



HAL
open science

Etude photophysique des protéines fluorescentes photoconvertibles utilisées en microscopie de super-résolution

Romain Berardozzi

► **To cite this version:**

Romain Berardozzi. Etude photophysique des protéines fluorescentes photoconvertibles utilisées en microscopie de super-résolution. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV015 . tel-01498997

HAL Id: tel-01498997

<https://theses.hal.science/tel-01498997>

Submitted on 30 Mar 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Nanobiologie et biologie structurale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« **Romain BERARDOZZI** »

Thèse dirigée par « **Dominique BOURGEOIS** » et
codirigée par « **Virgile ADAM** »

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Étude photophysique des protéines fluorescentes photoconvertibles utilisées en microscopie super-résolution

Thèse soutenue publiquement le « **2 décembre 2016** »,
devant le jury composé de :

Mme, Christelle, BRETON

Professeure, Université Grenoble-Alpes, Présidente

M, Peter, DEDECKER

Chargé de recherche, Université catholique néerlandophone de Louvain,
Rapporteur

M, Arnaud, GAUTIER

Maître de Conférences, École Normale Supérieure, Rapporteur

M, Dominique, BOURGEOIS

Directeur de recherche, Institut de Biologie Structurale, Membre

Mme, Ulrike, ENDESFELDER

Chargé de recherche, Institut Max Planck, Membre



Université Grenoble-Alpes

EDCSV
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Thèse

préparée à l'Institut de Biologie Structurale
pour obtenir le titre de
Docteur ès Sciences
Mention: Nanobiologie

**Étude photophysique des protéines
fluorescentes photoconvertibles utilisées en
microscopie super-résolution**

par **Romain Berardozi**

Directeur de thèse:

Dr. Dominique Bourgeois

Co-directeur de thèse:

Dr. Virgile Adam

Examineurs:

Pr. Antoine Delon

Pr. Ulrike Endesfelder

Rapporteurs:

Dr. Arnaud Gautier

Dr. Peter Dedecker

septembre 2013 - août 2016



« [...] un peu plus de **résolution**, de soin ou de persévérance : voilà ce qui, le plus souvent, décide.

Croire au « génie » du chercheur est un préjugé malsain qui décourage les modestes et encourage les présomptueux »

Inquiétudes d'un biologiste
Jean Rostand

Table des matières

Table des matières	v
Résumé	vii
Résumé en anglais (Abstract)	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xi
Liste des symboles	xv
I PREMIÈRE PARTIE : PRISE DE VUE	1
1 Les protéines fluorescentes, des outils biotechnologiques	3
1.1 Préliminaires théoriques à propos de l'émission de lumière	3
1.2 De la bioluminescence aux protéines fluorescentes	6
1.2.1 Bioluminescence et systèmes enzymatiques	6
1.2.2 Fluorescence et protéines fluorescentes	9
1.3 Relations structure-fonction des protéines fluorescentes	12
1.3.1 Structure des protéines fluorescentes	12
1.3.2 Propriétés photophysiques	15
1.4 Applications des protéines fluorescentes	18
1.4.1 Des colorants aux protéines fluorescentes	18
1.4.2 Protéines fluorescentes et cartographie spatiale de la cellule	22
1.4.3 Protéines fluorescentes et cartographie physico-chimique de la cellule	22
1.4.4 Protéines fluorescentes et interactions protéines-protéines	23
1.5 Ingénierie des protéines fluorescentes	23
1.5.1 Longueur d'onde d'émission	24
1.5.2 Brillance	25
1.5.3 Repliement et maturation du chromophore	26
1.5.4 Oligomérisation	27
2 Phototransformations et protéines fluorescentes photomodulables	29

2.1	Photoblanchiment	29
2.2	Photoactivation et protéines photo-activables (PAFPs)	33
2.3	Photocommutation et protéines photocommutables (RSFPs)	37
2.4	Scintillement (<i>blinking</i>)	40
2.5	Photoconversion et protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs)	44
3	Microscopie conventionnelle et microscopie de super-résolution	57
3.1	Microscopie photonique et limites imposées par la diffraction de la lumière	58
3.2	Microscopie de super-résolution	59
3.2.1	Microscopie de super-résolution en champ proche	59
3.2.2	Microscopie de super-résolution en champ lointain	60
3.3	Microscopie PALM avancée	71
3.3.1	Microscopie super-résolution multi-couleurs et 3D	71
3.3.2	Comptage moléculaire	72
3.3.3	Pistage de molécules uniques (spt-PALM)	76
II	DEUXIÈME PARTIE : PROBLÉMATIQUE DE LA THESE	79
4	Problèmes liés au scintillement des PCFPs	81
4.1	Effet du scintillement sur l'analyse de données PALM	81
4.1.1	Effet du scintillement ultra-rapide sur les données PALM	81
4.1.2	Effet du scintillement lent sur les données PALM quantitatives	82
4.1.3	Effets du scintillement lent sur les données PALM dynamiques	85
4.2	Méthodes de réduction et de correction du scintillement	85
4.2.1	Réduction du scintillement par traitement chimique	85
4.2.2	Correction du scintillement <i>in silico</i>	87
4.3	Ingénierie de PCFPs peu ou pas scintillantes	90
5	Problèmes liés à la photoconversion incomplète et ralentie	93
5.1	Importance de l'échantillonnage et de la densité de marquage en PALM	93
5.1.1	Copies endogènes non marquées	93
5.1.2	Repliement protéique et maturation du chromophore	94
5.1.3	Photoconversion incomplète	95
5.1.4	Photoconversion ralentie	96
5.2	Photoconversion par proche UV et photoconversion amorcée	96
5.2.1	Conséquences de l'utilisation des proches UV (405 nm)	96
5.2.2	Photoconversion amorcée	97
III	TROISIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES	99
6	Collecte et traitement de données PALM	101
6.1	Présentation de l'installation PALM de l'IBS	101
6.1.1	Lasers	102

6.1.2	Microscope	102
6.1.3	Caméra et module deux-couleurs	104
6.2	Préparation d'échantillons pour la microscopie PALM	106
6.2.1	Traitement des surfaces et des tampons	106
6.2.2	Immobilisation de protéines fluorescentes <i>in vitro</i>	107
6.2.3	Protéines en environnement cellulaire	114
6.3	Collecte de données PALM et localisation	115
7	Analyse photophysique des protéines fluorescentes	121
7.1	Cas particulier de jeux de données peu denses	121
7.1.1	Regroupement des localisations en clusters	121
7.1.2	Estimation des vitesses macroscopiques de phototransformation	122
7.1.3	Calcul des rendements quantiques et vitesses microscopiques de phototransformations	124
7.2	Cas de jeux de données denses (e.g. <i>in cellulo</i>)	125
7.2.1	Problème lié aux jeux de données denses	126
7.2.2	Méthode d'analyse itérative des traces de fluorescence	127
7.3	Conditions expérimentales optimales pour l'étude de la photophysique	131
7.3.1	Stratégie expérimentale et simulation de jeux de données	131
7.3.2	Effet du signal/bruit	131
7.3.3	Effet du temps d'acquisition	131
7.3.4	Effet de la densité de puissance laser	133
7.3.5	Effet de la densité moléculaire	133
7.3.6	Effet de l'échantillonnage	133
8	Cristallographie aux rayons X	137
8.1	Cristallogénèse	137
8.1.1	mEos2 et mEos2-A69T	137
8.1.2	Dendra2-T69A	138
8.2	Collecte et traitement des données	139
9	Spectroscopie U.V.-visible	143
9.1	Spectroscopie cinétique	143
9.2	Mesure du temps de vie de l'état excité	143
9.3	Caractérisation spectroscopique	144
9.3.1	Spectre d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence	144
9.3.2	Mesure du pK_a apparent du chromophore	144
9.3.3	Mesure du coefficient d'extinction molaire par la méthode de Ward	144
9.3.4	Mesure du rendement quantique de fluorescence par la méthode relative de Wilson et Williams	145
IV	QUATRIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	149
10	Étude du phénomène de scintillement et de photoblanchiment	151

10.1	Prise de vue	151
10.2	Stratégie expérimentale et caractérisation spectroscopique	155
10.3	Conséquences de l'orientation de l'arginine 66 sur le scintillement et le photoblanchiment	159
10.3.1	Analyse qualitative	159
10.3.2	Analyse quantitative	160
10.3.3	Effet des conditions physico-chimiques	163
10.3.4	Analyse en cellules eucaryotes HeLa	165
10.4	Modèle et conclusion	166
10.5	Dendra2-T69A, un variant prometteur?	173
10.6	Stratégies de réduction du scintillement lent	174
11	Étude des mécanismes photophysiques limitant l'échantillonnage	177
11.1	Scintillement dans la forme verte et photoconversion	177
11.1.1	Prise de vue	177
11.1.2	Scintillement lent dans la forme verte de mEos2	177
11.1.3	Distorsion des courbes cumulatives de photoconversion de mEos2	179
11.1.4	Photoconversion vert à rouge impliquant un état sombre intermédiaire de long temps de vie	181
11.2	Photoblanchiment et incomplétude de photoconversion	184
11.2.1	Prise de vue	184
11.2.2	Photoblanchiment post et pré-photoconversion	184
11.3	Comparaison de la photoconversion par proche U.V. et de la photoconversion par amorçage	187
11.3.1	Prise de vue	187
11.3.2	Photoconversion amorcée et scintillement rapide	188
11.3.3	La photoconversion amorcée : une phototransformation impliquant un intermédiaire de court temps de vie	190
11.3.4	La photoconversion amorcée : une alternative viable à la photoconversion proche UV pour le PALM quantitatif?	191
V	CINQUIÈME PARTIE : CONCLUSION	195
VI	ANNEXES	201
11.4	Alignement de séquences des variants de la série Eos	203
11.5	Regroupement des localisations en clusters en contexte bactérien	204
11.6	Paramètres des simulations de jeux de données PALM	205
11.7	Hétérogénéité du profil laser et distorsion des courbes cumulatives	206
11.8	Découpage du profil laser en régions concentriques à illumination homogène	207
11.9	Effet de l'orientation de l'arginine 66 sur la cinétique de photoconversion	208
11.10	Publications de thèse	209
11.10.1	Avilov et al., PlosOne, 2014	209
11.10.2	Adam et al., COCB, 2014	225
11.10.3	Berardozi et al., JACS, 2015	237

TABLE DES MATIÈRES

v

Bibliographie

277

Remerciements

279

Résumé

Depuis les travaux de Leuwenhoek, la microscopie photonique s'est imposée comme un outil de choix pour l'étude de la cellule. Révolutionnée au cours des années 1980 par la découverte de marqueurs fluorescents codés génétiquement - les protéines fluorescentes-, la microscopie photonique a connu un nouveau souffle. Malgré les grandes innovations permises par cette révolution, l'utilisation de photons limite intrinsèquement le pouvoir de résolution de la microscopie photonique en fixant la limite de séparation aux alentours de 200 nm. Cette barrière imposée par la diffraction de la lumière limite l'accès aux détails des structures fines de la cellule : l'ultrastructure cellulaire et les assemblages supra-moléculaires sont alors hors de portée d'étude.

Récemment, la découverte de protéines fluorescentes dont les propriétés d'émission peuvent être activement contrôlées par la lumière -les protéines fluorescentes photomodulables- a ouvert la voie à l'étude nanoscopique de la cellule. L'exploitation ingénieuse des propriétés photophysiques de ces remarquables émetteurs de lumière permet de contourner la barrière de résolution imposée par la diffraction de la lumière (microscopie de super-résolution). En particulier, l'utilisation de protéines fluorescentes passant du vert au rouge sous illumination (protéines fluorescentes photoconvertibles vert à rouge, PCFP) permet la reconstruction d'images non limitées en diffraction des cellules grâce à la microscopie de localisation après photo-activation (PALM). Cette technique permet dans l'idéal un examen non seulement structural mais également quantitatif et dynamique des constituants cellulaires à l'échelle nanométrique. Néanmoins, ces approches avancées sont actuellement limitées par le comportement photophysique complexe des PCFPs telles que mEos2 et Dendra2 couramment utilisées utilisées comme marqueurs en microscopie PALM.

En particulier, les transitions répétées des PCFPs dans leur forme rouge entre un état fluorescent et des états non-fluorescents dits états sombres (scintillement) compliquent l'analyse quantitative des jeux de données PALM. En confondant une molécule unique scintillante avec de nombreuses molécules uniques, l'estimation du nombre de copies d'une protéine ou la stœchiométrie des oligomères protéiques est biaisée. Malgré l'existence de méthodes permettant de réduire le scintillement par traitement chimique ou de corriger son effet par des méthodes informatiques, le scintillement devient un obstacle difficilement contournable dans des conditions cellulaires où les traitements chimiques sont peu adaptés et où la densité moléculaire potentiellement importante complique la correction *in silico*. Des marqueurs fluorescents adaptés au comptage par microscopie de localisation et peu (ou idéalement pas) scintillants aujourd'hui absents sont alors particulièrement convoités. La conception raisonnée de tels variants repose principalement sur la compréhension des mécanismes photophysiques sous-jacents. En combinant cristallographie aux rayons X et microscopie de localisation, nos travaux mettent en évidence que le comportement de scintillement est principalement contrôlé par un acide aminé conservé

parmi les PCFPs et situé à proximité du chromophore : l'arginine 66. L'orientation différente du groupement guanidinium porté par la chaîne latérale de ce résidu d'acide aminé entre mEos2 et Dendra2 est à l'origine de leurs différences de scintillement et de photoblanchiment. Nos résultats corroborent l'hypothèse du rôle de l'Arg66 comme acteur central dans le mécanisme de photoblanchiment par décarboxylation du glutamate 212 ainsi que dans le scintillement rapide par échange de proton avec le chromophore. L'interprétation de nos données suggère l'existence chez les PCFPs d'un état sombre de long temps de vie dont la structure diffère de celle des états sombres isomérisés des protéines fluorescentes photocommutables. Dans le futur, un effort collectif visant à bloquer la formation de cet état sombre promet une nouvelle révolution en démocratisant le comptage par microscopie PALM.

En parallèle, alors que le scintillement dans la forme rouge des PCFPs est à l'origine d'erreurs de sur-comptage, l'inefficacité de photoconversion entraîne une erreur systématique de sous-comptage et contribue à limiter la précision de localisation des images super-résolues par effet de sous-échantillonnage. L'incomplétude de photoconversion, i.e. le fait que seule une fraction de la population verte soit photoconvertie en une population rouge, est un obstacle majeur à la quantification par microscopie de localisation. Nos travaux mettent en évidence que la photoconversion vert à rouge emprunte une voie compétitive de la voie directe vert à rouge et impliquant un état sombre intermédiaire de long temps de vie (> 150 s). Cette voie baptisée « route sombre » ralentit considérablement la vitesse de photoconversion par effet de remisage et contraint à augmenter significativement le temps de collecte afin d'obtenir un échantillonnage nécessaire à l'obtention de données quantitatives non biaisées et d'une précision de localisation optimale. Sous illumination proche UV, la vitesse de la route sombre est accélérée limitant ainsi les effets de remisage. Cependant, de telles conditions d'illumination induisent en parallèle un photoblanchiment de la forme verte et de la forme rouge à l'origine d'un sous-échantillonnage important.

En somme, les travaux menés au cours de cette thèse ont contribué à préciser les mécanismes photophysiques des protéines fluorescentes photoconvertibles vert à rouge à l'origine d'artéfact lors de l'extraction d'informations quantitatives à partir de jeux de données PALM. La nouvelle vision globale des phototransformations subies par les PCFPs lors d'une collecte PALM devrait servir dans le futur de base théorique à la conception de variants améliorés pour l'imagerie quantitative et dynamique à l'échelle nanométrique. D'ores et déjà, nous proposons l'utilisation de la PCFP ingénierée au cours de cette thèse (Dendra2-T69A) - combinant le caractère monomérique de Dendra2 à la brillance et la photorésistance de mEos2 - comme PCFP « digne de confiance » pour la microscopie super-résolution PALM.

Abstract

Since the seminal work of Leeuwenhoek, optic microscopy established itself as a valuable tool for cell biology. Revolutionized in the 80's by the discovery of genetically encoded fluorescent tags, optic microscopy gained momentum. Despite the nice innovations that followed this revolution, the use of photons intrinsically limits the resolving power of optic microscopy around 200 nm. The diffraction barrier limits the scrutinization of cells : cellular ultrastructure and supra-molecular assemblies are out of reach.

Recently, the discovery of fluorescent proteins which emission properties can be actively controlled by light (photomodulatable fluorescent proteins) paved the way to the nanoscopic investigation of the cell. Taking advantage of these smart and conspicuous light emitters allows to break the diffraction barrier imposed by light diffraction (super-resolution microscopy). Particularly, the use of fluorescent proteins able to irreversibly pass from a native green emitting form to a red emitting form (photo-convertible fluorescent proteins ; PCFPs) allow the reconstruction of non diffraction-limited images by localization microscopy after photoactivation (PALM).

Thanks to this method, cell components can ideally be investigated not only structurally but also quantitatively and dynamically at the nanometric scale. Nevertheless, these advanced approaches are currently limited by the complex photophysical behaviour of these PCFPs, such as mEos2 and Dendra2 commonly used as markers in PALM microscopy.

In particular, the repeated transitions of PCFPs in their red state between a fluorescent and a non-fluorescent state called dark state (blinking) complicates the quantitative analysis of PALM dataset. By confounding a single blinking molecule with several molecules, the estimation of protein copy number in a cell or oligomers stoichiometry is biased. Despite numerous methods that allow to reduce by chemical treatment or correct *in silico* the blinking, it becomes a hardly surmountable hurdle in live cells where the use of chemical cocktail is maladapted and *in silico* analysis is pushed at the limit of its ability. Fluorescent markers adapted for quantitative localization microscopy lowly (or ideally non-) blinking and today missing are thus particularly desired. The smart rational design of such fluorophores requires a fine understanding of the underlying photophysical mechanisms.

By combining X-ray crystallography and localization microscopy, our work reveals that the blinking mechanism is mainly controlled by an aminoacid strictly conserved among PCFPs and located in the close vicinity of the chromophore : the arginine 66. The difference in the orientation of the guanidinium group beared by the Arg66 residue in mEos2 and Dendra2 mostly accounts for the difference in their blinking and bleaching behaviour. Our results corroborate the hypothesis that the Arg66 plays a key role in the photobleaching by glutamate 212 decarboxylation and in the fast blinking by exchanging proton with the chromophore. The interpretation of our data suggests the existence in PCFPs of a

long-lived dark state which structure may differ from the one of photoswitchable fluorescent proteins. In the future, a collective effort must be carried out to prevent the formation of this long-lived dark state and will certainly be the warrantor of quantitative PALM microscopy democratization.

In parallel, while PCFPs blinking in the red form results in over-counting errors, low photoconversion efficiency ends up in systematic under-counting errors and contribute to limit the achievable resolution by under-sampling effect. Photoconversion incompleteness, *i.e.* the fact that only a fraction of the green population photoconverts to a red form, is one of the main hurdles to PALM microscopy counting approaches. Our work reveals that the green-to-red photoconversion can pass through a route implying a dark state intermediate and competing with the direct route from green to red. This route baptized "dark route" considerably slow down the photoconversion velocity by a shelving effect, constraining to increase the collection time to get sufficient sampling, unbiased quantitative data and optimal localization precision. Under violet illumination, the dark route is accelerated thus limiting the shelving effect. However, in such conditions a violet-induced bleaching of both green and red forms may result in a strong under-sampling.

Overall, the work carried out during this PhD program contributes to precise the green-to-red photoconvertible fluorescent proteins' photophysical mechanisms leading to artifacts when extracting quantitative information from PALM dataset. The new synoptic view of the phototransformations experienced by a PCFP when collecting a PALM dataset should help in the future to engineer new enhanced variants for quantitative and dynamic investigation of the cell with nanometric accuracy. Already, we propose the use of the Dendra2-T69A variant develop during this PhD program that combines the truly monomeric nature of Dendra2 and the brightness and photoresistance of mEos2 as a "trustable" PCFP for PALM microscopy.

Liste des figures

1.1	Orbitales moléculaires et états électroniquement excités	4
1.2	Diagramme de Perrin-Jabłoński	5
1.3	Bioluminescence chez la luciole	7
1.4	Bioluminescence chez les méduses	8
1.5	Principe de la bioluminescence par transfert d'énergie par résonance	10
1.6	Arbre phylogénétique des principales espèces porteuses de protéines fluorescentes	11
1.7	Bestiaire des organismes produisant naturellement des protéines fluorescentes	12
1.8	Structure de la protéine fluorescente GFP	13
1.9	Chromophore de la protéine fluorescente verte avGFP	14
1.10	Vue synoptique des réactions chimiques autocatalytiques au cours de la maturation du chromophore	16
1.11	Spectre d'absorption de la protéine fluorescente verte avGFP	17
1.12	Vue synoptique des méthodes de marquage fluorescent des protéines	21
1.13	Étude de la concentration en ions calciques par FRET	24
1.14	Étude de l'interaction entre protéines par FRET et par complémentation	25
1.15	Brillance des protéines fluorescentes conventionnelles	26
2.1	Manifestation du photoblanchiment à l'échelle d'ensemble	30
2.2	Mécanismes de photoblanchiment de la protéine fluorescente anthozoaire IrisFP	32
2.3	Étude de la dynamique des protéines par FRAP	33
2.4	Mécanismes de photoactivation de la PA-GFP	34
2.5	Étude de la dynamique des protéines après photo-activation	35
2.6	Mécanisme de photocommutation de la RSFP anthozoaire Dronpa	40
2.7	Manifestation du scintillement à l'échelle de la molécule unique	41
2.8	Mécanisme de scintillement de la forme verte d'IrisFP	42
2.9	Vue synoptique des mécanismes de scintillement (diagramme de Jablonski)	43
2.10	Manifestation de la photoconversion vert à rouge	45
2.11	Origine des PCFPs anthozoaires	46
2.12	Comparaison de l'oligomérisation <i>in cellulo</i> de mEos2, Dendra2 et mEos3.2	48
2.13	Comparaison des formes vertes et rouges des PCFPs	50
2.14	Réaction d'élimination β	51
2.15	Modèle de photoconversion par élimination β unimoléculaire E1	52
2.17	Étude de la dynamique des cellules et des protéines après photoconversion	54
2.16	Modèle de photoconversion par élimination β bimoléculaire (E2)	55

3.1	Échelle de taille et de temps en biologie	57
3.2	Critère de Rayleigh et limite de résolution	58
3.3	Microscopie de super-résolution STED	61
3.4	Effet de la densité de marquage sur la résolution spatiale en PALM (Nyquist)	64
3.5	Microscopie de super-résolution par photoblanchiment (SHRImP)	65
3.6	Microscopie de super-résolution par photocommutation stochastique (dSTORM)	66
3.7	Microscopie de localisation après photoactivation (PALM)	67
3.8	Microscopie PALM et microscopie électronique	68
3.9	Microscopie PALM deux-couleurs	71
3.10	Méthodes de comptage basées sur la mesure d'intensité de fluorescence	74
3.11	Méthode de comptage basée sur le « photoblanchiment par pas »	75
3.12	Étude de la dynamique de molécules uniques par microscopie PALM (spt-PALM)	77
4.1	Effet du scintillement ultra-rapide	81
4.2	Estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques par microscopie PALM	82
4.3	Estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques par microscopie PALM (PCFP non scintillante)	83
4.4	Estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques par microscopie PALM (PCFP scintillante)	84
4.5	Effet du scintillement lent sur le suivi de particules uniques en PALM	86
4.6	Méthode de correction itérative du scintillement proposée par Lee <i>et al.</i>	89
5.1	Facteurs à l'origine d'erreurs de sous-comptage en microscopie de localisation PALM	94
6.1	Vue d'ensemble du microscope PALM de l'IBS de Grenoble	101
6.2	Caractéristiques des lasers de l'installation PALM	102
6.3	Caractéristiques de l'illumination par réflexion interne totale (TIRF)	103
6.4	Caractérisation de la dérive latérale et axiale	104
6.5	Caractéristiques du module PALM deux-couleurs	105
6.6	Correction des aberrations chromatiques et géométriques	105
6.7	Traitement des lamelles et milieu de montage	106
6.8	Caractéristiques d'un hydrogel de PVA	108
6.9	Caractérisation de la diffusion de protéines au sein d'un hydrogel de PVA	109
6.10	Imagerie défocalisée de mEos2 immobilisée au sein d'un hydrogel PVA ou immobilisée par amidification	109
6.11	Vue synoptique de l'immobilisation des protéines par amidification	111
6.12	Comparaison des méthodes d'immobilisation des protéines	112
6.13	Image super-résolue de bactéries BL21 exprimant mEos2	114
6.14	Effet sur le comportement photophysique de l'application d'un seuil avant localisation	116
6.15	Précision de localisation (mEos2 immobilisée en PVA)	118
6.16	Méthode de suppression des localisations de type « faux-positifs »	119
7.1	Analyse des traces de fluorescence pour l'étude photophysique	123
7.2	Histogrammes et estimation des constantes cinétiques de phototransformation	124
7.3	Analogie entre la vidange d'un bassin et la désexcitation de l'état excité	126

7.4	Procédure algorithmique itérative permettant l'estimation des paramètres photophysiques des protéines fluorescentes	130
7.5	Vue synoptique de la méthode d'analyse du comportement photophysique à l'échelle de la molécule unique	132
7.6	Détermination des conditions expérimentales optimales pour l'analyse du comportement photophysique	135
8.1	Micrographies des cristaux de mEos2-A69T	137
8.2	Cristallogénèse de Dendra2-T69A	139
9.1	Mesure du pK_a apparent du chromophore par titration	145
9.2	Mesure des coefficients d'extinction molaire par la méthode de Ward	146
9.3	Mesure des rendements quantiques de fluorescence par la méthode relative de Wilson et Williams	147
10.1	Comparaison des valeurs de N_{scint} publiées POUR mEos2 et Dendra2	153
10.2	Comparaison de séquences de mEos2 et Dendra2	154
10.3	Comparaison de structures de mEos2 et Dendra2	154
10.4	Caractérisation spectroscopique de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs	155
10.5	Comparaison des structures de mEos2, Dendra2 et mEos2-A69T	156
10.6	Comparaison des kymogrammes typiques de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs Dendra2-T69A	159
10.7	Histogrammes de scintillement et fraction de molécules scintillantes	160
10.8	Vitesses macroscopiques de photoblanchiment et de scintillement	161
10.9	Histogrammes N_{off} et fraction des états sombres de long temps de vie	162
10.10	Constantes cinétiques de retour $off \rightarrow on$ et effet de la lumière violette	164
10.11	Scintillement lent de la forme rouge à l'échelle d'ensemble	165
10.12	Constantes cinétiques de photoblanchiment et de scintillement et effets des conditions chimiques	166
10.13	Modèle de formation de l'état sombre de long temps de vie par torsion avec transfert de charge intramoléculaire (TICT)	169
10.14	Modèle photophysique de scintillement et photoblanchiment	170
10.15	Tentative de réduction du scintillement lent de Dendra2-T69A	175
10.16	Caractérisation du mutant mEos2-R66L	176
11.1	Scintillement de la forme verte de mEos2 sous illumination 405, 488 et 561 nm	178
11.2	Scintillement de la forme verte de mEos2 suivi par spectroscopie d'absorbance	179
11.3	Courbes cumulatives des molécules rouges photoconverties au cours d'une collecte PALM	180
11.4	Effet du pré-blanchiment sur les courbes cumulatives	181
11.5	Trace de fluorescence mettant en évidence une photoconversion avec état intermédiaire sombre	182
11.6	Simulations de l'évolution de la population rouge d'après le modèle impliquant une voie vert à rouge indirecte	183
11.7	Mise en évidence du photoblanchiment de la forme rouge sous illumination violette à l'échelle de la molécule unique	186

11.8	Mise en évidence du photoblanchiment de la forme rouge sous illumination violette à l'échelle d'ensemble	187
11.9	Comparaison de la photoconversion cyan et amorcée de Dendra2 à l'échelle de la molécule unique	189
11.10	Comparaison de l'efficacité de photoconversion amorcée en fonction de l'orientation de l'arginine 66	190
11.11	Cinétiques de photoconversion amorcée de mEos2-A69T selon les conditions d'illumination	191
11.12	Caractérisation de la photoconversion amorcée en fonction des conditions d'illumination	192
11.13	Cinétiques de photoconversion amorcée simulées	193
11.14	Photoconversion combinée par amorçage et par proches UV	194
11.15	Alignement de séquences des variants de la série Eos	203
11.16	Regroupement des localisations en clusters dans le cytoplasme d'un colibacille	204
11.17	Effet de l'hétérogénéité laser sur les courbes cumulatives de photoconversion	206
11.18	Découpage du profil laser en régions	207
11.19	Effet de l'arginine 66 sur la cinétique de photoconversion	208

Liste des tableaux

2.1	Protéines fluorescentes photo-activables caractérisées à la mi-mars 2016	36
2.2	Protéines fluorescentes photocommutables caractérisées à la mi-mars 2016	38
2.3	Protéines fluorescentes photoconvertibles caractérisées à la mi-mars 2016	49
3.1	Vue synoptique des techniques de microscopie super-résolution	70
8.1	Conditions de cristallogénèse de mEos2-A69T	138
8.2	Statistiques de la collecte et l'affinement des données cristallographiques de mEos2-A69T	141
8.3	Statistiques de la collecte et l'affinement des données cristallographiques de Dendra2- T69A	142
9.1	Rendements quantiques de fluorescence de la fluoescéine et de la rhodamine 6G	146
10.1	Caractéristiques spectroscopiques des protéines mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leurs formes vertes et rouges	158
10.2	Distance cristallographiques d'intérêt pour mEos2, Dendra2 et mEos2-A69T	167
10.3	Propriétés photophysiques <i>in vitro</i> des formes rouges de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs	171
10.4	Propriétés photophysiques <i>in cellulo</i> des formes rouges de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs	172
10.5	Comparaison des séries Eos et Dendra pour les applications PALM quantitatives	173
11.1	Caractérisation de la photoconversion à l'aide du module deux-couleurs	181
11.2	Photoblanchiment de la forme rouge en fonction des conditions d'illumination	193
11.3	Paramètres utilisés pour la simulation des jeux de données PALM	205

Liste des symboles

δ	limite de séparation / <i>separation limit</i>
ϵ	coefficient d'extinction molaire / <i>molar extinction coefficient</i>
η	indice optique / <i>optical index</i>
\mathcal{C}_{conv}	complétude de photoconversion / <i>photoconversion completeness</i>
Φ_{bl}	rendement quantique de photoblanchiment de la forme rouge / <i>red form photobleaching quantum yield</i>
Φ_{conv}	rendement quantique de photoconversion / <i>photoconversion quantum yield</i>
Φ_{off}	rendement quantique de transition de l'état <i>off</i> vers l'état <i>on</i> (dans la forme rouge) / <i>quantum yield of off to on state recovery (in the red form)</i>
Φ_{on}	rendement quantique de scintillement (transition de l'état <i>on</i> vers l'état <i>off</i> dans la forme rouge) / <i>blinking quantum yield (from on to off state in the red form)</i>
σ	précision de localisation / <i>localization precision</i>
τ	temps de vie de l'état excité / <i>excited-state lifetime</i>
f_{lent}	fraction des événements de scintillement vers un état sombre de long temps de vie / <i>fraction of blinking events toward a long-lived dark stat</i>
f_{rapide}	fraction des événements de scintillement vers un état sombre de court temps de vie / <i>fraction of blinking events toward a short-lived dark stat</i>
k_{bl}^{micro}	vitesse microscopique de photoblanchiment de la forme rouge / <i>red form photobleaching microscopic rate</i>
k_{off}^{micro}	vitesse microscopique de transition de l'état <i>off</i> vers l'état <i>on</i> (dans la forme rouge) / <i>microscopic rate of off to on state recovery (in the red form)</i>
k_{on}^{micro}	vitesse microscopique de scintillement (transition de l'état <i>on</i> vers l'état <i>off</i> dans la forme rouge) / <i>blinking microscopic rate (from on to off state in the red form)</i>
k_{bl}	vitesse macroscopique de photoblanchiment de la forme rouge / <i>red form photobleaching macroscopic rate</i>
k_{off}	vitesse macroscopique de transition de l'état <i>off</i> vers l'état <i>on</i> (dans la forme rouge) / <i>macroscopic rate of off to on state recovery (in the red form)</i>
k_{on}	vitesse macroscopique de scintillement (transition de l'état <i>on</i> vers l'état <i>off</i> dans la forme rouge) / <i>blinking macroscopic rate (from on to off state in the red form)</i>

N_{conv}	nombre cumulé de molécules rouges photoconverties / <i>cumulated number of red photoconverted molecules</i>
$pK_{a,app}$	$-\log_{10}K_a$, constante d'acidité apparente du chromophore / <i>apparent acidity constant of the chromophore</i>
s	largeur à mi-hauteur de la Gaussienne ajustée à la PSF / <i>full width at half maximum of the gaussian fitted to the PSF</i>
spt	suivi de particules uniques par microscopie PALM / <i>single particle tracking PALM</i>
% p/v	pourcentage poids/volume / <i>% w/v; percent weight/volume</i>
Å	ångström / <i>ångström</i>
q	PALM quantitatif / <i>quantitative PALM</i>
AOTF	filtre acousto-optique accordable / <i>acousto-optical tunable filter</i>
APTES	(3-aminopropyl)triéthoxysilane
DMSO	diméthylsulfoxyde / <i>dimethyl sulfoxide</i>
DoFi	profondeur de champ / <i>depth of field</i>
DPSS	laser à solide pompé par diode / <i>diode-pumped solid state laser</i>
DSS	disuccinimidyl subérate
EMCCD	caméra à dispositif de transfert de charges à multiplication d'électrons / <i>electron Multiplying Charge-Coupled Device</i>
$Fe(CN)_3$	ferricyanure / <i>ferricyanure</i>
GSD	déplétion de l'état fondamental / <i>ground state depletion</i>
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique / <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ON	ouverture numérique / <i>numeral aperture</i>
P_{dens}	densité de puissance du laser / <i>laser power density</i>
PAFP	protéine fluorescente photo-activable / <i>photo-activatable fluorescent protein</i>
PALM	microscopie de localisation suite à photo-activation / <i>photo-activated localization microscopy</i>
PBS	tampon phosphate salin / <i>phosphate buffer saline</i>
PCFP	protéine fluorescente photoconvertible / <i>photoconvertible fluorescent protein</i>
PFA	paraformaldéhyde / <i>paraformaldehyde</i>
PSF	fonction d'étalement du point (réponse impulsionnelle optique) / <i>point spread function</i>
PVA	alcool polyvinylique / <i>polyvinyl alcohol</i>
QC/MM	chimie quantique/mécanismes moléculaires / <i>quantum chemical/molecular mechanisms</i>

- RSFP protéine fluorescente photocommutable / *reversibly photoswitchable fluorescent protein*
- SIM microscopie par illumination structurée / *structured illumination microscopy*
- SMLM microscopie de localisation de molécules uniques / *single molecule localization microscopy*
- SNR rapport signal/bruit / *signal-to-noise ratio*
- SOFI microscopie de super-résolution par fluctuation optique / *super-resolution optical fluctuation imaging*
- STED déplétion par émission stimulée / *stimulated emission depletion*
- STORM microscopie de reconstruction optique stochastique / *stochastic optical reconstruction microscopy*
- TCSPC comptage de photons uniques corrélés en temps / *time-correlated Single Photon Counting*
- TIRF microscopie de fluorescence par réflexion totale interne / *total internal reflection fluorescence microscopy*

Première partie :

PRISE DE VUE

Dans cette partie, nous poserons les bases de la photobiochimie des protéines fluorescentes et de leurs utilisations en biologie cellulaire. Nous commencerons par une présentation des relations structure/fonction des protéines fluorescentes à partir de l'exemple de la GFP (Chapitre 1, page 3). Nous aborderons ensuite la dynamique des protéines fluorescentes avec un tour d'horizon des modifications structurales subies par les protéines fluorescentes sous illumination et une description de protéines fluorescentes remarquables : les protéines fluorescentes photomodulables (PMFPs)(Chapitre 2, page 29). Enfin, nous présenterons le contexte actuel et les défis futurs en microscopie photonique de super-résolution (Chapitre 3).

Les protéines fluorescentes, des outils biotechnologiques

Dans ce chapitre nous nous limiterons à l'étude des protéines fluorescentes conventionnelles (pour les protéines fluorescentes photomodulables voir le Chapitre 2, page 29). Après une présentation sommaire de la bioluminescence au sein du monde vivant, nous aborderons les protéines fluorescentes sous l'angle historique. Nous nous intéresserons en particulier aux relations structures/comportements photophysiques de ces bio-macromolécules émettrices de lumière et terminerons par un tour d'horizon de leurs applications biotechnologiques.

1.1 Préliminaires théoriques à propos de l'émission de lumière

La lumière est un rayonnement électromagnétique véhiculant de l'énergie sous forme de quanta appelés photons. Toute source lumineuse est caractérisée par un mouvement d'électrons en son sein. Ainsi, l'émission de lumière par une molécule est le résultat d'un changement de son état électronique décrit par ses orbitales moléculaires (combinaisons des orbitales atomiques).

Dans l'état fondamental d'une molécule (noté S_0), l'orbitale occupée la plus haute en énergie (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) contient une paire d'électrons à spins antiparallèles (Figure 1.1). Au cours de l'excitation électronique d'une molécule ($S_0 \rightarrow S_1$, qui peut être, entre autres, photo-, chimio- ou mécano-induite¹), un des électrons de l'HOMO est porté à la plus basse orbitale non occupée (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*) sans changement de spin. La molécule entre alors dans un état électroniquement excité singulet noté S_1 (Figure 1.1)². L'excitation d'une molécule consiste donc en une transition électronique endergonique permise par un couplage énergétique avec l'absorption d'un photon, une réaction chimique exergonique ou une réaction mécanique. L'énergie apportée pour l'excitation doit être supérieure à la différence d'énergie entre les états électroniques S_0 et S_1 . L'apport d'une énergie supérieure (*e.g.* photons de plus courte longueur d'onde) est à l'origine d'une transition entre l'état fondamental et un état vibrationnel associé à l'état S_1 (Figure 1.2). L'excédent énergétique est ensuite dissipé sous forme de chaleur : retour vers l'état vibrationnel de

1. Pour une revue exhaustive des modalités d'excitation électronique voir [Adam, 2009].

2. Un état dit triplet noté T_1 peut être peuplé par conversion inter-système à partir de l'état S_1 , suivie d'une relaxation vibrationnelle. Les spins des électrons de l'orbitale HOMO et LUMO de l'état triplet sont parallèles et son énergie est inférieure à celle de l'état S_1 (Figure 1.1).

plus basse énergie associé à l'état S_1 (relaxation vibrationnelle).

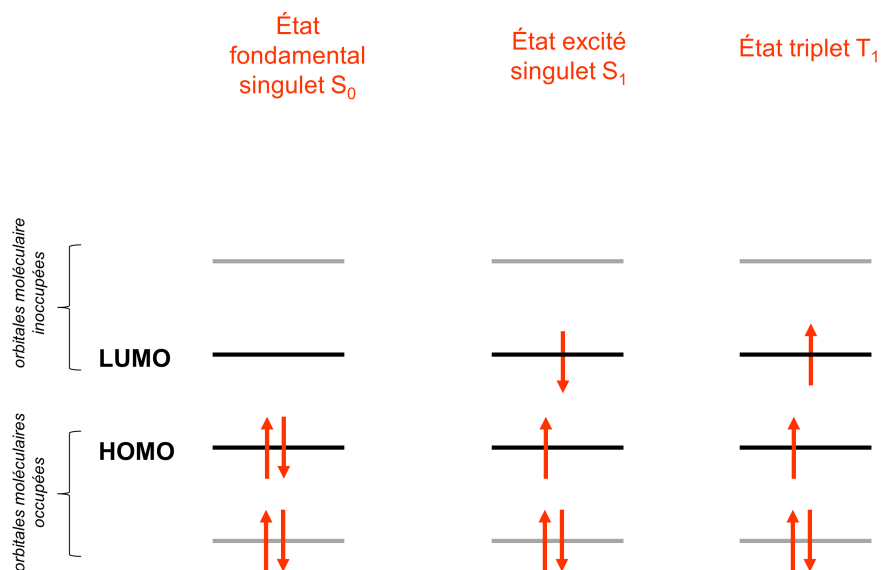


Figure 1.1 – Orbitales moléculaires et états électroniquement excités Chaque orbitale moléculaire est représentée par une ligne horizontale (Gauche). À l'état fondamental singulet S_0 , l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) contient deux électrons à spins antiparallèles (Centre). Lors de l'excitation, un électron vient occuper l'orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (LUMO) sans changement de spin : il se forme un état électroniquement excité singulet S_1 (Droite) Si un changement de spin accompagne le changement d'orbitale moléculaire de l'électron, l'état formé est appelé état triplet T_1 .

L'état électroniquement excité S_1 est un état de haute énergie et instable dont la durée de vie est courte (de l'ordre de la ps à plusieurs ns). L'état S_1 se désexcite (dissipation d'énergie) via deux voies principales : une voie radiative (accompagnée de l'émission de photons) et une voie non radiative. La voie radiative correspond à la transition entre l'état électroniquement excité et l'état fondamental ($S_1 \rightarrow S_0$) accompagnée de l'émission de photons : luminescence (Figure 1.2). On associe à cette voie la constante cinétique k_r . On parle de fluorescence lorsque la molécule (appelée fluorophore) entre dans son état S_1 suite à l'absorption d'un photon³. Lorsque S_1 est peuplé suite à l'absorption d'un photon on parle de fluorescence. La constante cinétique de désexcitation radiative k_r est associée à cette transition.

Les voies non radiatives de désexcitation de l'état S_1 sont multiples. Dans le cas d'un fluorophore isolé⁴, la dissipation de l'énergie accumulée par l'état excité peut se faire par transitions entre des états électroniques de même spins (e.g. $S_1 \rightarrow S_0$; Figure 1.2) : conversion interne ; ou entre états

3. Selon les autres modalités d'excitation (mécanique, chimique ou électrique), on parle de mécano- chimi- ou électro-luminescence respectivement.

4. Si le fluorophore électroniquement excité (noté F) se trouve à une distance inférieure à 10 nm d'un second fluorophore (noté G) dont le spectre d'absorption recouvre partiellement le spectre d'émission du fluorophore F , l'énergie issue de la désexcitation de l'état S_1 de F est transférée par résonance au fluorophore G qui est alors excité. On parle de transfert d'énergie par résonance (FRET pour *Förster resonance energy transfer*).

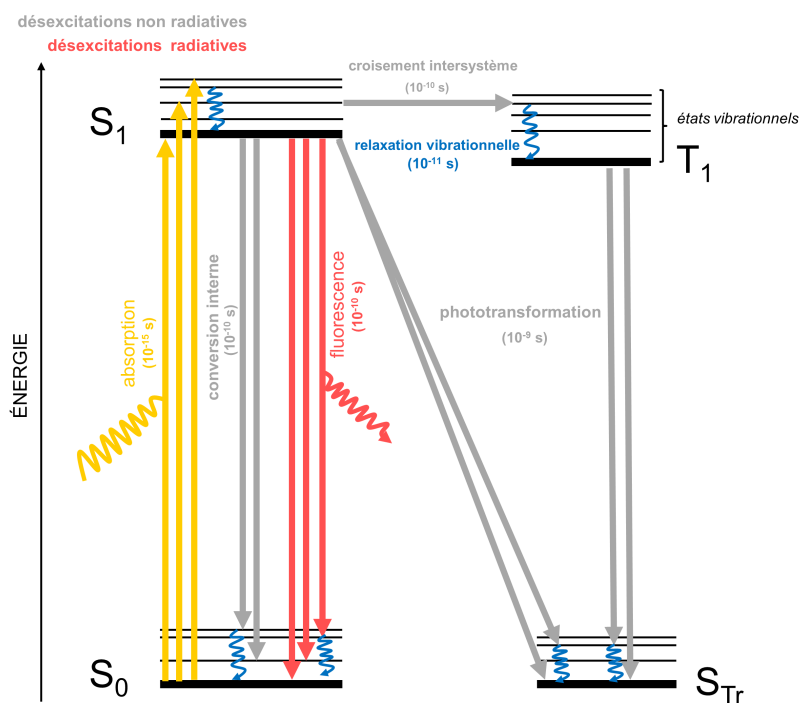
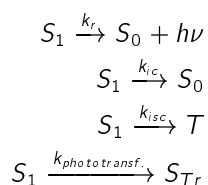


Figure 1.2 – Diagramme de Perrin-Jabłoński Les états électroniques sont représentés par des lignes horizontales. Les lignes les plus épaisses correspondent à l'état électronique de niveau vibrationnel zéro. Les niveaux vibrationnels de plus haute énergie pour chaque état sont représentés par des lignes fines. L'absorption ou l'émission de photons associée aux phénomènes radiatifs (absorption et fluorescence) sont représentées en jaune et en rouge respectivement. Les voies de désexcitation non radiatives sont représentées par des flèches grises et la relaxation vibrationnelle en bleu. Les temps caractéristiques des transitions sont rapportés entre parenthèses.

