P.S., Niebert, M., Ullrich, T., Bao, G., Zeug, A., and Richter, D.W. (2011). An ion-insensitive cAMP biosensor for long term quantitative ratiometric fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements under variable physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 286, 23419–23431.
- Sarma, G.N., Kinderman, F.S., Kim, C., von Daake, S., Chen, L., Wang, B.-C., and Taylor, S.S. (2010). Structure of D-AKAP2:PKA RI complex: Insights into AKAP specificity and selectivity. *Struct. Lond. Engl.* 1993 18, 155–166.
- Schwarzländer, M., Logan, D.C., Fricker, M.D., and Sweetlove, L.J. (2011). The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide “flashes.” *Biochem. J.* 437, 381–387.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* 120, 4247–4260.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., and Tsien, R.Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5, 545–551.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–239.
- Sinnecker, D., Voigt, P., Hellwig, N., and Schaefer, M. (2005). Reversible Photobleaching of Enhanced Green Fluorescent Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 7085–7094.
- Tang, C.M., Dichter, M., and Morad, M. (1990). Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6445–6449.
- Taylor, S.S., Ilouz, R., Zhang, P., and Kornev, A.P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 646–658.
- Taylor, S.S., Zhang, P., Steichen, J.M., Keshwani, M.M., and Kornev, A.P. (2013). PKA: Lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1834, 1271–1278.
- Topell, S., Hennecke, J., and Glockshuber, R. (1999). Circularly permuted variants of the green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 457, 283–289.
- Tramier, M., Gautier, I., Piolot, T., Ravalet, S., Kemnitz, K., Coppey, J., Durieux, C., Mignotte, V., and Coppey-Moisan, M. (2002). Picosecond-Hetero-FRET Microscopy to Probe Protein-Protein Interactions in Live Cells. *Biophys. J.* 83, 3570–3577.
- Tramier, M., Zahid, M., Mevel, J.-C., Masse, M.-J., and Coppey-Moisan, M. (2006). Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc. Res. Tech.* 69, 933–939.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–544.

- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence Principles and Applications* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Villoing, A., Ridhoir, M., Cinquin, B., Erard, M., Alvarez, L., Vallverdu, G., Pernot, P., Grailhe, R., Mérola, F., and Pasquier, H. (2008). Complex Fluorescence of the Cyan Fluorescent Protein: Comparisons with the H148D Variant and Consequences for Quantitative Cell Imaging [†]. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 12483–12492.
- Voliani, V., Bizzarri, R., Nifosi, R., Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., and Beltram, F. (2008). Cis-trans photoisomerization of fluorescent-protein chromophores. *J Phys Chem B* 112, 10714–10722.
- Wachter, R.M., and Remington, S.J. (1999). Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr. Biol. CB* 9, R628–R629.
- Wachter, R.M., Yarbrough, D., Kallio, K., and Remington, S.J. (2000). Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein. *J. Mol. Biol.* 301, 157–171.
- Walsh, D.A., and Van Patten, S.M. (1994). Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* 8, 1227–1236.
- Weisz, O.A. (2003). Organelle Acidification and Disease. *Traffic* 4, 57–64.
- Welch, E.J., Jones, B.W., and Scott, J.D. (2010). Networking with AKAPs. *Mol. Interv.* 10, 86–97.
- Xu, X., Gerard, A.L., Huang, B.C., Anderson, D.C., Payan, D.G., and Luo, Y. (1998). Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 26, 2034–2035.
- Yoshizaki, H. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162, 223–232.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* 296, 913–916.
- Zeug, A., Woehler, A., Neher, E., and Ponimaskin, E.G. (2012). Quantitative Intensity-Based FRET Approaches—A Comparative Snapshot. *Biophys. J.* 103, 1821–1827.
- Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14997–15002.
- Zhang, J., Hupfeld, C.J., Taylor, S.S., Olefsky, J.M., and Tsien, R.Y. (2005). Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437, 569–573.
- Zhou, X.X., and Lin, M.Z. (2013). Photoswitchable fluorescent proteins : ten years of colorful chemistry and exciting applications §. 682–690.
- Zippin, J.H., Chen, Y., Straub, S.G., Hess, K.C., Diaz, A., Lee, D., Tso, P., Holz, G.G., Sharp, G.W.G., Levin, L.R., et al. (2013). CO₂/HCO₃[–] and Calcium-regulated Soluble Adenylyl Cyclase as a Physiological ATP Sensor. *J. Biol. Chem.* 288, 33283–33291.