électroniques de spins différents (e.g. $S_n \rightarrow T_n$ Figure 1.2) : conversion inter-système. Alternativement, la dissipation d'énergie peut résulter de réactions photochimiques aboutissant à la formation d'un état de plus basse énergie (singulet noté S_{Tr} ou doublet) et dont la structure a été réversiblement ou irréversiblement modifiée (Figure 1.2). On parle alors de phototransformations (abordées en détails dans le Chapitre 2, page 29). L'ensemble des voies de désexcitation non radiatives caractérisées par la constante cinétique k_{nr} entrent en compétition avec la voie radiative et résultent en une diminution du nombre de photons émis par la molécule.

En résumé :



avec k_r la constante de désexcitation radiative, k_{ic} la constante de désexcitation non radiative par conversion interne,

k_{isc} la constante de désexcitation non radiative par conversion intersystème et $k_{phototransf.}$ la constante de désexcitation non radiative par phototransformation.

1.2 De la bioluminescence aux protéines fluorescentes

Dans le monde vivant, l'émission de photons est un phénomène physique réalisé au sein de nombreux clades (bactéries, champignons, eucaryotes unicellulaires et métazoaires [Haddock et al., 2010a]) et impliqué dans la réalisation de nombreuses fonctions biologiques [Bautz, 2005]. L'émission de lumière par les êtres vivants (bioluminescence) repose à l'échelle moléculaire sur des systèmes de nature biochimique et d'origines évolutives diverses.

1.2.1 Bioluminescence et systèmes enzymatiques

Généralités

La bioluminescence repose sur des couplages énergétiques chimio-photoniques au cours desquelles une enzyme (appelée génériquement luciférase) catalyse la transformation d'un substrat (appelé génériquement luciférine). Le fonctionnement du système luciférine/luciférase est à l'origine de l'émission d'une lumière dite froide (d'origine chimique par opposition à la lumière dite chaude d'origine thermique) véhiculant des photons dont la longueur d'onde couvre une gamme allant de 450 à 650 nm [Hastings, 1996] [Stanley, 2014].

Les travaux de Robert Boyle ont mis en évidence que les réactions de bioluminescences ne peuvent se faire en l'absence d'air [Boyle, 1666]. Les réactions de bioluminescence consistent en une oxydation du substrat grâce à l'activité oxydo-réductase de l'enzyme en présence d'un cofacteur : l'oxygène moléculaire (O_2) ou des composés peroxydés (H_2O_2 par exemple).

L'oxydation de la luciférine par la luciférase est à l'origine d'une excitation électronique du substrat qui entre dans un état S_1 (oxyluciférine électroniquement excitée). En se désexcitant par voie radiative, l'oxyluciférine émet de la lumière (Figure 1.3). L'émission de lumière se poursuit jusqu'à consommation totale de la luciférine (substrat) par l'enzyme.

En 1921, Harvey met en évidence un système bioluminescent dont le fonctionnement diffère de ceux connus jusqu'alors [Harvey, 1921]. Alors qu'en général, le substrat est le facteur limitant de la bioluminescence, chez de nombreux cnidaires et cténophores (et en particulier chez la méduse *Æquora victoria*, l'émission de lumière est contrôlée par la présence d'ions calciques [Shimomura and Johnson, 1970] [Shimomura, 1995]. L'enzyme à l'origine de l'émission de lumière, appelée æquorine, ne possède des propriétés de catalyse similaire à la luciférase qu'après fixation d'ions calciques sur son motif en main EF [Inouye, 2004]. Le complexe æquorine-cœlentérazine- Ca^{2+} appelé BFP-aq catalyse l'oxydation de la cœlentérazine (substrat) en cœlentéramide qui retourne à son état fondamental par voie radiative (lumière bleue : 459 nm, d'où le nom du complexe (*blue fluorescent protein*⁵). À la différence du système enzymatique retrouvé chez la luciole, l'excitation du substrat par l'æquorine est décorrélée de son oxydation et induite par les modifications structurales consécutives à la fixation d'ions calciques

5. Cette dénomination historique est abusive dans la mesure où il s'agit de chimiluminescence. Ce terme prête aujourd'hui à confusion avec la protéine fluorescente bleue (BFP).

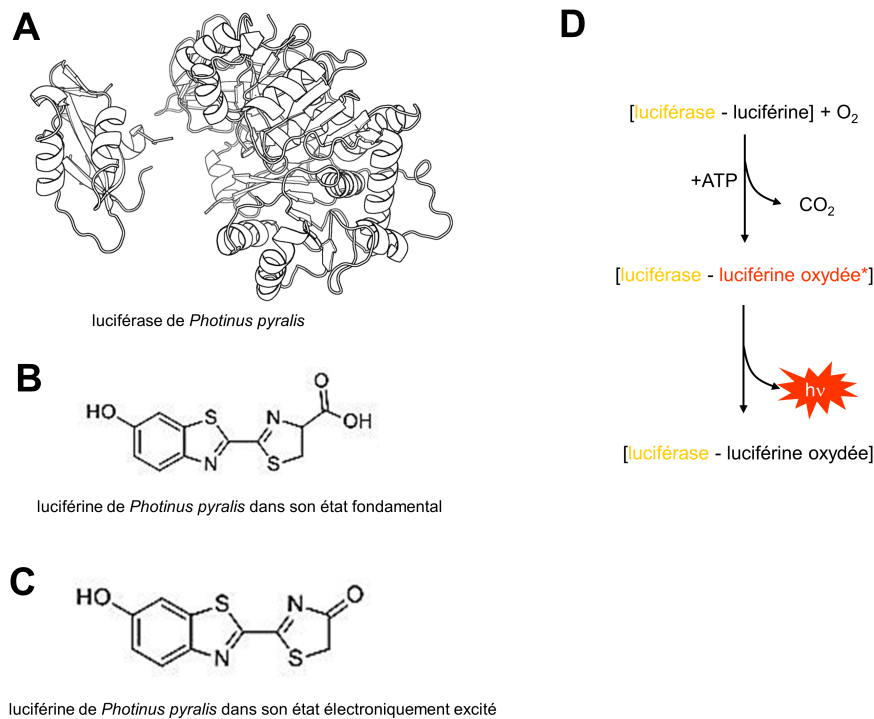


Figure 1.3 – Bioluminescence chez la luciole : système luciférase/luciférine (A). Structure tridimensionnelle de la luciférase de la luciole *Photinus pyralis* (code PDB : 1LCI) (B). Structure de la luciférine de luciole dans son état fondamental singulet (S_0) (C). Structure de la luciférine de luciole après oxydation : oxyluciférine (D). Schéma réactionnel de la catalyse enzymatique de la luciférine par la luciférase à l'origine de l'émission de photons (l'état électroniquement excité est repéré par un astérisque)

sur l'enzyme.

Importance biologique et technologique de la bioluminescence

La diversité des systèmes luciférase/luciférine retrouvés chez les différentes espèces bioluminescentes révèle l'absence d'homologie et suggère l'apparition de propriétés de luminescence au moins 40 fois indépendamment au cours de l'histoire du vivant [Haddock et al., 2010a]. La bioluminescence est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques (prédation, recherche de partenaire sexuel et camouflage, entre autres) conférant aux organismes un avantage évolutif important [Haddock et al., 2010a]. L'émission de lumière par les êtres vivants est exploitée depuis des siècles par l'Homme notamment par les peuples amérindiens qui en capturant des *cucujos* (*Pyrophorus sp.*) éclairent leur habitat [Amsterdamsky et al., 1984]. Quelques siècles plus tard, les systèmes enzymatiques bioluminescents sont encore utilisés par l'Homme comme outils technologiques. La fusion de la luciférase à une protéine d'intérêt permet notamment d'étudier le niveau d'expression de son gène et constitue alors un test efficace de mesure de l'activité d'un promoteur [Bronstein et al., 1994]. Idéalement, la fusion de

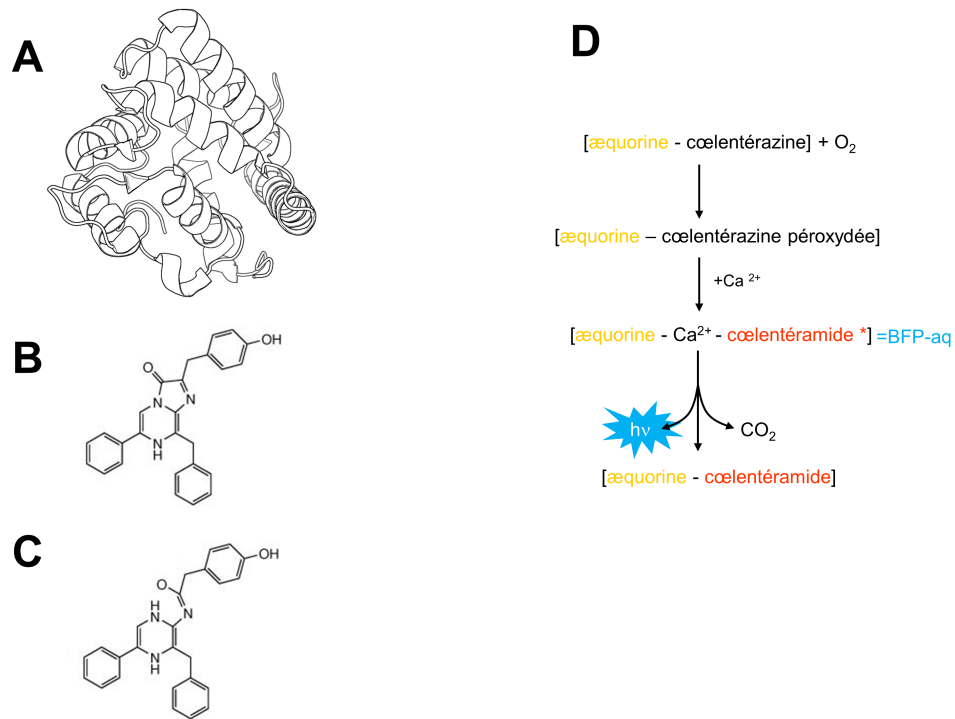


Figure 1.4 – Bioluminescence chez les méduses : système æquorine/coelentérazine (A). Structure tridimensionnelle de la luciférase de la méduse *Æquora victoria* (code PDB : 1EJ3) : æquorine (20 kDa) (B). Structure de luciférine de la méduse *Æquora victoria* dans son état fondamental singulet S_0 : coelentérazine (C). Structure de la luciférine de la méduse *Æquora victoria* après catalyse : coelentéramide (D). Schéma réactionnel de la catalyse enzymatique de la coelentérazine par l'æquorine à l'origine de l'émission de photons (l'état électroniquement excité est repéré par un astérisque).

protéines d'intérêt à cet émetteur de lumière permet leur cartographie spatiale au sein de la cellule par microscopie. Des avancées récentes ont permis le développement d'un système luciférase/luciférine jusqu'à 10 fois plus brillant, autorisant une localisation subcellulaire fine par bioluminescence [Nakajima et al., 2010]. La large gamme des systèmes luciférase/luciférine aujourd'hui disponibles couvre l'ensemble du spectre du visible du violet au proche infrarouge (675 nm, longueur d'onde faiblement absorbée par les tissus biologiques, ouvrant alors la porte à l'imagerie non invasive *in vivo* [Kiyama et al., 2016]).

D'autre part, la sensibilité aux ions calciques des systèmes de type æquorine/ coelentérazine retrouvés chez les cnidaires et cténophores est exploitée pour le dosage lumineux *in cellulo* de la concentration en calcium ($[Ca^{2+}]$) [Ridgway and Ashley, 1967].

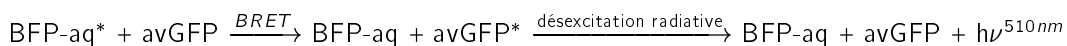
1.2.2 Fluorescence et protéines fluorescentes

Découverte

L'étude intensive de la méduse hydrozoaire *Æquora victoria* depuis les travaux d'Harvey a mis en avant un étonnant constat : dans son habitat naturel, cette méduse émet une lumière verte (~ 510 nm) alors que les extraits purifiés d'æquorine/ cœlentérazine émettent une lumière bleue (~ 470 nm) [Shimomura et al., 1962].

La présence de composés fluorescents verts dans les tissus photogéniques d'*Æquora victoria* était connue depuis 1955 [Davenport and Nicol, 1955]. Leur nature protéique fut mise en évidence plus tard grâce aux travaux de Shimomura qui baptisa cette protéine l'avGFP pour *Æquora victoria green fluorescent protein* : protéine fluorescente verte [Shimomura and Johnson, 1969]. En 1974, Morise et ses collaborateurs proposent un mécanisme moléculaire permettant d'expliquer le décalage bathochromique (vers le rouge) de la lumière émise par la méduse dans son habitat naturel. Étant donné le recouvrement du spectre d'émission du système æquorine / cœlentérazine (BFPaq) et du spectre d'absorption de l'avGFP, ils proposent un transfert d'énergie par résonance entre la BFP-aq* excitée et l'avGFP qu'ils appellent bioluminescence avec transfert d'énergie par résonance (*bioluminescence resonance energy transfer*, BRET) [Morise et al., 1974] [Ward, 1979] (Figure 1.5). La BFP-aq* excitée retourne vers son état fondamental en transférant son énergie à l'état fondamental de l'avGFP qui entre alors dans un état électroniquement excité (avGFP*). La désexcitation par voie radiative de l'avGFP* est à l'origine de l'émission de photons verts ($\lambda_{em}=510$ nm), en accord avec les observations en milieu naturel.

En résumé :



Pour la première fois, un fluorophore de nature intégralement protéique est découvert. Ce fluorophore codé génétiquement a rapidement été perçu comme un outil de choix en biologie cellulaire, permettant le marquage lumineux de protéines d'intérêt par fusion. Des efforts importants ont donc été mis en œuvre jusqu'à isoler et cloner en 1992 le gène codant pour l'avGFP [Prasher et al., 1992]. Dès lors, l'avGFP devient un outil biotechnologique particulièrement adapté pour la mesure du niveau d'expression et la cartographie spatiale de protéines d'intérêt chez de nombreuses espèces modèles en biologie [Chalfie, 1994]. Les applications des protéines fluorescentes en biologie cellulaire seront abordées en détails à la page 18 *sqq*.

Généralités

Face au succès promis par l'utilisation des protéines fluorescentes en biologie cellulaire, le « filon » a été intensément exploité au cours des années 1990 à 2000. Les travaux fondateurs de Shimomura ont annoncé le début d'une longue succession de découvertes de protéines homologues à l'avGFP chez différentes espèces animales, notamment chez de nombreuses espèces hydrozoaires planctoniques et luminescentes proches de la méduse *Æquora victoria* (*Obelia* [Aglyamova et al., 2011] ; *Phialidium* [Pakhomov and Martynov, 2011] ; *Clytia* [Fouirage et al., 2014]). Des protéines fluorescentes partageant ~ 30 % d'homologie de séquence avec les protéines hydrozoaires ont également été retrouvées chez des espèces anthozoaires non-bioluminescentes [Wiedenmann et al., 2004a] [Wiedenmann, 1997] et

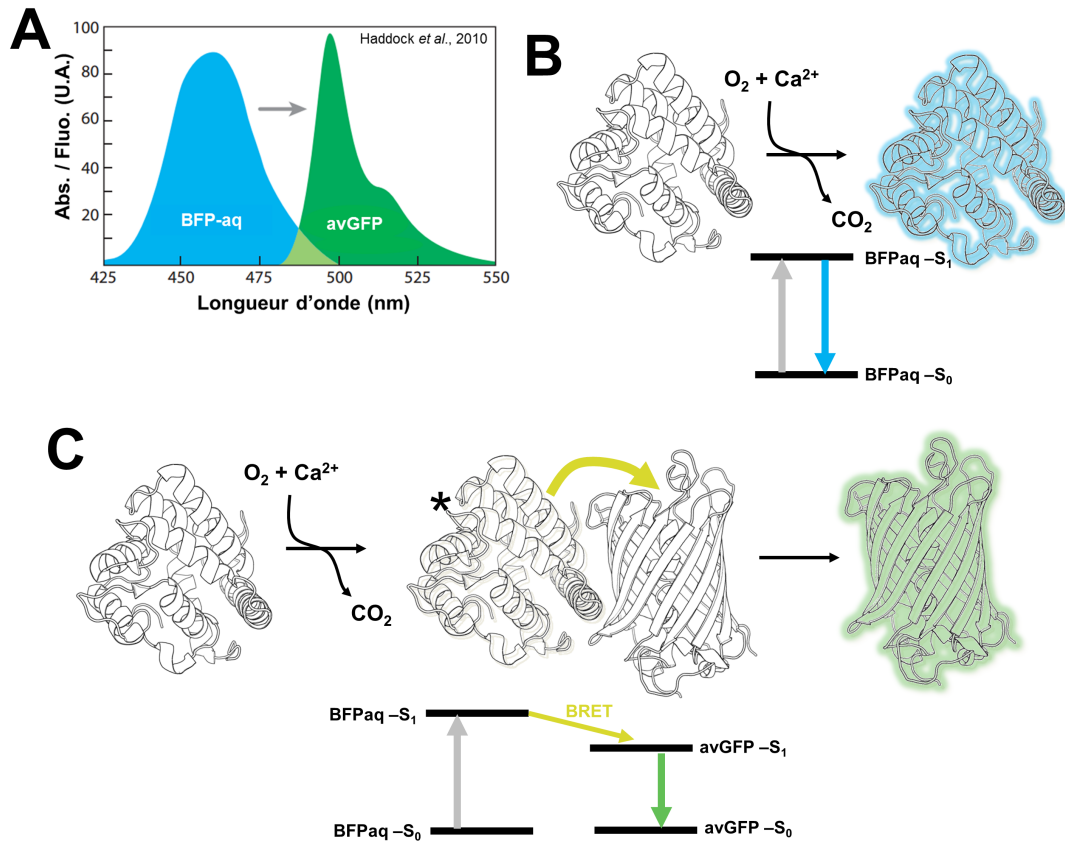


Figure 1.5 – Principe de la bioluminescence par transfert d'énergie par résonance (BRET) (A). Spectre d'émission de la BFP-aq (bleu) et d'absorption de l'avGFP (vert) (adapté de [Haddock et al., 2010a]). On note un recouvrement spectral partiel autorisant une désexcitation de l'état électroniquement excité de la BFP-aq par FRET vers l'avGFP si celle-ci se trouve à une distance inférieure à 10 nm (B). En l'absence d'avGFP, l'état excité peuplé après fixation d'ions calciques se désexcite par voie radiative (fluorescence bleue; ~470 nm) (C). En présence d'avGFP à une distance inférieure à 10 nm, l'état excité de la BFP-aq (répéré par un astérisque) se désexcite par voie non radiative en transférant par résonance son énergie à l'avGFP qui entre dans un état excité. L'état excité de l'avGFP se désexcite par voie radiative (fluorescence verte; ~510 nm).

bioluminescentes [Ward, 1979]. Alors que les protéines fluorescentes hydrozoaires émettent exclusivement dans la gamme vert-jaune du spectre visible, leurs homologues anthozoaires exploitent une plus large gamme de couleurs (Figure 1.6). Ainsi des protéines fluorescentes cyans⁶, jaunes⁷, oranges⁸, rouges⁹ et rouge lointain¹⁰ ont été découvertes permettant d'élargir la boîte à outils (Figure 1.6). Plus récemment des protéines fluorescentes ont été retrouvées au sein du phylum des Céphalochordés (Amphioxus du genre *Branchiostoma*) [Deheyn et al., 2007], des Cténophores (Cydippida du genre *Haeckelia*) [Haddock et al., 2010b] et des Arthropodes (Copépode du genre *Pontella* [Hunt et al., 2010] et *Chiridius* [Masuda et al., 2006]) (Figure 1.6 et 1.7).

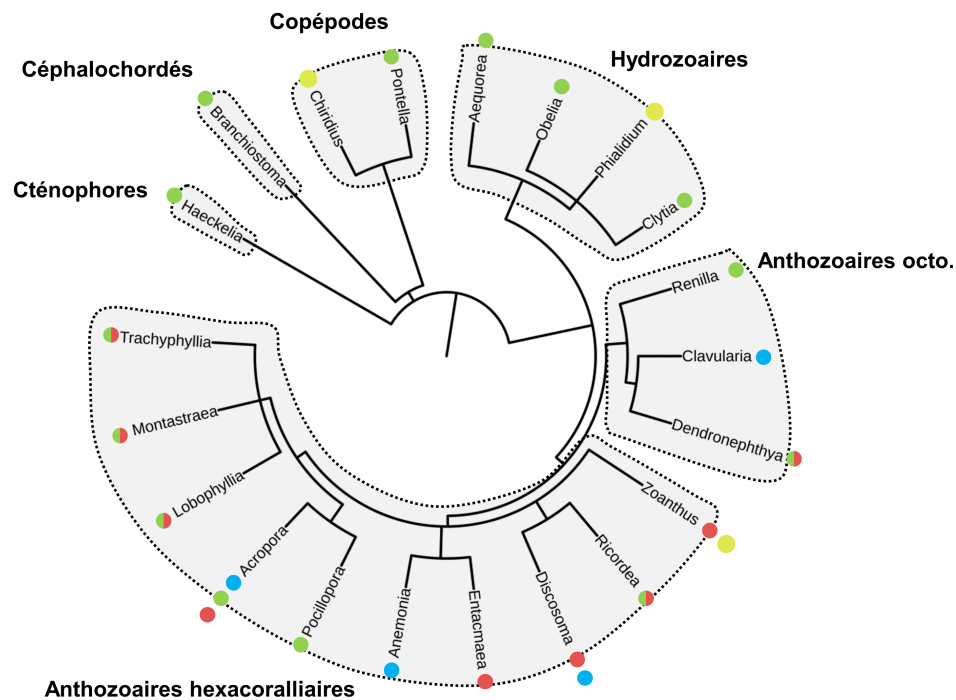


Figure 1.6 – Arbre phylogénétique des principales espèces chez lesquelles ont été isolées des protéines fluorescentes
La couleur des cercles indique le maximum d'émission de fluorescence des différentes protéines fluorescentes naturelles retrouvées chez les espèces du genre. Le cercle mi-vert mi-rouge représente les protéines fluorescentes photoconvertibles présentées dans le Chapitre 2 à la section 2.5, page 44. Remarquer l'absence de protéines fluorescentes cyan et rouge au sein de la classe des hydrozoaires.

6. amFP486 de *Anemonia majano* [Matz et al., 1999]; cFP484 de *Clavularia* sp. [Wiedenmann et al., 2004a]; MiCy de *Acropora* sp. [Karasawa et al., 2004a]; mcCFP de *Montastrea cavernosa* [Sun et al., 2004]; dsFP483 de *Discosoma striata* [Carter et al., 2004]; PdaC1 de *Pocillopora damicornis* [Carter et al., 2004].

7. zfp538 de *Zoanthus* sp. [Remington et al., 2005].

8. Kusabira Orange de *Fungia concinna* [Karasawa et al., 2004b].

9. drFP583 de *Discosoma* sp. connue sous le nom de DsRed [Matz et al., 1999].

10. eqFP611 de *Entacmaea quadricolor* [Wiedenmann et al., 2002].

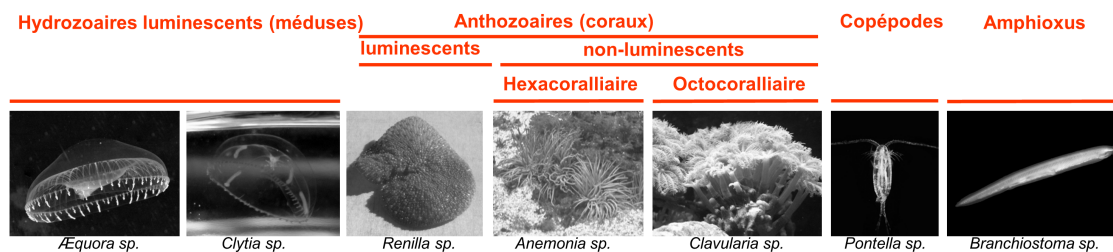


Figure 1.7 – Bestiaire des organismes produisant naturellement des protéines fluorescentes L'ensemble de ces organismes vivent en milieu marin. Source des images : Wikipédia.

En parallèle des approches d'exploitation de la biodiversité naturelle, la gamme du spectre lumineux couvert par les protéines fluorescentes a été élargi par ingénierie (mutagenèse raisonnée, aléatoire ou évolution dirigée). Nous développerons cet aspect plus en détails dans la section 1.5, page 23.

Importance biologique

La fonction biologique des protéines fluorescentes est encore largement discutée. Elles assurent notamment la coloration des coraux en jouant le rôle de pigments [Dove et al., 2001] [Kelmanson and Matz, 2003] [Matz et al., 2006]. D'autre part, il a été suggéré que les protéines fluorescentes puissent assurer une fonction de protection en jouant un rôle d'antioxydants [Palmer et al., 2009] ou de filtres à rôle photoprotecteur [Kawaguti, 1969] [Wiedenmann et al., 1999] [Salih et al., 2000], permettant de protéger les algues zooxanthelles symbiotiques et de limiter le photoblanchiment des coraux [Salih et al., 2006]. Enfin, il a également été proposé un rôle d'antenne relai de photons optimisant l'absorption de lumière par les photosystèmes des algues photosynthétiques présents dans les tissus cnidariens [Verkhusha and Lukyanov, 2004].

1.3 Relations structure-fonction des protéines fluorescentes

L'utilisation des protéines fluorescentes comme outils biotechnologiques requiert une connaissance fine des relations structures/fonctions. Dès la découverte de l'avGFP chez la méduse *Aequora victoria* des efforts ont été menés afin de connaître les bases structurales à l'origine des propriétés de fluorescence.

1.3.1 Structure des protéines fluorescentes

En 1996, les structures cristallographiques de l'avGFP et de la EGFP sont obtenues et servent de base à la compréhension des mécanismes photochimiques et photophysiques à l'origine de l'émission de lumière [Ormö et al., 1996] [Yang et al., 1996].

Le squelette protéique, un tonneau β

L'ensemble des protéines fluorescentes découvertes présentent une très forte homologie de structure. Toutes sont composées de 11 brins β organisés en un tonneau β soluble d'environ 2,5 nm de diamètre et 5,2 nm de hauteur formé post-traductionnellement au cours du repliement (Figure 10.5). La structure en tonneau β des protéines fluorescentes est semblable à celle des porines composées de

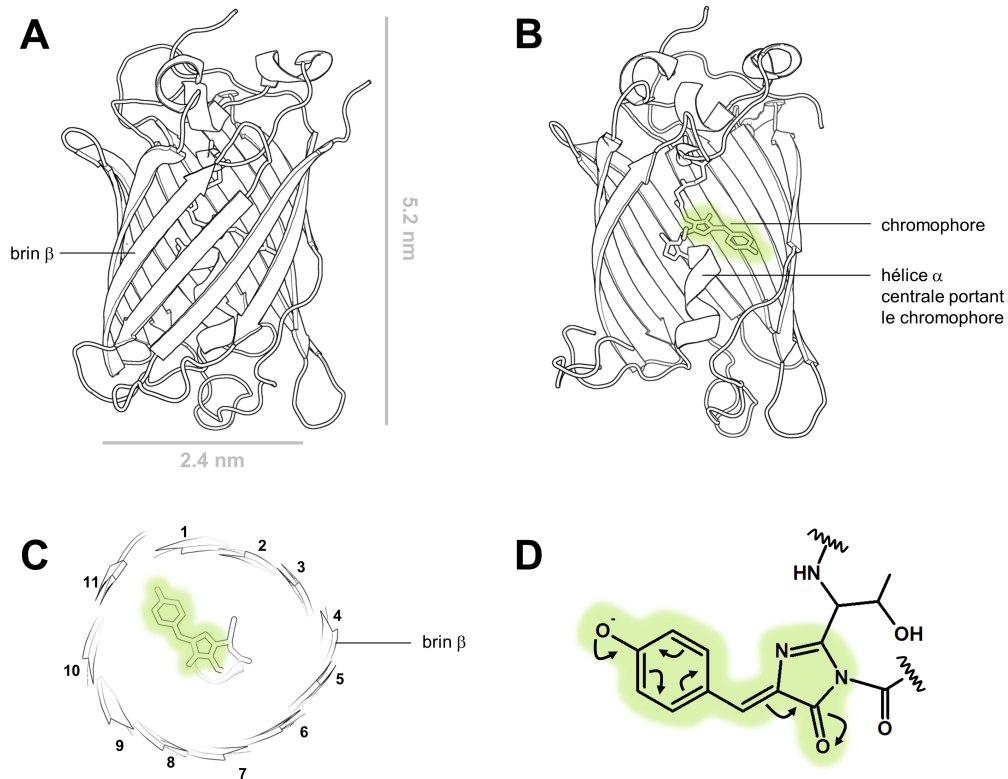


Figure 1.8 – Structure de la protéine fluorescente GFP (A) Tonneau β composés de 11 brins β antiparallèles contenant en son centre le chromophore. (B) Vue de l'intérieur du tonneau β après avoir retiré les brins 1, 2 et 3. Le chromophore est porté par une hélice α centrale. (C) Vue en coupe transversale de l'intérieure du tonneau β mettant. (D) Structure du chromophore mettant en évidence la délocalisation des électrons par résonance.

16 brins β [Kreusch et al., 1994] et à celle de la streptavidine composées de 8 brins β [Hendrickson et al., 1989], entres autres. À la différence de ces deux protéines, les deux extrémités du tonneau β des protéines fluorescentes sont fermées par de courtes hélices α formant des « couvercles ». L'extrémité N-terminale est engagée dans la formation d'une des hélices α refermant le tonneau et joue un rôle central dans les phénomènes de repliement et de fluorescence comme le suggère la diminution drastique de la fluorescence de la GFP suite à la troncation d'un unique acide aminé en N-terminal [Phillips, 1997]. À l'opposé, l'extrémité C-terminale forme une région désordonnée extérieure au tonneau pouvant être modifiée sans importantes détériorations des propriétés de fluorescence. En règle générale, la partie C-terminale des protéines fluorescentes tolère davantage de modifications si bien que les constructions

en fusion C-terminale conduisent à moins d'artéfacts [Palmer and Freeman, 2004].

Naturellement, la GFP sauvage (avGFP) présente une tendance à former des dimères [Yang et al., 1996]. Ces dimères résultent d'une interaction de type effet hydrophobe entre les acides aminés apolaires (Ala206, Leu221 et Phe223) de deux monomères. Le remplacement de ces acides aminés par d'autres à chaîne latérale chargée (mutations Ala206Lys, Leu221Lys et Phe223Arg) réduit considérablement l'interaction et permet l'obtention d'un mutant monomérique appelé mGFP.

Le repliement des protéines fluorescentes est fortement affecté par la température du milieu. Les protéines fluorescentes issues d'hydrozoaires vivants en eaux froides sont particulièrement thermo-intolérantes au delà de 25 °C (e.g. avGFP [Siemering et al., 1996]) alors que les protéines fluorescentes anthozoaires issues de coraux vivants en eaux chaudes tropicales se replient avec une meilleure efficacité à 37 °C [Snapp, 2009].

Enfin, le tonneau β est traversé par une hélice α (Figure 10.5) portant à son extrémité une triade d'acides aminés réagissant entre-eux pour former un groupe hétérocyclique à l'origine des propriétés d'absorption de lumière des protéines fluorescentes : le chromophore (voir section suivante).

Le chromophore, un système conjugué

Structure du chromophore La réaction autocatalytique entre les trois acides aminés Ser65-Tyr66-Gly67 de l'avGFP appelée « maturation » donne naissance à un 4-(p-hydroxybenzylidène)-5-imidazolinone (abrégé en p-HBDI) appelé chromophore. Le chromophore est composé de deux cycles : un homocycle aromatique hydroxybenzyle (anneau ϕ) et un hétérocycle imidazolinone (anneau I); reliés entre eux par un groupement propène dit pont méthylène en conformation *cis*-plane¹¹. Les liaisons doubles des deux anneaux sont conjuguées par méthylène, permettant ainsi une délocalisation des électrons π sur l'ensemble du chromophore à l'origine des propriétés de fluorescence (Figure 1.9).

Maturation du chromophore Au cours de la première étape de la maturation, des ré-arrangements torsionnels affectent la triade d'acides aminés. Suite à cette étape, le carbonyl de la liaison peptidique entre la sérine 65 et la tyrosine 66 pointe en direction de l'amine de la liaison peptidique entre glycine 67 et tyrosine 66 (Figure 1.10 A). Cette géométrie favorise l'attaque

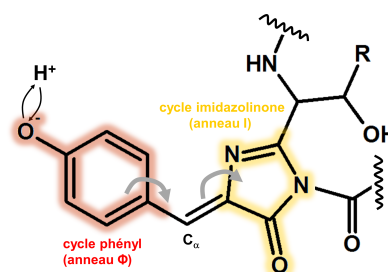


Figure 1.9 – Chromophore de la protéine fluorescente verte GFP Le chromophore 4-(p-hydroxybenzylidène)-5-imidazolinone est composé de deux cycles : un homocycle aromatique (hydroxybenzyle) présentant une fonction titrable (OH/O⁻) et un hétérocycle azoté (imidazolinone) reliés par un pont méthylène en conformation *cis*-plane. Le carbone méthylénique est nommé C _{α} . Les flèches grises représentent les mouvements des électrons π entre les deux cycles conjugués par le pont méthylène.

11. Le pont méthylène du chromophore de certaines protéines fluorescentes peut adopter une conformation *trans*-plane. C'est le cas notamment de la forme native de la protéine fluorescente anthozoaire eqFP611 [Wiedenmann et al., 2002] et de la forme photocommutée de la plupart des protéines fluorescentes photocommutables (voir détails en page 37).

nucléophile du doublet non-liant de l'amine sur le carbone du carbonyl aboutissant à une cyclisation intra-moléculaire (Figure 1.10 B). La cyclisation est favorisée par la présence de la glycine (très faible encombrement stérique) strictement conservée en position 67 chez l'ensemble des protéines fluorescentes. L'amine secondaire portée par l'anneau I néoformé est ensuite oxydée en amine secondaire en présence d'oxygène moléculaire (Figure 1.10 C). Une dernière étape de déshydratation permet d'enrichir le chromophore en électrons π : formation d'un pont méthylène entre l'anneau ϕ et I . Cette liaison π C_{α} - C_{β} active alors la délocalisation des électrons le long du p-HBDI¹².

Le rôle de la matrice protéique dans le contrôle de la maturation est encore mal compris et étudié par des approches théoriques [Ma et al., 2010] [Ma et al., 2012] [Ma et al., 2016] et expérimentales [Sniogowski et al., 2005] [Craggs, 2009] [Pletneva et al., 2010] .

Selon les protéines fluorescentes, le demi-temps de maturation va de la seconde (TurboGFP demi-temps de maturation $\tau_{1/2}=1.7$ s *in vitro* [Evdokimov et al., 2006]) à l'heure (mPlum $\tau_{1/2}=100$ min en cellules de la lignée B [Wang et al., 2004]). D'autre part, la maturation étant particulièrement sensible aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, état redox, ...), la quantité de protéines fluorescentes fonctionnelles (*i.e.* émettant des photons) selon le contexte d'étude varie significativement et doit être attentivement pris en compte.

Propriétés spectrales du chromophore En solution, le chromophore de l'avGFP présente une double bande d'absorption (pic principal à ~ 395 nm et pic mineur à ~ 475 nm) [Ward, 1979]. L'anneau ϕ porte un groupe protonable en équilibre entre une forme acide protonée (phénol) et une forme base conjuguée déprotonée (phénolate) et est caractérisé par une constante apparente d'équilibre de protonation du chromophore notée $pK_{a,app}$. Les deux formes du chromophore sont respectivement appelées forme neutre et forme anionique (pic d'absorption à ~ 395 nm et ~ 475 nm respectivement ; (Figure 1.11) et seule la forme anionique est fluorescente.

L'incapacité du chromophore isolé de la GFP [Forbes and Jockusch, 2009] et de la protéine dénaturée [Webber et al., 2001] à émettre de la lumière après excitation suggère que le squelette protéique joue un rôle central dans le phénomène de fluorescence : le chromophore est nécessaire à la fluorescence mais non suffisant. L'environnement protéique du chromophore permet d'une part le maintien de la planéité du chromophore (propriété essentielle à la fluorescence) et d'autre part restreint les rotations autour des liaisons C-C évitant ainsi les conversions internes ultra-rapides en compétition avec la voie radiative [Mooney et al., 2013]¹³.

1.3.2 Propriétés photophysiques des protéines fluorescentes

Propriétés d'absorption (ϵ) et d'excitation (k_{ex})

Comme tout fluorophore, les protéines fluorescentes sont caractérisées par leur spectre d'absorption *i.e.* la gamme de longueurs d'onde dont l'énergie permet l'excitation du chromophore ($S_0 \rightarrow S_1$). Une estimation quantitative de l'absorptivité molaire des chromophores (capacité à absorber la lumière)

12. La maturation des chromophores des protéines fluorescentes nativement rouges est plus complexe et fait intervenir une réaction supplémentaire allongeant le réseau de liaisons doubles conjuguées (oxydation pour DsRed ; oxydation + déshydratation entraînant une rupture de liaison covalente pour asFP595)

13. Des chromophores organiques à torsion restreinte ont d'ailleurs été synthétisés en mimant l'effet de la matrice protéique sur le chromophore de la GFP [Wu and Burgess, 2008].

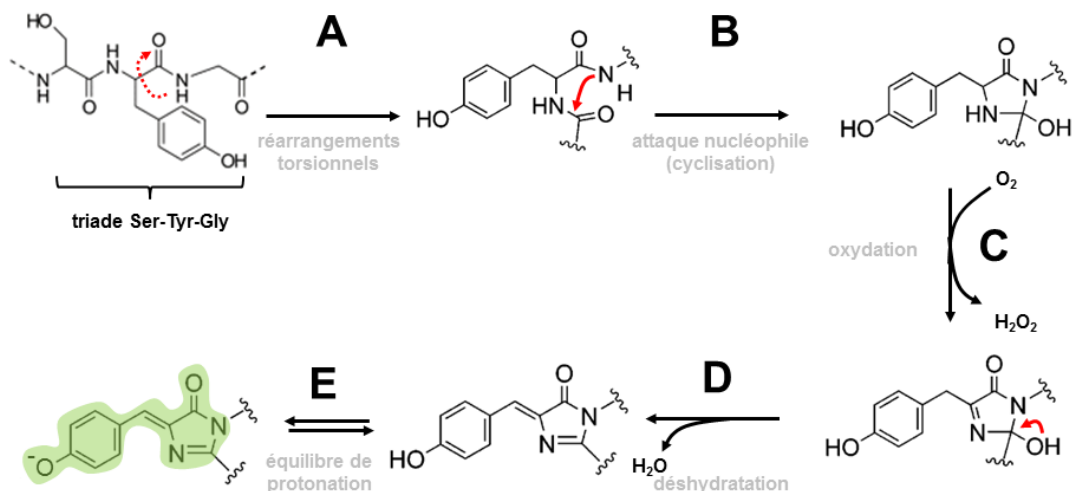


Figure 1.10 – Vue synoptique des réactions chimiques autocatalytiques intervenant lors de la maturation du chromophore (A). Ré-arrangements torsionnels de la triade d’acides aminés Ser65, Tyr66 et Gly67 (B). Attaque nucléophile intramoléculaire entre l’amine de la liaison peptidique 66-67 et le carbonyle de la liaison peptidique 65-66 aboutissant à une cyclisation intramoléculaire (C). Réaction d’oxydation de l’anneau *I* du chromophore (D). Réaction de déshydratation aboutissant à la mise en place du pont méthylène conjugant les deux anneaux. Figure modifiée d’après [Zhang et al., 2006].

est donnée par le coefficient d’absorption molaire noté ϵ et exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$ ¹⁴.

L’excitation du chromophore des protéines fluorescentes est optimale pour une longueur d’onde située au maximum de son spectre d’absorption (notée λ_{ex}). On note la longueur d’onde d’excitation λ_{ex} . La vitesse de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ sous illumination à λ_{ex} appelée vitesse d’excitation (k_{ex}) définie par l’équation (1.1) permet d’appréhender l’évolution de la population S_1 dans les conditions d’illumination.

$$k_{ex} = \epsilon P \lambda \frac{10^{-6} \ln(10)}{N_A h c} \quad (1.1)$$

avec ϵ le coefficient d’extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) à la longueur d’onde d’excitation λ_{ex} (nm), P (W/cm^2) la densité de puissance du laser d’excitation, N_A le nombre d’Avogadro, h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière.

¹⁴. Le coefficient d’extinction molaire est défini à une longueur d’onde donnée et à un pH donné (voir page 144 pour les détails techniques de la mesure du ϵ des protéines fluorescentes).

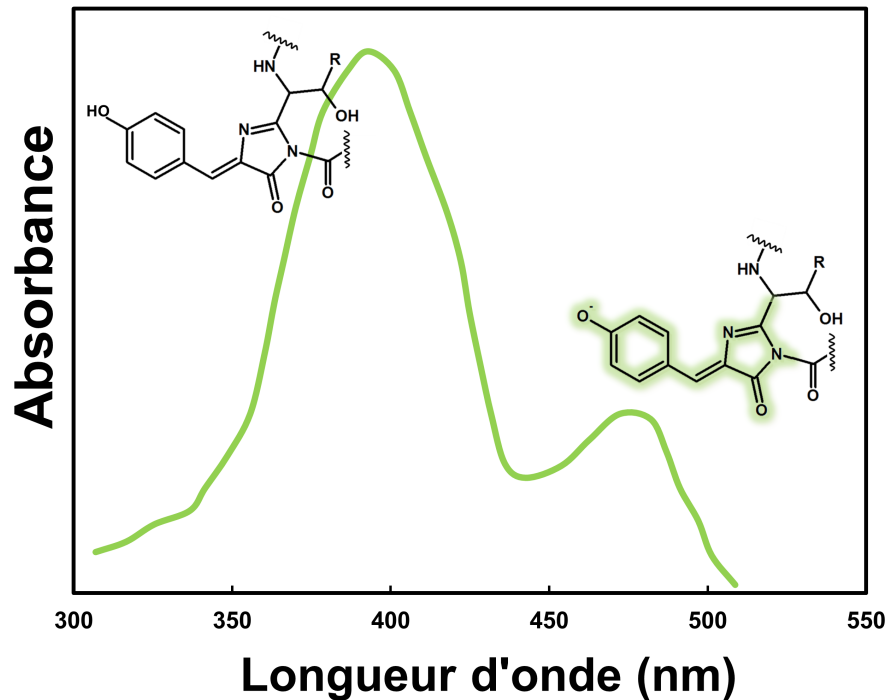


Figure 1.11 – Spectre d'absorption de la protéine fluorescente vert avGFP. Le spectre est composé d'une bande violette (maximum à 395 nm) et d'une bande bleue (maximum à 475 nm) correspondant respectivement aux formes protonée et anionique du chromophore.

Propriétés de fluorescence (Φ_{flu} et τ)

Une protéine fluorescente émet d'autant plus de photons que l'état excité se désexcite par voie radiative (définie par sa constante cinétique k_r) par rapport aux voies non radiatives (définies par la constante cinétique k_{nr}). Le rapport entre le nombre de photons émis par désexcitation radiative et le nombre de photons absorbés est appelé rendement quantique de fluorescence (Φ_{flu} ; équation (1.2)). Un rendement quantique de fluorescence de 1 signifie que 100% des états excités se désexcitent par voie radiative en émettant de la lumière.

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

En considérant une protéine fluorescente à rendement quantique inférieur à 1, se désexcitant par voie radiative et non radiative, l'évolution au cours du temps de la population de l'état excité est donnée

par l'équation 1.3.

$$\frac{dS_1(t)}{dt} = \underbrace{k_{ex} S_0(t)}_{\text{apparition de l'état excité } S_0 \rightarrow S_1} - \underbrace{(k_{nr} + k_r) S_1(t)}_{\text{disparition de l'état excité } S_1 \rightarrow S_0} = k_{ex} S_0(t) - \frac{1}{\tau} S_1(t) \quad (1.3)$$

avec τ le temps de vie de l'état excité.

À l'état stationnaire ($\frac{dS_1(t)}{dt} = 0$) et en considérant à faible intensité d'illumination l'absence de déplétion de l'état fondamental S_0 , il vient :

$$S_1(t) = \frac{k_{ex} S_0}{k_{nr} + k_r}$$

La lumière émise par une protéine fluorescente se désexcitant par voie radiative ($S_1 \xrightarrow{k_r} S_0$) à un temps donné (i_{fluor} , appelée brillance) est donnée par l'équation :

$$i_{fluor}(t) = k_r S_1(t) = \frac{k_r k_{ex} S_0}{k_{nr} + k_r} = k_{ex} S_0 \Phi_{fluor} = f(\epsilon P \Phi_{fluor}) \quad (1.4)$$

La lumière émise intégrée sur le temps de vie total de la protéine fluorescente (I_{fluor} , appelée budget de photons) est donnée par l'équation :

$$I_{fluor} = \int_0^{t_{bl}} i_{fluor}(t) dt = t_{bl} k_{ex} S_0 \Phi_{fluor} = f(t_{bl} \epsilon P \Phi_{fluor}) \quad (1.5)$$

avec t_{bl} le temps avant photoblanchiment.

Le budget de photons est un paramètre clé des protéines fluorescentes. Un fort budget de photons permet l'acquisition d'image d'excellente qualité. Sachant que le budget de photons intrinsèque d'une protéine fluorescente est contraint par sa photorésistance (t_{bl} , temps avant photoblanchiment), son rendement quantique de fluorescence (Φ_{fluor}) et son coefficient d'extinction molaire (ϵ , lui même dépendant de l'équilibre de protonation du chromophore), la conception de nouvelles protéines fluorescentes à haut budget de photons doit reposer sur l'optimisation conjointe de ces trois paramètres (voir page 25).

1.4 Applications des protéines fluorescentes

Nous allons dans les paragraphes suivants nous intéresser aux applications biotechnologiques de ces émetteurs protéiques de lumière.

1.4.1 Des colorants aux protéines fluorescentes : histoire de l'observation microscopique du vivant

Dès la première utilisation d'un microscope dans le but d'étudier des objets biologiques [Hooke, 1665], un problème majeur s'est présenté : les échantillons biologiques sont naturellement peu colorés

et peu contrastés, si bien que leur observation en l'état est peu informative. Un objectif central de la biologie cellulaire depuis ses débuts a alors été de trouver des parades efficaces à la transparence naturelle des cellules. En 1858, Joseph von Gerlach a mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'un colorant naturellement présent chez les insectes (le carmin) comme moyen efficace de coloration différentielle du noyau de cellules de cerveau [von Gerlach, 1858]. Pendant de nombreuses années, les échantillons biologiques ont été rendus informatifs et contrastés par l'utilisation de colorants peu spécifiques à l'image du carmin (coloration Giemsa [Giemsa, 1904] et coloration Feulgen [Feulgen and Volt, 1924] entre autres). L'utilisation de ces colorants permet de modifier de manière partiellement contrôlée les propriétés d'absorption de la lumière de différents compartiments cellulaires, permettant ainsi leur discrimination par la lumière.

La fin du XIX^{ème} siècle en Europe voit fleurir l'industrie chimique qui contribue au développement de composés fluorescents organiques. Les fluorophores disponibles sont utilisés afin d'améliorer le contraste des cellules et faciliter leur observation microscopique dès 1914 [Von Prowazek, 1914]. Le début du XX^{ème} siècle marque donc le début de l'ère de la microscopie de fluorescence. Les premiers microscopes à transmission de fluorescence sont développés en Allemagne [Heimstädt, 1911] et plus tard modifiés pour l'étude d'échantillons épais (excitation par l'objectif ; microscope d'épifluorescence) [Ellinger and Hirt, 1929].

En parallèle, de l'entre deux guerres aux années 1950, des méthodes physiques sont utilisées pour améliorer le contraste des échantillons biologiques (contraste de phase [Zernike, 1938] et contraste interférentiel différentiel [Nomarski, 1952]). En s'affranchissant de l'utilisation de colorants parfois cytotoxiques, ces techniques permettent l'observation de cellules vivantes dans un état proche (voire identique) de leur état physiologique. Néanmoins, ces techniques n'autorisent pas l'étude spécifique de compartiments ou constituants cellulaires.

Dès les années 1940, sous l'impulsion de Albert Coons, les méthodes de marquage fluorescent gagnent en spécificité grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorophores à rôle de rapporteurs lumineux [Coons et al., 1941] (Figure 1.12). Avec l'immunofluorescence, l'emploi de colorants à spécificité peu contrôlée se raréfie. Malgré l'important gain de spécificité apporté par l'immunomarquage, l'utilisation d'anticorps peut être à l'origine de nombreux artéfacts, notamment un marquage non-spécifique à l'origine de faux-positifs ou une faible accessibilité à l'épitope à l'origine de faux-négatifs. La taille des assemblages anticorps primaires/secondaires est à l'origine d'une modification de l'image de l'objet. En particulier, l'immunomarquage des microtubules augmente leur diamètre de 25 à 60 nm [Weber et al., 1978] [Bates et al., 2007]. L'utilisation d'anticorps peut également être responsable d'un regroupement artéfactuel des protéines d'intérêt (*clustering*) [Suzuki et al., 2012]. Ces inconvénients sont à garder à l'esprit lors de l'utilisation de cette méthode de marquage aujourd'hui en microscopie de super-résolution (*e.g.* STORM).

De surcroît, ces techniques se limitent à l'étude de cellules fixées et ayant subi un traitement de perméabilisation des membranes pour permettre la pénétration des anticorps dans la cellule [Sabatini et al., 1963]. Malgré ces inconvénients, l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorophores organiques permet d'exploiter l'intégralité du spectre visible avec une brillance élevée, et est encore largement répandue aujourd'hui.

À la fin des années 1960, la découverte des systèmes enzymatiques bioluminescents bouleverse les

stratégies de marquage en introduisant l'étiquetage lumineux codé génétiquement (fusion entre les protéines d'intérêt et la luciférase utilisée comme rapporteur). Le marquage est alors totalement spécifique, exempt de faux-positifs et compatible avec l'observation de cellules vivantes. Malgré une émission de photons potentiellement infinie si l'enzyme est approvisionnée en substrat, la faible fluence de photon du système luciférine/luciférase limite son utilisation jusqu'à la découverte des protéines fluorescentes qui viendront révolutionner les stratégies de marquage lumineux génétique (Figure 1.12). La microscopie des années 80 est alors dynamisée par l'utilisation des protéines fluorescentes à fort budget de photons et dont la brillance est modulable par l'intensité lumineuse d'excitation. Néanmoins, malgré les efforts d'optimisation des protéines fluorescentes, la plupart tendent à oligomériser à haute concentration introduisant des artefacts lors de l'observation [Landgraf et al., 2012] [Vreja et al., 2015]. D'autre part, le budget de photons des protéines fluorescentes est, en général, plus faible que celle des fluorophores organiques largement optimisés depuis le début du XX^{ème} siècle¹⁵.

Afin de tirer profit du développement exponentiel de fluorophores organiques de haute qualité, de nouvelles stratégies de marquage ont vu le jour au début du XXI^{ème} siècle. Ces méthodes reposent sur la fusion de la protéine d'intérêt à une enzyme dit auto-étiquetable. Ces enzymes capables de reconnaître spécifiquement un substrat catalyse la formation d'une liaison covalente entre leur chaîne polypeptidique et ce dernier. Les fluorophores modifiés portant le substrat reconnu par l'enzyme sont alors covalamment reliés à la construction en fusion. L'enzyme de réparation O⁶-alkylguanine-DNA alkytransferase (AGT) qui catalyse la fixation d'un fluorophore modifié portant un O⁶-benzylguanine à l'une de ses cystéines est notamment utilisée et commercialisée sous le nom de SNAP [Calebiro et al., 2013] (Figure 1.12)¹⁶.

Alternativement, les fluorophores modifiés peuvent se fixer de manière spécifique mais non covalente. Notamment, la dihydrofolate réductase d'*E. coli* (eDHFR) fixe un antibiotique -la thriméthoprimine (TMP)- qui peut être couplée à un fluorophore [Chen et al., 2012] (Figure 1.12)¹⁷. L'utilisation de ces étiquettes à fluorescence non-intrinsèque impose d'avoir recours à des méthodes permettant la pénétration des fluorophores organiques dans les cellules. Les fluorophores non-perméables aux membranes cellulaires doivent alors être micro-injectés [Keppler et al., 2006] ou chargés à l'aide de billes [Maurel et al., 2010], manipulation pouvant altérer l'état de la cellule et limiter l'observation de cellules vivantes. Dans tous les cas, le recours à des fluorophores organiques exogènes en excès peut conduire à un marquage non spécifique et à une augmentation du bruit [Cole, 2013].

En général, l'utilisation d'étiquettes de haut poids moléculaire (maximale avec l'immunomarquage¹⁸)

15. Fluorophore organique rouge (AlexaFluor 594) : $\epsilon=92\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $\Phi_{fluor}=0.66$ soit une brillance ($\epsilon\phi$) de 60 720.

Protéine fluorescente rouge (mEos3.2) : $\epsilon=32\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $\Phi_{fluor}=0.55$ soit une brillance de 17 600, ~ 3.5 fois inférieure à celle de l'AlexaFluor 594.

De plus, la plus forte photorésistance des fluorophores organiques (notamment en présence de cocktail anti-photoblanchiment) est à l'origine d'un budget de photons plus important.

16. De nombreux autres systèmes analogues sont disponibles : ligase d'acide lipoïque [Fernez-Suz et al., 2007]; ligase de biotine [Chen et al., 2005]; haloalkane déhalogénase commercialisée sous le nom de Halo [Los et al., 2008] [Uno et al., 2014]

17. Des nombreux autres systèmes analogues existent : étiquette histidine [Wieneke et al., 2014]; sondes spécifiques du cytosquelette [Lukinavicius et al., 2014]

18. La découverte chez des camélidés d'anticorps à chaîne unique et de petite taille baptisé *nanobody* a permis de considérablement réduire la taille de l'étiquette en immunomarquage [Muyldermans, 2013].

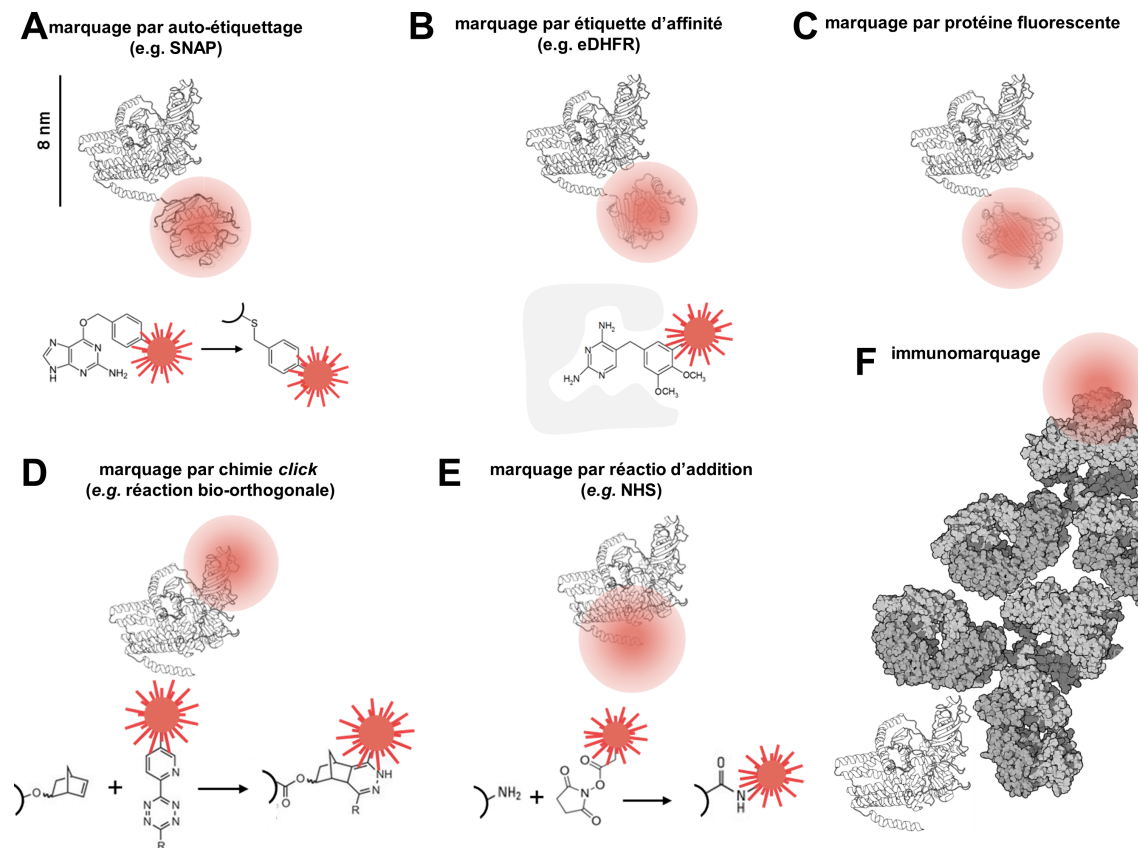


Figure 1.12 – Vue synoptique des méthodes de marquage fluorescent des protéines Marquage d'une des deux chaînes de la cellulose synthase (code PDB : 4HG6) par (A). fusion à une étiquette auto-marquable (SNAP (code PDB : 3KZY), liaison covalente) en utilisant un fluorophore couplé à une O⁶-benzylguanine, par (B). fusion à une étiquette auto-marquable (eDHFR (code PDB : 4P3R), non covalent) en utilisant un fluorophore couplé à la triméthopime, par (C). fusion à une protéine fluorescente, par (D). insertion d'acides aminés non naturels et réaction bio-orthogonale avec un fluorophore couplé à une tétrazine, par (E). marquage par réaction d'addition sur amines avec un fluorophore couplé à un groupement NHS, par (F) immunomarquage (anticorps primaire et secondaire couplé à un fluorophore).

peut entraîner une modification de la localisation des protéines d'intérêt [Landgraf et al., 2012] [Vreja et al., 2015], de leur dynamique [Raskin and de Boer, 1999] [Edwald and Veatch, 2013] ou encore des modifications morphologiques des compartiments cellulaires [Snapp et al., 2003] [Snapp, 2009]. L'utilisation de protéines fluorescentes fortement monomériques (tel que le mutant mGFPmut3 portant la mutation Ala206Lys cassant l'interface de dimérisation entre monomères) semble limiter les artefacts de localisation [Graham et al., 2014].

Les travaux de Swulius et Jensen sur MreB (analogue bactérien de l'actine) mettent en évidence par des études comparatives la modification de l'organisation de l'assemblage supramoléculaire dans le cas de fusion avec YFP. Alors qu'en microscopie électronique sans marquage par protéine fluorescente MreB s'assemble en hélices isolées, les hélices MreB-YFP observées en microscopie de fluorescence forment des faisceaux d'hélices [Swulius and Jensen, 2012]. En se basant sur les travaux de Swulius et

Jensen, Margolin a introduit la notion de « prix d'étiquetage » [Margolin, 2012] : marquer une protéine d'intérêt ne peut se faire sans contre-parties¹⁹.

Afin d'éviter d'avoir à payer ce « prix d'étiquetage », des méthodes de marquage avec modification mineure de la protéine d'intérêt ont été développées. Les protéines sont marquées par réaction d'addition à l'aide de fluorophores couplés à des groupes réactifs (groupement réactif aux amines (NHS) [Nanda and Lorsch, 2014] ou groupement réactif aux thiols/cystéine (maléimide) [Kim et al., 2008]) (Figure 1.12). Néanmoins, ces stratégies ne permettent qu'un marquage faiblement spécifique. Pour pallier ce manque de spécificité, des acides aminés non naturels réactifs peuvent être insérés dans la séquence de la protéine lors de sa traduction. Par exemple, l'insertion de l'acide aminé non naturel norbornène permet la fixation covalente d'un fluorophore couplé à la tétrazine par réaction bio-orthogonale (réaction rétro Diels-ALder ; chimie *click*) [Lang et al., 2012] (Figure 1.12). Des composés dits fluorogènes (fluorescents uniquement après fixation covalente) permettent également le marquage spécifique de protéines modifiées contenant une séquence spécifique à 4 cystéines (e.g. F₁ASH-EDT₂) [Griffin et al., 2000].

1.4.2 Protéines fluorescentes et cartographie spatiale de la cellule

L'utilisation de protéines fluorescentes comme marqueurs lumineux permet l'obtention de représentations graphiques (éventuellement 3D) de la cellule par microscopie de fluorescence. L'utilisation conjointe de protéines fluorescentes couvrant différentes régions du spectre visible autorise la cartographie de plusieurs protéines d'intérêt et l'étude de leurs relations spatiales (colocalisation par exemple). Les techniques de microscopie de fluorescence conventionnelle et super-résolution seront abordées en détails dans le Chapitre 3, page 57.

1.4.3 Protéines fluorescentes et cartographie physico-chimique de la cellule

La sensibilité des protéines fluorescentes à l'environnement, en particulier au pH [Campbell and Choy, 2001], à la température [Leiderman et al., 2006] et à la concentration en différents ions a largement été exploitée au cours des 30 dernières années avec le développement de capteurs de l'état physico-chimique de la cellule.

La présence d'un groupe titrable sur l'anneau ϕ du chromophore rend ses propriétés de fluorescence modulables par le pH. Il est alors possible à partir de la quantité de chromophores dans leur forme anionique fluorescente (estimée par l'intermédiaire de l'intensité de fluorescence) de mesurer le pH *in cellulo* [Kneen et al., 1998]. L'optimisations du système a conduit à la naissance de capteurs ratiométriques du pH (e.g. PHluorin, initialement utilisés afin d'étudier le rôle des protons dans la transmission synaptique [Miesenböck et al., 1998]).

19. L'effet de la fusion d'une protéine d'intérêt à une protéine fluorescente est actuellement discuté. Récemment, il a été montré que la fusion à une protéine fluorescente n'affecte que peu la localisation des protéines d'intérêt et leur assemblage [Vreja et al., 2015].

La concentration en de nombreux autres ions peut être mesurée à l'aide de protéines fluorescentes²⁰. La sensibilité naturelle des protéines fluorescentes jaunes (YFP) aux ions chlorures [Zhong et al., 2014] a été largement exploitée notamment dans les domaines des neurosciences [Arosio and Ratto, 2014].

La mesure de la concentration en ions auxquels les protéines fluorescentes ne sont pas sensibles (e.g. Ca^{2+}) a été rendu possible par le développement de constructions chimériques entre protéines fluorescentes et protéines ions-sensibles. Notamment, la construction Cameleon permet l'imagerie par fluorescence de la concentration intra-cellulaire en ions calciques [Miyawaki et al., 1997] (Figure 1.13). La distance séparant la CFP de la YFP est modulée par les changements conformationnels subit par la calmoduline suite à la fixation d'ions calciques. En absence de Ca^{2+} , les deux protéines fluorescentes sont distantes de plus de 10 nm, si bien que le transfert d'énergie par résonance est alors impossible et l'excitation de la CFP résulte en l'émission d'une lumière cyan. En présence de Ca^{2+} , les deux partenaires se rapprochent (distance inférieure à 10 nm), le FRET devient possible résultant en un changement de la longueur d'onde d'émission (jaune).

1.4.4 Protéines fluorescentes et interactions protéines-protéines

L'utilisation d'un couple de protéines fluorescentes choisies telles que le spectre d'absorption de l'une soit partiellement recouvrant avec le spectre d'émission de l'autre (voir Figure 1.14 A) permet l'étude de l'interaction protéine-protéine par FRET. En cas d'interaction, la distance entre les protéines chute en deçà de 10 nm, si bien que le transfert d'énergie par résonance entre deux protéines fluorescentes devient possible et qu'un décalage bathochrome (vers le rouge) de la lumière émise est observé à l'image de ce qui a été décrit précédemment pour les nanocapteurs [Kenworthy, 2001] (Figure 1.14 A).

Inspiré des méthodes de complémentation de la β -galactosidase scindée (*split β galactosidase*) [Rossi et al., 1997], les méthodes de complémentation de fluorescence (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) basées sur les protéines fluorescentes scindées (*split GFP*) ont vu le jour au milieu des années 2000 [Hu and Kerppola, 2003] [Magliery et al., 2005]. En marquant chaque protéine avec un fragment incomplet et donc non fluorescent d'une protéine fluorescente, il est possible d'étudier leur interaction qui se traduit par une restauration des propriétés de fluorescence (Figure 1.14 B).

1.5 Ingénierie des protéines fluorescentes

Les propriétés photophysiques des protéines fluorescentes sont finement modulables par de simples modifications (mêmes ponctuelles) de leurs séquences primaires²¹. Depuis leur découverte, les protéines fluorescentes ont été intensément mutées dans un but d'optimisation [Jones et al., 2012] [De-

20. Une large gamme de nano-capteurs cellulaires est actuellement disponible et permet de mesurer de nombreux paramètres physico-chimiques (conditions redox [Lohman and Remington, 2008], température [Donner et al., 2012], encombrement moléculaire *in cellulo* [Morikawa et al., 2016]) ainsi que la concentration en différents métabolites (oxyde nitrique [Pearce et al., 2000], AMPc [Zaccolo et al., 2000], 1,4,5-triphosphate (IP_3) [Hirose et al., 1999], maltose [Fehr et al., 2002], ATP/ADP [Berg et al., 2009]).

21. À l'heure actuelle, des protocoles standardisés d'ingénierie ont été dévoilés et promettent l'obtention de protéines fluorescentes brillantes, monomériques et photorésistantes [Ai et al., 2014].

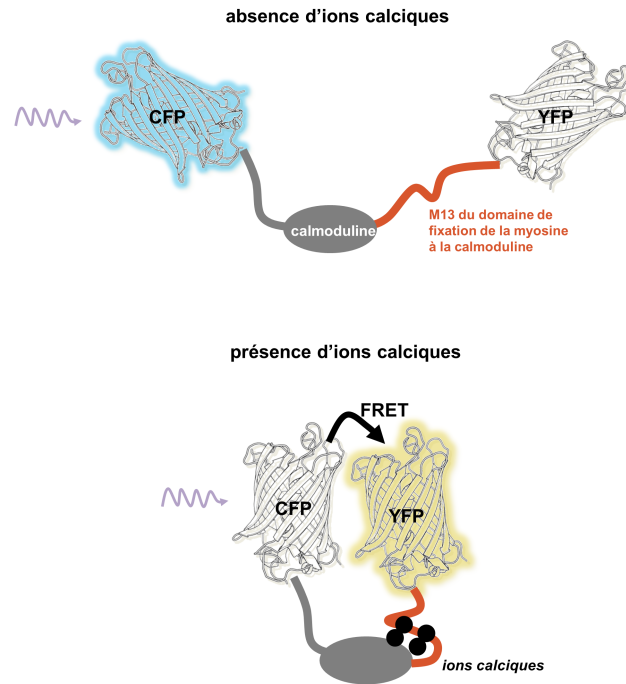


Figure 1.13 – Mesure de la concentration en ions calciques par FRET La sonde Cameleon est composée d'une CFP et d'une YFP reliée par une construction sensible aux ions calciques : calmoduline et domaine de fixation de la myosine à la calmoduline (Haut). En absence d'ions calciques, la CFP et la YFP se tiennent à une distance empêchant le transfert d'énergie par résonance entre la CFP excitée et la YFP. La lumière émise est cyan (Bas). En présence d'ions calciques, le domaine de fixation de la myosine à la calmoduline se « rabat » sur la calmoduline, la CFP et la YFP se rapprochent et sont alors séparées par une distance permettant le FRET. La lumière émise est alors jaune.

decker et al., 2013].

1.5.1 Longueur d'onde d'émission

La gamme du spectre lumineux couvert par les protéines fluorescentes s'est élargi au cours des années grâce aux travaux d'ingénierie de ces émetteurs de lumière. À partir de la GFP, des mutants émettant dans d'autres régions du spectre visible ont été développés par mutation du chromophore (bleu (mutation Tyr66His) [Yang et al., 1998] ; cyan (mutation Tyr66Trp) [Heim and Tsien, 1996]) ou de son environnement (jaune [Wachter et al., 1998]). À partir de la protéine fluorescente rouge anthozoaire DsRed, une série de protéines fluorescentes émettant du jaune (mBanana) au rouge (mTomato) et baptisée série mFruit a été développée [Shaner et al., 2004]. En parallèle, des efforts de mutagenèse ont permis de voir émerger une série de protéines fluorescentes émettant dans le rouge lointain ($\lambda_{em} > 650$ nm) (HcRed, mPlum [Wang et al., 2004], AQ143 [Gurskaya et al., 2001] [Shkrob et al., 2005], RFP639 développé à partir de eqFP611 [Kredel et al., 2008], Katushka [Shcherbo et al.,

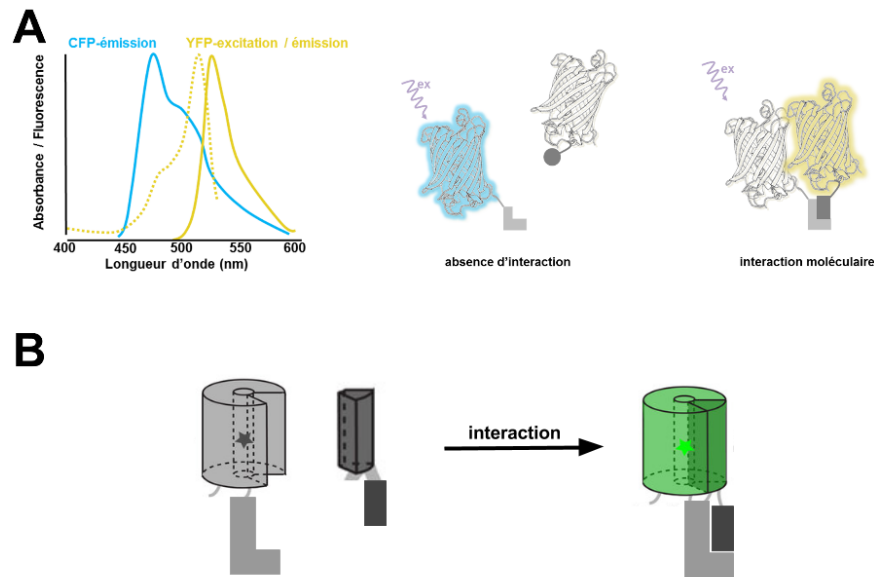


Figure 1.14 – Étude de l'interaction entre protéines par FRET et par complémentation (A). Étude de l'interaction entre deux protéines fusionnées à la CFP et la YFP. Le recouvrement du spectre d'émission de la CFP et du spectre d'absorption de la YFP permet le transfert d'énergie par résonance lorsque les deux protéines se retrouvent à une distance inférieure à 10 nm (typiquement lors de l'interaction entre les deux protéines d'intérêt qu'elles marquent) (B). Étude de l'interaction entre deux protéines fusionnées respectivement à deux fragments de la GFP non fluorescent. Lors de l'interaction des deux protéines, les deux fragments s'assemblent et forment une GFP complète qui acquiert alors des propriétés de fluorescence (complémentation de fluorescence). Modifié d'après [Jiang et al., 2016].

2007] et TagRFP 675 [Piatkevich et al., 2013a])²². Ces protéines fluorescentes émettant dans une région du spectre lumineux peu absorbée par les tissus biologiques (« fenêtre des tissus biologiques ») sont particulièrement adaptées à l'imagerie *in vivo*. À l'image des protéines fluorescentes situées à l'extrême opposé du spectre lumineux (protéine fluorescente violette, Sirius [Tomosugi et al., 2009]), la faible brillance de ces émetteurs en compromet l'utilisation (Figure 1.15).

1.5.2 Brillance

La brillance ($B = \epsilon \cdot \Phi_{fluor}$) est un paramètre clé en imagerie. Un fluorophore brillant émet de nombreux photons par unité de temps permettant la reconstruction d'une image et ce même à basse puissance d'illumination, protégeant ainsi l'échantillon des effets phototoxiques.

Les travaux de Tsien sur la GFP mettent en évidence qu'une unique mutation peut être à l'origine d'une amélioration drastique de la brillance des protéines fluorescentes [Heim et al., 1995]. La mutation ponctuelle Ser65Thr est à l'origine d'une amélioration d'un facteur 5 de la brillance sous excitation à 488 nm par rapport à avGFP. En modifiant le réseau de liaisons hydrogènes à proximité du chro-

²². On notera l'existence de protéines fluorescentes non homologues à celles décrites jusqu'alors et émettant dans la gamme rouge lointain du spectre visible notamment l'iRFP [Filonov et al., 2011] et l'IFP2.0 (*infrared fluorescent protein*) [Yu et al., 2014] dérivées du phytochrome bactérien.

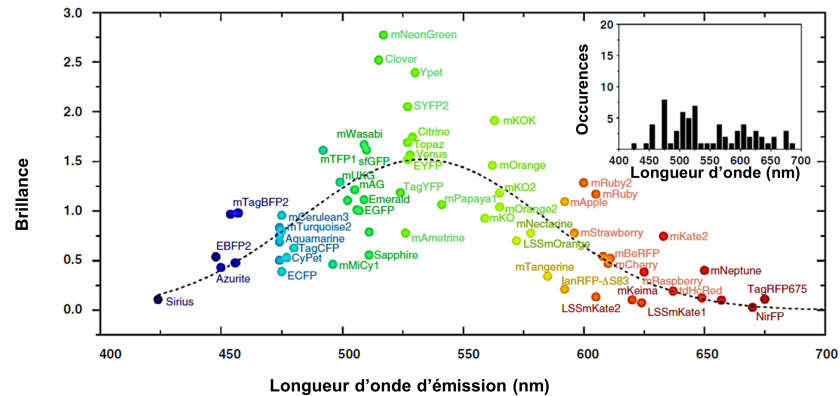


Figure 1.15 – Diagramme des brillances des protéines fluorescentes en fonction de la longueur d'onde d'émission. La brillance est exprimée relativement à celle de l'EGFP (brillance= 1). En insert est représenté l'histogramme de distribution des protéines fluorescentes en fonction de leur longueur d'onde d'émission (option de case : 15 nm).

mophore, cette mutation stabilise la forme anionique fluorescente par rapport à la forme neutre non fluorescente majeure chez l'avGFP. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) à 488 nm est alors significativement augmenté à l'origine de l'augmentation de la brillance.

De manière plus générale, la brillance de nombreuses autres protéines fluorescentes peut être significativement augmentée par stabilisation de la forme anionique du chromophore c'est-à-dire par une diminution de son $pK_{a,app}$.

En parallèle, la brillance peut être améliorée par augmentation du rendement quantique, c'est-à-dire en limitant la désexcitation par voie non radiative. Cette stratégie a particulièrement été mise en œuvre pour le développement de mutants fortement brillants de la série des protéines fluorescentes cyans (CFP) [Goedhart et al., 2012].

1.5.3 Repliement et maturation du chromophore

La brillance effective ($= B \cdot \eta$, avec η la quantité de protéines fluorescentes fonctionnelles *i.e.* correctement repliée et à chromophore mature) est également un paramètre clé en microscopie d'ensemble. L'intensité de fluorescence émise sera d'autant plus forte que le nombre d'émetteurs est important *in cellulo*. Un meilleur repliement de la protéine et une meilleure maturation du chromophore contribuent à une augmentation du signal global de fluorescence et à l'amélioration des images. Le mutant GFP^{Ser65T^{hr}} développé par le groupe de Tsien présente une maturation plus rapide du chromophore [Heim et al., 1995]. Le mutant GFP^{Ser65T^{hr}/Phe64Leu} (baptisé EGFP) voit son efficacité de repliement et de maturation significativement améliorée à 37 °C. L'optimisation s'est poursuivie avec l'apparition des mutants Emerald et superfolder GFP [Pédelacq et al., 2006] mettant en évidence comment les cycles successifs de mutagenèse permettent l'optimisation de la brillance effective.

1.5.4 Oligomérisation

Marquer une protéine d'intérêt par fusion à une protéine fluorescente peut être à l'origine de nombreux artefacts notamment si cette dernière présente une tendance forte à oligomériser (détails à la section 1.4.1, page 18 *sqq.*). Une représentation graphique fidèle de la réalité cellulaire requiert alors l'utilisation précautionneuse de protéines fluorescentes hautement monomériques.

Grâce aux structures cristallographiques, des efforts importants ont pu être menés afin de rompre l'interface entre monomères ayant tendance à oligomériser. Ces stratégies ont été particulièrement appliquées aux protéines fluorescentes anthozoaires généralement tétramériques (*e.g.* DsRed → mRFP1 [Campbell et al., 2002]). L'obtention de versions monomériques des protéines fluorescentes anthozoaires reste cependant une tâche particulièrement complexe.

La fusion d'une protéine fluorescente oligomérique à la protéine membranaire du réticulum endoplasmique lisse (CytERM) entraîne son regroupement en clusters à la surface des saccules qui prennent alors la forme remarquable d'un réseau tubulaire appelé spires organisées (*organized smooth endoplasmic reticulum*, OSER) [Snapp et al., 2003]. Cette modification morphologique du RE sert de base à une méthode diagnostique de l'état d'oligomérisation des protéines fluorescentes exprimées en fusion dans un contexte cellulaire (test OSER). Un score est attribué à chaque protéine fluorescente en fonction de la fraction de cellules présentant un phénotype en spires organisées de réticulum endoplasmique [Costantini et al., 2012]. Cette méthode permet d'appréhender la tendance des monomères de protéines fluorescentes à interagir entre eux directement dans le contexte dans lequel ils seront plus tard exprimés à la différence des méthodes d'ultracentrifugation analytique par exemple qui révèle l'oligomérisation *in vitro*.

Plus récemment, une nouvelle méthode diagnostique de l'oligomérisation des protéines fluorescentes en contexte cellulaire bactérien a été développée par Landgraf *et al.*. La fusion d'une protéine fluorescente à tendance marquée à oligomériser à la protéase bactérienne ClpP est à l'origine d'une agrégation de cette dernière qui forme alors un point unique fluorescent dans le cytoplasme de la bactérie (« phénotype en point ») [Landgraf et al., 2012].

Les nouvelles stratégies de marquage par chimie *click* (page 20) permettent de s'affranchir des problèmes d'oligomérisation et s'imposent comme des stratégies d'avenir. En parallèle, des méthodes ont été proposées afin de limiter les artefacts induits par l'oligomérisation des protéines fluorescentes [Bullina et al., 2003].

Le développement de mutants monomériques même à concentration élevée telle qu'observée dans les environnements cellulaires denses est un des défis futurs de l'ingénierie des protéines fluorescentes.

Dans ce Chapitre, nous avons mis en évidence le potentiel des protéines fluorescentes et l'importance de leur optimisation par ingénierie. Dans le Chapitre suivant, nous allons nous intéresser à la dynamique de ces protéines et notamment aux modifications chimiques et structurales induites par la lumière et à l'origine de modifications de leurs propriétés de fluorescence.

Phototransformations et protéines fluorescentes photomodulables

Lors de l'observation d'une protéine fluorescente en microscopie, le chromophore excité suite à l'absorption de lumière dissipe son énergie excédentaire non seulement par voie radiative (émission de photons collectés pour la construction de l'image) mais également par des voies non radiatives compétitives (conversion interne, croisement intersystème et phototransformations). Nous nous intéresserons dans ce Chapitre aux voies de désexcitation par phototransformation.

On appelle phototransformations les modifications (chimiques et/ou structurales) induites par la lumière affectant (réversiblement ou irréversiblement) les protéines fluorescentes (chromophore et/ou squelette protéique) et engendrant des modifications de leurs propriétés spectrales¹. Globalement, les phototransformations réduisent la brillance du fluorophore en entrant en compétition avec la voie radiative de désexcitation. Néanmoins, ces voies non radiatives particulières peuvent être habilement exploitées afin de développer des outils biotechnologiques puissants.

Une classe de protéines fluorescentes se distingue des protéines fluorescentes conventionnelles par leur remarquable capacité à moduler leurs propriétés spectrales suite à illumination. Ces protéines fluorescentes appelées protéines fluorescentes photomodulables (PMFPs) ont une forte propension à utiliser les voies non radiatives de désexcitation par phototransformation. Les PMFP regroupent les protéines fluorescentes photo-activables (PAFPs, page 33), les protéines fluorescentes photocommutables (RSFPs, page 37) et les protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs, page 44).

2.1 Photoblanchiment

Définition

Le photoblanchiment se manifeste à l'échelle d'ensemble par une **décroissance irréversible de l'intensité de fluorescence** émise par un échantillon de fluorophores² sous illumination (Figure 2.1). En conséquence, la qualité des images collectées décroît au cours du temps [Bernas et al., 2005]. Ce

1. Pris en compte le fait que toutes les protéines fluorescentes subissent des phototransformations, nous exclurons l'utilisation confuse du terme « protéines fluorescentes phototransformables ».

2. Tous les fluorophores (protéines fluorescentes et fluorophores organiques) photoblanchissent.

phénomène s'explique à l'échelle moléculaire par un ensemble de réactions photochimiques modifiant irréversiblement la structure du fluorophore qui n'est alors plus capable d'émettre de lumière. Le photoblanchiment peut être compris comme une « consommation » des fluorophores à mesure qu'ils sont observés. Le photoblanchiment complique alors l'étude d'événements biologiques dynamiques lents : une fois le fluorophore éteint l'expérience est terminée. Les fluorophores hautement photorésistants sont donc convoités.

À l'échelle de la molécule unique, le photoblanchiment se manifeste par un raccourcissement de la fenêtre temporelle pendant laquelle un signal lumineux est émis par le fluorophore. Le photoblanchiment peut être tel que le nombre de photons émis par le fluorophore pendant son temps de vie est insuffisant pour permettre sa localisation.

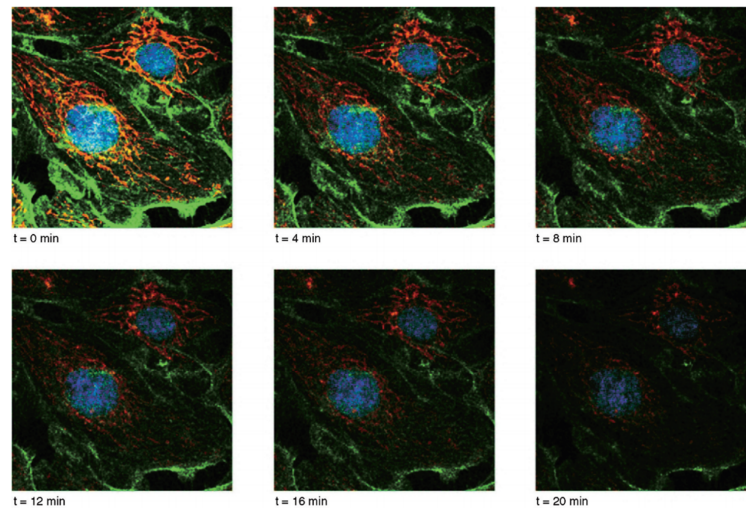


Figure 2.1 – Manifestation du photoblanchiment à l'échelle d'ensemble Diminution de l'intensité de fluorescence au cours du temps d'un échantillon de cellules endothéliales d'artères pulmonaires de bœuf marquées au DAPI (bleu), MitoTracker Red CMXRos (rouge) et BODIPY-FL phalloïdine (vert). Images collectées par Paolo Bianchini de l'Université de Gênes. Reproduit d'après [Pawley, 2006].

Mécanismes du photoblanchiment

Les mécanismes à l'origine du photoblanchiment sont encore aujourd'hui largement discutés. Paradoxalement, alors que la naissance d'une nouvelle protéine fluorescente est le plus souvent accompagnée d'une caractérisation de sa cinétique de photoblanchiment, peu d'études ont été menées ces dernières 30 années sur les mécanismes sous-jacents et sur la nature des états photoblanchis, si bien que l'ingénierie de protéines fluorescentes hautement photorésistantes repose en général sur des approches empiriques.

Les approches théoriques [Roy et al., 2011] [Regmi et al., 2013] et expérimentales [Greenbaum et al., 2000] [Jiménez-Banzo et al., 2008] [Duan et al., 2013] du photoblanchiment des protéines fluorescentes offrent aujourd'hui un panorama plutôt hétérogène du point de vue mécanistique. Notamment,

l'effet de l'oxygène moléculaire sur la photorésistance des protéines fluorescentes est controversé. Il a été rapporté que la photodestruction des protéines fluorescentes est peu sensible à la présence de d'oxygène moléculaire dans l'environnement à la différence des fluorophores organiques comme l'iodure de propidium [Bernas et al., 2004]. Cette observation fait écho à la protection du chromophore des protéines fluorescentes au sein de la cage protéique qu'est le tonneau β . Alors qu'un fluorophore organique est en interaction directe avec son environnement, le chromophore en est partiellement isolé et d'autres mécanismes n'impliquant pas de réactifs externes au tonneau β pourraient être impliqués dans la photodestruction du chromophore.

D'autres études révèlent au contraire que la durée de vie des protéines fluorescentes est dépendante de la concentration en oxygène moléculaire : en condition anaérobie, le photoblanchiment est significativement réduit [Bernas et al., 2004]. Il a été suggéré que l'oxygène moléculaire en réagissant avec l'état triplet de long temps de vie (ms) forme de l'oxygène singulet radicalaire induisant en cascade des transformations chimiques irréversibles à l'origine du photoblanchiment [Greenbaum et al., 2000] [Jiménez-Banzo et al., 2008]. En particulier, il a été montré récemment au sein du laboratoire que, chez la protéine fluorescente anthozoaire IrisFP, l'oxygène radicalaire généré par la réaction de l'état triplet avec l'oxygène moléculaire est à l'origine du photoblanchiment par oxydation de la méthionine 159 et de la cystéine 171 dans des conditions modérée d'excitation lumineuse (Figure 2.2 C) [Duan et al., 2013].

Au contraire, à forte intensité d'excitation, le photoblanchiment résulte d'une décarboxylation du glutamate 212 (strictement conservé au sein des protéines fluorescentes) par des mécanismes redox impliquant un transfert d'électrons (Figure 2.2 B). Dans ce cas, l'état photoblanchi présente un chromophore non plan doublement réduit. Les acides aminés à proximité du chromophore (en particulier l'His194 et l'Arg66) voient leur conformation modifiée. La photostabilité des protéines fluorescentes est donc non seulement affectée par la présence d'oxygène moléculaire dans l'environnement mais également par la présence de composés à activité redox [Bogdanov et al., 2009a] [Malkani and Schmid, 2011]. Notamment, l'utilisation de DABCO s'avère efficace pour augmenter la photorésistance de la protéine fluorescente Dendra2 couramment utilisée en microscopie super-résolution [Avilov et al., 2014].

L'importance des transferts d'électrons lors du photoblanchiment des protéines fluorescentes est corroboré par les résultats publiés cette année par le groupe de Lukyanov [Bogdanov et al., 2016]. Leurs observations suggèrent que le photoblanchiment des protéines fluorescence EGFP et EYFP est conséquent au transfert d'électron entre le chromophore et la tyrosine 145 comme en témoigne l'augmentation d'un facteur 80 de la photostabilité du mutant ponctuel EGFP-Tyr145Leu par rapport à son parent EGFP.

Enfin, de manière générale, il a été rapporté que la vitesse de photoblanchiment des protéines fluorescentes en fonction de la puissance d'illumination varie de manière supra-linéaire [Cranfill et al., 2016] [Chen et al., 2002]. Malgré la zone d'ombre concernant les mécanismes sous-jacents, il peut être proposé que la bi-modalité du photoblanchiment en fonction de la puissance d'excitation (observée chez la protéine fluorescente IrisFP) pourrait être un comportement général des protéines fluorescentes et expliquer alors cette dépendance aux conditions d'illumination. D'autre part, des mécanismes à deux photons pourraient également expliquer un tel phénomène comme décrit pour les fluorophores organiques [Patterson and Piston, 2000].