Publications

I. Erard et al (2013) Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging

Marie Erard, Asma Fredj, Helene Pasquier, Dahdjim-Benoît Betolngar, Yasmina Bousmah, Valérie Derrien, Pierre Vincent and Fabienne Merola

Journal

Molecular Biosystems (2013) 8, 258–267

Abstract

Cyan fluorescent proteins (CFPs) are widely used as FRET donors in genetically encoded biosensors for live cell imaging. Recently, cyan variants with greatly improved fluorescence quantum yields have been developed by large scale random mutagenesis. We show that the introduction of only two mutations, T65S and H148G, is able to confer equivalent performances on the popular form ECFP, leading to Aquamarine (QY = 0.89, τ_f = 4.12 ns). Besides an impressive pH stability ($pK_{1/2}$ = 3.3), Aquamarine shows a very low general sensitivity to its environment, and undetectable photoswitching reactions. Aquamarine gives efficient and bright expression in different mammalian cell systems, with a long and single exponential intracellular fluorescence lifetime mostly insensitive to the fusion or the subcellular location of the protein. Aquamarine was also able to advantageously replace the CFP donor in the FRET biosensor AKAR for ratiometric measurements of protein kinase A activity. The performances of Aquamarine show that only two rounds of straightforward single point mutagenesis can be a quick and efficient way to optimize the donor properties in FRET-based biosensors.

II. Mérola et al (2014) Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging

Fabienne Mérola, Asma Fredj, Dahdjim-Benoît Betolngar, Cornelia Ziegler, Marie Erard and Hélène Pasquier

Journal

Biotechnology journal (2014) 9, 180-191

Abstract

Cyan fluorescent proteins (CFPs) derived from *Aequorea victoria* green fluorescent protein are the most widely used Förster resonant energy transfer (FRET) donors in genetically encoded biosensors for live-cell imaging and bioassays. However, the weak and complex fluorescence emission of cyan variants, such as enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) or Cerulean, has long remained a major bottleneck in these FRET techniques. Recently, several CFPs with greatly improved performances, including mTurquoise, mTurquoise2, mCerulean3, and Aquamarine, have been engineered through a mixture of site-directed and large-scale random mutagenesis. This review summarizes the engineering and relative merits of these new cyan donors, which can readily replace popular CFPs in FRET imaging protocols, while reaching fluorescence quantum yields close to 90%, and unprecedented long, near-single fluorescence lifetimes of about 4 ns. These variants display an increased general photostability and much reduced environmental sensitivity, notably towards acid pH. These new, bright, and robust CFPs now open up exciting outlooks for fluorescence lifetime imaging microscopy and advanced quantitative FRET analyses in living cells. In addition, the stepwise engineering of Aquamarine shows that only two critical mutations in ECFP, and one in Cerulean, are required to achieve these performances, which brings new insights into the structural bases of their photophysical properties.

III. Betolngar et al (2015) Analyzing the pH sensitivity of FRET biosensors carrying cyan and yellow fluorescent proteins

Dahdjim-Benoît Betolngar, Marie Erard, Yasmina Bousmah, Hélène Pasquier, Awa Diop-Sy, Elvire Guiot, Pierre Vincent, Fabienne Merola

Journal

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2015)

Abstract

Genetically encoded FRET reporters are widely used to monitor specific biomolecular activities in cell imaging, pharmacological screenings and pre-clinical research. However, the popular cyan and yellow fluorescent proteins used as energy transfer donors and acceptors in these reporters suffer from strong pH sensitivities close to the physiological pH range. We studied by fluorescence lifetime imaging (FLIM) a model FRET tandem and a FRET-based kinase A activity reporter (AKAR2.2) expressed in the cytosol of living cells, while changing the intracellular pH between pH 8 and pH 5. In both constructs, acid pHs elicit a major drop in the CFP donor lifetime, FRET efficiency and FRET ratio. The magnitude of these perturbations are very significant compared to the functional responses of the AKAR biosensor to forskoline. A simple model of pH-dependent FRET has been developed, that qualitatively accounts for both FLIM and ratiometric observations. In the FRET tandem, replacing the CFP donor by the recently engineered, pH-insensitive Aquamarine donor ($pK_{1/2}=3.3$), allows the determination of the transition pK of EYFP ($pK_{1/2}=6.7$) and Citrine ($pK_{1/2}=6.2$), while replacing the yellow acceptor with a non-chromophoric version carrying the Y66A mutation gives access to the transition pK of ECFP ($pK_{1/2}=6.2$). A similar analysis of the AKAR biosensor reveals additional contributions to the pH responses in this construct, that remain to be identified. This study underlines the major and complex impact of pH changes on the signal of a FRET biosensor in the living cell.