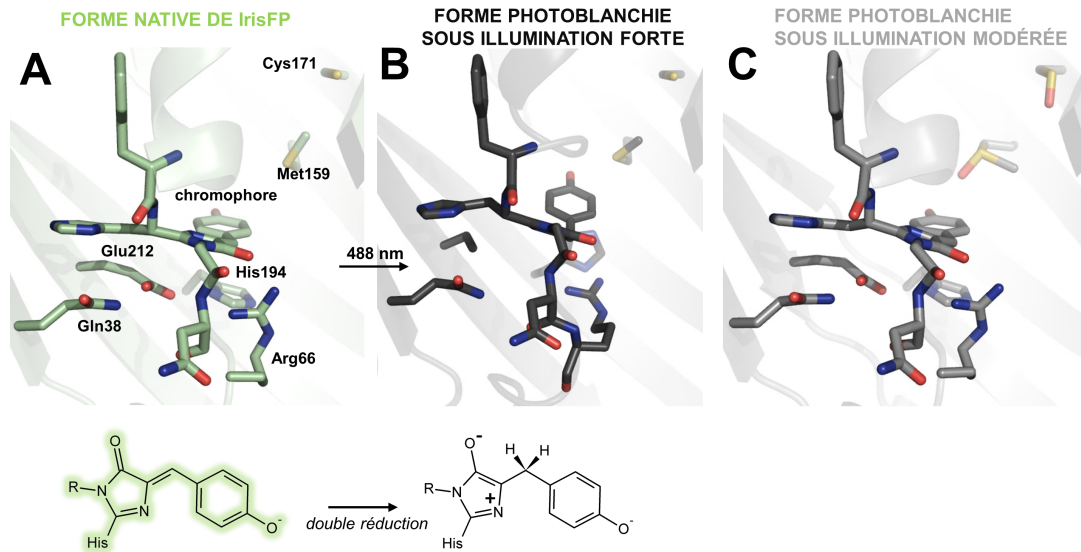


Figure 2.2 – Mécanismes de photoblanchiment de la protéine fluorescente anthozoaire IrisFP (A). Structure de la cavité du chromophore d'IrisFP dans son état *cis* vert fluorescent (code PDB : 2VVH) (B). Structure de la cavité du chromophore d'IrisFP photoblanchie sous forte intensité d'excitation (code PDB : 4LJB). Remarquer la décarboxylation du glutamate 212 ainsi que le changement de conformation de l'Arg66 et de l'His194 couplé à une perte de planéité du chromophore (C). Structure de la cavité du chromophore d'IrisFP photoblanchie sous faible intensité d'excitation (code PDB : 4LJD). Remarquer l'oxydation de la cystéine 171 et de la méthionine 159.

Exploitation du photoblanchiment

La destruction photo-induite des protéines fluorescentes est exploitée afin d'étudier la dynamique des protéines en cellules vivantes (retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP ; *fluorescence recovery after photobleaching*)) [Axelrod et al., 1976]. La photodestruction irréversible localisée des fluorophores permet le découpage de la population initiale en deux sous-ensembles : un photoblanchi et l'autre -non exposé à la lumière- fluorescent (Figure 2.3). La redistribution de la population globale est observée au sein de la région exposée à la lumière. L'échange entre les deux populations est à l'origine d'une augmentation de l'intensité de fluorescence. La mesure d'un coefficient de diffusion latérale à partir des courbes cinétiques de recouvrement de fluorescence permet l'étude de la dynamique spatiale de la protéine d'intérêt. La mobilité des protéines au sein d'un compartiment cellulaire, entre compartiments ou entre cellules peut alors être étudiée [Phair and Misteli, 2001] [Lippincott-Schwartz et al., 2003].

La méthode de perte de fluorescence induite par photoblanchiment (FLIP, *fluorescence loss in photobleaching*) peut également être utilisée aux mêmes fins [Cole et al., 1996].

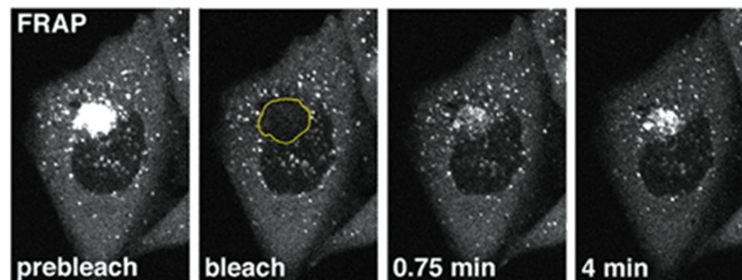


Figure 2.3 – Expérience de suivi de la dynamique en cellule vivante par FRAP. Expérience de FRAP sur la protéine ϵ COP1 (protéine de revêtement des vésicules cis-golgiennes) exprimée en fusion avec la GFP. La région encerclée de jaune correspond à la région photoblanchie. Reproduit de [Presley et al., 2002]

2.2 Photoactivation et protéines photo-activables (PAFPs)

Définition

La photoactivation se manifeste à l'échelle d'ensemble par une **augmentation de l'intensité de fluorescence** émise par un échantillon de fluorophores photo-activables sous illumination par une lumière actinique (généralement violette, voir Table 2.1). Dans leur forme native les PAFPs résident dans un état sombre non fluorescent et passent sous illumination dans un état fluorescent.

À l'échelle moléculaire, l'acquisition des propriétés de fluorescence s'explique par une modification du chromophore et/ou de son environnement à l'origine d'une augmentation du rendement quantique de fluorescence Φ_{fluor} (e.g. 0.13 à 0.79 chez la PAGFP [Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002]) et de l'absorptivité molaire ϵ à la longueur d'onde d'excitation de la forme activée. On définit alors un contraste de photo-activation $C_{PA} = \frac{\epsilon^{post} \cdot \Phi_{fluor}^{post}}{\epsilon^{ant} \cdot \Phi_{fluor}^{ant}}$.

Protéines fluorescentes photo-activables

Le large choix de protéines fluorescentes photo-activables (PAFPs) disponibles aujourd'hui suite aux efforts d'ingénierie menés ces dernières années constitue une boîte à outils de prédilection pour répondre à de nombreuses questions biologiques (Table 2.1). Les efforts d'optimisation ont particulièrement porté sur la réduction de la tendance à oligomériser (versions monomériques), sur l'amélioration du contraste et sur la diversité de couleur d'émission (vert, rouge et infra-rouge).

Mécanismes de photo-activation

Les mécanismes de photo-activation ont été intensément étudiés chez la protéine photo-activable verte PAGFP [Henderson et al., 2009] et rouge PAmCherry [Subach et al., 2009a]. Chez ces deux

PAFPs, la photo-activation consiste en une photoréaction de type Kolbe aboutissant à une décarboxylation du glutamate 212 (Figure 2.4). Chez PAMCherry, la transition entre la forme native non fluorescente et la forme fluorescente est le résultat d'une oxydation conduisant à la formation par oxydation d'une liaison double supplémentaire. Cette liaison permet d'étendre le réseau de liaisons doubles conjuguées à l'origine d'un chromophore rouge. Chez PAGFP, la décarboxylation du Glu212 est à l'origine d'un changement d'état de protonation du chromophore expliquant l'entrée dans un état fluorescent. Ce mécanisme est identique à celui observé plus tôt chez l'avGFP [van Thor et al., 2002]. Les mécanismes de photo-activation chez deux PAFPs récemment développées (PATagRFP (rouge) [Subach et al., 2010a] et PAMKAté (rouge lointain) [Gunewardene et al., 2011]) sont eux encore mal compris. L'absorption de deux photons consécutifs ainsi que la présence d'oxygène moléculaire semble être nécessaire à la photo-activation de PATagRFP.

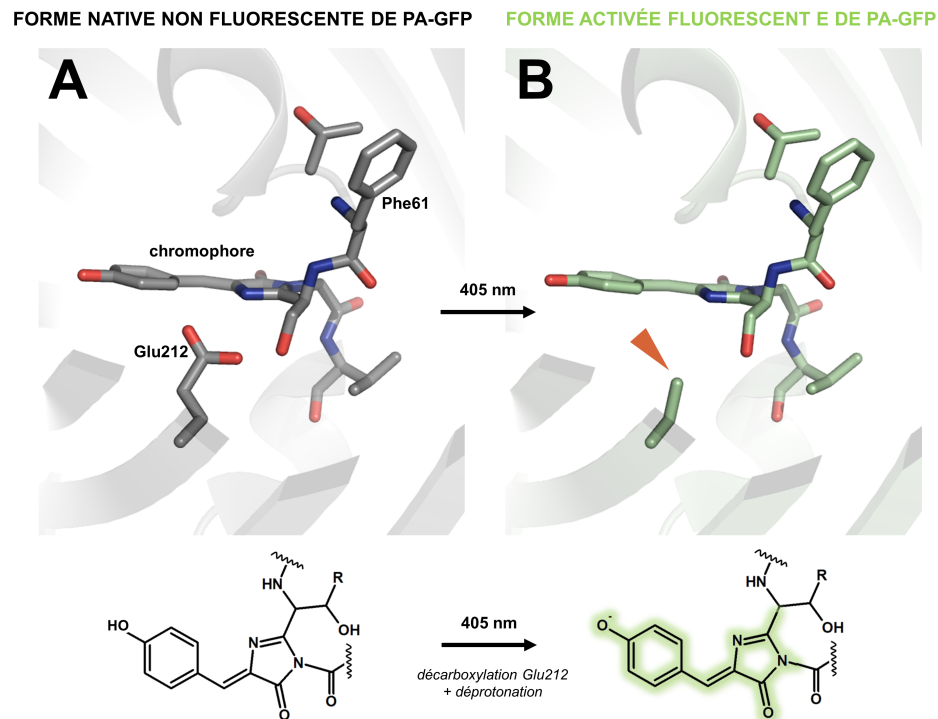


Figure 2.4 – Mécanismes de photoactivation de la protéine fluorescente photoactivable PAGFP (A). Structure de la PAGFP dans son état natif non fluorescent (code PDB : 3GJ1) (B). Structure de la PAGFP dans son état photo-activé après illumination sous lumière proche UV (code PDB : 3GJ2). Remarquer la décarboxylation du Glu212 résultant d'une photoréaction de type Kolbe et le changement d'état de protonation du chromophore.

Exploitation de la photo-activation

La photo-activation peut être exploitée pour suivre au cours du temps les protéines d'intérêt marquées au sein de la cellule (Figure 2.5). Une illumination localisée permet de photo-activer une fraction

de la population alors observable et pistable. Néanmoins, le photoblanchiment affecte la capacité à pister la protéine photo-activée sur des échelles de temps longues.

Les propriétés de phototransformations des PAFPs sont également exploitées en microscopie de super-résolution. Nous étudierons dans le Chapitre suivant (page 57) comment les PAFPs sont utilisées afin de contourner la limite en résolution imposée par la diffraction de la lumière.

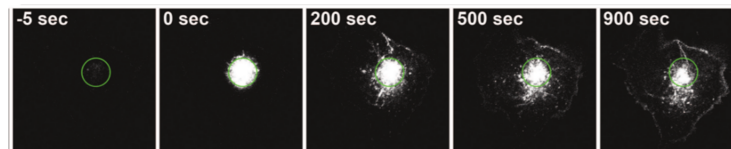


Figure 2.5 – Étude de la dynamique des protéines après photo-activation La protéine membranaire FGFR-4 fusionnée à la PAGFP est localement photo-activée par une illumination violette. Sa diffusion latérale au cours du temps au sein de la cellule peut être alors suivie par microscopie de fluorescence. D'après [Haugsten et al., 2014].

Table 2.1 – Protéines fluorescentes photo-activables caractérisées à la mi-mars 2016

Protéine (oligomérisation)	Protéine mère [sauvage]	Organisme d'origine	Chromophore	$\lambda_{ex/em}$	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϕ_{fluor}	Brillance	pK _{a,app}	Φ_{act} [<i>contraste</i>]	Lumière actinique (nm)	Réf.
PA- GFP	EGFP [GFP]	<i>Æquora victoria</i>	SYG	504 / 517	17,400	0.79	41%	N.C.	[100]	405	[Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002]
PA- TagRFP (M)	TagRFP [eqFP578]	<i>Entacmaea quadricolor</i>	MYG	562 / 595	66,000	0.38	75%	5.3	[540]	405	[Subach et al., 2010a]
PAmRFP1-1 (M)	mRFP [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	578 / 605	10,000	0.08	2.40%	4.4	N.C.	375-385	[Verkhusha and Sorkin, 2005]
PAmRFP1-2 (M)	mRFP [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	578 / 605	N.C.	0.07	N.C.	N.C.	N.C.	375-385	[Verkhusha and Sorkin, 2005]
PAmRFP1-3 (M)	mRFP [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	578 / 605	N.C.	0.06	N.C.	N.C.	N.C.	375-385	[Verkhusha and Sorkin, 2005]
PAmCherry1 (M)	mCherry [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	564 / 595	18,000	0.46	25%	6.3	[4000]	405	[Subach et al., 2009b]
PAmCherry2 (M)	mCherry [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	570 / 596	24,000	0.53	38%	6.2	[5000]	405	[Subach et al., 2009b]
PAmCherry3 (M)	mCherry [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	QYG	570 / 596	21,000	0.24	15%	6.2	[3000]	405	[Subach et al., 2009b]
PAmKate (M)	mKate/ TagFP635[TagRFP]	<i>Entacmaea quadricolor</i>	MYG	586 / 628	25,000	0.18	13%	5.6	[100]	405	[Gunewardene et al., 2011]
PAiRFP1	AtPCD [AtBphP2]	<i>Agrobacterium tumefaciens C58</i>	biliverdine	690 / 717	67,100	0.048	9.60%	5.2	[9.0]	660	[Piatkevich et al., 2013b]
PAiRFP2	AtPCD [AtBphP2]	<i>A. tumefaciens C58</i>	biliverdine	692 / 719	63,600	0.047	8.90%	5.4	[5.9]	660	[Piatkevich et al., 2013b]

2.3 Photocommutation et protéines photocommutables (RSFPs)

Définition

La photocommutation se manifeste à l'échelle d'ensemble par une **variation réversible de l'intensité de fluorescence** émise par un échantillon de fluorophores sous illumination. À l'échelle moléculaire, la photocommutation est la conséquence d'une transition réversible entre un état fluorescent dit état *on* et un état sombre non fluorescent dit état *off*. En général, la brillance de la forme *off* tend à être nulle, d'une part à cause d'une faible absorptivité molaire à la longueur d'excitation de la forme *on* et d'autre part à cause d'un rendement quantique de fluorescence médiocre. À l'obscurité, ces états *off* ont un temps de vie de plusieurs heures. Le lent retour thermique de la forme sombre vers la forme fluorescente témoigne de son importante stabilité (notion de bistabilité). Sous illumination par une longueur d'onde appropriée, le temps de vie de l'état *off* est sensiblement réduit (ms à s). Le contraste de photocommutation (défini comme le rapport entre l'intensité de fluorescence avant photocommutation et l'intensité à l'équilibre entre forme *off* et *on*) est en général fort. Lors de la commutation *on* \rightarrow *off*, l'état *off* retourne peu vers l'état *on*, d'une part à cause du retour thermique *off* \rightarrow *on* lent et, d'autre part, à cause de sa faible absorptivité molaire à la longueur d'onde responsable de la commutation *on* \rightarrow *off*. Le contraste de photocommutation des RSFPs est en général tel que ces fluorophores remarquables sont exploitables en microscopie de super-résolution (e.g. dSTORM).

Protéines fluorescentes photocommutables (RSFPs)

Grâce aux efforts d'ingénierie des dernières décennies, une large gamme de protéines fluorescentes photocommutables (RSFP) est aujourd'hui disponible pour de nombreuses applications biologiques (Table 2.2).

Table 2.2 – Protéines fluorescentes photocommutables caractérisées à la mi-mars 2016

Protéine (oligomérisation)	Protéine mère [sauvage]	Organisme source	Chromophore	$\lambda_{ex/em}$ (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_{fluor}	Brillance	pK _a	$\Phi_{commutation}$		Lumière actinique (nm)		Ref.
									on-off	off-on	on-off	off-on	
RSFPs négatives													
mTFP0.7 (M)	cFP484	<i>Clavularia sp.</i>	AYG	453 / 488	60,000	0.5	89%	4	N.C.	N.C.	458	405	[Henderson et al., 2007]
Dronpa (M)	22G	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	503 / 517	94,100	0.67	188%	5.3	3.0×10^{-4}	7.0×10^{-1}	488	405	[Ando et al., 2004]
Dronpa-2 (M)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	489 / 515	56,000	0.28	47%	N.C.	4.7×10^{-2}	N.C.	488	405	[Ando et al., 2007]
Dronpa-3 (M)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	489 / 515	58,000	0.33	57%	N.C.	5.3×10^{-3}	N.C.	488	405	[Ando et al., 2007]
rsFastLime (M)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	496 / 518	39,094	0.77	89%	N.C.	N.C.	N.C.	488	405	[Stiel et al., 2007]
bsDronpa (M)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	460 / 504	45,000	0.5	67%	N.C.	N.C.	N.C.	488	405	[Stiel et al., 2007]
rsCherryRev (M)	mCherry [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	MYG	572 / 608	84,000	0.005	1%	5.5	N.C.	N.C.	550	450	[Stiel et al., 2008]
rsTagRFP (M)	TagRFP [eqFP578]	<i>E. quadricolor</i>	MYG	567 / 585	36,800	0.11	12%	6.6	N.C.	N.C.	570	445	[Subach et al., 2010c]
mEosFP M159A (M/D)	mEosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	487 / 512	98,600	0.52	153%	4.3	2.6×10^{-3}	1.5×10^{-1}	488	405	[Adam et al., 2011]
mGeos-C (M/D)	mEos2 [mEosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505 / 516	76,967	0.81	186%	6	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
mGeos-E (M/D)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	501 / 513	69,630	0.75	156%	6-6.5	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
mGeos-F (M/D)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	504 / 515	53,135	0.85	135%	5	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
mGeos-L (M/D)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	501 / 513	53,448	0.72	115%	5-5.5	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
mGeos-M (M/D)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	503 / 514	51,609	0.85	131%	4.5-5.0	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
mGeos-S (M/D)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	501 / 512	64,602	0.76	146%	5.0-5.5	N.C.	N.C.	488	405	[Wang et al., 2014b]
Mut2Q (M)	GFP	<i>A. victoria</i>	AYG	496 / 507	54,000	0.28	45%	6	4.7×10^{-3}	2.6×10^{-2}	478	405	[Abbruzzetti et al., 2005]
EYQ1 (M)	EYFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	SYG	510 / 524	73,000	0.72	156%	6.9	1.8×10^{-4}	6.0×10^{-2}	514	405	[Bizzarri et al., 2010]
rsEGFP (M)	EGFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	TYG	493 / 510	47,000	0.36	50%	6.5	N.C.	N.C.	488	405	[Grotjohann et al., 2011]
rsEGFP2 (M)	EGFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	TYG	478 / 503	61,000	0.3	54%	N.C.	N.C.	N.C.	488	405	[Grotjohann et al., 2012]
rsFolder (M)	rsEGFP2-Superfolder-GFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	TYG	477 / 503	51,600	0.25	54%	5.5	2.1×10^2	0.44	488	405	[El Khatib et al., 2016]
rsFolder2 (M)	rsEGFP2-Superfolder-GFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	TYG	478 / 503	44,000	0.23	54%	5.5	1.98×10^2	0.28	488	405	[El Khatib et al., 2016]
rsGreen1 (M)	rsEGFP-Superfolder-GFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	TYG	486/509	61,000	0.42	77%	5.9	4.2×10^3	0.14	488	405	[Duwé et al., 2015]
RSFPs positives													
Padron (M)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	CYG	503 / 522	43,000	0.64	82%	N.C.	N.C.	N.C.	405	488	[Stiel et al., 2007]
rsCherry (M)	mCherry [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	MYG	572 / 610	80,000	0.02	5%	6	N.C.	N.C.	450	550	[Stiel et al., 2008]
asFP595 (T)	-	<i>A. sulcata</i>	MYG	572 / 595	56,200	<0.001	<0.2%	N.C.	N.C.	N.C.	450	568	[Lukyanov et al., 2000]
KFP1 (T)	asFP595	<i>A. sulcata</i>	MYG	590 / 600	59,000	0.07	12%	N.C.	N.C.	N.C.	458	532	[Chudakov et al., 2003]
RSFP découpée													
Dreiklang (M)	Citrine [GFP]	<i>A. victoria</i>	GYG	511 / 529	83,000	0.41	101%	7.2	N.C.	N.C.	405	365	[Brakemann et al., 2011]

Mécanismes de la photocommutation

La photocommutation consiste en une isomérisation *cis* – *trans* du chromophore induite par la lumière³ et est couplée à une modification de l'état de protonation du chromophore. Dans son état *off*, l'anneau ϕ du chromophore des RSFPs est systématiquement protoné et sa conformation *cis* ou *trans* selon la protéine⁴.

Classiquement, on distingue deux classes de RSFP à mécanisme d'isomérisation du chromophore : les RSFPs positives et négatives (pour revue voir [Bourgeois and Adam, 2012]). Les RSFPs positives (e.g. Padron) sont commutées *off* \rightarrow *on* par la lumière d'excitation (lumière absorbée par la forme fluorescente ; dans le cas de Padron la lumière cyan). Au contraire, les RSFPs négatives (e.g. Dronpa) sont commutées *on* \rightarrow *off* par la lumière d'excitation.

La stabilisation du chromophore de la forme *off* des RSFPs par des interactions non covalentes avec son environnement proche lui confère une forte stabilité thermique. De plus, l'isomérisation du chromophore est accommodée par de notables mouvements du tonneau β [Mizuno et al., 2008].

En 2014, une série de RSFPs présentant de bon contraste de photocommutation (mGeos) a été ingénierée à partir de la protéine fluorescente photoconvertible mEos2 [Wang et al., 2014b]. Les deux dernières années ont vu naître de nouvelles RSFPs optimisées notamment pour l'exploration de compartiments cellulaires oxydants (périplasma bactérien) (rsGreens [Duwé et al., 2015] ; rsFolder 1 et 2 développées au sein du laboratoire [El Khatib et al., 2016]) et pour une utilisation en microscopie de super-résolution (SOFI) (Skylan-S [Zhang et al., 2015]).

Exploitation des propriétés de photocommutation

La flexibilité du tonneau β au cours de la photocommutation rend cette phototransformation particulièrement sensible à la viscosité de son environnement. Cette propriété est exploitée afin de mesurer les propriétés micro-rhéologiques de la cellule [Kao et al., 2012]. Les déformations du tonneau β lors de la photocommutation ont également été exploitées à des fins de contrôle génétique induit par la lumière (optogénétique) [Zhou et al., 2012].

D'autre part, la capacité des RSFPs à s'échanger entre deux états optiquement distinguables et ce de manière réversible sur de nombreux cycles a permis le développement de nouveaux moyens élégants de stockage d'information [Adam et al., 2010]. Les transitions répétées *on* \rightleftharpoons *off* sont également exploitées pour l'étude structurale de la cellule avec une précision nanométrique (voir Chapitre 3, page 57).

Enfin, les RSFPs sont utilisées pour l'étude de l'interaction entre protéines via des techniques améliorées de FRET : FRET photochromique (pcFRET) [Giordano et al., 2002] [Subach et al., 2010b].

3. La classe de RSFP découplées représentée par Dreiklang passant d'un état fluorescent à un état sombre indépendamment de l'illumination ne dépend pas d'une isomérisation du chromophore. Les transitions *on* \rightleftharpoons *off* sont le résultat de réactions d'hydratation/déshydratation du chromophore [Brakemann et al., 2011].

4. Généralement, le chromophore de la forme *off* des RSFPs adopte une conformation *trans* à l'exception d'asFP595 et son variant KFP1 pour lesquelles le chromophore adopte une conformation *cis*.

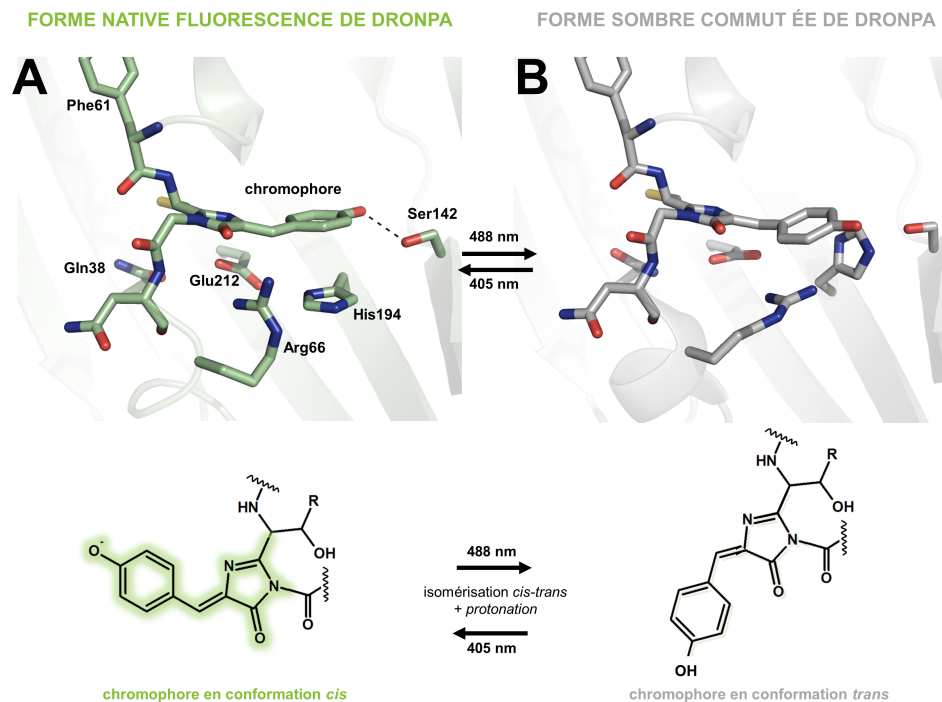


Figure 2.6 – Mécanisme de photocommutation de la RSFP anthozoaire Dronpa (A). Structure de la forme native fluorescente de la RSFP Dronpa (code PDB : 2Z1O) (B). Structure de la forme sombre photocommutée sous illumination 488 nm de la RSFP Dronpa (code PDB : 2POX). Remarquer l’isomérisation du chromophore couplée à une protonation de l’hydroxybenzyle, la rupture de la liaison hydrogène entre l’anneau ϕ et la sérine 142 et changements conformationnels de l’Arg66 et l’His194.

2.4 Scintillement (blinking)

Définition

Le scintillement (en anglais *blinking*) se manifeste à l’échelle de la molécule unique par une **fluorescence intermittente** au cours du temps sous illumination (Figure 2.7). Le phénomène de scintillement a été rapporté pour la première fois en 1997 par Dickson *et al.* sur la YFP [Dickson *et al.*, 1997]. Le caractère intermittent de l’émission de fluorescence s’explique à l’échelle moléculaire par des transitions réversibles et répétées de la protéine entre un état fluorescent (dit *on*) et un (ou des) état(s) sombre(s) (dit(s) état(s) *off*)(Figure 2.7). Historiquement, le terme « scintillement » a été utilisé pour décrire un phénomène de photocommutation $on \rightleftharpoons off$ réversible observable uniquement à l’échelle de la molécule unique. En effet, à la différence de la photocommutation, il est impossible⁵ de peupler les états sombres de manière suffisante à affecter le signal de fluorescence à l’échelle d’ensemble. En d’autres termes, le contraste de scintillement est médiocre : les états *off* peuplés par scintillement ont

5. À l’exception du scintillement lent ; voir plus bas dans le paragraphe.

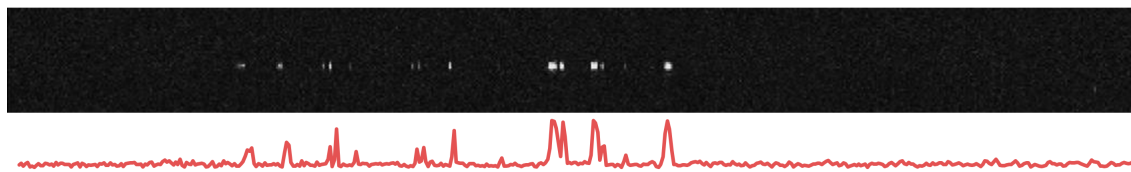


Figure 2.7 – Manifestation du scintillement à l'échelle de la molécule unique Kymogramme d'une molécule unique de mEos2 dans sa forme rouge immobilisée par liaison covalente à une lamelle de verre. Remarquer le caractère intermittent de la fluorescence émise au cours du temps.

un temps de vie relativement court (μs à s) prévenant leur accumulation au cours du temps. L'importante vitesse de retour vers l'état *on* témoigne d'une instabilité du chromophore de la protéine dans sa forme *off*. Le scintillement, à la différence de la photocommutation, n'est alors pas caractérisé par une bi-stabilité. Lors de la transition *on* \rightarrow *off*, l'état *off* peuplé revient fortement vers l'état *on*, d'une part en lien avec le retour thermique *off* \rightarrow *on* rapide et d'autre part par l'effet de la lumière sur cette réaction. La faible stabilité des formes *off* des protéines fluorescentes non photocommutables (à l'image de mEosFP) peut s'expliquer par la forte flexibilité de la matrice protéique dans cet état [Smyrnova et al., 2015].

La frontière entre scintillement et photocommutation reste néanmoins floue dans la mesure où la distinction repose sur les notions de contraste et de bi-stabilité à comportement non binaire. Le scintillement lent (état *off* très stable en l'absence de lumière (plusieurs minutes)) mis en évidence lors de cette thèse pourrait être défini comme photocommutation. Cependant, le contraste reste trop faible pour permettre l'exploitation de ce mécanisme afin de contourner la barrière imposée par la diffraction de la lumière en microscopie. Afin d'éviter toute confusion sémantique, nous réserverons le terme de photocommutation aux événements conduisant à la formation d'un état *off* à chromophore en conformation *trans*.

Mécanismes du scintillement

Le scintillement est un phénomène photophysique particulièrement bien décrit (à la fois pour les fluorophores organiques (e.g. Atto565) [Yeow et al., 2006] et les protéines fluorescentes (e.g. mEos2) [Annibale et al., 2010]). Paradoxalement, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal compris. Les études de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et de microscopie à l'échelle de la molécule unique ont permis de mettre en évidence que les temps de vie des états *off* des protéines fluorescentes s'étendent sur une gamme allant de quelques $\mu\text{s}/\text{ms}$ [Haupts et al., 1998] [Heikal et al., 2000] [Liu et al., 2006] [Schenk et al., 2004] à $0.01/1$ s [David et al., 2012] [Annibale et al., 2010] [Shaner et al., 2008] et que le temps de vie de ces états peut être modifié selon les conditions d'illumination [Lee et al., 2012].

Les états *off* de très courts temps de vie (inférieur au temps d'acquisition de l'image, scintillement ultra-rapide) pourraient correspondre à une forme protonée du chromophore (EGFP [Haupts et al., 1998] [Liu et al., 2006]). Le scintillement ultra-rapide pourrait donc résulter de transferts de protons à l'état fondamental au niveau du groupe titrable du chromophore (Figure 2.9; vert).

À l'image des fluorophores organiques, pour lesquels le scintillement rapide ($t_{off} \sim \text{ms}$ à dizaines de

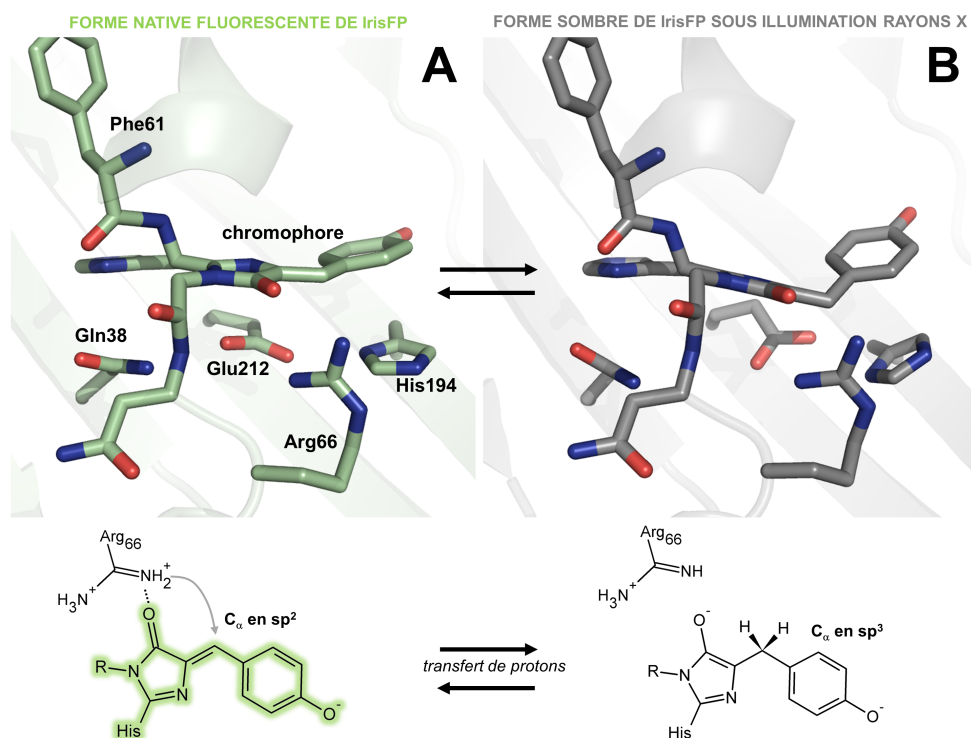


Figure 2.8 – Mécanismes de scintillement de la forme verte d'IrisFP (A). Structure de la forme *cis* verte d'IrisFP (code PDB : 2VVH) (B). Structure de la forme verte transitoirement non fluorescente suite à illumination sous rayons X (état sombre) (code PDB : 3TMT). L'échange de proton entre l'arginine 66 et le carbone α du chromophore *cis* vert (C) est à l'origine d'une distorsion du chromophore consécutive à la perte du pont méthylénique (D). La perte de planéité explique la perte des propriétés de fluorescence. Le carbone α du chromophore se déprotonne en échangeant son proton avec l'arginine 66 déprotonée.

ms) résulte d'une conversion inter-système, les états *off* des protéines fluorescentes pourraient correspondre à des états triplets excités [Ambrose et al., 1994] [Ha and Tinnefeld, 2012] (Figure 2.9 ; jaune).

En parallèle, plusieurs études mettent en évidence l'existence d'états sombres doublets de nature radicalaire ($D\cdot$) chez les fluorophores organiques (rhodamines [van de Linde et al., 2011a] et oxazines [Kottke et al., 2010]) corroborant l'hypothèse de l'importance des transferts d'électrons pour le scintillement de la rhodamine 6G [Zondervan et al., 2003]. De manière similaire, le scintillement des protéines fluorescentes pourrait résulter d'un transfert d'électrons à l'état excité ou à l'état fondamental [Roy et al., 2011] (Figure 2.9 ; gris). L'influence des conditions redox du milieu sur le scintillement des protéines fluorescentes (DMEM [Bogdanov et al., 2009b], MEA [Endesfelder et al., 2011] [Altman et al., 2012], DABCO [Avilov et al., 2014])⁶ vient donner du crédit à cette hypothèse. Une réduction d'un facteur 3 de la propension de Dendra2 à scintiller a notamment été notée en présence de DABCO. Les travaux menés précédemment au laboratoire ont permis d'identifier par combinaison de cristal-

6. Il a également été démontré que le scintillement peut être contrôlé par la température de l'environnement [Wong et al., 2007].

lographies aux rayons X et approches QC/MM, un nouvel état sombre chez la protéine fluorescente IrisFP [Adam et al., 2009a] [Roy et al., 2011]. Cet état formé suite à l'illumination par les rayons X présente un chromophore non plan (Figure 2.8). Il a été proposé que la perte de planéité soit liée à un échange de protons/électrons entre l'arginine 66 et le C_α du chromophore à l'état triplet. La protonation du C_α induit un changement de conformation ($sp^2 \rightarrow sp^3$) à l'origine de la perte de la planéité d'une part et du pont méthylène d'autre part, empêchant alors la conjugaison des anneaux ϕ et l . Le scintillement rapide pourrait résulter d'échanges de protons entre la matrice protéique et le chromophore à l'état triplet excité (Figure 2.9 ; rouge).

La nature des états *off* de plus long temps de vie (> 1 s, scintillement lent) reste quant à elle actuellement inconnue. Il est néanmoins tentant d'imaginer que les états *off* de temps de vie long chez les protéines fluorescentes pourraient résulter d'une torsion du chromophore à l'image de l'isomérisation subie par les RSFPs lors de la photocommutation (Figure 2.9 ; bleu).

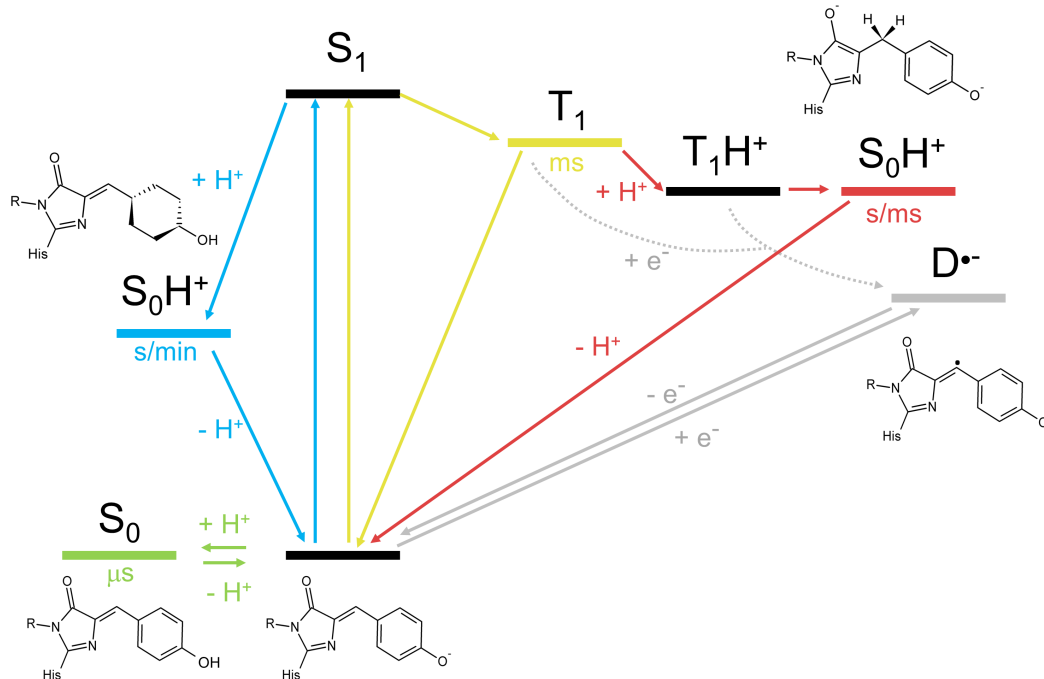


Figure 2.9 – Vue synoptique des mécanismes de scintillement (diagramme de Jablonski) L'intermittence de fluorescence à l'échelle de la molécule unique peut s'expliquer (vert), par des transitions réversibles rapides (10^6 Hz) entre la forme anionique fluorescente et protonée non fluorescente du chromophore (jaune), par l'entrée transitoire dans des états excités triplets (T_1) d'un temps de vie de l'ordre de la ms (rouge), par l'entrée dans un état fondamental S_0H^+ à C_α doublement protoné par transfert de protons entre Arg66 et état triplet T_1 (gris), par l'entrée transitoire dans un état doublet radicalaire peuplé soit depuis l'état fondamental S_0 soit depuis des états triplets (bleu), par l'entrée transitoire dans un état fondamental singulet S_0 à phénol protoné et chromophore tordu ou isomérisé.

Exploitation du scintillement

Le caractère stochastique du scintillement est exploité afin de contourner élégamment la limite imposée par la diffraction de la lumière en microscopie de fluorescence (voir Chapitre suivant, page 57). Néanmoins, le scintillement des protéines fluorescentes s'avère être un handicap majeur pour le développement des approches quantitatives basées sur la microscopie de super-résolution. Nous discuterons des conséquences du scintillement sur les jeux de données de microscopie super-résolution dans la Partie II, page 81.

Comprendre les mécanismes à l'origine du scintillement afin de le limiter constitue le *delenda carthago* de cette thèse.

2.5 Photoconversion et protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs)

Définition

La photoconversion se manifeste à l'échelle d'ensemble par un **déplacement bathochrome irréversible de l'émission** de fluorescence (Figure 2.10). Le phénomène s'explique à l'échelle moléculaire par une réaction photochimique modifiant la structure du chromophore si bien que $\lambda_{em}^{ant} < \lambda_{em}^{post}$.

Les protéines fluorescentes photoconvertibles forment un ensemble hétérogène du point de vue des mécanismes et des propriétés spectrales des états photoconvertis⁷. On peut distinguer deux classes de PCFP : les PCFPs « conventionnelles » passant d'une forme native verte à une forme photoconvertie rouge et les PCFPs « non conventionnelles » à forme photoconvertie non rouge. Nous nous intéressons dans cette thèse aux protéines photoconvertibles « conventionnelles » vert à rouge très largement utilisées en microscopie de super-résolution pour l'efficacité de leur phototransformation.

Protéines fluorescentes photoconvertibles non conventionnelles

En 2005, Habuchi *et al.* remarque que sous illumination par une lumière 532 nm, la protéine fluorescente rouge anthozoaire (DsRed) passe irréversiblement dans un état super-rouge [Habuchi *et al.*, 2005] suite à une isomérisation du chromophore couplée à une décarboxylation du glutamate 212. L'utilisation de cette PCFP est fortement limitée par la réduction drastique du rendement quantique de fluorescence accompagnant la photoconversion (de 0.7 à 0.01). La trop faible brillance de la forme photoconvertie limite l'utilisation de cette sonde fluorescente pour la localisation de protéines d'intérêt. La protéine PSmOrange développée en 2011 passe d'une forme orange à une forme rouge lointain [Subach *et al.*, 2011] sous illumination suite à la rupture à la base de l'hélice α portant le chromophore d'une liaison covalente par des mécanismes oxydatifs [Pletnev *et al.*, 2014]. La brillance plus élevée que DsRed dans sa forme photoconvertie permet son utilisation en microscopie. Néanmoins, comme la plupart des protéines fluorescentes dont l'émission est fortement décalée vers le rouge, la brillance reste modeste et peu propice à la collecte d'image de qualité. De plus, la forme photoconvertie est très peu stable et 50% de la population est dégradée plusieurs jours après photoconversion [Subach

7. On notera l'existence de fluorophores organiques photoconvertibles notamment rouge à bleu (cyanine 3.5) [Kwok *et al.*, 2016].

et al., 2011] [Subach et al., 2012].

Les protéines fluorescentes photoconvertibles PSCFP et PSCFP2 voient leur fluorescence passer de cyan à vert sous illumination 405 nm suite à la décarboxylation du glutamate 212 [Chudakov et al., 2004]. Comme pour la PAGFP, cette décarboxylation est à l'origine d'une modification de l'état de protonation du chromophore (chromophore neutre : fluorescence cyan ; chromophore anionique : fluorescente verte). Néanmoins, ces PCFPs présentent également une faible brillance dans leur forme photoconvertie compromettant leur utilisation. De plus, combinée à la forte autofluorescence des cellules dans le vert [Benson et al., 1979] [Aubin, 1979] le rapport signal/bruit se voit très sévèrement réduit.

En somme, les PCFPs non conventionnelles possèdent l'avantage d'exploiter une gamme du spectre lumineux⁸ distincte des PCFPs conventionnelles mais leur faible brillance compromet pour l'instant leur utilisation.

Protéines fluorescentes photoconvertibles vert à rouge

L'émission de lumière rouge de ces PCFPs suite à photoconversion les rend particulièrement adaptées à l'utilisation en cellules, dans la mesure où l'autofluorescence est moindre dans cette région du spectre visible.

En 2002, Labas et ses collaborateurs découvrent la présence chez deux espèces anthozoaires, *Montastrea cavernosa* et *Ricordea florida*, l'existence de protéines fluorescentes photoconvertibles vert à rouge sous illumination dans le proche UV : mcavRFP et rfloRFP respectivement [Labas et al., 2002]. Plus tard, des PCFPs similaires seront découvertes chez les espèces *Trachyphyllia geoffroyi* (tgeoRFP (Kaede) [Ando et al., 2002]), *Dendronephthya sp.* (dendFP [Pakhomov et al., 2004]) et *Lobophyllia hemprichii* (EosFP [Wiedenmann et al., 2004b]) (Figure 2.11). Toutes les protéines fluorescentes naturellement photoconvertibles vert à rouge sont issues d'espèces anthozoaires appartenant aux sous-ordres des Faviinae (Kaede, mcavRFP

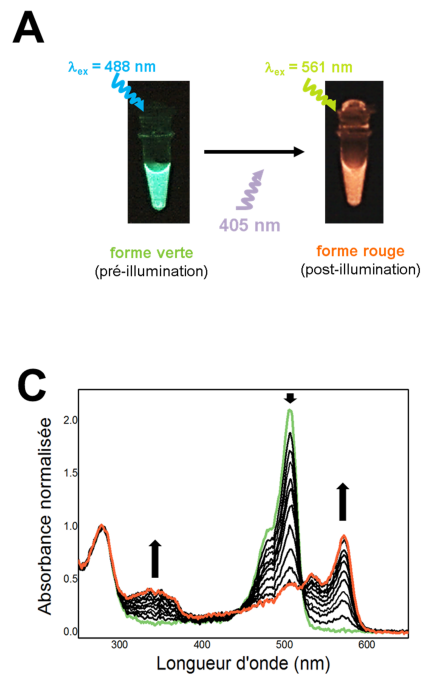


Figure 2.10 – Manifestation de la photoconversion vert à rouge de mEos2 à l'échelle d'ensemble (A). Tubes contenant une solution de mEos2 après purification et excités par un laser 488 nm (gauche) et après illumination par une lumière violette et excités par un laser 561 nm (droite) (B). Spectres d'absorption d'une solution de mEos2 illuminée par une lumière proche UV diffuse (405 nm) (pré-illumination : vert ; post-illumination : rouge ; intermédiaires : noirs)

8. D'autres photoconversions « non conventionnelles » ont été mises en évidence notamment la photoconversion rouge à vert de mKate ainsi que la photoconversion orange à rouge lointain de mOrange et HcRed [Kremers et al., 2009]. Nous n'aborderons pas ici les photoconversion chimio-induites comme le rougissement de la GFP en conditions oxydantes [Bogdanov et al., 2009c] ni le rougissement de l'EGFP induit par la lumière violette mis en évidence l'an dernier [Sattarzadeh et al., 2015].

et EosFP), Alcyoniinae (dendFP) ou Corallimorpharinae (rflorFP). En dehors des anthozoaires, aucune autre PCFP vert à rouge n'a été découverte à l'heure actuelle.

Comme la plupart des protéines fluorescentes anthozoaires, ces dernières présentent une forte tendance à oligomériser. En particulier, des expériences de filtration sur gel ont montré que la protéine Kaede forme, en conditions physiologiques, un tétramère, limitant fortement son utilisation en tant qu'étiquette pour le marquage de protéines d'intérêt. À l'image des cycles d'optimisation des protéines fluorescentes conventionnelles (voir page 23), des efforts ont été menés afin de limiter l'oligomérisation des PCFPs naturelles. Nous détaillerons les stratégies d'optimisation des séries de PCFPs issues de EosFP et dendFP.

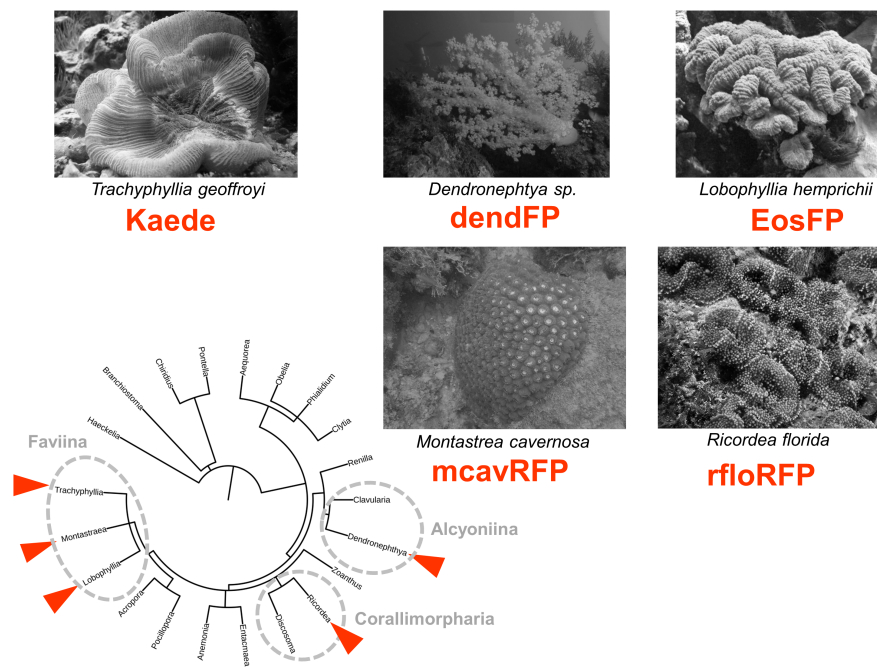


Figure 2.11 – Origine des PCFPs anthozoaires Photographies des espèces anthozoaires desquelles sont issues les PCFPs vert à rouge (notées en rouge) et leur position phylogénétique (repérées par une tête de flèche rouge). Les sous-ordres d'anthozoaires chez lesquels sont naturellement présentes les PCFPs vert à rouge sont repérés par un cercle pointillé gris.

Série Eos⁹ En s'inspirant de la stratégie de monomérisation utilisée pour l'obtention de mRFP1 à partir de son parent tétramérique DsRed, Wiedemann *et al.* ont obtenu une version monomérique (mEosFP) du tétramère sauvage EosFP. Les mutations Val123Thr et Thr158His, en rendant les interfaces de dimérisation A/C et A/B davantage hydrophiles sont à l'origine du variant monomérique. Néanmoins, mEosFP montre une tendance à la dimérisation à forte concentration [McKinney

9. Pour l'alignement des séquences des variants de la série Eos voir en Annexe, page 203.

et al., 2009] et une expression relativement faible à 37 °C. Grâce aux structures cristallographiques de mEosFP [Nienhaus et al., 2005], d'autres acides aminés interagissant à l'interface entre monomères ont pu être identifiés. L'interaction par empilement π de deux histidines 121 ainsi que l'interaction par pont salin entre l'arginine 170 et l'aspartate 156 contribuent à la stabilisation de dimères de mEosFP. Ces observations ont servi de support à l'ingénierie semi-directionnelle d'un variant dont la tendance à oligomériser est réduite : mEos2 [McKinney et al., 2009]. En parallèle, la brillance, la maturation, le repliement ainsi que la photostabilité ont été optimisés. Jusqu'en 2012, mEos2 s'est imposée comme une PCFP de choix pour les approches de microscopie en combinant une tendance réduite à oligomériser et un budget de photons élevé. Les travaux de Zhang et collaborateurs détrônent mEos2 en proposant une série de variants (mEos3.1 et mEos3.2) à budget de photons et maturation plus élevés et une tendance à oligomériser tendant vers zéro même à forte concentration [Zhang et al., 2012]. En effet, mEos3 présente un score d'environ 90% au test OSER soit 8% de moins que le mutant très monomérique de la GFP : mEGFP^{A206K} [Cranfill et al., 2016]. Les résultats au test ClpP (voir page 27) viennent confirmer la nature fortement monomérique de mEos3.2 (Figure 2.12) [Wang et al., 2014a].

L'an dernier, le groupe de Looger a présenté deux nouveaux variants de la série Eos baptisés mEos4a et mEos4b compatibles pour la microscopie de corrélation photonique-électronique (CLEM) [Paez-Segala et al., 2015]. La fluorescence de ces variants est faiblement affectée par les traitements nécessaires à la préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission et présentent un fort caractère monomérique.

Série Dendra En parallèle, la série Dendra issue de la protéine fluorescente naturellement photoconvertible dendFP a également été extensivement optimisée. La tendance à oligomériser de dendFP a été fortement diminuée chez le variant Dendra [Gurskaya et al., 2006] développé en s'inspirant de la stratégie de monomérisation utilisée pour l'ingénierie de Azami-Green [Karasawa et al., 2003]. Plus récemment, une version davantage brillante et à meilleure expression à 37 °C de Dendra baptisée Dendra2 a été commercialisée (Evrogen). La fusion de Dendra2 à la protéase bactérienne ClpP (test d'oligomérisation ClpP ; voir page 27) n'induit pas d'artéfact de localisation témoignant d'une très faible tendance à oligomériser, à l'image de mEos3.2 (Figure 2.12).

Les PCFPs de la série Dendra en plus de présenter une très faible tendance à oligomériser sont les seules à pouvoir être photoconverties par une lumière cyan plutôt qu'une lumière violette énergétique et cytotoxique [Gurskaya et al., 2006]. Néanmoins, l'efficacité de photoconversion sous lumière violette est rapportée par Evrogen comme étant nettement plus efficace que sous lumière cyan.

Autres séries En parallèle des stratégies d'optimisation des protéines naturellement photoconvertibles, des protéines fluorescentes conventionnelles ont été rendues photoconvertibles par mutagenèse. En 2008, la PCFP mKikGR a été ingénierée à partir de la protéine fluorescente conventionnelle monomérique mKikume [Habuchi et al., 2008]. En 2010, en se basant sur l'alignement de EosFP, Dendra2, Kaede et KikGR, les acides aminés conservés à plus de 50% ont été remplacés dans la séquence de la protéine fluorescente cyan mTFP1 (cFP484) extraite du corail *Clavularia sp.*. Après plusieurs cycles d'optimisation, une famille de PCFPs vert à rouge appelées mClavGR a vu le jour [Hoi et al., 2010]. Plus tard, les protéines mClavGR ont été plus extensivement optimisées conduisant à la naissance des PCFPs mMaple [McEvoy et al., 2012] et plus récemment mMaple2 et 3 présentant une très faible tendance à oligomériser [Wang et al., 2014a].

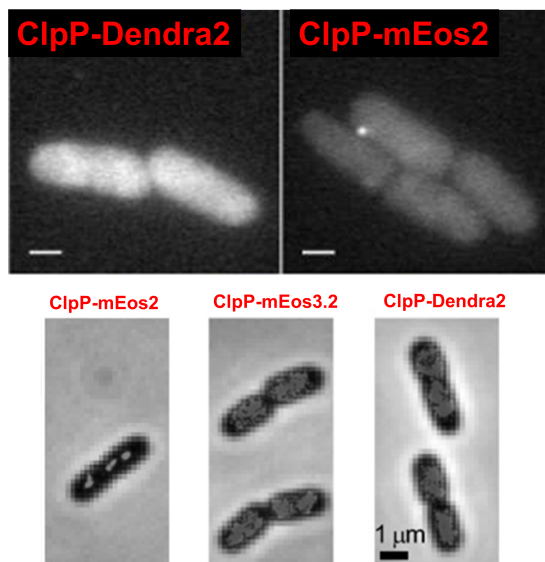


Figure 2.12 – Comparaison de l'oligomérisation in cellulo de mEos2, Dendra2 et mEos3.2 Expression de la protéase bactérienne ClpP en fusion avec Dendra2, mEos2 ou mEos3.2 dans le cytoplasme d'*Escherichia coli*. Un signal de fluorescence diffus (Dendra2 et mEos3.2) témoigne d'une tendance réduite de la protéine fluorescente à oligomériser alors que le « phénotype en point » (mEos2) témoigne d'une forte tendance à oligomériser. Modifié d'après [Landgraf et al., 2012] et [Wang et al., 2014a]. Barre d'échelle : 1 μm.

Dernièrement, une série de protéines fluorescentes issues d'une protéine fluorescente photocommutable (Dronpa) a été ingénierée [Moeyaert et al., 2014]. Malgré sa forte brillance et photorésistance, sa structure tétramérique pourrait être à l'origine d'artéfacts lors de son utilisation dans certains contextes cellulaires.

L'ensemble des protéines fluorescentes photoconvertibles vert à rouge issues des efforts d'ingénierie et aujourd'hui disponibles sont présentées dans la Table 2.3.

Table 2.3 – Protéines fluorescentes photoconvertibles caractérisées à la mi-mars 2016

Protéine (oligomérisation)	Protéine mère [sauvage]	Organisme source	Chromophore	$\lambda_{ex/em}$ (nm)		ϵ (mM ⁻¹ .cm ⁻¹)		ϕ_{fluor}		Brillance		pK _a		Φ_{conv}	Lumière actinique (nm)	Ref.
				ANTE	POST	A	P	A	P	A	P	A	P	[contraste]		
PS-CFP (M)	aceGFP [GFP]	<i>Aequorea coerulescens</i>	TWG	402/468	490 / 511	34	27	0.16	0.19	16%	15%	4	6	N.C.	405	[Chudakov et al., 2004]
PS-CFP2 (M)	PS-CFP [aceGFP]	<i>A. coerulescens</i>	TWG	400/468	490 / 511	43	47	0.2	0.23	25%	32%	4.3	6.1	[2000]	405	[Chudakov et al., 2004]
Kaede (T)	-	<i>Trachyphyllia geoffroyi</i>	HYG	508/518	572 / 582	98,8	60,4	0.8	0.33	236	60%	5.6	5.6	2.4 x 10 ⁻⁴ [2000]	405	[Ando et al., 2002]
KikGR (T)	KikG	<i>Favia favaus</i>	HYG	507/517	583 / 593	28,2	32,6	0.7	0.65	59	63%	7.8	5.5	4.7 x 10 ⁻³ [2000]	405	[Tsutsui et al., 2005]
mKikGR (M)	KikGR [KikG]	<i>Favia favaus</i>	HYG	505	580 / 591	49	28	0.69	0.63	100	53%	6.6	5.2	7.5 x 10 ⁻³	405	[Habuchi et al., 2008]
EosFP (T)	wtEosFP	<i>Lobophyllia hemprichii</i>	HYG	506/516	571 / 581	72	41	0.7	0.55	150	67%	5.8	N.C.	N.C.	405	[Wiedenmann et al., 2004b]
mEosFP (M/D)	EosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/516	569 / 581	97,2	41,3	0.67	0.66	194	81%	5.3	6.5	N.C.	405	[Adam et al., 2011]
d1EosFP (D)	EosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/516	571 / 581	74,8	40	0.68	0.6	151	72%	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Wiedenmann et al., 2004b]
d2EosFP (D)	EosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	506/516	571 / 581	84	33	0.66	0.62	165	61%	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Wiedenmann et al., 2004b]
tdEos (D)	EosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	506/516	569 / 581	84	33	0.66	0.6	165	59%	5.7	6.7	[200]	405	
mEos2 (M/D)	mEosFP	<i>L. hemprichii</i>	HYG	506/519	573 / 584	56	46	0.84	0.66	140	90%	5.6	6.4	[6.9] à 100 s	405	[McKinney et al., 2009]
mEos3.1 (M)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/513	570 / 580	88,4	33,5	0.83	0.62	218	62%	5.2	6	N.C.	405	[Zhang et al., 2012]
mEos3.2 (M)	mEos2	<i>L. hemprichii</i>	HYG	507/516	572 / 580	63,4	32,2	0.84	0.55	159	53%	5.4	5.8	N.C.	405	[Zhang et al., 2012]
mEos4a (M)	mEos2 [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/516	570 / 580	83,5	61,0	0.86	0.71	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Paez-Segala et al., 2015]
mEos4b (M)	mEos2 [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/516	570 / 580	78,1	55,5	0.84	0.71	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Paez-Segala et al., 2015]
DendFP (T)	-	<i>Dendronephthya sp.</i>	HYG	494/506	560/578		82,6	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	488-405	[Pletneva et al., 2016]
Dendra (M)	DendGFP	<i>Dendronephthya sp.</i>	HYG	486/505	558 / 575	21	20	0.72	0.7	45	42%			[1,400]	488-405	[Gurskaya et al., 2006]
Dendra2 (M)	Dendra [DendFP]	<i>Dendronephthya sp.</i>	HYG	490/507	553 / 573	45,1	35	0.55	0.55	74	57%	7.2	6.2	N.C.	488-405	[Adam et al., 2011]
mClavGR1 (M)	mTFP1 [cFP484]	<i>Clavularia sp.</i>	HYG	486/503	565 / 582	16	21	0.84	0.56	40	35%	8	7.4	N.C.	405	[Hoi et al., 2010]
mClavGR2 (M)	mClavGR1 [mTFP1]	<i>Clavularia sp.</i>	HYG	488/504	566 / 583	19	32	0.77	0.53	44	50%	8	7.3	[4.7] à 100 s	405	[Hoi et al., 2010]
mcavRFP (M)	-	<i>Montastraea cavernosa</i>	HYG	504/517	572 / 580	53,1	60	0.6	0.6	95	107%	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Oswald et al., 2007]
rflorFP	-	<i>Ricordea florida</i>	HYG	508/518	566 / 574	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Labas et al., 2002]
rflorFP	-	<i>Catalaphyllia jardinei</i>	HYG	509/517	573 / 582	105	55,8	0.55	0.56	172	93%	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Oswald et al., 2007]
lhemOFF	-	<i>L. hemprichii</i>	HYG	507/517	543 / 574	94,2	36,3	0.58	0.65	163	70%	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Oswald et al., 2007]
mMaple (M)	mClavGR2	<i>Clavularia sp.</i>	HYG	489/505	566 / 583	15	30	0.74	0.56	33	50%	8.2	7.3	[10.8] à 100 s	405	[McEvoy et al., 2012]
mMaple2 (M)	mMaple	<i>Clavularia sp.</i>	HYG	N.C./506	N.C./582	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Wang et al., 2014a]
mMaple3 (M)	mMaple	<i>Clavularia sp.</i>	HYG	N.C./505	N.C./583	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	405	[Wang et al., 2014a]
pc-Dronpa (T)	Dronpa	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	HYG	505/517	569 / 581	115	75	0.85	0.68	291	190%	5.5	6.3	N.C.	405	[Moeyaert et al., 2014]
pc-Dronpa2 (T)	PC-Dronpa	<i>Echinophyllia sp. SC22</i>	HYG	504/515	569 / 583	100	105	0.83	0.68	248	213%	5.8	6.1	N.C.	405	[Moeyaert et al., 2014]
PSmOrange (M)	mOrange [DsRed]	<i>Discosoma sp.</i>	TYG	548/565	636 / 662	113,3	32,7	0.51	0.28	172	27%	6.2	5.6	[10 700]	488	[Subach et al., 2011]

Mécanismes de la photoconversion vert à rouge

La photoconversion, une rupture photo-induite de chaîne peptidique par β -élimination

Le rougissement photo-induit est le résultat d'un mécanisme de formation du chromophore rouge totalement différent de celui connu pour les protéines fluorescentes rouges anthozoaires connues jusqu'alors (*e.g.* DsRed). La comparaison des séquences de l'ensemble des PCFPs vert à rouge naturelles révèle une conservation stricte du motif His-Tyr-Gly à l'origine du chromophore en position 62-63-64. La présence du résidu histidine en position 62 est nécessaire à la photoconversion des PCFPs : une substitution de cet acide aminé chez Kaede a pour conséquence une perte des propriétés de photoconversion [Ando et al., 2002] [Mizuno et al., 2003]. Des expériences de résonance magnétique

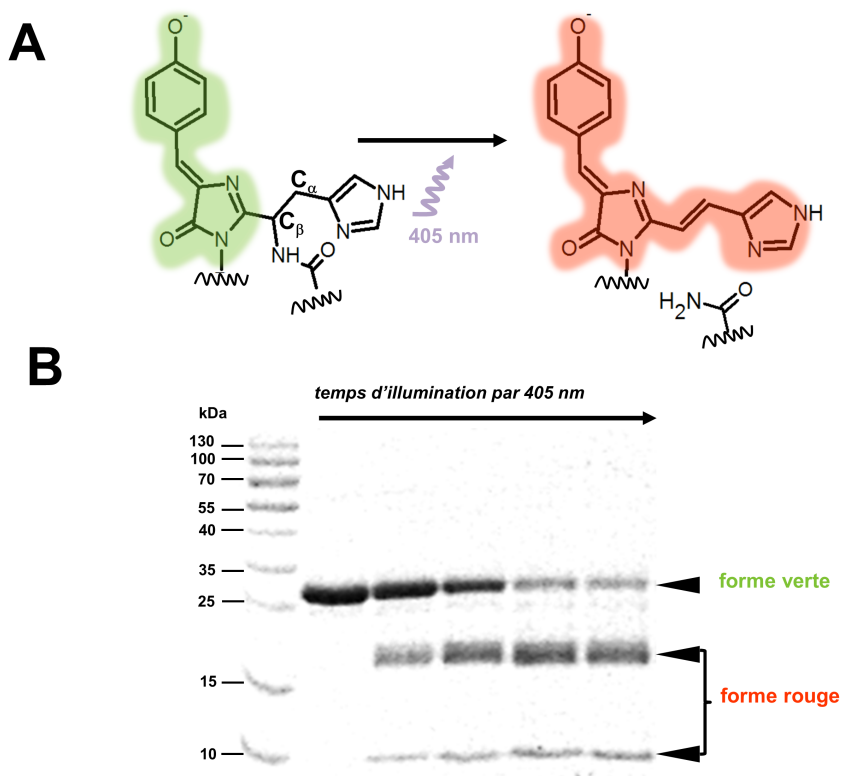


Figure 2.13 – Comparaison des formes vertes et rouges des PCFPs (A). Structure des chromophores vert pré-conversion et rouge post-conversion des PCFPs. Noter la formation d'un lien double entre le C_{α} et le C_{β} de l'histidine 62 à l'origine d'un réseau plus large de liaisons doubles conjuguées. (B). Electrophorèse en conditions dénaturantes de la protéine mEos2 au cours du phénomène de photoconversion. Noter la rupture de la connectivité de la chaîne polypeptidique lors du phénomène de photoconversion.

nucléaire ont mis en évidence que le chromophore de la forme rouge intègre l'histidine 62 dans le système π délocalisé grâce à une liaison double formée entre le carbone α et β de l'histidine 62 (Figure 2.13 A) [Mizuno et al., 2003]. Le chromophore alors formé (2-2-(5-imidazolyl)éthynyl)-4-(p-hydroxybenzylidène)-5-imidazolinone présente un réseau de liaisons conjuguées plus large à l'origine

de la transition bathochromique.

Cette désaturation de la liaison C_{α} - C_{β} de l'histidine 62 s'accompagne d'une rupture de la chaîne polypeptidique de la protéine comme en témoignent les électrophorèses en conditions dénaturantes de mEos2 exposée à la lumière violette (Figure 2.13 B). Cette rupture est la conséquence d'une réaction de β -élimination au niveau de la liaison C_{α} - C_{β} de l'histidine 62¹⁰. À l'heure actuelle, les mécanismes exacts de la β -élimination à l'origine de la photoconversion sont encore mal compris et de nombreux modèles mécanistiques détaillés ont été proposés.

Au cours d'une β -élimination, une liaison C-C substituée (alcane) est transformée en liaison C=C (alcène) (Figure 2.14). L'insaturation de la liaison résulte du départ d'un nucléofuge et de l'abstraction d'un proton par une base forte. Lors de l'arrachage du proton par la base, le doublet électronique de la liaison H-C est transféré à la liaison C-C.

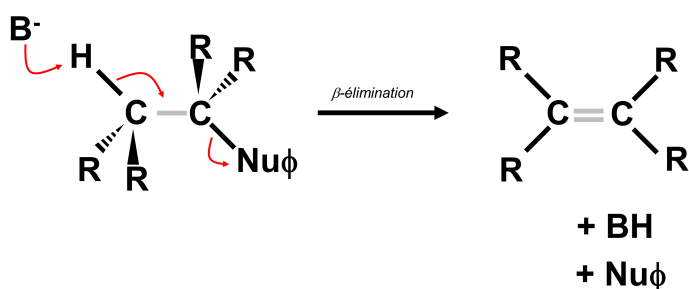


Figure 2.14 – Réaction d'élimination β Deux mécanismes interviennent lors d'une réaction d'élimination β : d'une part, l'abstraction du proton par une base (B^-) et d'autre part le départ d'un groupe partant nucléofuge ($Nu\phi$). L'abstraction du proton et le départ du nucléofuge peuvent se faire de manière concertée (mécanisme E2) ou séquentielle (mécanisme E1). La réaction d'élimination consiste en une insaturation de la liaison C-C en liaison C=C.

Mécanisme d'élimination β unimoléculaire (E1)

En 2003, Mizuno *et al.* proposent un modèle d'élimination unimoléculaire (E1) pour la photoconversion de Kaede [Mizuno *et al.*, 2003]. D'après ce modèle, la rupture de la liaison C_{α}^{His62} -N (départ du nucléofuge, ici un carboxamide) et l'abstraction du proton se font de manière séquentielle (Figure 2.15).

Rupture de la liaison C-N : départ du nucléofuge carboxamide D'après ce modèle, la rupture de la liaison C_{α}^{His62} -N est le résultat d'un transfert d'électron au sein du chromophore excité ionisé. Un des doublets non liant de l'oxygène de l'anneau I du chromophore excité sous sa forme quinonoïdale est délocalisé et permet le clivage de la liaison C-N à l'origine du départ d'un groupe carboximidique (Figure 2.15 A) qui passe rapidement sous sa forme tautomère carboxamide préférée (Figure 2.15 B). Le départ du groupe partant est nettement favorisé en présence d'un catalyseur acide. La forme imidazolium de l'histidine 62 (forme doublement protonnée) située à proximité du carbonyl porté par la Phe61 pourrait assurer le rôle de catalyseur acide en protonant le groupe partant.

Quels sont les mécanismes à l'origine de la protonation de l'histidine 62 ?

10. Cette réaction rare chez les protéines diffère des réactions d'hydrolyse classique de la chaîne polypeptidique.

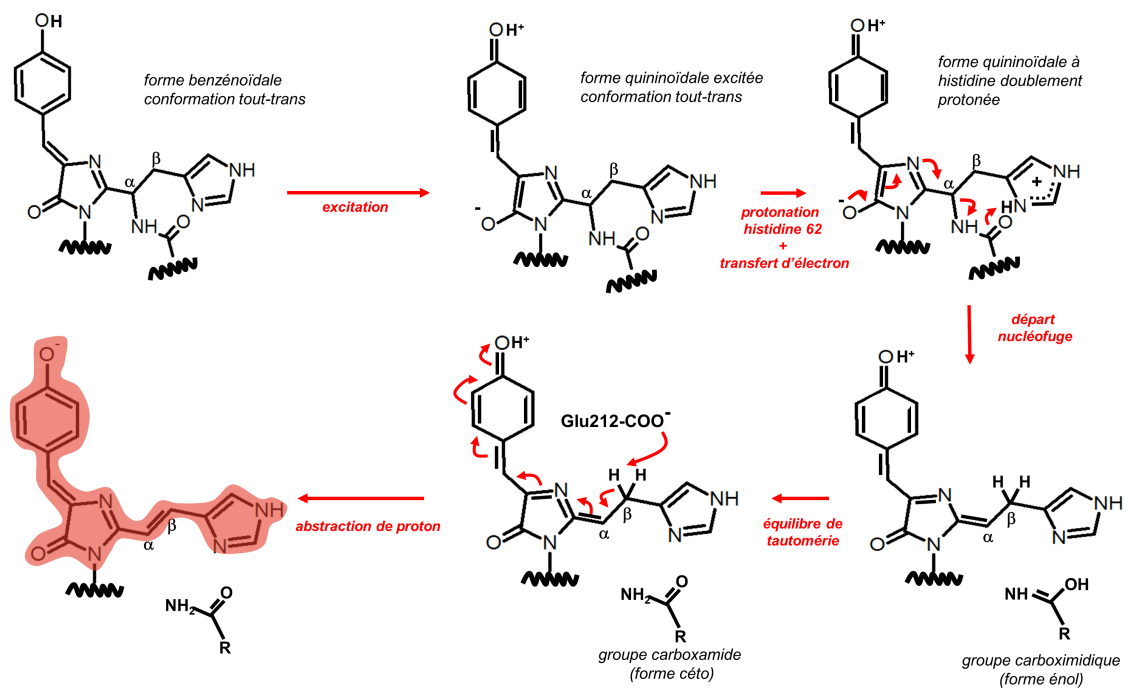


Figure 2.15 – Modèle de photoconversion par élimination β unimoléculaire E1 Dans sa forme quinonoïdale électroniquement excitée, un transfert d'électron au sein du chromophore de l'anneau I au C_{α}^{His62} permet le départ du nucléofuge (groupe carboximidique). La rupture de la liaison C-N est facilitée par le transfert de proton entre l'histidine sous sa forme cationique imidazolium et le groupe hydroxy-iminique porté par le carbone α de la Phe61. L'origine du proton porté par l'His62 est encore débattue. Dans un second temps, un des protons porté par le carbone β de l'His62 est arraché par une base forte (Glu212 dans sa forme de base conjuguée). La liberté rotationnelle entre l'étape 1 et 2 autorise une potentielle isomérisation de l'histidine 62 observée uniquement chez les mutants KikGR.

Les mécanismes à l'origine de la protonation de l'His62 sont encore discutés voire réfutés [Lelimosin et al., 2009]. La protonation de l'His62 pourrait résulter d'un transfert de proton à l'état excité (*excited state proton transfer*, ESPT) depuis le phénol de l'anneau ϕ [Mizuno et al., 2003] [Tsutsui et al., 2005] [Hayashi et al., 2007]. L'implication d'un ESPT au cours du phénomène de photoconversion reste cependant très controversé. Alors que chez EosFP, l'absence de fluorescence par excitation de la forme neutre du chromophore suggère l'absence d'ESPT [Nienhaus et al., 2005], des travaux de récents mettent en évidence un ESPT chez Dendra2 [Fron et al., 2013].

D'autre part, des études de résonance magnétique nucléaire, mettent en évidence qu'un transfert direct de proton entre résidus tyrosine et histidine au sein de peptides est possible à l'état fondamental [Morozova and Yurkovskaya, 2010].

Dans tous les cas, la protonation de l'histidine 62 dans sa conformation *trans* reste particulièrement

défavorisée par son environnement apolaire. D'autre part, le transfert de proton de l'histidine au carbonyle de la Phe61 lors du départ du carboxamide est géométriquement défavorisée. En effet la paire d'électrons portée par le carbonyle est perpendiculaire à celle du N-H de l'His62 défavorisant leur interaction. La présence d'une molécule d'eau à proximité semblerait néanmoins faciliter la réaction de protonation/déprotonation [Hayashi et al., 2007]. En 2009, Lelimosin *et al.* propose un mécanisme de β -élimination ne faisant pas intervenir de transfert de proton entre His62 et carbonyle du Phe61 [Lelimosin et al., 2009]. D'après leur modèle, la rupture de la liaison C-N est le résultat d'un ESPT entre le carbonyle de la Phe61 et l'amine δ de l'His62.

Abstraction du proton et formation d'une liaison double D'après le modèle E1 séquentiel, l'abstraction du proton du C_β suit la rupture de la liaison C-N. Les mécanismes à l'origine de l'arrachage d'un des protons portés par le C_β sont restés longtemps mal déterminés. Les structures cristallographiques de EosFP et Kaede ont permis de mettre en évidence qu'une distance de 3.3 Å seulement sépare le carboxylate du glutamate 212 et le carbone β de l'histidine 62. Il a donc été proposé que le glutamate 212 puisse jouer un rôle de base (sous sa forme carboxylate) dans l'abstraction du proton à l'origine de la liaison C=C insaturée (Figure 2.15) [Hayashi et al., 2007] [Lelimosin et al., 2009] [Kim et al., 2015]. Cette hypothèse est corroborée par l'absence de photoconversion chez les mutants pour lesquels le glutamate est remplacé par une glutamine [Nienhaus et al., 2005] [Hayashi et al., 2007]. Les données de QC/MM de Lelimosin *et al.* suggèrent la possibilité d'une abstraction de proton ne faisant pas intervenir le Glu212 mais une forme carbanion de l'His62 [Lelimosin et al., 2009].

L'élimination de type séquentielle E1 autorise une rotation autour de la liaison C_α - C_β de l'His62 modulée par l'environnement [Lelimosin et al., 2009]. Ainsi, la photoconversion E1 n'est pas stéréosélective : le chromophore rouge peut adopter une conformation de la liaison C_α - C_β différente de celle du chromophore pré-conversion (*trans*). En effet, après la rupture de la liaison C-N, l'éloignement du carbonyle du Phe61 qui compromettrait jusqu'alors la rotation autour de la liaison C_α - C_β autorise une isomérisation de l'His62 avant que la liaison soit de nouveau bloquée par la formation d'une liaison double.

Chez la PCFP ingénierée KikGRX, la liaison C_α - C_β du chromophore rouge est en conformation *cis*, suggérant que la photoconversion résulte d'un mécanisme E1 au cours duquel, l'état intermédiaire précédant l'abstraction du proton voit la liaison C_α - C_β de l'His62 s'isomériser [Tsutsui et al., 2005]. Une protéine photoconvertible de synthèse développée à partir de l'ancêtre commun hypothétique des protéines fluorescentes par l'addition de 13 mutations a permis de suggérer le rôle central, entres autres, de la glutamine 38 particulièrement conservée au sein des protéines fluorescentes photoconvertibles dans le contrôle de la photoconversion [Kim et al., 2013].

Mécanisme d'élimination β bimoléculaire (E2)

En 2005, Nienhaus *et al.* proposent un modèle bimoléculaire E2 d'élimination. D'après ce modèle, l'abstraction du proton et la rupture de la liaison se font de manière concertée : la rupture de la liaison C-N n'est pas la conséquence d'un transfert d'électrons au sein du chromophore excité.

Comme mentionné précédemment, la protonation de l'His62 conduisant à la formation d'un groupement imidazolium est un phénomène central de la photoconversion (catalyseur acide) et l'origine du proton est actuellement discutée. pourrait résulter d'un transfert de proton à l'état excité

(ESPT) [Nienhaus et al., 2005]. Kim et *et al* ont proposé en 2015 un nouveau modèle permettant de réconcilier l'ensemble des informations structurales et photophysiques compilées au cours des dernières dix années [Kim, 2012] [Kim et al., 2015].

D'après leur modèle, la protonation de l'His62 est précédée de son isomérisation en conformation *cis* après rotation autour de la liaison $C_{\alpha}^{His62}-C_{\beta}^{His62}$. Dans cet environnement, le N ϵ de l'His62 se retrouve dans un environnement hydrophile favorable à sa protonation, à une distance compatible avec le transfert de proton depuis le glutamate 212. Ce modèle mécanistique suppose une forte flexibilité du tonneau β de la protéine afin d'accommoder l'isomérisation de l'His62 accompagnée d'une torsion de l'anneau ϕ du chromophore (Figure 2.16). Suite à l'isomérisation *cis* \rightarrow *trans* de l'histidine 62 (retour à la conformation initiale), la conformation est idéale pour la réalisation concertée de la réaction d'élimination : le glutamate sous sa forme carboxylate arrache le proton du carbone β , réaction qui s'accompagne du départ du groupe carboximique protoné par l'His62 doublement protonée.

En somme, les données actuelles suggèrent que la photoconversion chez Kaede, la série Eos et la série Dendra est le fruit d'une élimination concertée (E2). Le glutamate 212 sous sa forme base conjuguée joue un rôle important dans, d'une part l'abstraction du proton et d'autre part la protonation de l'His62 à rôle de catalyseur acide. La flexibilité du tonneau est une condition essentielle à la bonne réalisation de la photoconversion.

Exploitation de la photoconversion vert à rouge

La plasticité spectrale des protéines fluorescentes photoconvertibles leur confère une place de choix parmi les outils biotechnologiques.

Étude de la dynamique spatio-temporelle des protéines

À l'image de la photo-activation, la photoconversion permet le pistage au cours du temps d'une population de protéine. Nativement sous une forme verte, les PCFPs sont plus commode d'utilisation par rapport aux PAFPs qui résident nativement sous une forme non fluorescente. En effet, il est alors possible de rechercher dans le canal vert les cellules à expression ou à morphologie optimale par exemple. Les PCFPs ont été utilisées pour de nombreuses applications biologiques dynamiques en cellules [Chudakov et al., 2004] [Baker et al., 2010] [Chudakov et al., 2007] [Woods et al., 2014] et au sein d'embryons [Nowotschin et al., 2009].

Récemment, il a été montré que les PCFPs sont utilisables en tant que chronomètre moléculaire [Zhu et al., 2015]. Il est alors possible suite à photocon-

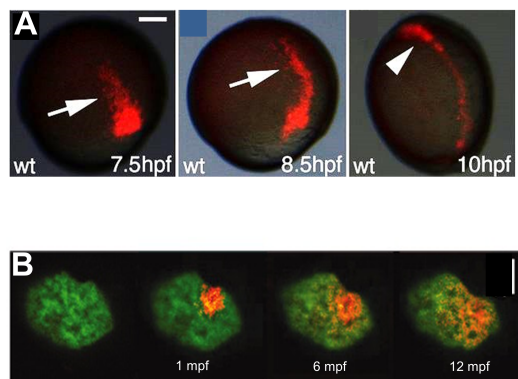


Figure 2.17 – Étude de la dynamique des cellules et des protéines après photoconversion (A). Pistage de cellules après photoconversion au sein d'un embryon de poisson-zèbre au sein duquel la protéine KikGR a été microinjectée. Le temps post-photoconversion en heure est donné en bas à gauche de chaque image. Modifié d'après [Paskaradevan and Scott, 2012]. Barre d'échelle : 100 μ m. (B). Pistage de la protéine nucléaire de fixation au rétinol (RBP) fusionnée à d2EosFP suite à photoconversion. Le temps post-photoconversion en minute est donné en bas de chaque image. Modifié d'après [Wiedenmann et al., 2004b]. Barre d'échelle 5 μ m.

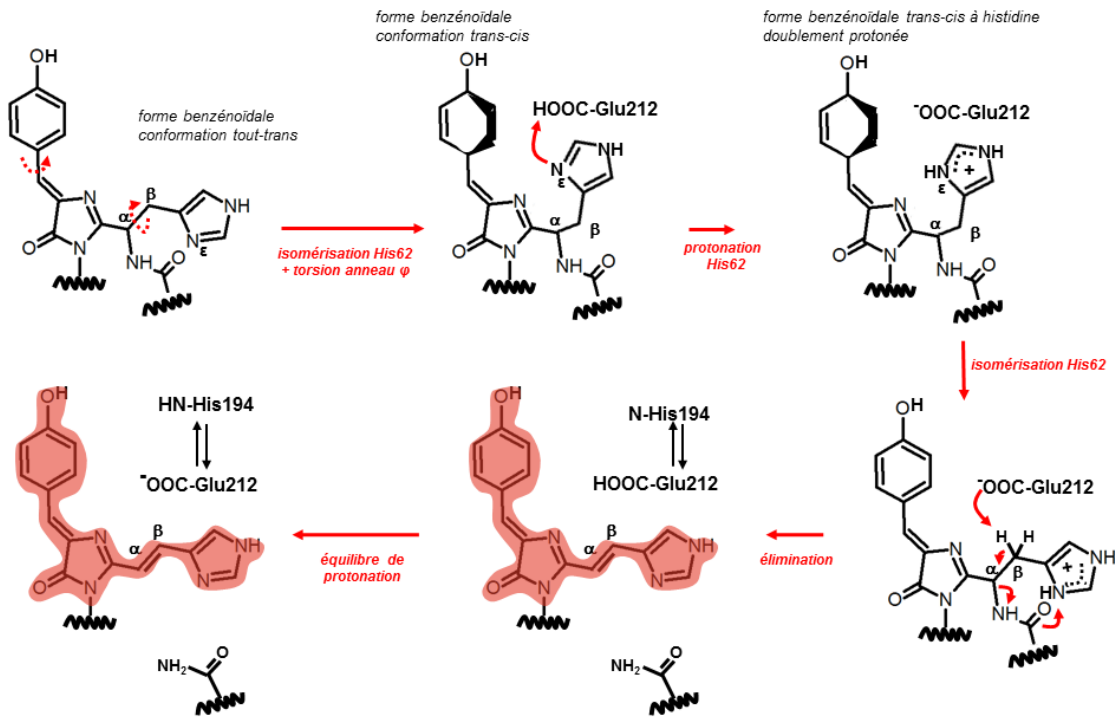


Figure 2.16 – Modèle de photoconversion par élimination β bimoléculaire (E2) Suite à l'absorption d'un photon, l'histidine 62 s'isomérise accompagnée d'une torsion à 90° de l'anneau ϕ du chromophore. Dans sa conformation isomérisée, l'His62 se trouve dans un environnement favorable à la protonation de son azote ϵ par le groupe carboxylique du glutamate 212. Dans sa forme imidazolium doublement protoné, l'His62 retourne dans sa conformation *trans* (chromophore *tout-trans*). Dans cette conformation, le carbone β se faisant face au carboxylate du Glu212 et le N_ϵ de l'His62 faisant face au carbonyl de la liaison peptidique de la phénylalanine 61, l'abstraction du proton et le départ du nucléofuge se font de manière concertée aboutissant à la rupture de liaison covalente et la désaturation de la liaison $C_\alpha^{His62}-C_\beta^{His62}$. Le glutamate retourne sous sa forme déprotonée en échangeant le proton gagné suite à l'abstraction par échange avec l'histidine 194 jouant le rôle de navette à protons.

version d'estimer l'« âge » d'une cellule ou d'une population de protéines (étude du renouvellement protéique (*turnover*)).

Microscopie super-résolution

Peu de temps après leur découverte, les PCFPs ont été utilisées en microscopie de super-résolution. Nous expliquerons dans le chapitre suivant comment les propriétés de phototransformations des PCFPs sont exploitées afin de contourner la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière en microscopie photonique.

Microscopie conventionnelle et microscopie de super-résolution

La cellule est un objet biologique microscopique et dynamique (Figure 3.1). Son étude repose sur l'utilisation d'instruments à haute résolution spatiale (microscopes) et temporelle. L'aspect dynamique étant difficilement appréhendable en microscopie électronique, la microscopie photonique s'impose alors comme un outil de choix pour l'étude spatio-temporelle de la cellule.

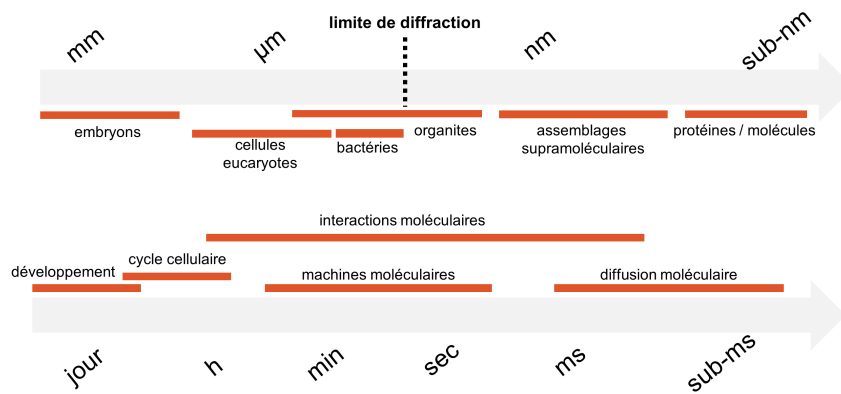


Figure 3.1 – Échelle de taille et de temps en biologie Adapté de [Liu et al., 2015]

3.1 Microscopie photonique et limites imposées par la diffraction de la lumière

Malgré les nombreuses innovations dans le domaine de l'optique en microscopie photonique, l'utilisation de la lumière pour la construction d'images impose des limites liées aux propriétés de ce rayonnement électromagnétique.

Au XIX^{ème} siècle, Ernst Abbe met en évidence l'importance de la diffraction de la lumière sur la résolution spatiale en microscopie photonique en champ lointain [Abbe, 1873]. La nature de la lumière impose que l'image d'un point lumineux au travers d'un système optique ne soit pas un point mais une tâche de diffraction dite tâche d'Airy. On définit la réponse impulsionnelle optique (ou fonction d'étalement du point, *point spread function* abrégé par la suite en PSF) comme le profil d'intensité de la tâche de diffraction (Figure 3.2). En pratique, seul le pic central de PSF est observé et est alors approximé par une gaussienne caractérisée par son amplitude a et sa largeur à mi-hauteur latérale s .

Au travers d'un système optique, deux objets sont dits résolus, s'il est possible de les distinguer sur l'image : ils respectent alors le critère de Rayleigh (voir Figure 3.2). La distance de Rayleigh appelée limite de séparation du microscope (notée δ) est donnée par l'équation suivante.

$$\delta = 0.61 \frac{\lambda}{(ON)} \quad (3.1)$$

avec λ la longueur d'onde de la lumière émise et ON l'ouverture numérique de l'objectif.

Pour un microscope d'ouverture numérique $ON=1.49$ et une longueur d'onde d'émission $\lambda=500$ nm (vert), la limite de séparation δ vaut environ 200 nm : la résolution est donc limitée à cette valeur en microscopie de fluorescence conventionnelle. L'observation des structures fines de la cellule (ultrastructure et assemblages supramoléculaires) est alors hors de portée (Figure 3.1).

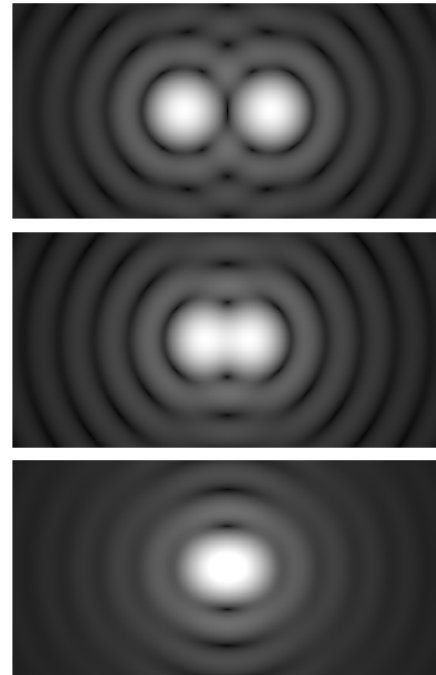


Figure 3.2 – Critère de Rayleigh et limite de résolution (Haut). les objets sont séparés par une distance latérale supérieure à la limite de séparation δ (distance de Rayleigh) du microscope, les deux tâches d'Airy ne se recouvrent pas : l'image est dite résolue. (Centre). les objets sont exactement séparés par une distance latérale égale à la limite de séparation : le critère de Rayleigh est atteint, les deux tâches d'Airy se recouvrent et les coordonnées du maximum d'une PSF coïncident avec les coordonnées du minimum de l'autre. (Bas). les objets sont séparés par une distance inférieure à la limite de séparation du microscope, le critère de Rayleigh n'est plus respecté, les tâches d'Airy se recouvrent largement : l'image est dite non résolue. *Source : Wikipédia*

Néanmoins, l'étude des constituants cellulaires nanométriques est possible grâce à l'utilisation de techniques de microscopie s'affranchissant de la lumière visible (microscopie électronique, résolution ~ 2 nm [Knoll and Ruska, 1932]) et microscopie aux rayons X, résolution ~ 30 nm [Kirkpatrick and Baez, 1948]). L'étude de cellules vivantes par ces techniques est néanmoins sévèrement compromise par le caractère ionisant des rayonnements utilisés. D'autre part, la faible spécificité de marquage limite l'utilisation de ces techniques à une étude structurale des échantillons. Au contraire, la microscopie de fluorescence basée sur le marquage hautement spécifique de macromolécules biologiques fournit une image fonctionnelle de la cellule.

Le développement récent de techniques de microscopie photonique approchant la résolution atteinte en microscopie électronique tout en conservant la spécificité du marquage fluorescent a ouvert la voie à l'investigation de la cellule à l'échelle nanoscopique sous microscope de fluorescence (microscopie de fluorescence super-résolution).

3.2 Microscopie de super-résolution

Les techniques de microscopie de fluorescence super-résolution constituent un ensemble varié de méthodes permettant de s'affranchir ou de contourner la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière. Les images obtenues permettent de distinguer deux objets séparés par une distance (de 10 à 100 nm) inférieure à la limite de séparation δ du microscope. On parle alors de microscopie de fluorescence sub-diffraction ou de nanoscopie de fluorescence.

Dans cette partie, nous mettrons l'accent sur les avantages et inconvénients respectifs des principales techniques de microscopie de fluorescence super-résolution (synthèse dans la Table 3.1, page 70).

3.2.1 Microscopie de super-résolution en champ proche

L'utilisation de la microscopie optique en champ proche pour s'affranchir de la limite imposée par la diffraction de la lumière a été proposée par E.H. Syngé dès 1928 [Syngé, 1928]. Cinquante ans plus tard seulement, les difficultés techniques de mise en place de ce système sont surmontées avec l'apparition des premiers microscopes optiques à balayage en champ proche (SNOM, *scanning near-field optical microscope*) [Betzig et al., 1987] et utilisés en tant qu'outil pour l'étude d'objets biologiques cinq ans plus tard [Betzig and Trautman, 1992].

En pratique, l'objet d'étude est balayé par une fibre optique utilisée à la fois comme source et récepteur de lumière (et dont le diamètre d'ouverture est inférieur à la longueur d'onde utilisée). La faible distance (~ 100 nm) entre la fibre et l'objet permet la collecte des ondes évanescentes de fluorescence plutôt que les ondes dispersées permettant ainsi de s'affranchir des effets de diffraction en champ lointain. L'image non limitée par la diffraction est obtenue après balayage de l'objet ce qui contraint alors à un temps de collecte long et limite donc l'utilisation du SNOM à l'étude d'événements peu dynamiques. La faible distance de propagation des ondes évanescentes (< 100 nm) restreint l'utilisation de cette technique à une étude de surface : la microscopie en champ lointain (abordée dans la partie suivante) permettent de s'affranchir de cette dernière contrainte.

3.2.2 Microscopie de super-résolution en champ lointain

Les techniques de microscopie de super-résolution en champ lointain permettent d'étudier les objets en volume. Dans les paragraphes qui suivent, nous décrivons l'ensemble des techniques de microscopie de super-résolution en champ lointain en mettant l'accent sur le comportement photophysique des fluorophores utilisés et sur les applications biologiques pour lesquelles elles sont le plus adaptées.

Microscopie d'illumination structurée champ large

La microscopie d'illumination structurée (*structured illumination microscopy*, SIM) est une technique de microscopie de super-résolution en champ lointain dont le pouvoir résolusif repose sur la récupération des hautes fréquences spatiales ne traversant pas l'optique du microscope. Grâce à la modification par interférence des fréquences spatiales émises par l'échantillon [Lukosz and Marchand, 1963], une résolution d'environ 100 nm peut être atteinte [Gustafsson, 2000]. L'image super-résolue est reconstruite à partir de données collectées sur un temps court, ce qui facilite l'étude de phénomènes dynamiques à l'échelle de la cellule, des tissus voire de l'organisme dans son entier. La reconstruction de l'image super-résolue nécessite cependant un traitement post-acquisition lourd ce qui rend cette méthode de microscopie super-résolution particulièrement sujette aux artéfacts.

Alors que l'utilisation de fluorophores conventionnels en SIM permet d'atteindre une résolution seulement 2 fois supérieure à celle de la microscopie conventionnelle, l'utilisation de protéines fluorescentes photomodulables¹ se comportant de manière non-linéaire sous illumination permet d'atteindre une résolution de 50 nm (SIM non-linéaire [Rego et al., 2012]).

En somme, la microscopie d'illumination structurée combine un pouvoir résolusif modéré à une haute résolution temporelle et est donc particulièrement adaptée à l'étude nanoscopique d'objets biologiques mobiles de taille importante.

Microscopie de super-résolution déterministe confocale

Les méthodes de microscopie de super-résolution déterministes reposent sur le balayage de l'échantillon par un patron d'illumination particulier permettant de moduler localement la PSF des fluorophores grâce à l'exploitation ingénieuse de leurs propriétés photophysiques. À la différence de la méthode d'illumination structurée, ces techniques nécessitent l'utilisation d'un microscope confocal et l'obtention d'une image par balayage compromet considérablement l'étude d'objets biologiques de taille importante (tissus, organismes). En revanche, à la différence du SIM, les images super-résolues sont obtenues sans traitement post-acquisition ce qui limite considérablement les artéfacts².

Dans les paragraphes suivants, nous présenterons deux techniques de microscopie de super-résolution confocales exploitant la réponse non linéaire des fluorophores à l'illumination (concept du RESOLFT, *reversible saturable optical linear fluorescence transitions*) : le STED et le GSD.

1. Du SIM non linéaire peut également être réalisé en exploitant les phototransformations de fluorophores conventionnels [Gustafsson, 2005]

2. En pratique, l'utilisation d'algorithmes de déconvolution (e.g. Richardson-Lucy) permet d'améliorer la qualité des images [Zanella et al., 2013]

Deplétion par émission stimulée (STED) Le principe du STED démontré en 1994 [Hell and Wichmann, 1994] n'a vu naître les premiers microscopes fonctionnels qu'en 2000 [Klar et al., 2000]. En pratique, l'échantillon est balayé par un faisceau de lumière d'excitation combiné à un faisceau torique de lumière de déplétion dont la longueur d'onde est choisie pour être en dehors de la gamme collectée pour la construction de l'image (Figure 3.3). Dans son état excité S_1 , le fluorophore suite à l'absorption d'un photon de déplétion retourne vers l'état fondamental S_0 par émission stimulée c'est-à-dire en émettant deux photons de même longueur d'onde que le photon absorbé plutôt qu'un photon unique par fluorescence dont la longueur d'onde se situe dans la gamme collectée. On définit l'intensité de saturation (I_{sat}) comme l'intensité de lumière de déplétion nécessaire à désexciter la moitié de la population de l'état excité S_1 par émission stimulée.

$$\delta = \frac{\lambda}{2.(ON).\sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}} \quad (3.2)$$

avec I l'intensité de déplétion appliquée au niveau de l'échantillon et I_{sat} l'intensité de saturation c'est-à-dire l'intensité nécessaire pour que 50% des molécules soient dans un état fluorescent et 50% dans un état sombre.

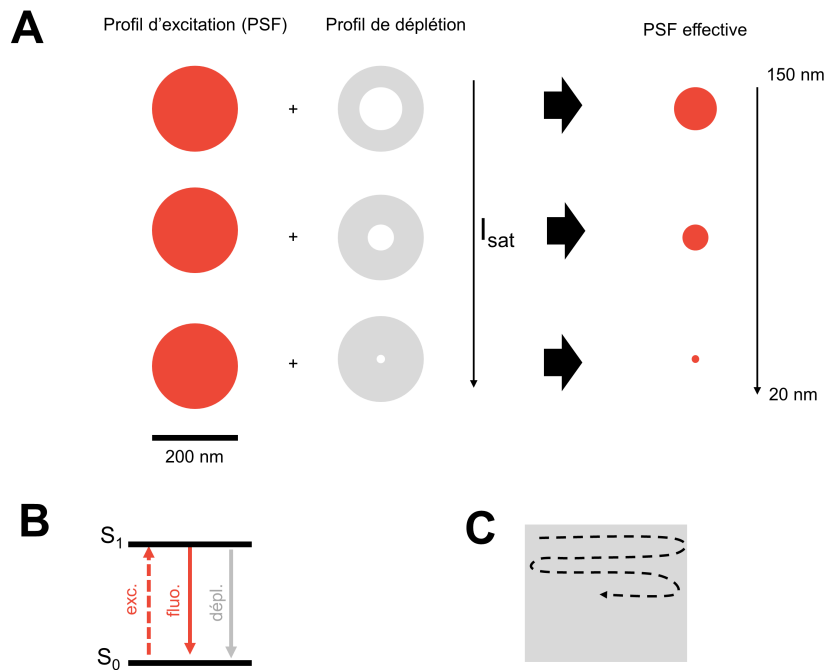


Figure 3.3 – Microscopie de super-résolution STED (A). L'utilisation conjointe d'un laser d'excitation gaussien et d'un laser de déplétion torique permet de réduire la taille de la PSF (profil de déplétion). La taille de la PSF effective obtenue est d'autant plus faible que l'intensité du laser de déplétion est forte (B). Diagramme de Jablonski du STED (exc. : excitation; fluo. : désexcitation par fluorescence; dépl. : désexcitation par émission stimulée) (C). L'image est obtenue par balayage de l'ensemble de l'échantillon.

D'après l'équation 3.2, la résolution est d'autant meilleure que l'intensité de déplétion (I) est forte ou que l'intensité de saturation (I_{sat}) est faible. L'intensité de saturation I_{sat} étant un paramètre intrinsèque au fluorophore et mal contrôlée, l'ingénierie de fluorophores à I_{sat} faible est actuellement limitée. Une résolution convenable en STED ne peut alors être atteinte que sous très forte intensité de lumière de déplétion ($MW.cm^{-2}$) à l'origine d'un photoblanchiment rapide des fluorophores et d'une phototoxicité importante [Eggeling et al., 1998] [Eggeling et al., 2013].

Déplétion par peuplement d'un état sombre (GSD) Alors qu'un gain important de résolution par microscopie STED nécessite l'utilisation d'une intensité de laser de déplétion importante, les techniques de microscopie de super-résolution GSD (*ground state depletion*) exploitant les états sombres des fluorophores repose sur une illumination plus « douce ». Grâce à l'exploitation des propriétés de photocommutation/scintillement des états sombres des fluorophores organiques (Cy3 et Alexa647 [Kwon et al., 2015]) et protéines fluorescentes photocommutables (rsEGFP2 [Grotjohann et al., 2012], asFP595 [Hofmann et al., 2005] [Schwentker et al., 2007])³, la PSF peut être modélisée en utilisant un faisceau torique de lumière actinique d'intensité modérée. Le succès de la microscopie RESOLFT repose sur l'utilisation de fluorophores présentant un excellent contraste de photocommutation c'est-à-dire pour lesquels un faible nombre de photons est suffisant pour envoyer (et à maintenir) les fluorophores dans leur état sombre. À l'image de l'émission stimulée, on définit l'intensité de saturation I_{sat} comme l'intensité de lumière actinique nécessaire à maintenir la moitié de la population de fluorophore dans leur état sombre. L'intensité de saturation est, dans ce cas, nettement inférieure à celle définie pour l'émission stimulée. D'après l'équation 3.2, une bonne résolution peut alors être atteinte à faible intensité d'illumination.

Actuellement, de nombreux fluorophores photocommutables/scintillants sont exploitables en GSD. Étant donné que l'image est obtenue par balayage (*i.e.* chaque point de l'échantillon n'est observé que pour un temps court de l'ordre de la μs -ms), l'utilisation de fluorophores à états sombres de court temps de vie est satisfaisante. En particulier, les fluorophores à états sombres de type états triplets (temps de vie de l'ordre de la ms) sont adaptés à l'obtention d'images super-résolues en GSD.

En somme, les techniques de permet, grâce à l'exploitation ingénieuse des propriétés de phototransformation des fluorophores (scintillement ou photocommutation), d'atteindre une résolution similaire au STED en s'affranchissant nettement des effets phototoxiques. Néanmoins, comme pour le STED, cette méthode confocale limite considérablement l'étude de larges régions avec une bonne résolution temporelle⁴. À la différence du SIM, le STED et le GSD sont des techniques mal adaptées aux questions biologiques dynamiques à l'échelle cellulaire et tissulaire (suivi en temps réel compromis et remplacé par de la chronocinématographie (*time lapse imaging*) et sont préférées pour l'étude d'objets biologiques de petite taille pour lesquels une bonne résolution est souhaitable.

3. Une distinction sémantique est envisageable entre techniques RESOLFT exploitant les propriétés de scintillement de fluorophores organiques (GSD *sensu stricto*) et les techniques de RESOLFT exploitant la photocommutation de protéines fluorescentes photocommutables (RESOLFT avec RSFPs, abusivement appelé RESOLFT).

4. Récemment, le groupe de Stefan Jakobs a obtenu par RESOLFT des images super-résolues (60 nm) de larves de *Drosophiles* vivantes [Schnorrenberg et al., 2016]. La résolution temporelle ne permet cependant que la collecte d'une image toutes les 230 s environ lorsque la surface de la région étudiée devient importante (chronocinématographie (*time lapse*))

Microscopie super-résolution par localisation de molécules uniques en champ large (SMLM)

Généralités En 1932, Heisenberg énonce qu'un fluorophore peut être précisément localisé à partir de sa PSF en se basant sur le centre de sa réponse impulsionnelle optique plutôt que sur la largeur [Heisenberg, 1932]. La position (x, y) d'un fluorophore isolé émettant 10^4 photons peut être connue avec une précision (σ) de l'ordre du nanomètre grâce à l'ajustement de sa PSF par une gaussienne (équation 3.3).

$$\sigma = \frac{s}{\sqrt{N}} \sim \frac{200 \text{ nm}}{\sqrt{10^4}} \sim 2 \text{ nm} \quad (3.3)$$

avec N le nombre de photons et s la largeur à mi-hauteur de la PSF.

Plus exactement, la précision de localisation est donnée par l'équation 3.4 [Mortensen et al., 2010] [Betzig et al., 2006]. En pratique, une précision de localisation de l'ordre de 10 à 50 nm est atteinte selon les techniques de microscopie utilisées.

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{s^2 + a^2/12}{N}\right)\left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi s^2 b^2}{a^2 N}\right)} \quad (3.4)$$

avec N le nombre de photons émis par la molécule, s et a respectivement la largeur à mi-hauteur latérale et l'amplitude de la PSF et b le bruit de fond.

À la fin des années 1980, la dynamique spatiale des kinésines est étudiée avec une précision nanométrique par microscopie de localisation [Gelles et al., 1988]. Plus tard, les techniques d'imagerie de fluorescence à précision nanométrique (FIONA, *fluorescence imaging with one nanometer accuracy*, FIONA) [Selvin et al., 2007] se développent et deviennent particulièrement utilisées pour l'étude de moteurs moléculaires [Yildiz and Selvin, 2005]. Elles restent néanmoins limitées à l'étude d'objets biologiques dans des contextes où la densité moléculaire ou de marquage reste faible (*e.g. in vitro*).

L'estimation précise de la position des fluorophores par microscopie de fluorescence au sein d'environnements où la densité moléculaire est forte (*e.g. in cellulose*) devient alors compliquée⁵. Une parade efficace permettant de conserver une bonne précision malgré la densité moléculaire forte à l'origine d'un recouvrement des PSFs consiste en l'observation « tour à tour » des fluorophores situés dans un même volume limité en diffraction

Échantillonnage et résolution La résolution atteinte en SMLM est, d'après le théorème de Nyquist-Shannon [Nyquist, 1928], significativement affectée par l'échantillonnage (fraction de fluorophores localisés) (Figure 3.5) [Huang et al., 2009]. Une distance d'échantillonnage critique de Nyquist (notée $\Delta_{Nyquist}$) égale à la moitié de la résolution désirée est nécessaire pour atteindre ce pouvoir résolusif. D'après l'équation 3.5, une résolution de l'ordre de 20 nm n'est atteinte que dans le cas où la densité de marquage dépasse 10^4 fluorophores par μm^2 (et que tous ces fluorophores sont localisés).

$$\Delta_{Nyquist} = \frac{2}{N^{1/D}} = \frac{1}{2}\delta \quad (3.5)$$

5. Lorsque la densité moléculaire est modérée, il est possible de conserver une bonne précision de localisation lorsque la population de fluorophores est hétérogène et en se basant sur une discrimination spectrale [Bornfleth et al., 1998] ou du temps de vie de fluorescence [Heilemann et al., 2002] des émetteurs ne respectant pas le critère de Rayleigh.

avec $\Delta_{Nyquist}$ le taux Nyquist d'échantillonnage, N la densité de marquage (en fluorophores par μm^2 ou fluorophores par μm^3), D la dimension de la structure étudiée (2 ou 3) et δ la résolution.

La qualité des images reconstruites par microscopie de localisation est donc affectée par de nombreux paramètres liés au marquage et à l'échantillonnage. Ces aspects seront abordés en détails dans la section 5.1 du Chapitre 5 de la Partie II (page 93).

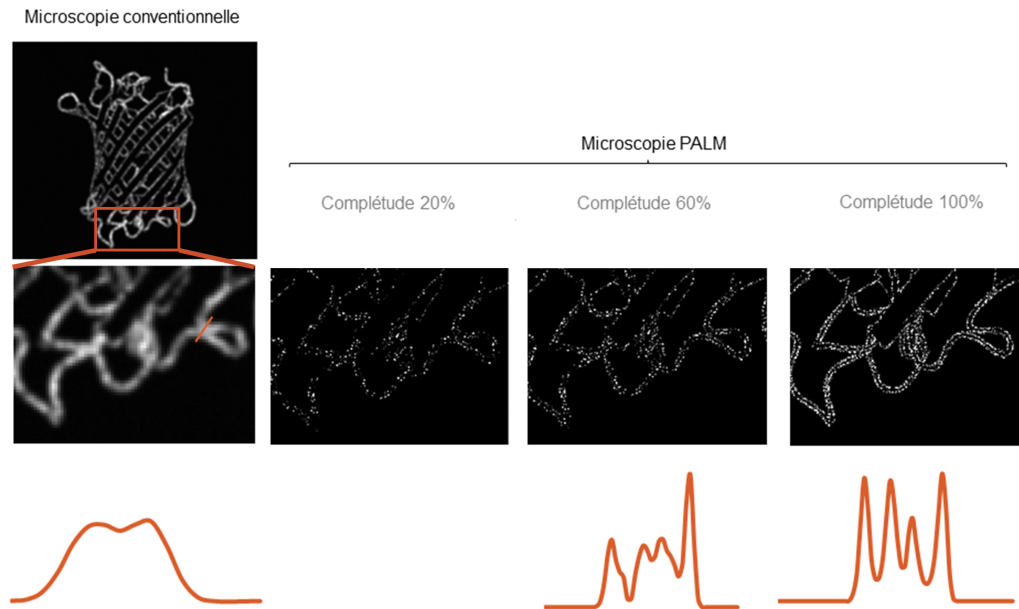


Figure 3.4 – Effet de la densité de marquage sur la résolution spatiale en PALM (Nyquist) Des jeux de données simulés dans lesquels des molécules sont positionnées sur un patron représentant la structure 3D de mEos2 ont été générés avec une complétude de photoconversion variant de 20 à 100%. Un profil le long d'une boucle est représenté en rouge. Lorsque la photoconversion est complète, la densité est telle que le profil le long de la boucle est précis

Microscopie de super-résolution basée sur le photoblanchiment La technique de microscopie de super-résolution SHRIMP (*Single-Molecule High-Resolution Imaging with Photobleaching* [Gordon et al., 2004]) est une technique de SMLM basée sur le photoblanchiment séquentiel de fluorophores ne respectant pas le critère de Rayleigh. Considérons deux fluorophores séparés par une distance inférieure à la limite de séparation δ du microscope (recouvrement partiel des PSFs gênant la localisation précise). Statistiquement, à un temps donné, seule une des deux molécules photoblanchit sous illumination (Figure 3.5). Il est alors possible, non seulement, de localiser avec précision la molécule restante (PSF isolée et donc ajustable) mais également la molécule photoblanchie par soustraction

du signal post-blanchiment au signal pré-blanchiment (Figure 3.5)⁶. Cette méthode ne requiert pas l'utilisation de fluorophores photomodulables et permet donc d'exploiter l'intégralité de la bibliothèque de fluorophores disponibles. Néanmoins, cette méthode lente et peu performante nécessite un traitement post-acquisition lourd pour la reconstruction des images super-résolues et reste limitée à l'étude d'échantillons pour lesquels la densité moléculaire reste faible.

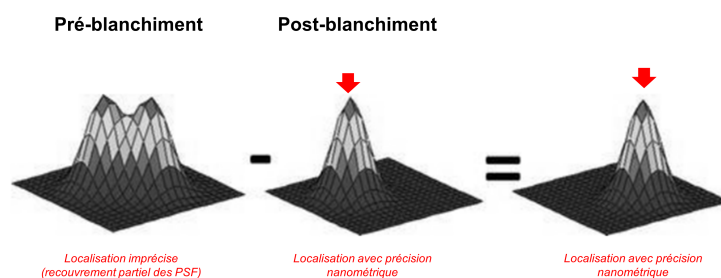


Figure 3.5 – Microscopie de super-résolution par photoblanchiment (SHRIMP) (A). Deux molécules sont séparées par une distance ne permettant pas leur localisation avec une précision nanométrique (B). Après photoblanchiment d'une des deux molécules, la PSF isolée de la molécule restante permet de déterminer sa position avec une précision nanométrique (C). La position de la molécule photoblanchie est déterminée avec précision suite à la soustraction du signal post-blanchiment au signal pré-blanchiment. Modifié d'après [Gordon et al., 2004]

Microscopie super-résolution basée sur la photocommutation et le scintillement : dSTORM et GSDIM

À la différence du RESOLFT pour lequel la photocommutation est induite localement par un patron d'illumination torique, la photocommutation/scintillement dans le cadre de la microscopie de localisation est induite stochastiquement sur l'ensemble du champ de vue. En pratique, en combinant lumière d'excitation et lumière actinique une grande majorité des fluorophores sont maintenus dans un état sombre et reviennent rarement et stochastiquement vers un état fluorescent.

En pratique, pour chaque image collectée, seuls quelques fluorophores éparses répartis aléatoirement émettent de la lumière et sont alors localisés avec une précision nanométrique (Figure 3.2). Ces fluorophores dans un état *on* fluorescent sont ensuite stochastiquement de nouveau envoyés dans un état sombre (et seront plus tard localisés lors d'une nouvelle transition *off* → *on*) ou dans un état photoblanchi. La collecte de nombreuses images limitées en diffraction permet la reconstruction d'une image super-résolue par accumulation des localisations à l'image d'une œuvre pointilliste.

En pratique une résolution macromoléculaire (dizaines de nm) est atteinte avec ces méthodes qui permettent alors de distinguer deux objets séparés par une distance minimale égale à trois fois la précision de localisation (3σ).

À la différence des fluorophores utilisés en RESOLFT dont les temps de vie peuvent être courts, les fluorophores photomodulables utilisés en dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy* [van de Linde et al., 2011b]) et en GSDIM (*ground state depletion with single molecule*

6. Des méthodes similaires au SHRIMP ont été développées afin d'atteindre une résolution inférieure à la limite imposée par la diffraction de la lumière (NALMS *nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy* [Qu et al., 2004] et BaLM *Bleaching/blinking associated Localization Microscopy* [Burnette et al., 2011], entre autres).

return [Testa et al., 2010]) doivent présenter un temps de vie de l'état *off* particulièrement long dans les conditions d'illumination afin que la majorité de la population soit la plupart du temps dans un état non fluorescent. Les états sombres de court temps de vie ne peuvent alors pas être exploités pour contourner la limite de résolution. L'utilisation de cocktails chimiques prolongeant le temps de vie des états sombres des fluorophores organiques (Vectashield par exemple [Olivier et al., 2013]) permet en parallèle d'améliorer la qualité des images super-résolues dSTORM.

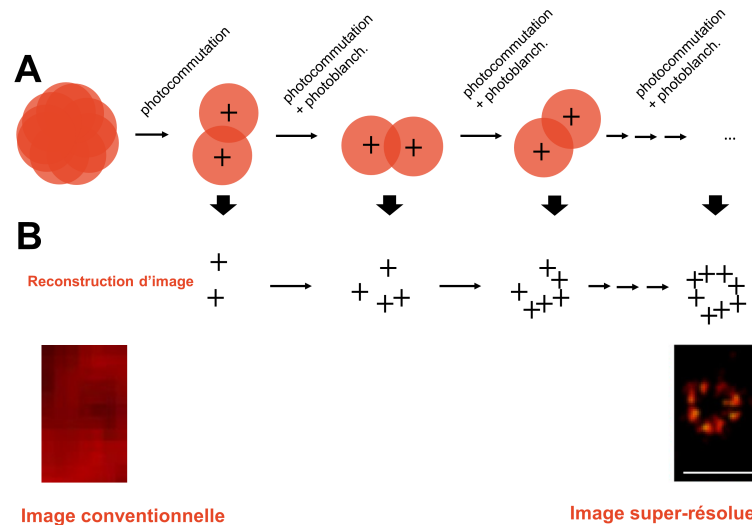


Figure 3.6 – Microscopie de super-résolution par photocommutation stochastique (dSTORM) (A). Initialement tous les fluorophores marquant les protéines gp120 du pore nucléaire émettent simultanément. Il n'est alors pas possible de localiser précisément chaque molécule. Les détails du complexe ne peuvent être étudiés. Sous illumination, la majorité des fluorophores sont photocommutés dans un état sombre sauf quelques rares fluorophores qui peuvent alors être localisés avec une précision nanométrique (croix noires). En répétant ces cycles de photocommutation/photoblanchiment de nombreuses fois, il est alors possible de reconstruire une image pointilliste du complexe (B). L'image alors obtenue n'est plus limitée en diffraction. Barre d'échelle : 250 nm. Modifié d'après [Löschberger et al., 2012].

Généralement, le dSTORM repose sur l'utilisation de fluorophores organiques, ce qui limite fortement l'observation de cellules vivantes (contraintes liées à l'immunomarquage (voir section 1.4, page 18 *sqq.*) et à l'utilisation de cocktails chimiques de contrôle du scintillement (agents réducteurs à thiols [Dempsey et al., 2011] [Heilemann et al., 2009] [Heilemann et al., 2008]; vitamine C [Benke and Manley, 2012]; phosphine [Vaughan et al., 2013]; monoéthanolamine MEA [Altman et al., 2012]; cocktail consommant l'oxygène moléculaire [van de Linde et al., 2011c])). La découverte récente de l'effet pro-scintillement des thiols et des composés à activité redox (glutathione) intracellulaires suggère un avenir brillant pour le dSTORM en cellules vivantes [Wombacher et al., 2010] [Klein et al., 2011]. Le développement récent de fluorophores scintillants spontanément [Uno et al., 2014] vient donner du crédit à la proche démocratisation du dSTORM en cellules vivantes.

Microscopie super-résolution basée sur la photoconversion et photo-activation : PALM Alors qu'en règle générale le dSTORM permet l'exploitation de la bibliothèque de fluorophores organiques et reste alors cantonné -le plus souvent- à l'étude de cellules fixées, la microscopie PALM (*photoactivated localization microscopy* [Betzig et al., 2006] [Hess et al., 2006]) grâce à un marquage endogène à l'aide de protéines fluorescentes photomodulables est une alternative performante pour l'étude nanométrique de cellules vivantes⁷. La barrière de résolution imposée par la diffraction de la lumière est contournée en observant « tour à tour » des protéines fluorescentes photoconvertibles ou photo-activables⁸ suite à leur activation au cours du temps.

En pratique, en présence d'une lumière actinique de phototransformation de très faible densité de puissance, la plupart des fluorophores résident dans leur état natif et quelques uns -formant un ensemble éparse- passent stochastiquement dans leur forme photo-activée/photoconvertie. Il est alors possible de localiser ces fluorophores avec une précision nanométrique (équation 3.4). Un nouveau sous-ensemble est ensuite observé après photoblanchiment des fluorophores précédemment activés et activation de nouveaux fluorophores. La collecte de nombreuses images permet, à l'image du dSTORM, la reconstruction d'une image pointilliste super-résolue (Figure 3.7).

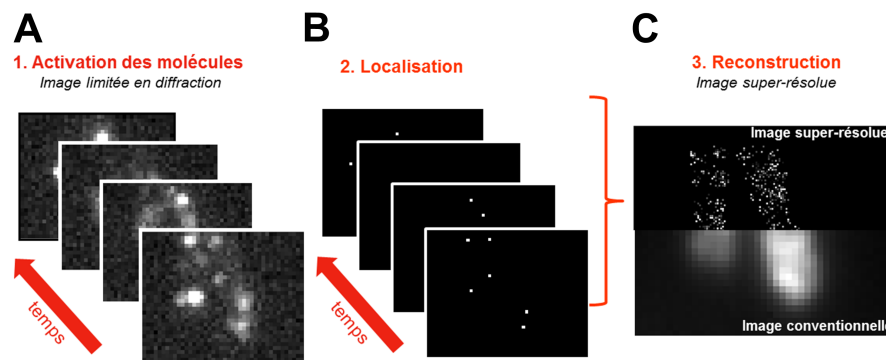


Figure 3.7 – Microscopie de localisation après photoactivation (PALM) Obtention d'une image super-résolue de bactérie *E. coli* exprimant la protéine photoconvertible mEos2 libre dans le cytoplasme. A. Des images limitées en diffraction d'un sous-ensemble éparse de la population de mEos2 ayant été photoconvertie par lumière violette (405 nm) sont collectées au cours du temps B. Sur chaque image, les PSF des molécules uniques sont ajustées par une gaussienne (localisation) permettant de connaître la position (x, y) de chaque molécule au cours du temps avec une précision σ . L'ensemble des localisations sont compilées en une image reconstruite super-résolue. Sur cette image, les molécules séparées par une distance supérieure à 3 fois la précision de localisation σ sont résolues à la différence de la même image obtenue par microscopie de fluorescence conventionnelle où tous les fluorophores émettent en même temps.

En pratique, à l'image du dSTORM, une résolution proche de celle obtenue en microscopie électronique à transmission (résolution macromoléculaire, Figure 3.8) est atteinte en PALM (environ 20-30

7. Malgré le potentiel de la microscopie PALM pour l'étude de cellules vivantes, ses applications restent en pratique généralement cantonnées à l'étude de cellules fixées. En effet, de nombreux éléments viennent compliquer l'obtention d'images super-résolues de cellules vivantes par microscopie PALM, notamment l'incompatibilité entre la mobilité de ces objets biologiques et le temps nécessaire à la collecte des données.

8. Historiquement, la microscopie PALM se réfère à l'utilisation de PCFPs et de PAFPs. On parle aujourd'hui abusivement de microscopie PALM lorsque des protéines fluorescentes photocommutables (e.g. mGeos [Wang et al., 2014b]) sont utilisées.

nm) dans les conditions idéales (fort rapport signal/bruit, faible dérive de l'échantillon et échantillonnage correct entre autres). À l'image du dSTORM, des objets séparés par moins de 3σ (soit $\sim 60-150$ nm) ne peuvent être distingués. Les assemblages moléculaires de taille inférieure (*e.g.* oligomères de protéines dont la taille n'excède généralement pas 10 nm) ne peuvent alors pas être résolus par cette méthode. Nous verrons dans la Partie suivante les stratégies actuelles en microscopie PALM qui permettent d'extraire des informations concernant les oligomères protéiques de taille inférieure à 10 nm et quelles sont les difficultés rencontrées lors de cet exercice.

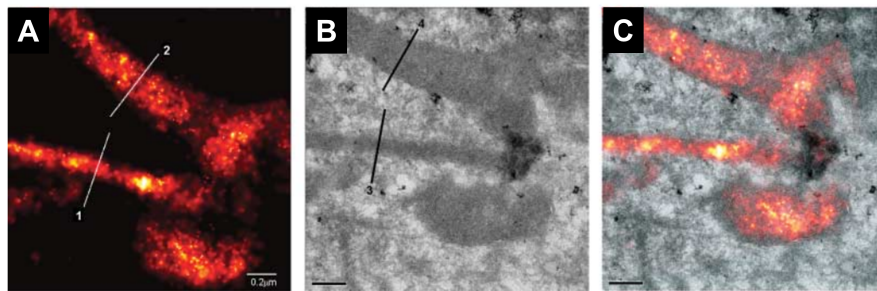


Figure 3.8 – Comparaison microscopie électronique à transmission et microscopie PALM (A). Image PALM reconstruite de la cytochrome C oxydase (protéine mitochondriale) marquée avec la protéine fluorescente dEosFP en cellule COS-7 (B). Image en microscopie électronique à transmission de la même cellule (C). Superposition de (A) et (B). D'après [Betzig et al., 2006].

En somme, malgré leur résolution macromoléculaire, les approches de microscopie super-résolution PALM/dSTORM pointillistes sont peu adaptées à l'étude d'événements dynamiques rapides, étant donnée que la reconstruction d'une image de qualité requiert une immobilité de l'échantillon à l'échelle du temps de collecte. Le plus souvent, l'échantillon est alors chimiquement fixé. Cependant, les artefacts induit par les fixateurs chimiques (glutaraldéhyde ou para-formaldéhyde), notamment les modifications de l'ultrastructure cellulaire⁹ exhorte à relever à l'avenir le défi de la microscopie de localisation en cellules vivantes.

Malgré les nombreuses applications actuelles de la microscopie PALM en cellules vivantes (étude du cytosquelette (bactérien [Niu and Yu, 2008a] ; eucaryote [Tatavarty et al., 2009]), des protéines membranaires [Heidbreder et al., 2012] ou des protéines diffusibles dans le cytoplasme (protéines virales [Manley et al., 2008]), les effets cytotoxiques liés à l'utilisation d'une lumière actinique violette de haute énergie constituera sans doute à l'avenir un obstacle au développement du PALM en cellules vivantes [Ramakrishnan et al., 2016].

La démocratisation du PALM dans le futur et sa robustesse pour répondre à des questions biologiques toujours plus exigeantes (quantification, pistage / échantillons épais, échantillons dynamiques) repose non seulement sur les développements optiques innovants (*e.g.* feuillet de lumière [Hu et al., 2013], optique adaptative [Booth et al., 2015], entre autres) mais également sur l'optimisation des protéines

9. Par exemple, des concentrations supérieures ou égales à 4% de PFA modifient profondément l'ultrastructure des mitochondries [Schnell et al., 2012].

fluorescentes photomodulables (en particulier dans le cadre de cette thèse à l'optimisation des PCFPs) utilisées comme marqueurs. L'ingénierie de protéines fluorescentes à haut budget de photons et à efficacité de phototransformation optimale (e.g. photoconversion rapide et complète) devrait permettre la collecte d'image PALM de qualité dans des contextes actuellement à la limite de ce qui est observable en microscopie de localisation.

Microscopie de super-résolution par corrélation des fluctuations temporelles de fluorescence (SOFI)

La microscopie de super-résolution par corrélation des fluctuations temporelles de fluorescence (*super-resolution optical fluctuations imaging*, SOFI) permet une amélioration d'un facteur 2 de la résolution en champ large grâce à l'analyse par auto-corrélation des fluctuations stochastiques (scintillement ou photocommutation) de la fluorescence émise par l'échantillon au cours du temps [Dertinger et al., 2010]. Alors que la résolution des méthodes basées sur la localisation des fluorophores (PALM, dSTORM) est sévèrement limitée dans le cas où plusieurs fluorophores émettent simultanément dans un même volume limité en diffraction, le SOFI en ne se reposant pas sur la localisation de molécules uniques permet de s'affranchir de cette contrainte.

Considérons 2 fluorophores situés dans les pixels notés $i+1$ et $i-1$ et séparés par un pixel noté i . Les deux fluorophores dans les pixels adjacents au pixel i contribuent aux fluctuations d'intensité de ce pixel au cours du temps dans l'image conventionnelle. Les fluctuations d'intensité des deux fluorophores étant stochastiques et indépendantes, les fluctuations d'intensité du pixel i sont alors faiblement corrélées. Le cumulants de $n^{\text{ième}}$ ordre (grandeur associée à la fonction d'auto-corrélation du $n^{\text{ième}}$ ordre) de chaque pixel de l'image permet de ne conserver que ceux fortement corrélés (i.e. les pixels contenant un fluorophore) et d'écarter ceux faiblement corrélés (i.e. les pixels ne contenant pas de fluorophore). Un gain de résolution de \sqrt{n} est obtenu lors de l'utilisation de fonctions d'auto-corrélation d'ordre n (en pratique, seul le cumulants de 4ème ordre est utilisé limitant la résolution autour de 100 nm).

Table 3.1 – Vue synoptique des techniques de microscopie super-résolution (modifié d'après [Schermelleh et al., 2010] et [Godin et al., 2014])

	Champ proche		Champ lointain			
	SNOM	SIM	Techniques déterministes confocales (RESOLFT)		Techniques stochastiques champ large (localisation)	
			STED	GSD	dSTORM	PALM
Principe	Scanning Near-field Optical Microscopy Balayage de sonde à petite ouverture	Structured Illumination Microscopy Illumination structurée (effet Moiré)	STimulated Emission Depletion Modélage de la PSF par illumination hétérogène et déplétion d'émission stimulée	Ground state depletion Modélage de la PSF par illumination hétérogène et photocommutation	STochastic Optical Reconstruction Microscopy Localisation résolue en temps de molécules uniques (pointillisme)	PhotoActivated Localization Microscopy Localisation résolue en temps de molécules uniques (pointillisme)
Densité de puissance de l'illumination	Faible	Moyenne (W/cm ²)	Très forte (MW/cm ²)	Forte (W/cm ² à kW/cm ²)	Forte (W/cm ² à kW/cm ²)	Forte (W/cm ² à kW/cm ²)
Détection	Avalanche à photodiodes	Caméra CCD champ large	Avalanche à photodiodes	Avalanche à photodiodes	Caméra CCD champ large	Caméra CCD champ large
Résolution latérale	20-120 nm	100-130 nm (50 nm en non linéaire)	20-100 nm	80-100 nm	20-50 nm	20-50 nm
Résolution temporelle	s-min	ms-s	ms-min	ms-min	s-min	s-min
Fluorophore	Tous	Fluorophores organiques (e.g. Alexa Fluor) ou protéines fluorescentes (e.g. EGFP) photostables et brillantes	Fluorophores organiques (e.g. ATTO, Rhodamine) ou protéines fluorescentes (Citrine) photostables	Fluorophores organiques scintillants (e.g. Alexa Fluor 647, Cy 3/5) ou protéines fluorescentes photocommutables (e.g. rsEGFP)	Fluorophores organiques (e.g. Alexa Fluor, Cy 3/5) ou protéines fluorescentes photocommutables à long temps <i>off</i> (e.g. rsEGFP)	Protéines fluorescentes photoconvertibles, photoactivables (e.g. PAGFP, PA mCherry) ou photocommutables à long temps <i>off</i> (e.g. mGeos)
Imagerie de cellules vivantes	Oui	Oui	Limité (phototoxicité)	Limité (phototoxicité)	Limité (souvent cellules fixées + traitement chimique)	Limité (cellules peu dynamique)
Imagerie multicolore	2	3-4	2	2	3	2
3D	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Traitement post-acquisition	Aucun	Reconstruction d'image (transformée de Fourier)	Aucun (déconvolution éventuellement pour réduire les artefacts)	Aucun (déconvolution éventuellement pour réduire les artefacts)	Localisation et reconstruction	Localisation et reconstruction
Avantages	Informations topographiques sur l'échantillon	Construction d'image rapide sur de grande régions / Peu invasif / Peu de restriction de marquage	Très peu sensible aux artefacts (pas de reconstruction d'image) / Résolution modulable	Très peu sensible aux artefacts (pas de reconstruction d'image) / Résolution modulable	Résolution macromoléculaire	Résolution macromoléculaire / Compatible cellules vivantes / Compatible suivi de particules uniques et comptage moléculaire
Inconvénients	Imagerie de surface uniquement / Mal adapté aux échantillons mous / Lent / Système fragile	Sensible aux artefacts de reconstruction	Photoblanchiment important / Phototoxicité / Construction de l'image par balayage (lent)	Construction de l'image par balayage (lent)	Sensible à la densité de marquage et d'échantillonnage / Lent / Souvent limité aux cellules fixées	Sensible à la densité de marquage et d'échantillonnage / Lent
Applications biologiques	Mal adapté	Échantillons vivants et dynamiques (cellules eucaryotes, tissus, embryons)	Structures de petites tailles (bactéries, assemblages supra-moléculaires)	Structures de petites tailles (bactéries, assemblages supra-moléculaires)	Cellules faiblement mobiles / Microbiologie / Biologie cellulaire eucaryote	Cellules faiblement mobiles / Microbiologie / Biologie cellulaire eucaryote

3.3 Microscopie PALM avancée

Depuis 20 ans, des efforts considérables ont été menés afin de développer des techniques de microscopie combinant une excellente résolution temporelle (ms) et spatiale (dizaines de nm) sur un champ d'observation large (plusieurs dizaines de μm). La microscopie de localisation PALM connaît aujourd'hui un essor remarquable en biologie cellulaire et son utilisation se démocratise comme en témoigne les nombreuses applications en cellules fixées ou vivantes, 2D ou 3D, simple ou multiple couleurs. L'attrait croissant pour la microscopie PALM s'explique notamment par ses nombreuses applications avancées que nous allons maintenant présenter.

3.3.1 Microscopie super-résolution multi-couleurs et 3D

Multi-couleurs

L'utilisation de protéines fluorescentes conventionnelles spectralement distinctes permet l'étude des relations spatiales entre macromolécules (microscopie multi-couleurs). La complexité des relations entre protéines, notamment l'organisation en clusters de taille inférieure à la limite de séparation δ , limite fortement l'utilisation de la microscopie de fluorescence conventionnelle. La large bibliothèque de PCFPs et de PAFPs actuellement disponibles permet de surmonter cet obstacle grâce à la microscopie PALM deux-couleurs¹⁰. La microscopie PALM deux-couleurs se base -en général- sur l'utilisation dans le canal vert d'une protéine fluorescente verte photo-activable (PA-GFP), photoconvertible cyan à vert (PS-CFP) ou photocommutable (mGeos) et dans le canal rouge d'une PCFP vert à rouge (série Dendra, série Eos, KikGR, Kaede) ou d'une PAFP rouge (PAmCherry).

En général, l'imagerie des deux canaux de fluorescence est séquentielle. Le canal rouge est d'abord imagé de manière exhaustive si bien que les PCFPs vert à rouge n'existent plus sous leur forme verte au moment d'imager les protéines fluorescentes photocommutables vertes. La photophysique complexe des protéines fluorescentes utilisées (notamment la photoconversion incomplète) est susceptible d'introduire des artefacts de colocalisation (voir Partie II, Chapitre 5, page 93). En pratique, il a été montré, par exemple, que la contamination par la forme verte de mEos2 lors de l'imagerie de

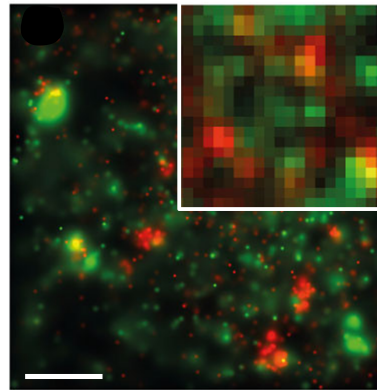


Figure 3.9 – Microscopie PALM deux-couleurs Image reconstruite PALM d'une cellule HeLa sous illumination TIRF exprimant le récepteur β_2 adrénergique en fusion avec la PCFP cyan à vert PS-CFP2 et le récepteur couplé à une protéine GPCR en fusion avec la PAFP rouge PAmCherry1. L'image obtenue en microscopie conventionnelle est présentée dans le coin droit haut. Barre d'échelle : $1\mu\text{m}$. Modifié d'après [Annibale et al., 2012].

¹⁰. Par soucis de simplification, on parlera de PALM deux-couleurs plutôt que de PALM/dSTORM deux-couleurs lorsqu'une protéine fluorescente photocommutable (Dronpa, mGeos) est utilisée dans le canal vert.

Dronpa dans le canal vert est négligeable [Shroff et al., 2007].

La microscopie PALM deux-couleurs séquentielle est particulièrement inadaptée à l'étude d'échantillons mobiles (e.g. cellules vivantes). L'ingénierie de nouvelles protéines fluorescentes photomodulables combinée au développement de techniques de discrimination spectrale a permis d'ouvrir la voie à la microscopie PALM multi-couleurs simultanée¹¹ [Gunewardene et al., 2011].

Microscopie PALM 3D

Les grandes capacités résolutive 2D de la microscopie PALM ont rapidement été étendues à la troisième dimension (3D). De nombreuses méthodes ont été développées afin de déterminer avec une précision nanométrique la position le long de l'axe z des fluorophores. Notamment, l'utilisation d'une lentille cylindrique astigmatique modifie la PSF des fluorophores en introduisant un trait particulier dépendant de leur position z [Huang et al., 2008]. L'analyse fine de la PSF permet alors non seulement la localisation dans le plan (x,y) mais également selon l'axe z. Grâce à la microscopie de super-résolution PALM 3D de nombreuses questions biologiques peuvent alors être abordées non plus selon un plan mais en volume. La microscopie de localisation 3D reste néanmoins limitée à l'étude d'objets peu épais (quelques μm d'épaisseur).

3.3.2 Comptage moléculaire

Au delà des approches morphologiques, les avancées en biologie cellulaire doivent énormément aux approches quantitatives visant à estimer le nombre de molécules par compartiment cellulaire ou encore la stœchiométrie d'oligomères protéiques. Dans les paragraphes suivants, nous présenterons les différentes techniques de comptage moléculaire en insistant sur leurs avantages et inconvénients respectifs.

Mesure du nombre de copies d'une protéine Historiquement, la mesure du nombre de copies de protéines au sein d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire a longtemps été réalisée par extraction et purification des protéines d'intérêt suivi d'une quantification par Western blot [Rudolph et al., 1999]. Les méthodes de quantification par spectrométrie de masse offrent aujourd'hui une plus grande précision mais obligent encore à une étude *ex situ* [Kirkpatrick et al., 2005].

La quantification des protéines *in situ* (c'est-à-dire directement dans la cellule) a été rendu possible grâce au développement des techniques de cytométrie en flux. Ces méthodes relativement sensibles permettent de mesurer de faibles concentrations (minimum de 800 molécules) [Truneh and Machy, 1987] à l'image de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [Meyer and Schindler, 1988]. Le comptage par FCS reste néanmoins limité à la quantification de protéines à concentrations nanomolaires et hautement dynamiques. Alors que l'ensemble de ces méthodes ne permettent pas de combiner quantification et localisation ultracellulaire des protéines d'intérêt, les méthodes de FCS sous microscope confocal (méthode de nombre et brillance *Number and Brightness*, N&B) [Dalal et al., 2008] sont un moyen élégant d'accéder simultanément aux deux paramètres.

11. En combinant trois protéines fluorescentes à spectres d'émission partiellement recouvrants (Dendra2 (orange), PAmCherry (rouge) et PAmKate (rouge lointain)) et en application des méthodes de déconvolution, les travaux de Gunewardene et al. ont abouti à l'obtention par microscopie PALM trois-couleurs d'un fibroblaste vivant.

Mesure de la stœchiométrie d'oligomères protéiques De nombreuses méthodes sophistiquées permettent d'estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques *ex situ* (chromatographie d'exclusion de taille et diffraction de rayons X aux petits angles (*small-angle X-ray scattering*, SAXS), entres autres). L'oligomérisation pouvant être affectée par les conditions physico-chimiques, ces méthodes peuvent être à l'origine de conclusions erronées dans la mesure où la stœchiométrie est estimée dans un environnement sensiblement différent du cytoplasme. Il est alors souhaitable de s'appuyer sur des méthodes permettant l'estimation de la stœchiométrie *in situ*.

Dans les paragraphes suivantes, nous présenterons les techniques de comptage moléculaire par microscopie.

Méthodes de comptage par mesure d'intensité et calibration

Sous microscope photonique, le nombre de copies d'une protéine d'intérêt [Taniguchi et al., 2010] et la stœchiométrie d'oligomères marqués [Fricke et al., 2015] peuvent être estimés *in cellulo* à partir de la mesure du nombre de photons émis (Figure 3.10 A et B). Grâce à une courbe de calibration construite à partir d'un standard dont la concentration peut être précisément connue et reliant le nombre de photons émis au nombre de protéines fluorescentes présentes, il est possible de compter. La justesse de la courbe de calibration est un des facteurs limitants du comptage moléculaire par ces méthodes. Le nombre de photons émis par une protéine fluorescente pouvant être affecté par des variations locales des conditions physico-chimiques, par la fusion du à une protéine d'intérêt [Coffman and Wu, 2012] ou par des effets d'extinction de fluorescence (*quenching*) lorsque la densité moléculaire locale augmente¹² [Lawrimore et al., 2011], les calibrations doivent être utilisées avec précaution afin d'éviter d'importantes erreurs de comptage.

Afin de pallier les effets liés au manque de fiabilité des calibrations des méthodes permettant une quantification « autonomes » ont été développées.

Méthodes de comptage par « photoblanchiment par pas »

Sako *et al.* mettent en application une méthode innovante de comptage basée sur le « photoblanchiment par pas » (*stepwise photobleaching*) de protéines marquées par un fluorophore [Sako et al., 2000]. En suivant l'intensité du signal émis par des récepteurs membranaires de facteurs de croissance épidermique (EGFR) marqués au Cy3, ils observent une décroissance « en marches d'escalier » témoignant d'un photoblanchiment successif des fluorophores utilisés comme marqueurs. En comptant les « pas » de décroissance, ils concluent que l'EGFR dimérise. Ces méthodes sont aujourd'hui largement utilisées pour estimer la stœchiométrie de nombreux récepteurs membranaires (Figure 3.11).

Longtemps limité à l'estimation de la stœchiométrie de complexes composés d'un nombre inférieur à 10 sous-unités [Das et al., 2007], le photoblanchiment par pas permet aujourd'hui grâce à l'amélioration des stratégies d'analyse des données [Teramura et al., 2006] [Ma et al., 2007] l'estimation de la stœchiométrie de complexes contenant jusqu'à 30 sous-unités [Leake et al., 2006] [Engel et al., 2009] [Lenn et al., 2011]. Cette méthode avantageuse permet l'exploitation de l'intégralité des fluorophores disponibles (EGFP [Ulbrich and Isacoff, 2007], mCherry [Yu et al., 2009], ATTO [Dietz et al., 2013] entre autres) mais reste limitée à l'étude d'oligomères isolés (*e.g.* oligomères membranaires ou protéines purifiées et étudiées *ex situ*). D'autre part, le faible rapport signal sur bruit complique l'analyse

12. Typiquement, l'extinction de fluorescence (*quenching*) devient non négligeable dans le cas d'oligomères à stœchiométrie élevée ou dans le cas de capsides virales par exemple.

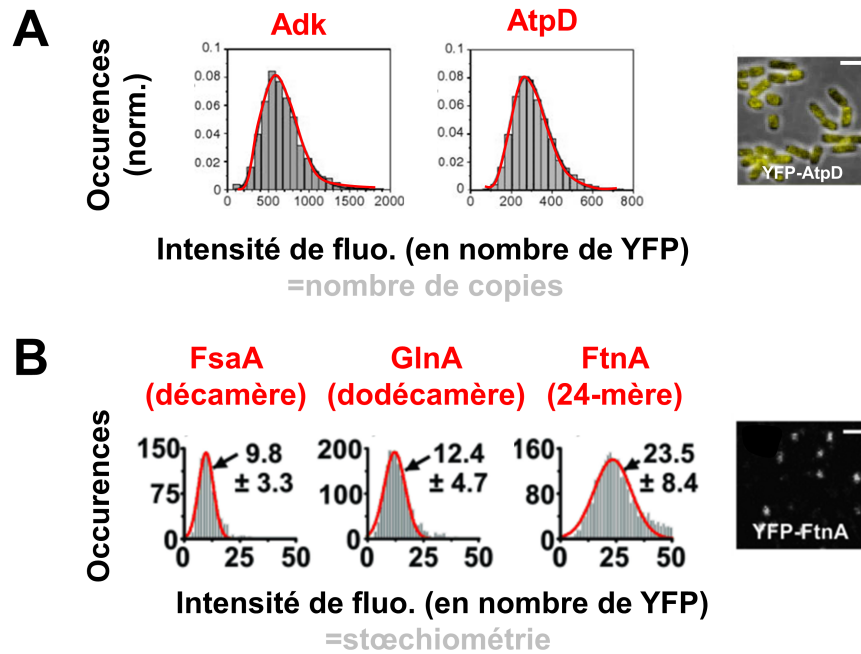


Figure 3.10 – Méthodes de comptage basées sur la mesure d'intensité de fluorescence (A). Mesure du nombre de copies des protéines Adk et AtpD exprimées en fusion avec la protéine fluorescente YFP. L'intensité de fluorescence mesurée par cellule (droite) est corrigée en fonction de la taille de la cellule. L'intensité de fluorescence est exprimée par rapport à celle émise par une YFP isolée et illuminée dans les mêmes conditions (calibration). Modifié d'après [Taniguchi et al., 2010]. Barre d'échelle : 1 μ m (B). Mesure de la stœchiométrie des complexes bactériens FsaA, GlnA et FtnA exprimées en fusion avec la YFP. Après expression en cellule eucaryote, purification et fixation à une lamelle de verre, l'intensité de chaque complexe est mesuré sous microscope confocal (droite). L'intensité de fluorescence est exprimée par rapport à celle émise par une YFP isolée et illuminée dans les mêmes conditions (calibration). Modifié d'après [Fricke et al., 2015]. Barre d'échelle : 700 nm

des traces de photoblanchiment par pas et les méthodes de détection par seuillage sont souvent insuffisantes [Ulbrich and Isacoff, 2007]. Des méthodes modernes basées sur une analyse par le modèle caché de Markov ont récemment vues le jour et permettent l'analyse de données de signal sur bruit limité [Yuan et al., 2014].

Méthodes de comptage in situ par localisation de molécules uniques

Dans le cas où le fluorophore utilisé pour marquer la protéine d'intérêt n'apparaît qu'une unique fois au cours de la collecte du jeu de données, la microscopie de localisation permet de compter les protéines « un à un ». En pratique, de nombreux éléments viennent compliquer la quantification par ces techniques.

dSTORM Bien que les méthodes de marquage basées sur l'utilisation d'étiquettes auto-marquables (e.g. SNAP) permettent de marquer élégamment une protéine avec un fluorophore unique (stœchiomé-

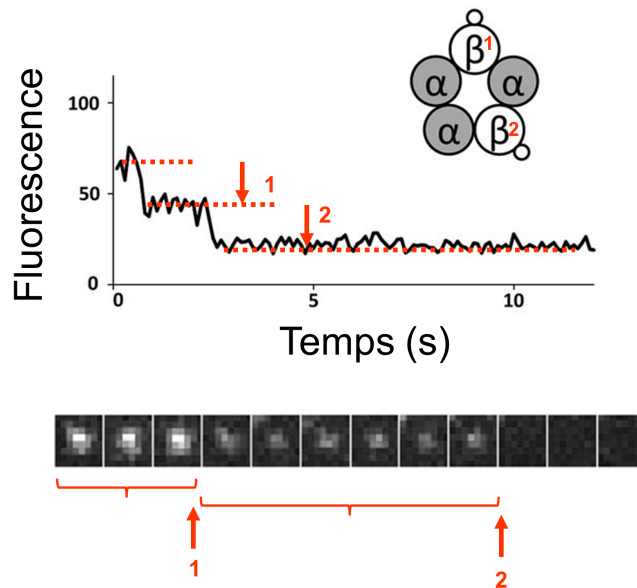


Figure 3.11 – Méthode de comptage basée sur le « photoblanchiment par pas » Mesure du nombre de sous unités β au sein du récepteur humain à la glycine marqué par la protéine fluorescente VenusFP grâce à la méthode de photoblanchiment par pas. L'intensité de fluorescence émise par un récepteur isolé décroît « en marches d'escalier » au cours de l'excitation. Chaque pas correspond au photoblanchiment d'une des protéines fluorescentes. On déduit du nombre de pas la stœchiométrie du monomère β au sein du récepteur. Modifié d'après [Durisic et al., 2012].

trie 1 :1), les modifications génétiques qu'elles imposent gênent à leur démocratisation et les méthodes d'immunomarquage reste généralement préférées.

Le dSTORM basé sur l'immunomarquage des protéines d'intérêt est tout particulièrement mal adapté au comptage moléculaire. En effet, la stœchiométrie de marquage par les anticorps primaires et secondaires est souvent mal connue et mal maîtrisée [Grußmayer et al., 2014]. Malgré les développements récents permettant de corriger cet effet [Ehmann et al., 2014], de nombreux autres phénomènes liés à l'utilisation d'anticorps écarte le marquage de la stœchiométrie 1 :1 (accessibilité à l'épitope à l'origine de faux-négatifs, aspécificité de marquage à l'origine de faux-positifs).

Le développement des techniques de dSTORM basées sur le marquage par fusion avec des protéines auto-étiquetables permet de s'affranchir des contraintes de stœchiométrie de marquage imposé par l'utilisation d'anticorps. Néanmoins, le comptage par dSTORM reste difficile. Les photocommutations répétées des fluorophores compromettent l'estimation quantitative à cause de l'incertitude sur le nombre de cycles de photocommutations. L'absence de correction de la photocommutation résulte en des erreurs systématiques de sur-comptage [Veatch et al., 2012a]. Des techniques ont néanmoins été récemment développées et permettant l'analyse quantitative des jeux de données dSTORM lorsque le comportement photophysique des fluorophores est connu *a priori* [Nieuwenhuizen et al., 2015].

Comme mentionné plus tôt, le succès du dSTORM repose sur l'utilisation de fluorophores dont le temps de vie de l'état *off* est long si bien que la plupart de la population est dans une forme éteinte lors de la collecte du jeu de données. Deux événements *on* sont alors particulièrement espacés dans le temps. [Jungmann et al., 2016]

PALM Les protéines fluorescentes photomodulables utilisées en PALM (PAFP et PCFP) présentent un comportement photophysique complexe s'éloignant du modèle simple facilitant le comptage : photoconversion → fluorescence constante → photoblanchiment. Dans les conditions classiques d'illumination PALM, les PMFPs utilisées comme marqueur subissent de nombreuses phototransformations peuvent être à l'origine d'erreur de sur- ou de sous-comptage. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés en particulier à deux phénomènes compliquant fortement l'extraction de données quantitatives à partir de jeux de données PALM : le scintillement de la forme rouge et la photoconversion incomplète et retardée. Le scintillement a l'origine de transitions répétées entre un état fluorescent et un état sombre, à l'image des photocommutations des fluorophores organiques utilisés en dSTORM, peuvent être à l'origine de comptage multiple d'un même fluorophore si aucune correction n'est appliquée (erreur de surcomptage). La photoconversion incomplète empêche l'observation d'une fraction de la population qui n'est alors pas comptée (erreur de sous-comptage). Le *Carthago delenda* de cette thèse vise à comprendre en détails les bases photophysiques de ces phototransformations afin de faciliter dans le futur les approches PALM quantitatives par la conception de mutants améliorés. Les conséquences de ces phénomènes photophysiques sur les approches PALM quantitatives ainsi que le problème central interrogé au cours de cette thèse sont présentés dans la partie II, page 81. Les approches florissantes de PALM quantitatif basées sur l'utilisation de protéines fluorescentes photo-activables (PAGFP [Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002], PAmCherry [?] [Nan et al., 2013a]) ou photoconvertibles (mEos2 [Puchner et al., 2013] [Annibale et al., 2011b] [Lando et al., 2012], Dendra2 [Lee et al., 2012]) ont doré et déjà permis de répondre à de nombreuses questions biologiques en cellules eucaryotes et bactériennes

3.3.3 Pistage de molécules uniques (spt-PALM)

L'étude de la mobilité spatiale des protéines impliquées dans des phénomènes cellulaires hautement dynamiques (*e.g.* remodelage du cytosquelette, signalisation cellulaire ou trafic vésiculaire) est une étape essentielle de l'étude fonctionnelle du système cellulaire. La dynamique d'une population de protéines d'intérêt peut être étudiée grâce à l'utilisation des protéines fluorescentes conventionnelles (FRAP, voir page 31) ou photomodulables (pistage après photoactivation ou photoconversion, voir page 54). Cependant, ces études à l'échelle d'ensemble ne permettent pas d'isoler des événements rares et présentent un niveau de détails insuffisant.

Les méthodes de pistage de molécules uniques (*single particle tracking*) basées sur la localisation de molécules dans un échantillon de faible densité de marquage permet la reconstruction de trajectoires moléculaires [Svoboda et al., 1993]. Cependant, ces techniques ne sont viables qu'en cas de faible densité de marquage limitant ainsi l'obtention de données statistiquement fiables et en cellules vivantes où la densité moléculaire est importante. En combinant pistage de molécules uniques et techniques de microscopie super-résolution (spt-PALM) [Manley et al., 2008], seule une fraction de la population totale de fluorophores est observée et pistée à un temps donné, ce qui permet la reconstruction de nombreuses trajectoires moléculaires en environnements denses *e.g.* *in cellulo*. La photoconversion

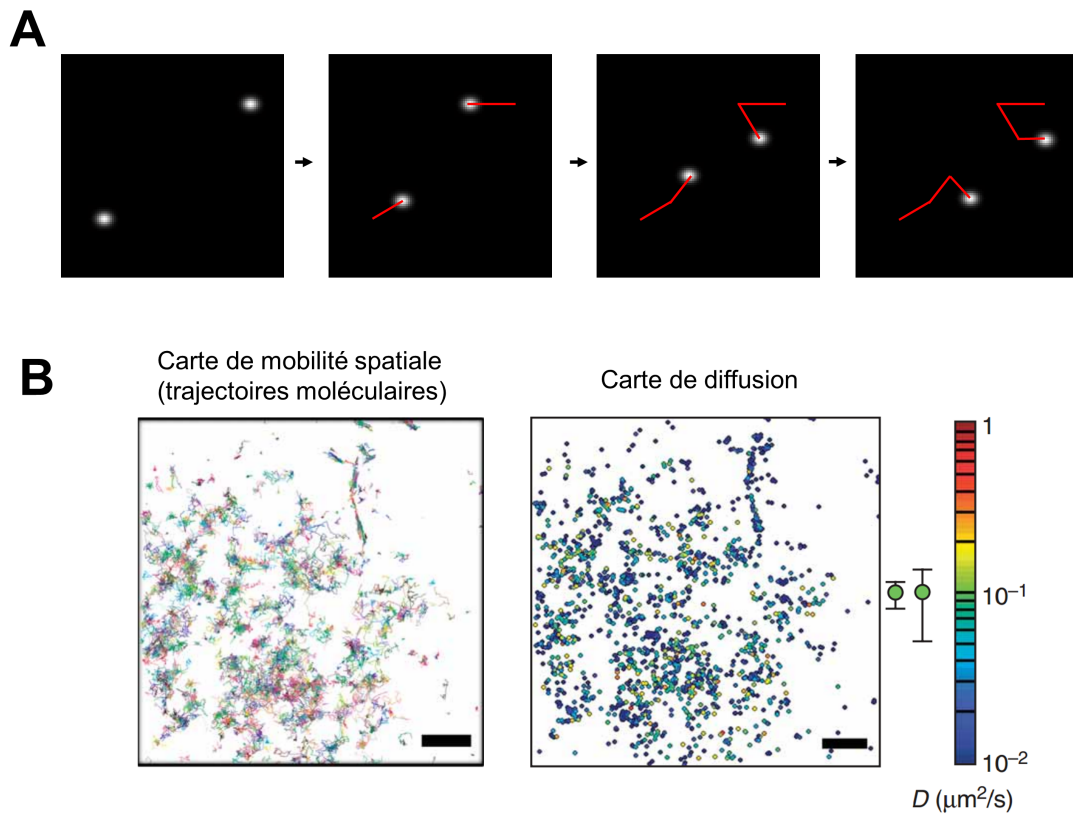


Figure 3.12 – Étude de la dynamique de molécules uniques par microscopie PALM (spt-PALM) (A). Principe du pistage de molécules uniques par PALM. Les molécules photoconverties sont localisées sur les images successives. L'utilisation d'un algorithme permet de connecter les localisations proches et de reconstruire la trajectoire moléculaire des molécules jusqu'à photoblanchiment. (B). Cartes des trajectoires moléculaires (gauche) et de diffusion (droite) des protéines membranaires VSVG en fusion avec mEosFP obtenues par spt-PALM. Les coefficients de diffusion (D) de chaque protéine est calculé à partir du déplacement moyen quadratique ($\langle x^2 \rangle$) de la molécule mesuré à partir de la trajectoire moléculaire d'après l'équation : $D = \frac{\langle x^2 \rangle}{4 \cdot t}$ avec t le temps de pistage. Barre d'échelle : 2 μm . D'après [Manley et al., 2008].

stochastique de quelques molécules permet leur localisation précise au cours du temps. La connexion des localisations issues d'une même molécule unique par des algorithmes puissants [Kalaidzidis, 2009] permet l'obtention de cartes de mobilité spatiale (Figure 3.12 A) à partir desquelles des conclusions sur les caractéristiques de diffusion des protéines peuvent être établies (Figure 3.12 B) (protéines membranaires VSVG [Manley et al., 2008]; protéines du cytosquelette bactérien FtsZ [Niu and Yu, 2008b]).

L'obtention de trajectoires composées d'un nombre important de localisations (>15) est nécessaire à l'estimation juste de coefficients de diffusion [Manley et al., 2008] si bien que l'utilisation de PMFPs hautement photorésistantes est très souhaitable. D'autre part, le scintillement intempestif des PCFPs complique la construction des trajectoires moléculaires (voir Chapitre II, page 85).

Deuxième partie :

PROBLÉMATIQUE DE LA THESE

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence l'importance des protéines fluorescentes photomodulables pour la microscopie de super-résolution ainsi que leur comportement photophysique complexe. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous intéressons aux protéines fluorescentes photoconvertibles (PCFPs) utilisées en microscopie de super-résolution PALM et en particulier à deux marqueurs populaires : mEos2 et Dendra2. Les nombreuses phototransformations subies par ces protéines fluorescentes lors de la collecte de données PALM compliquent l'extraction de données quantitatives et dynamiques.

Dans ce contexte, deux phénomènes sont particulièrement handicapants : le scintillement (Chapitre 4, page 81) et la photoconversion incomplète (Chapitre 5, page 93). Nous verrons dans cette partie dans quelle mesure ces phénomènes constituent un obstacle à l'obtention de données quantitatives et dynamiques à l'échelle nanométrique. Nous justifierons l'importance de la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents pour le développement de nouvelles protéines fluorescentes photoconvertibles optimisées pour les applications avancées de la microscopie PALM.

Problèmes liés au scintillement des PCFPs

4.1 Effet du scintillement sur l'analyse de données PALM

4.1.1 Effet du scintillement ultra-rapide sur les données PALM

Le scintillement ultra-rapide ($t_{off} <$ temps d'acquisition de l'image) a pour conséquence une diminution du nombre de photons émis par molécule par image. La forte incertitude sur la position de la molécule image après image ($\sigma \sim \frac{1}{\sqrt{N}}$; équation 3.4, page 63) a pour conséquence la formation d'un cluster de localisations particulièrement étalé (Figure 4.1). Le regroupement des localisations issues d'une molécule unique est alors compliqué et peut conduire au regroupement de localisations issues de plusieurs molécules en un super-cluster ou en le tronçonnage d'un cluster de localisations correspondant à une molécule unique en plusieurs sous-clusters lors de l'utilisation de méthodes de regroupement spatial des localisations¹. Le scintillement ultra-rapide peut mener à des conclusions erronées quant à la localisation en cluster des protéines d'intérêt.

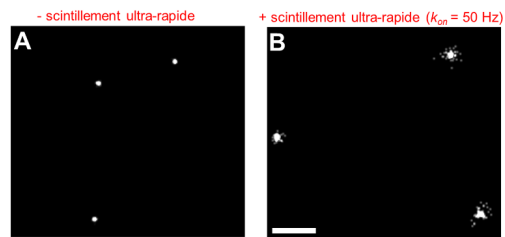


Figure 4.1 – Effet du scintillement ultra-rapide sur la localisation de molécules uniques (A). Clusters de localisations de données simulées sans scintillement ultra-rapide. Les clusters de localisations sont peu étalés et il est alors simple de regrouper correctement les localisations issues d'une molécule unique (B). Clusters de localisations de données simulées avec scintillement ultra-rapide ($\Phi_{scint} = 10^{-4}$ et $k_{on} = 50 \text{ s}^{-1}$). En présence de scintillement ultra-rapide la précision de localisation est diminuée laissant place à une possible interprétation erronée des données (regroupement erroné des localisations). Barre d'échelle : $1\mu\text{m}$.

1. Méthodes basées sur l'étude statistique de la distribution spatiale : filtre de Kalman [Lando et al., 2012], méthode des plus proches voisins [Endesfelder et al., 2013], analyse Bayésienne [Cox et al., 2012], fonction de Ripley L ou fonction de distribution radiale (corrélation de paires) [Shivanandan et al., 2015]. Méthodes algorithmiques : algorithme de regroupement basé sur la densité (DBSCAN) [Ester et al., 1996], algorithme de Hoshen-Kopelman [Gunzenhäuser et al., 2012].

4.1.2 Effet du scintillement lent sur les données PALM quantitatives

Dans les paragraphes suivants, nous nous intéresserons aux conséquences du scintillement lent sur l'analyse quantitative des données PALM. **En quoi le scintillement des PCFP complique-t-il l'extraction d'informations quantitatives à partir de données PALM, notamment dans le cas de l'estimation de la stœchiométrie d'oligomères ?**

Estimer la stœchiométrie

Considérons un oligomère protéique d'une taille de 20 nm et composé de n monomères chacun marqué par une PCFP et observé dans des conditions permettant d'atteindre une précision de localisation σ de 20 nm. La taille du complexe étant inférieure à $3.\sigma$, il est alors impossible à partir de la localisation des PSFs de distinguer spatialement les n monomères du complexe. L'estimation de la stœchiométrie du complexe (n) ne peut alors se faire qu'à partir de l'étude de la trace de fluorescence globale du complexe constituée de la concatenation des n traces (Figure 4.2).

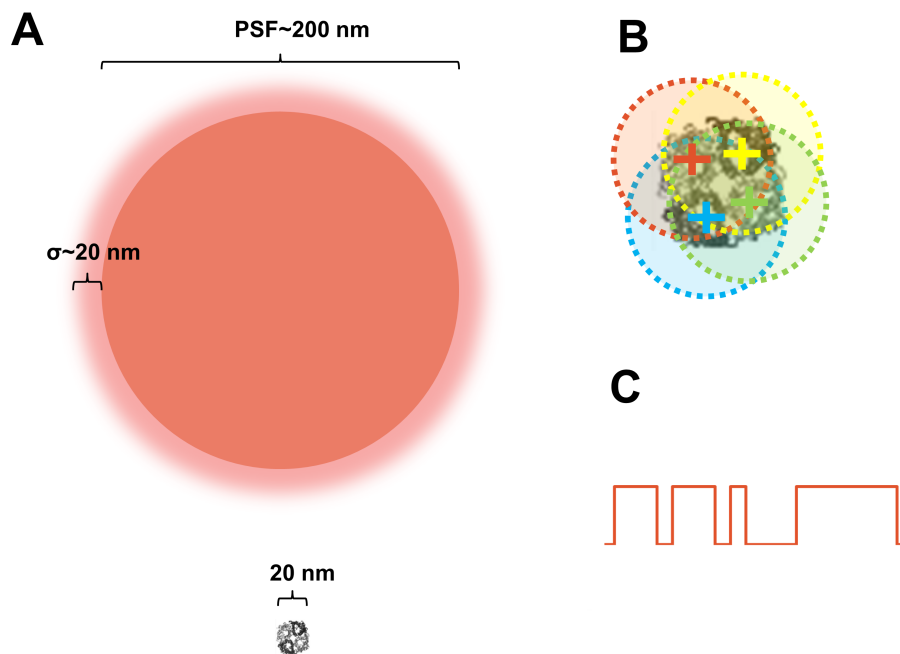


Figure 4.2 – Estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques par microscopie PALM (A). La taille de l'oligomère est du même ordre de grandeur que l'erreur faite sur la localisation (précision de localisation σ) (B). Chaque monomère est alors localisé avec une erreur telle que sa position se trouve dans la sphère d'erreur de localisation d'un autre (cercle pointillé) (C). Idéalement, la stœchiométrie peut être estimée à partir de l'analyse de la trace de fluorescence de l'oligomère.

Cas idéal d'une PCFP non scintillante

Considérons une protéine fluorescente photoconvertible idéale non scintillante. Une fois dans son état photoconverti rouge, la protéine émet de la lumière de manière continue au cours du temps jusqu'à photoblanchiment. Marquons une protéine d'intérêt par fusion avec cette PCFP idéale. La protéine située à la position (x,y) sera caractérisée par une trace temporelle de fluorescence continue (un créneau unique).

Supposons maintenant que notre protéine d'intérêt s'assemble en dimère de taille $< 3.\sigma$. L'échantillon est illuminé avec une densité de puissance de lumière violette (405 nm) telle que la probabilité que les deux molécules soient dans un état rouge simultanément tend vers zéro. Le signal émis par le dimère sera alors caractérisé par une trace temporelle de fluorescence à deux créneaux comme présentée en Figure 4.3. Le nombre de créneaux indique directement -dans ce cas- le nombre de protéines composant l'oligomère.

L'utilisation d'une PCFP non scintillante comme marqueur permet -dans l'idéal- un comptage du nombre de protéines au sein d'un volume de taille inférieure à $3.\sigma$ et donc d'estimer la stœchiométrie d'oligomères protéiques.

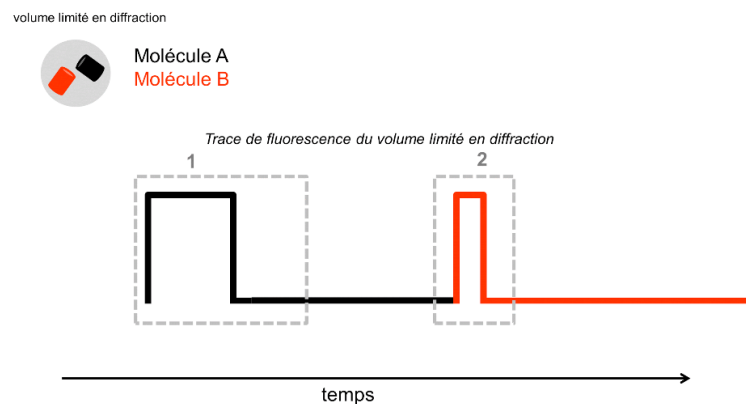


Figure 4.3 – Estimation de la stœchiométrie d'un complexe protéique par PALM dans le cas d'une PCFP idéale non scintillante. Après photoconversion, la protéine émet de la lumière de manière continue jusqu'à photoblanchir. Chaque créneau de la trace de fluorescence peut alors être assigné à une protéine. Le nombre de protéines situées dans le volume $3.\sigma$ peut ainsi être simplement estimé.

Cas réel d'une PCFP scintillante

Considérons maintenant une protéine fluorescente photoconvertible scintillante. Une fois dans son état photoconverti rouge, la protéine émet de la lumière de manière intermittente au cours du temps (alternance entre périodes pendant lesquelles la protéine réside dans des états sombres de plus ou moins long temps de vie et périodes pendant lesquelles elle réside dans son état fluorescent).

Le signal émis par le dimère sera alors caractérisé par une trace temporelle de fluorescence à multiples créneaux comme présentée en Figure 4.4. Le nombre de protéines composant le cluster ne peut pas être directement estimé à partir de la trace de fluorescence. En effet, contrairement au cas

idéal, un fluorophore unique apparaît plusieurs fois consécutivement au cours de la collecte du jeu de données et peut alors être compté plusieurs fois. Un créneau peut correspondre soit à un événement de scintillement soit à un événement de photoconversion d'une nouvelle protéine fluorescente. Sans intégrer le scintillement à l'analyse de la trace de fluorescence (en procédant comme dans le paragraphe précédent), le comptage est biaisé par des artéfacts systématiques de sur-comptage. Les erreurs de sur-comptage liées au scintillement des fluorophores ont été démontrées lors de l'utilisation de protéines fluorescentes photoconvertibles (mEos2 [Annibale et al., 2010] [Annibale et al., 2011a]) et photoactivables (PAGFP [Sengupta et al., 2011]).

L'estimation correcte de la stœchiométrie doit alors prendre en compte le scintillement et corriger son effet. Une première approche simple permettant d'estimer la stœchiométrie du complexe consiste en un regroupement des créneaux de fluorescence séparés par un temps inférieur à un temps critique fixe noté τ_c [Greenfield et al., 2009] et d'assigner ce regroupement à une molécule unique². En choisissant arbitrairement une valeur de τ_c (par exemple $\tau_c=4$ images comme rapporté par Greenfield *et al.* ou 2 fois la déviation standard de la distribution des temps *off* comme rapporté par Gunzenhäuser [Gunzenhäuser et al., 2012]) on compte, dans l'exemple présenté Figure 4.4, 4 molécules : le stœchiométrie du complexe est surestimée.

Le comptage est évidemment fortement affecté par le choix de la valeur τ_c . Pour une faible valeur de τ_c , la trace de fluorescence d'une molécule unique sera tronçonnée en de nombreuses sous-traces chacune attribuée à une molécule unique, à l'origine d'erreurs de sur-comptage. Au contraire, pour une valeur élevée de τ_c , les traces de fluorescence de plusieurs molécules distinctes apparaissant successivement dans un même volume $3.\sigma$ seront regroupées en une super-trace attribuée à une seule molécule unique, à l'origine d'erreurs de sous-comptage. De nombreuses méthodes ingénieuses permettant de corriger l'effet du scintillement sur le comptage ont été développées et seront présentées en détails en page 87.

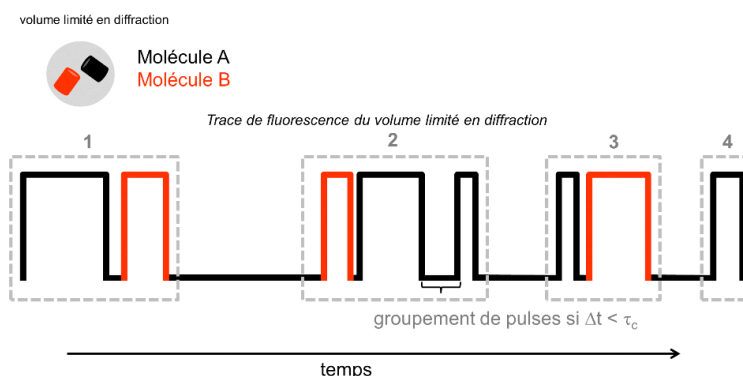


Figure 4.4 – Estimation de la stœchiométrie d'un complexe protéique par PALM dans le cas d'une PCFP réelle scintillante
 À cause du scintillement, les traces de fluorescence des deux protéines s'entremêlent. Une solution pour estimer le nombre de protéines situées dans le volume limité en diffraction consiste alors à grouper les créneaux séparés par un temps inférieur à τ_c . Ici, en fixant arbitrairement τ_c , on compte 4 molécules : le nombre est surestimé.

L'effet du scintillement rapide ($100 \text{ ms} < t_{off} < 1 \text{ s}$) est facilement corrigé, le temps de vie moyen

2. méthode proposée par défaut lors de l'analyse des données de localisation avec ThunderSTORM.

des états sombres étant statistiquement plus faible que le temps séparant la photoconversion successive de deux molécules distinctes. Au contraire, l'effet du scintillement lent est plus problématique et biaise l'estimation de la stœchiométrie, étant donné que le temps séparant deux événements *off* → *on* n'est plus statistiquement discernable du temps séparant l'apparition successive de deux molécules distinctes. Les erreurs de comptage sont amplifiées lors de l'utilisation de PCFPs à scintillement lent.

Les rendements quantiques de photoblanchiment des PCFPs sont de l'ordre de 10^{-5} dans leurs formes verte et rouge. Une fraction de la population verte photoblanchit alors avant photoconversion si bien qu'elle n'est jamais observée et conduit à des erreurs de sous-comptage. En parallèle, une fraction de la population rouge photoblanchit avant d'avoir émis suffisamment de photons pour pouvoir être localisée, à l'origine également d'erreurs de sous-comptage.

Récapitulatif Les protéines fluorescentes photoconvertibles actuellement disponibles pour la microscopie PALM ont particulièrement tendance à entrer dans des états sombres de long temps de vie et à rapidement photoblanchir dans les conditions d'illumination PALM classique. Leur utilisation est donc particulièrement sujette à artéfact de comptage. Il est alors nécessaire d'avoir recourt à des méthodes de réduction (voir page 85) ou de correction poussée du scintillement (voir page 87).

4.1.3 Effets du scintillement lent sur les données PALM dynamiques

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons aux conséquences du scintillement dans le cadre d'approches PALM dynamiques (*single particle tracking* PALM, spt PALM). **En quoi le scintillement complique le pistage de protéines d'intérêt marquées par une PCFP ?**

L'entrée intermittente du fluorophore dans un état sombre de long temps de vie a pour conséquence un black-out de plusieurs images au cours desquelles la position de la molécule est perdue et entraînant une incertitude lors de la reconstruction de sa trajectoire (Figure 4.5). La reconstruction de la trajectoire est d'autant plus compliquée dans les environnements denses (*e.g. in cellulose*).

4.2 Méthodes de réduction et de correction du scintillement

Face aux artéfacts induits par le scintillement, il est alors important de développer des méthodes permettant de limiter ce phénomène voire de s'en débarrasser.

4.2.1 Réduction du scintillement par traitement chimique

De nombreuses études ont montré que la photophysique des fluorophores (organiques et protéines fluorescentes) est fortement affectée par les conditions de l'environnement et que des modifications du pH [Haupts et al., 1998] [Liu et al., 2006], des conditions redox [Bogdanov et al., 2009b] [Endesfelder et al., 2011] [Ha and Tinnefeld, 2012] [Altman et al., 2012] [Avilov et al., 2014] ou de la teneur en oxygène moléculaire [Aitken et al., 2008] permettent de contrôler le comportement des fluorophores,

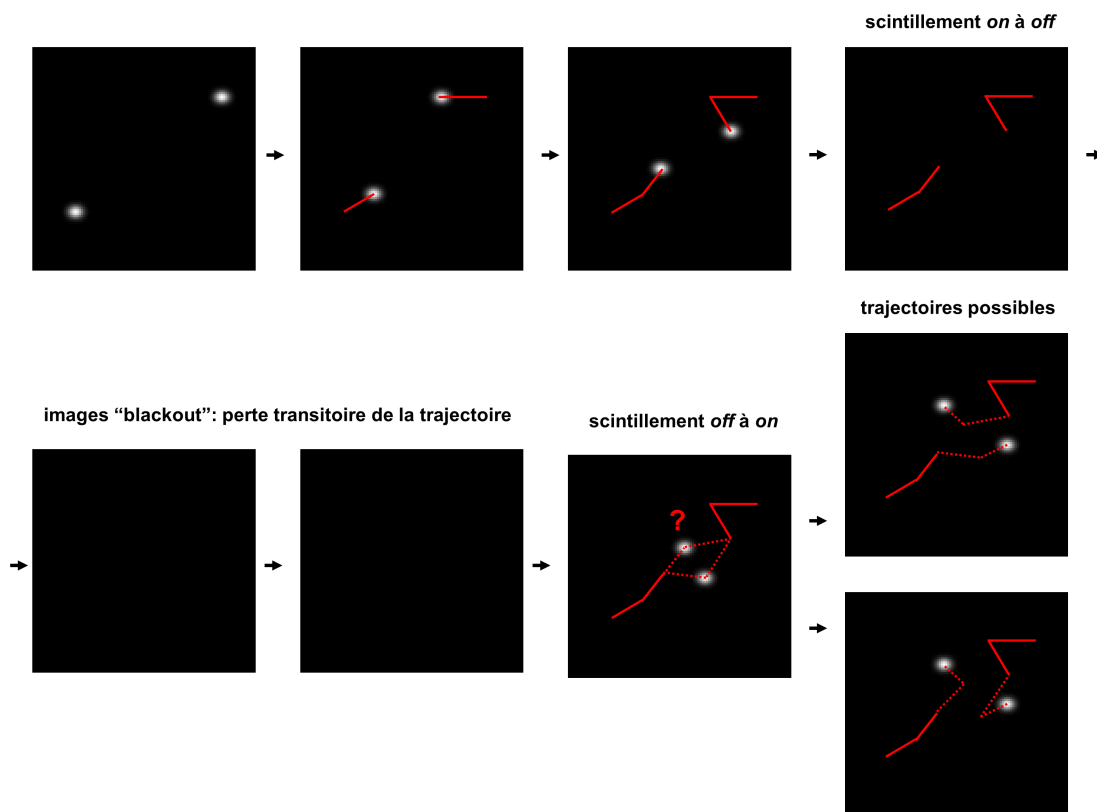


Figure 4.5 – Effet du scintillement lent sur le suivi de particules uniques en PALM La trajectoire des deux molécules est correctement établie (trait rouge) avant l'entrée dans un état sombre (transition *on* → *off*). L'entrée dans un état sombre résulte en des images dites « blackout » au cours desquelles la trajectoire ne peut pas être reconstruite. Au retour de fluorescence (*off* → *on*), il est alors compliqué d'assigner le signal à la molécule correspondante. Selon le choix fait, les trajectoires sont significativement différentes ce qui peut notamment altérer la mesure de coefficient de diffusion des molécules.

notamment le scintillement [van de Linde and Sauer, 2014].

Lorsqu'il est possible dans le cadre de l'expérience de s'éloigner des conditions physiologiques (étude *in vitro* ou en cellules fixées), des cocktails d'inhibition du scintillement peuvent être ajoutés au milieu. Notamment, le scintillement de fluorophores organiques comme le Cy5 peut être aboli en présence de cocktail consommant l'oxygène moléculaire et de Trolox [Rasnik et al., 2006]. L'utilisation du composé à activité redox 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) permet une réduction significative du scintillement de Dendra2 *in vitro* et en cellules fixées [Avilov et al., 2014].

Si ces méthodes sont aujourd'hui viables afin de limiter l'effet du scintillement pour les approches PALM quantitatives en cellules fixées, elles ne sont en pratique pas utilisées à notre connaissance. Le succès timide de ces méthodes s'explique peut être par l'idée rémanente et fautive que les protéines fluorescentes sont protégées de l'environnement par leur tonneau β et que leur photophysique ne peut

être affectée par les conditions physico-chimiques de l'environnement malgré les quelques preuves du contraire [Bogdanov et al., 2009b] [Endesfelder et al., 2011] [Avilov et al., 2014].

L'estimation de la stœchiométrie en cellules vivantes (limitant ainsi les artéfacts liés à l'utilisation de fixateurs chimiques) reste actuellement un défi dont le succès ne pourra pas être épaulé par l'utilisation de cocktails anti-scintillement. La correction de l'effet du scintillement est alors la seule stratégie d'avenir.

4.2.2 Correction du scintillement in silico

Toutes les méthodes présentées ici tentent de répondre par différents moyens à la question suivante : Comment estimer à partir de la trace de fluorescence d'un cluster le nombre de molécules qui le compose ?

Méthodes basées sur le nombre de scintillements

Considérons la trace de fluorescence d'un cluster composé de N_{mol} molécules uniques scintillant chacune en moyenne un nombre de fois noté N_{scint} . Cette trace de fluorescence sera caractérisée par un nombre moyen de transitions $on \rightarrow off$ noté N'_{scint} et défini par l'équation 4.1.

$$N'_{scint} = N_{mol}(1 + N_{scint}) \quad (4.1)$$

avec N'_{scint} le nombre moyen de transitions $on \rightarrow off$ de la trace d'un cluster composé de N_{mol} molécules scintillant chacune en moyenne N_{scint} fois

Connaissant le nombre moyen d'événements de scintillement (N_{scint}) de la protéine fluorescente utilisée, estimé indépendamment et dans conditions chimiques et d'illumination proche (dans l'idéal identique afin de s'affranchir d'éventuels effets de l'environnement physico-chimique sur la photophysique), il est possible de compter les molécules constituant le cluster. Cette méthode simple ne nécessitant qu'une calibration du nombre moyen de scintillement est utilisée en routine pour de nombreuses applications biologiques (protéines de liaison à l'ADN [Lando et al., 2012] [Endesfelder et al., 2013] [Ricci et al., 2015] et protéines membranaires [Löschberger et al., 2014] [Letschert et al., 2014]). Dans la mesure où l'environnement diffère peu de celui dans lequel la calibration a été réalisée, cette méthode s'avère efficace.

Une méthode similaire basée sur les histogrammes de distribution de probabilité de transition $on \rightarrow off$ (N'_{scint}) a été développée par le groupe de Mike Heilemann [Fricke et al., 2015]. La distorsion des ces histogrammes induite par le regroupement de N_{mol} molécules en une super-trace peut être prédit d'après l'équation 4.2 (loi binomiale négative).

$$P_p(N'_{scint}) = \binom{N'_{scint} + N_{mol} - 1}{N_{mol} - 1} p^{N_{mol}} (1 - p)^{N'_{scint}} \quad (4.2)$$

avec $P_p(N'_{scint})$ la probabilité d'observer p transitions $on \rightarrow off$ pour une trace issue de N_{mol} molécules et N'_{scint} le nombre de transitions $on \rightarrow off$

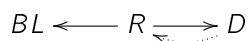
À partir du nombre de transitions $on \rightarrow off$, il est alors possible d'estimer la stœchiométrie des oligomères et a notamment été mise en œuvre pour l'étude de protéines membranaires [Fricke et al., 2015].

Méthodes basées sur l'analyse statistique de l'organisation spatiale

D'autre part, le nombre de molécules peut être estimé à partir de l'organisation des localisations dans l'espace à l'aide de méthodes statistiques. Ces méthodes reposent sur la capacité à discriminer la distribution uniforme aléatoire des localisations issues d'une molécule unique, de la distribution en cluster des localisations issues de n molécules distinctes. Dans le cas d'une organisation en cluster, la probabilité de trouver une localisation proche d'une autre est plus importante que la probabilité de trouver une localisation éloignée des autres. L'utilisation d'une fonction de corrélation de paires permet alors de déterminer le nombre de molécules par cluster [Sengupta et al., 2011] [Sengupta and Lippincott-Schwartz, 2012] [Veatch et al., 2012b]. Ces méthodes présentent l'avantage de ne nécessiter aucune connaissance préalable du comportement photophysique des fluorophores utilisés. Néanmoins, la quantification est particulièrement sensible à la précision de localisation et s'avère compliquée lorsque les clusters ne s'organisent pas en édifices à symétrie radiale. De plus, elles ne permettent que l'analyse quantitative de clusters contenant un nombre élevé de molécules et se révèlent en conséquent plutôt adaptées à l'estimation du nombre de copies de protéines par cluster ou par cellule qu'à l'estimation de la stœchiométrie d'oligomères³.

Méthodes basées sur le temps séparant deux créneaux au sein des traces

La stœchiométrie d'oligomères protéiques ne pouvant être estimée sans biais en utilisant une valeur arbitraire de τ_c [Greenfield et al., 2009] [Gunzenhäuser et al., 2012], il est alors nécessaire d'avoir recours à des méthodes permettant de déterminer la valeur optimale de τ_c , laquelle dépend de la photophysique du fluorophore et de la densité moléculaire. En 2011, Annibale *et al.* proposent une méthode semi-empirique permettant de déterminer la valeur optimale de τ_c afin de compter globalement le nombre de molécules dans un échantillon [Annibale et al., 2011b]. D'après le modèle cinétique de phototransformation d'une PCFP présenté ci-dessous, la distribution des temps *off* d'une population est ajustée par une mono-exponentielle.



avec BL la forme photoblanchie, R la forme rouge fluorescente et D la forme *off*.

À τ_c unique et fixe, les créneaux séparés par un $t_{off} > \tau_c$ seront considérés comme issus de deux molécules distinctes, à l'origine d'erreurs de sur-comptage alors que les créneaux séparés par un $t_{off} < \tau_c$ seront considérés comme issus d'une même molécule, à l'origine d'erreurs de sous-comptage. Une valeur optimale de τ_c peut alors être choisie telle que les erreurs de sur-comptage et de sous-comptage se compensent : dans ce cas, le nombre réel de molécules dans l'échantillon peut être estimé. Afin de déterminer cette valeur optimale, Annibale *et al.* proposent de découper chaque trace avec une gamme de temps critiques (notés ici τ_c et appelés t_d dans la publication originale). Pour chaque τ_c , le nombre de transition $on \rightarrow off$ des traces est compté ($N(\tau_c)$). La fonction reliant $N(\tau_c)$ à τ_c est correctement ajustée par le modèle suivant, ce qui permet de calculer le nombre de molécules (N_{mol}) dans l'échantillon :

$$N(\tau_c) = N_{mol} \cdot (1 + N_{scint} \cdot \exp \frac{1 - \tau_c}{t_{off}}) \quad (4.3)$$

3. Les méthodes statistiques utilisant la fonction de Ripley partagent les mêmes limites [Kiskowski et al., 2009] [Nan et al., 2013b]. Récemment, des méthodes utilisant le pavage de Voronoï ont vu le jour (*Voronoi tessellation*) [Levet et al., 2015].

avec N_{mol} le nombre molécule par cluster, N_{scint} le nombre moyen d'événement de scintillement et t_{off} le temps moyen pendant lequel vit l'état sombre.

Cette méthode reste limitée à l'analyse d'échantillons homogènes (comptage global) et ne permet pas une analyse quantitative d'échantillons pour lesquels la densité moléculaire varie spatialement (*e.g. in cellulo*).

Lee *et al.* développent la même année une méthode élégante permettant d'estimer la stœchiométrie locale au sein d'échantillons hétérogènes à partir de l'analyse des traces de fluorescence [Lee *et al.*, 2012]. Le tronçonnage correct des traces de fluorescence (erreur de comptage minimale) repose sur l'utilisation d'une valeur optimale de τ_c qui dépend non seulement de la photophysique (à l'image de la méthode proposée par Annibale *et al.*; en particulier par les constantes de retour *off* \rightarrow *on* rapide et lent) mais également du nombre de molécules par cluster (densité moléculaire). Une courbe dite courbe τ_c reliant la valeur optimale de τ_c à appliquer afin de limiter les erreurs de comptage au nombre de molécule par cluster (N_{mol}) est construite à partir de données molécule unique simulées avec les paramètres photophysiques mesurées *in vitro* lors d'une expérience indépendante. Les données simulées constituent un ensemble de super-traces dont la stœchiométrie variant de $N_{mol}=1$ à $N_{mol}=N$ est connue. Pour chaque sous-ensemble de super-traces à N_{mol} donné, toutes les valeurs τ_c sont testées et celle pour laquelle la stœchiométrie estimée est au plus proche de la stœchiométrie réelle (minimisation des erreurs de comptage) est dite valeur de τ_c optimale. On construit alors une courbe reliant la valeur optimale de τ_c au nombre de molécule par cluster (courbe τ_c Figure 4.6 B).

À partir des super-traces expérimentales, le nombre de molécules par cluster (N_{mol}) est d'abord approximé en comptant chaque créneau de la trace ($\tau_c=0$). Selon la valeur de $N_{mol,1}$ approximée, une valeur de τ_c optimale est alors choisie et les traces analysées en conséquent. Une nouvelle valeur de $N_{mol,2}$ est alors déterminée. La procédure est poursuivie de manière itérative jusqu'à ce que le nombre de molécules par cluster converge ($N_{mol,(i-1)} \sim N_{mol,(i)}$).

En somme, cette méthode permet d'estimer localement le nombre de molécules en se basant sur une

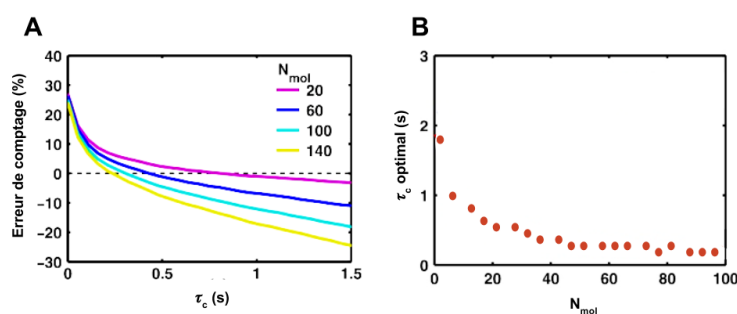


Figure 4.6 – Méthode de correction itérative du scintillement proposée par Lee *et al.* (A). Mise en évidence de l'existence d'une valeur optimale de τ_c dépendant du nombre de molécule (N_{mol}) au sein du cluster (B). Courbe de la valeur optimale de τ_c en fonction du nombre de molécules par cluster. Modifié d'après [Lee *et al.*, 2012].

connaissance *a priori* de la photophysique de la protéine fluorescence utilisée. Elle reste cependant relativement lourde à mettre en place et s'avère peu efficace lorsque le scintillement lent ($t_{off} >$ quelques

secondes) est important (erreurs de comptage).

En 2014, des années de développement au sein de l'équipe ont convergé vers le développement d'une méthode itérative de correction du scintillement inspirée de celle proposée par Lee *et al.* mais pour laquelle la connaissance *a priori* de la photophysique de la protéine fluorescente n'est pas nécessaire [Avilov *et al.*, 2014]. Le comportement photophysique est mesuré en même temps que la correction pour le scintillement est effectuée. Ainsi, le comptage n'est pas perturbé par les potentiels effets de l'environnement sur le comportement photophysique : les vitesses de phototransformations ne sont plus estimées indépendamment *in vitro* mais directement dans le contexte d'étude (*e.g. in cellulo*)⁴. Nous détaillerons cette méthode dans la Partie III, Chapitre 7, page 121 *sqq.*

4.3 Ingénierie de PCFPs peu ou pas scintillantes

Les limites actuelles des méthodes de réduction et de correction du scintillement invitent vivement au développement de nouvelles PCFPs à photorésistance élevée et scintillement réduit (voire nul). Ces marqueurs fluorescents manquent aujourd'hui cruellement⁵ et leur développement permettrait de s'affranchir des obstacles actuellement rencontrés lors de l'étude quantitative et dynamique à l'échelle nanométrique d'environnements cellulaires denses.

La conception de mutants de ce type est une tâche complexe mais prometteuse. Le principal obstacle à l'ingénierie de PCFPs faiblement scintillantes est lié à la gestion des bibliothèques de mutants générés. Dans le cadre de l'optimisation de la brillance par exemple, de larges bibliothèques de mutants générés par mutagenèse aléatoire (plusieurs milliers) peuvent être facilement analysées par expression en bactéries et criblées pour la brillance. Le crible pour le scintillement devant être mené à l'échelle de la molécule unique, les approches haut-débit sont sévèrement limitées. En effet, cette échelle d'analyse impose la production, la purification de chaque mutant ainsi que la collecte de données PALM et leur analyse, ce qui requiert d'importantes ressources humaines et computationnelles (voir Chapitre 7, page 121 *sqq.*)⁶. Il est alors préférable de se reposer sur des approches de mutagenèse raisonnée.

Le succès de la mutagenèse raisonnée repose principalement sur la compréhension des mécanismes à l'origine du scintillement et du photoblanchiment et notamment sur l'individualisation des acides aminés jouant un rôle clé dans ce phénomène.

4. Alternativement, la valeur optimale τ_c peut être déterminée à partir de l'étude de la valeur de $|\frac{N' - N_{mol}}{N_{mol}}|$ [Coltharp *et al.*, 2012], avec N' le nombre d'événements *on* \rightarrow *off* et N_{mol} le nombre de molécules estimé par la méthode de Lando *et al.* [Lando *et al.*, 2012].

5. À l'heure actuelle, seules quelques boîtes quantiques (*quantum dots*) à scintillement réduit ou nul ont été ingénierées ([Hohng *et al.*, 2004], [Marchuk *et al.*, 2012]).

6. Alternativement, les mutants générés pourraient être exprimés en bactéries (pour lesquels la transformation génétique ne nécessite que peu d'ADN par rapport aux cellules eucaryotes). Néanmoins, l'étude de la photophysique à grande échelle reste difficilement automatisable et nécessite une importante ressource computationnelle et humaine. D'autre part, l'étude photophysique en bactérie est particulièrement compliquée en lien avec la faible taille du cytoplasme de ces cellules. Le nombre de molécules à étudier afin d'analyser le comportement photophysique en limitant le bruit statistique est tel que la densité moléculaire à atteindre par cellules est au-delà des seuils tolérés pour l'estimation correcte de la photophysique des méthodes actuellement disponibles (voir page 7.6).

**Problématique**

En combinant cristallographie aux rayons X (Chapitre 8, page 137) et microscopie de localisation (Chapitre 6, page 101), nous proposons de comprendre les bases mécanistiques du scintillement en passant notamment par l'estimation des rendements quantiques de scintillement et photoblanchiment (Chapitre 7, page 121) de deux PCFPs « à la mode » en microscopie PALM (mEos2 et Dendra2). En particulier, nous proposons de comprendre le rôle de l'arginine 66 dans le contrôle de ces deux mécanismes.

À terme, les études mécanistiques réalisées dans le cadre de cette thèse devrait servir de base pour la conception raisonnée de mutants de PCFPs à comportement optimisé pour la microscopie PALM quantitative et dynamique.

Problèmes liés à la photoconversion incomplète et ralentie

Dans cette Chapitre, nous nous intéresserons aux conséquences des voies complexes de photoconversion vert à rouge des PCFPs sur l'analyse des données PALM quantitatives.

5.1 Importance de l'échantillonnage et de la densité de marquage en PALM

Reprenons notre oligomère protéique composé de n monomères. Malgré les efforts de marquage, de nombreux paramètres (que nous discuterons dans les pages qui suivent) limitent le marquage effectif (*i.e.*, dans le cas des PCFPs, le marquage tel qu'un signal de fluorescence rouge est observé) et induisent en conséquence un sous-échantillonnage à l'origine d'erreurs systématiques de sous-comptage¹.

5.1.1 Copies endogènes non marquées

Dans le cas d'une expression ectopique (gène portée par un plasmide extra-génomique) de la fusion protéine d'intérêt-PCFP, une fraction des n monomères du complexe est issue de l'expression endogène de la copie non marquée (Figure 5.1 A). À la différence des stratégies de marquage non génétique, cet effet est contournable par transgénèse en remplaçant la copie du gène non marqué par la copie du gène en fusion (*knock-out + knock-in*)². Alternativement, les modifications de l'ADN génomique peuvent être évitées en exprimant la construction fusion dans un type cellulaire n'exprimant pas la protéine d'intérêt (expression orthogonale). Cette méthode permet par exemple l'étude de la stœchiométrie de complexes bactériens en cellule eucaryote mammifère par simple expression ectopique [Finan et al., 2015]. Néanmoins, la différence de contexte physiologique peut être à l'origine de modifications de la stœchiométrie du complexe à l'étude.

1. Le sous-échantillonnage affecte également la résolution d'après le critère de Nyquist (équation 3.5, page 63).

2. Le système CRISPR-Cas9 actuellement en plein essor, facilite grandement la transgénèse grâce à la recombinaison homologue de gène codant pour la construction chimère protéine d'intérêt-protéine fluorescente [Doudna and Charpentier, 2014].

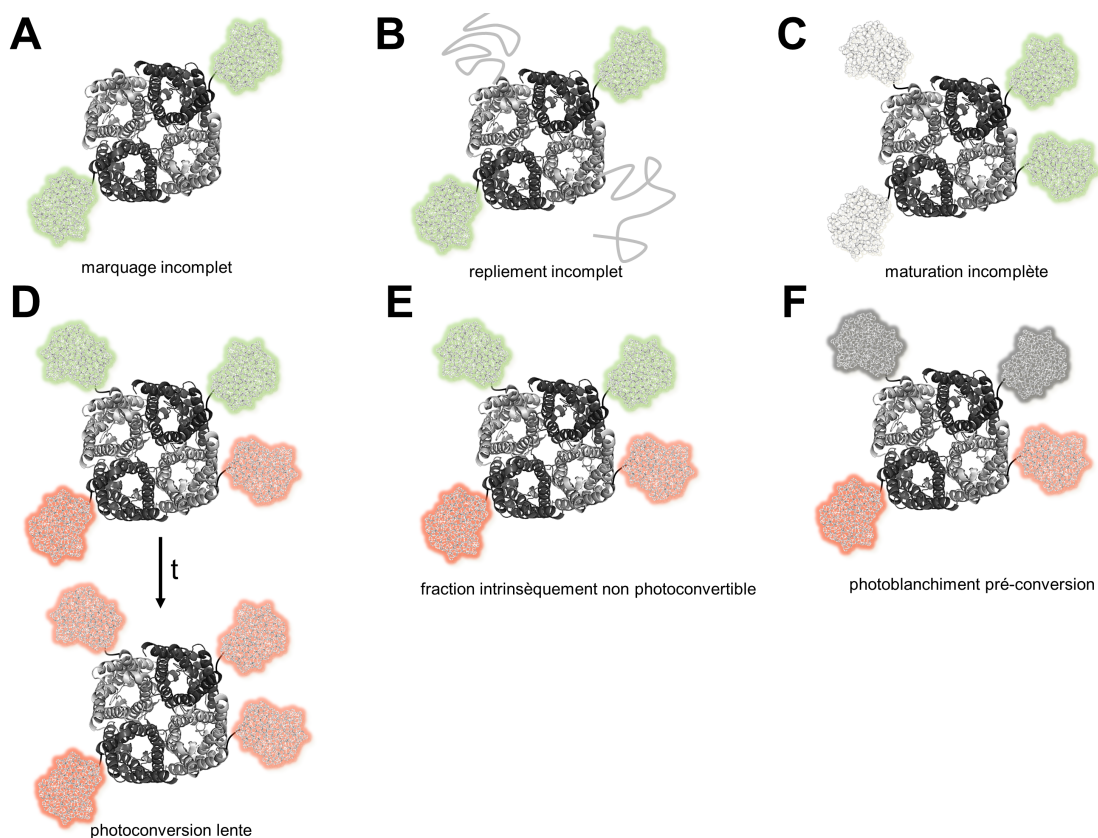


Figure 5.1 – Facteurs à l'origine d'erreurs de sous-comptage en microscopie de localisation PALM Exemple basé sur le marquage du tétramère de l'aquaporine Z (code PDB : 2ABM). (A). Tétramère composé pour moitié de copies non marquées (copies endogènes) (B). Tétramère composé pour moitié de copies marquées par des protéines fluorescentes mal repliées et non fluorescentes (C). Tétramère composé pour moitié de copies marquées par des protéines fluorescentes à chromophore non mature et donc non fluorescentes (D). Après un temps t , seule la moitié des PCFP ont été photoconverties. Plus tard, toutes ont photoconverti (photoconversion lente) (E). Après un temps infini, seule la moitié des PCFP ont photoconverti, une fraction verte est intrinsèquement non photoconvertible (F). Après un temps infini, seule la moitié des PCFP ont photoconverti, une fraction verte a été photoblanchie. L'ensemble des paramètres ne sont pas exclusifs et peuvent donc s'additionner et contribuer à amplifier les erreurs de sous-comptage.

5.1.2 Repliement protéique et maturation du chromophore

Parmi les n monomères fusionnés à une PCFP, une fraction peut se retrouver marquée par des protéines fluorescentes non fonctionnelles (*i.e.* non fluorescentes). L'absence de fluorescence peut être le résultat d'un mauvais repliement de la protéine ou d'une maturation incorrecte du chromophore (Figure 5.1 B et C).

Le choix d'une PCFP pour les études quantitatives devrait se faire en fonction de ses propriétés de repliement et de maturation du chromophore dans les conditions physico-chimiques de l'environnement au sein duquel elle s'exprime. Il est notamment crucial de choisir la PCFP à repliement optimal

dans les conditions physico-chimiques de l'environnement d'étude (cellules mammifères et bactériennes (37 °C) ; levures (30 °C)). La PCFP mMaple voit par exemple son efficacité de repliement fortement diminuer en cellules mammifères par rapport aux cellules bactériennes [McEvoy et al., 2012] [Wang et al., 2014a], et ne devrait donc pas être employée dans ce contexte pour des approches quantitatives. D'une manière générale, comme suggéré par McEvoy, les stratégies d'évolution dirigées en bactéries à l'origine de la plupart des mutants récents de protéines fluorescentes favorisent la sélection de variants à forte efficacité de repliement et maturation du chromophore en bactérie. Cela ne présage en aucun cas que les propriétés seront conservées une fois exprimées dans un environnement biochimique différent.

En somme, l'utilisation de PCFPs à faible efficacité de repliement et de maturation du chromophore entraîne des erreurs systématiques de sous-dénombrement et diminue la résolution.

5.1.3 Photoconversion incomplète

Expérimentalement, on observe qu'une fraction des PCFPs ne semblent jamais photoconverties (Figure 5.1 E et F). Les mécanismes à l'origine de cette incomplétude de photoconversion sont aujourd'hui mal compris et les données quantitatives disponibles à ce jour pour la PCFP mEos2 sont très hétérogènes. Entre ~60% [Puchner et al., 2013] [Durisic et al., 2014] et ~4%³ [Wang et al., 2014a], des protéines mEos2 dans leur forme verte photoconvertissent sous illumination 405 nm. Les travaux menés sur Kaede viennent conforter l'hypothèse d'une incomplétude sévère de photoconversion des PCFPs [Schäfer et al., 2006]. Aussi, une fraction des PCFPs utilisées comme marqueurs ne sont jamais observables et sont à l'origine d'un sous-échantillonnage important.

Il est alors capital pour le développement des approches PALM quantitatives d'apporter des réponses aux questions suivantes : **Quels sont les mécanismes à l'origine de l'incomplétude de photoconversion ?**

Qu'advient-il de la population verte initiale ne passant pas dans un état rouge ? Existe-il une fraction de la population intrinsèquement non photoconvertible et non interchangeable avec la fraction photoconvertible (Figure 5.1 E) ? Une fraction de la population verte est-elle photoblanchie par la lumière 405 nm avant d'être photoconvertie (Figure 5.1 F) ?

Actuellement, peu de réponses ont été apportées à ces questions. Les travaux de Schafer sur Kaede suggèrent néanmoins qu'une importante fraction de la population verte est photoblanchie par la lumière proche UV avant d'être photoconvertie.



Problématique

En combinant microscopie de localisation (et notamment microscopie de localisation deux-couleurs) et spectroscopie UV-visible nous proposons de comprendre les mécanismes photo-

3. Les données de Wang obtenues après comparaison du nombre de PCFPs effectivement localisées en microscopie PALM et le nombre total exprimé par Western Blot quantitatif sont peu compatibles avec données spectroscopiques de photoconversion. Il est fort probable que l'incomplétude de photoconversion soit largement sur-estimée.

physiques sous-jacents à l'échantillonnage incomplet lors de la collecte de données PALM avec mEos2. Nous proposons de mettre en évidence les phototransformations subies par la forme verte et la forme rouge des PCFPs dans les conditions d'illumination typique de la microscopie PALM (lumière 561+405 nm) à l'origine d'une incomplétude ou d'un ralentissement de la photoconversion.

5.1.4 Photoconversion ralentie

Lors de nos expériences en laboratoire, nous avons observé que la photoconversion vert à rouge s'éloigne du modèle de photoconversion par interconversion vert à rouge 1 :1. Entre nos mains, la photoconversion de mEos2 est retardée par rapport à ce modèle et une photophysique plus complexe semble être à l'œuvre dans les conditions d'illumination typique de collecte PALM. La lenteur de la photoconversion contraint à collecter des jeux de données longs afin d'obtenir un échantillonnage satisfaisant. Un ralentissement excessif devient particulièrement handicapant lors de l'étude de cellules hautement dynamiques pour lesquelles une image de qualité ne peut être obtenue que par échantillonnage rapide et complet.

Quels sont les mécanismes à l'origine de l'écart au modèle de photoconversion par interconversion vert à rouge 1 :1 ? Quels sont les mécanismes sous-jacents entrant en compétition et ralentissant l'apparition des fluorophores rouges au cours du temps ?

5.2 Photoconversion par proche UV et photoconversion amorcée

5.2.1 Conséquences de l'utilisation des proches UV (405 nm)

La photoconversion des PCFPs actuellement utilisées en PALM requiert l'illumination de l'échantillon par une lumière proche UV à l'exception des PCFPs de la série Dendra rapportée comme photoconvertibles sous illumination cyan (488 nm). Dans nos conditions expérimentales, la photoconversion de Dendra2 sous illumination cyan s'avère peu efficace et particulièrement lente. Aussi, l'utilisation de lumière proche UV est actuellement la seule stratégie viable pour une collecte rapide des jeux de données PALM.

La lumière proche UV véhicule des photons de haute énergie interagissant avec de nombreuses molécules biologiques (acides aminés aromatiques et acides nucléiques entre autres). Des études récentes mettent en évidence l'effet cytotoxique de la lumière 405 nm sur, à la fois, les cellules eucaryotes mammifères et cellules bactériennes [Ramakrishnan et al., 2016]. Cet effet jusqu'alors négligé et le plus souvent contourné par l'observation de cellules fixées pourrait à l'avenir limiter l'expansion de la microscopie PALM à l'étude de cellules vivantes. De plus, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induite par les proches UV pourrait entraîner une modification du comportement photophysique des protéines fluorescentes notamment en facilitant les événements redox comme le scintillement ou le photoblanchiment. Par ailleurs et dans une moindre mesure, la densité de puissance de la lumière d'excitation nécessaire à l'observation de molécules uniques est source de mort cellu-

laire [Strack, 2015] [Wäldchen et al., 2015].

5.2.2 Photoconversion amorcée

Récemment, l'équipe de Pantazis de l'*Eidgenössische Technische Hochschule de Zürich* a mis en évidence une nouvelle modalité efficace de photoconversion chez Dendra2 baptisée photoconversion amorcée (*primed conversion*) [Dempsey et al., 2015]. La photoconversion est induite par l'excitation simultanée de l'échantillon par une lumière cyan (488 nm) et une lumière infrarouge (IR, 735 nm). En s'affranchissant de la lumière énergétique violette, cette nouvelle modalité de photoconversion est non seulement moins phototoxique mais permet également une photoconversion profonde et confinée au sein des tissus. Face à cette découverte, de nombreuses questions sont soulevées : quels sont les mécanismes sous-jacents ? pourquoi la photoconversion amorcée est inefficace chez mEos2 alors qu'elle fonctionne chez Dendra2 ? quelle est l'efficacité de la photoconversion amorcée par rapport à la photoconversion UV à la fois en terme de complétude et de vitesse ?



Problématique

En combinant simulations informatiques et en comparant les cinétiques de photoconversion proche UV et amorcée de variants de la série Eos et Dendra, nous proposons d'apporter des détails mécanistiques concernant cette nouvelle voie encore largement mal comprise.

Troisième partie :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans le contexte actuel de la microscopie super-résolution avancée, le comportement photophysique complexe des protéines fluorescentes photoconvertibles est un obstacle majeur. L'étude du comportement photophysique de ces protéines à l'échelle de la molécule unique et la corrélation de ces observations avec les données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X permettent d'affiner le modèle mécanistique de ces phénomènes handicapants.

Dans cette partie, nous décrivons l'ensemble des techniques utilisées pour l'obtention des résultats expérimentaux présentés dans cette thèse en mettant l'accent sur les limites et avantages de chaque technique.

Dans un premier temps, nous présenterons le microscope PALM de l'Institut de Biologie Structurale et les techniques de préparation des échantillons pour la microscopie super-résolution. Dans un second temps, nous aborderons les méthodes d'analyse des jeux de données molécule unique, notamment les méthodes de mesure des rendements quantiques de phototransformations. Dans un dernier temps, nous présenterons les méthodes ayant permis la caractérisation structurale et biochimique des protéines fluorescentes présentées.

Collecte et traitement de données PALM

6.1 Présentation de l'installation PALM de l'IBS

Les données molécule unique présentées dans cette thèse ont été collectées sur l'installation PALM de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble telle que décrite dans ce Chapitre (Figure 6.1).

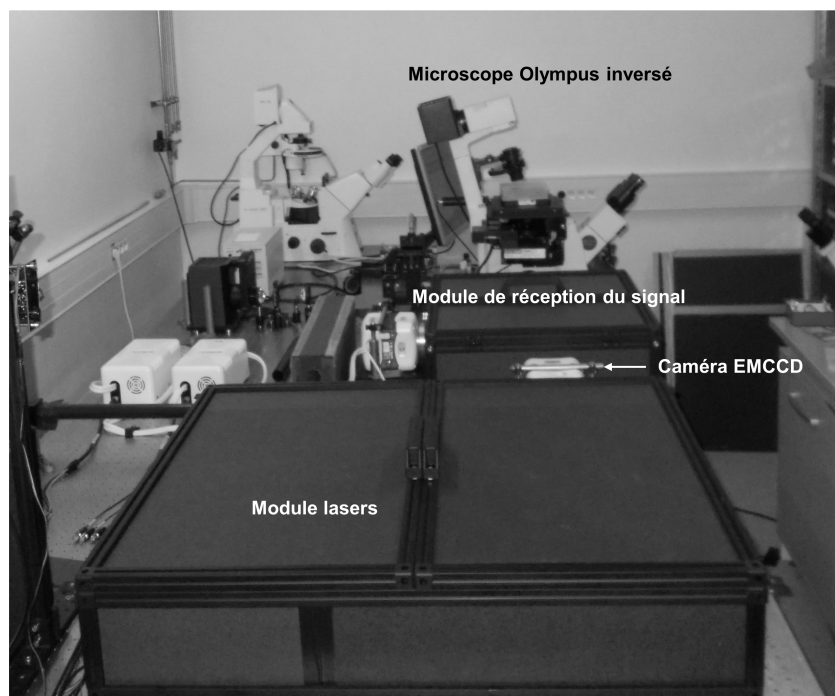


Figure 6.1 – Vue d'ensemble du microscope PALM de l'IBS de Grenoble

6.1.1 Module d'excitation

Les échantillons sont illuminés grâce à des sources lasers à solides pompés par diodes (DPSS) à émission continue de différentes longueurs d'ondes (405 nm : CrystaLaser / 488 nm : SpectraPhysics / 561 nm : Cobolt Jena / 643 nm : diode laser Toptica) dont l'intensité et les séquences temporelles d'illumination sont modulées par un filtre acousto-optique accordable (AOTF, Quanta Tech) (Figure 6.2 A). Les profils des faisceaux lasers au niveau de l'échantillon sont correctement ajustés par une gaussienne, permettant ainsi de prédire mathématiquement la densité de puissance laser locale (Figure 6.2 C,D). Afin d'éviter une photo-sélection artéfactuelle au sein d'échantillons pour lesquels les dipôles des chromophores ont des orientations variables et fixes dans le temps, les faisceaux lasers sont polarisés circulairement grâce à une lame à retard quart d'onde (Figure 6.2 B)¹.

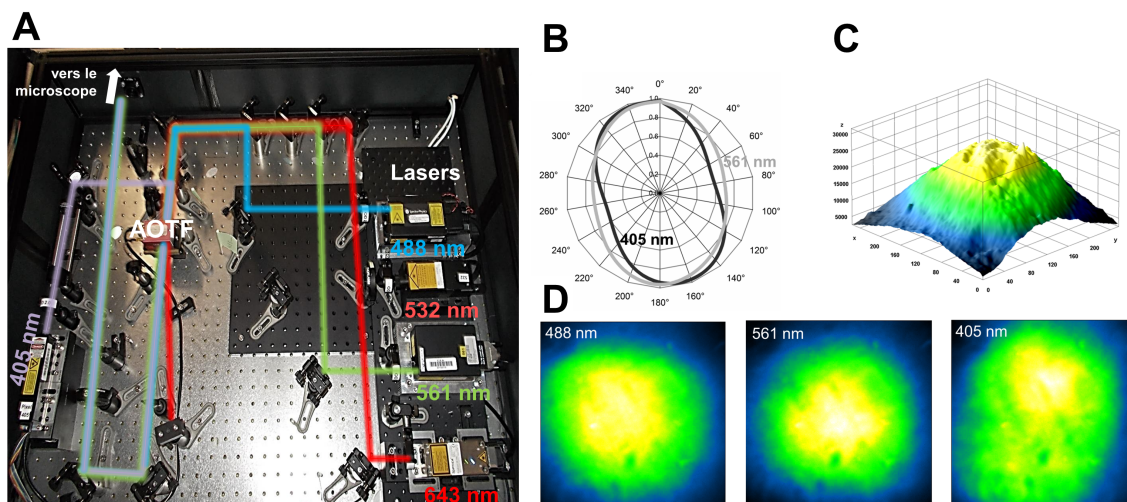


Figure 6.2 – Caractéristiques des lasers de l'installation PALM (A). Vue d'ensemble du module d'excitation laser (B). Polarisation (quasi-circulaire) des lasers 405 et 561 nm utilisés pour la collecte de jeux de données PALM (C,D). Profils des lasers mesurés au niveau de l'échantillon à l'aide d'une lamelle recouverte d'un fluorophore adapté (Stabilo jaune ou rose).

6.1.2 Microscope

L'installation est composée d'un microscope inversé IX81 d'Olympus équipé d'un objectif x100 apochromatique d'ouverture numérique (ON) égale à 1.49. La profondeur de champ pour cet objectif (*depth of field*, DoFi ; *i.e.* volume de l'échantillon dont l'image est focalisée sur le capteur de la caméra) est de l'ordre de 550 nm d'après l'équation (6.1).

1. Alors qu'avec une polarisation linéaire les dipôles ayant des coordonnées sphériques $\phi \neq -180^\circ$ ou $\phi \neq +180^\circ$ et $\theta=0^\circ$ ne sont pas excités, avec une polarisation circulaire, tous les dipôles avec $\theta=0^\circ$ sont excités quelque soit la valeur de ϕ .

$$DoFi = \frac{\eta \cdot ON \cdot e}{M} + \frac{\eta \lambda}{ON^2} \quad (6.1)$$

avec η , l'indice optique de l'huile à immersion (huile type FF (Cargille); $\eta=1.479$), ON , l'ouverture numérique de l'objectif ($ON=1.49$), e la taille du pixel sur la caméra ($e=16 \mu\text{m}$), M le grandissement ($M=\times 150$) et λ la longueur d'onde d'excitation ($\lambda=500 \text{ nm}$).

Grâce à un périscope situé à l'arrière du microscope, l'illumination peut alternativement être réglée en champ large ou en réflexion interne totale (*total internal reflexion fluorescence*, TIRF). En mode TIRF, seules les molécules résidant à une distance (appelée profondeur de pénétration et notée β^{-1}) couverte par les ondes évanescentes formées à l'interface lamelle/milieu de montage sont excitées. En général, avec $\beta^{-1} \sim 100\text{nm}$, le rapport signal/bruit est significativement amélioré en conséquence de l'excitation différentielle des molécules proches et distantes de la lamelle. Alors qu'en champ large les molécules situées en dehors de la profondeur de champ sont excitées et contribuent à un signal diffus (bruit de fond), en illumination TIRF leurs distances à la lamelle $> \beta^{-1}$ empêchent leur excitation (Figure 6.3). La variation exponentielle de l'intensité de l'onde évanescente en fonction de la distance à la lamelle (z) (équation 6.2) empêche l'estimation précise de la densité de puissance locale pour chaque molécule dans les échantillons où la distance entre molécules et lamelle est hétérogène. En l'absence d'information sur les conditions d'illumination locale, l'estimation des rendements quantiques de phototransformations est compliquée (voir Chapitre 7, page 121 *sqq.*).

$$I(z) = I_0 \exp(-\beta z) \quad (6.2)$$

avec β^{-1} la profondeur de pénétration, z la distance lamelle-molécule et I_0 l'intensité de l'onde évanescente à la lamelle.

Limitation de la dérive

L'étude du comportement photophysique d'une molécule unique repose principalement sur la capacité de l'expérimentateur à reconstruire au cours du temps sa trace de fluorescence. Afin de faciliter la reconstruction de ces traces de fluorescence, la dérive (mouvements de l'échantillon par rapport à l'objectif du microscope) doit être minimale, sinon prise en compte et corrigée. Dans le cas où la dérive est importante, il est nécessaire d'intégrer à l'échantillon des billes fluorescentes photorésistantes (TetraSpeck Microspheres, $0.1\mu\text{m}$, ThermoFisher Sc.). Le suivi de leur position (x,y) au cours de la collecte permet de mesurer la dérive latérale pour la corriger ensuite. Dans le cas du microscope PALM de l'IBS, la

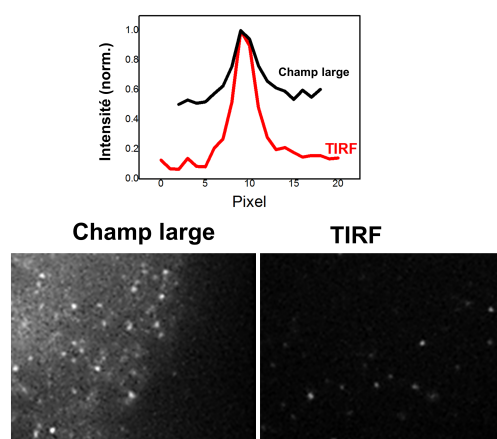


Figure 6.3 – Caractéristiques de l'illumination par réflexion interne totale (TIRF) (Bas). Cellules HeLa exprimant la protéine fluorescente mEos2 libre dans le cytoplasme observées en champ large ou en illumination TIRF (Haut). Profils d'intensité d'une molécule unique en champ large et en TIRF mettant en évidence un amélioration du rapport signal/bruit dans le second mode.

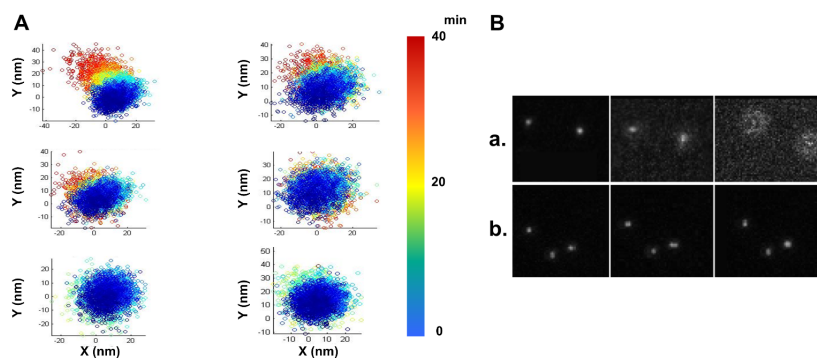


Figure 6.4 – Dérive latérale et axiale de billes fluorescentes sur le microscope équipé d'une platine IX2-NPS (A). Des billes fluorescentes montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage 80% glycérol sont imagées pendant 40 minutes (1 panneau correspond à 1 bille). Les positions (x,y) de chaque bille à chaque instant (t=0 : bleu à t=40 min : rouge sombre) sont représentées sur les graphiques. Sur l'échelle de temps étudiée, la dérive latérale est de l'ordre de la précision de localisation (B). Dans les mêmes conditions expérimentales, une image des billes est collectée à t=0, à t=20 min et à t= 40 min (a.) sans respect d'un temps de stabilisation et en utilisant l'huile à immersion Nikon ou (b.) après respect d'un temps de stabilisation et en utilisant l'huile à immersion type FF Cargille.

dérive dans le plan (x,y) est limitée grâce au montage d'une platine IX2-NPS pour tourelle (Olympus). Cette platine sertit l'objectif si bien la solidarité des deux éléments réduit considérablement leurs mouvements relatifs (dérive latérale). Des expériences menées sur billes TetraSpeck pendant 40 minutes mettent en évidence l'absence de dérive latérale significative avec l'utilisation de la platine IX2-NPS (Figure 6.4).

La dérive axiale (selon l'axe z) est à l'origine d'une perte de la focalisation au cours de la collecte. La dérive en z est limitée par l'utilisation d'une huile faiblement visqueuse (170 centiStokes; huile à immersion type FF Cargille) et par le respect d'un temps de stabilisation entre le positionnement de la lamelle sur la platine et la collecte des données.

L'utilisation particulièrement contraignante d'un tel système nous a amené récemment à modifier l'installation PALM. Aujourd'hui, la combinaison d'une platine stable contrôlée par ordinateur et à pas nanométrique ainsi que le contrôle de la dérive axiale grâce à l'utilisation du module de correction de dérive en z du microscope Olympus rend la collecte de données PALM plus confortable.

6.1.3 Caméra et module deux-couleurs

La fluorescence émise par l'échantillon sous illumination est collectée sur une caméra à dispositif de transfert de charges à multiplication d'électrons (EMCCD) Evolve rétro-éclairée (PhotoMetrics) équipée d'un capteur de 512x512 pixels dont la taille physique du pixel est de 16x16 μm . L'image est focalisée sur le capteur de l'EMCCD grâce à un télescope en amont de la caméra dont le rapport des deux focales vaut 1.5. Le télescope porte la taille du pixel de l'image collectée dans la cas de l'utilisation d'un objectif x100 à $\frac{16\mu\text{m}}{1.5 \times 100} \sim 107 \text{ nm}$.

Le nombre de photons émis par un fluorophore est estimé à partir du nombre de coups mesurés sur l'image connaissant le gain de la caméra EMCCD (coups/photons). Ce dernier est estimé à partir d'une courbe de calibration établie en fonction du gain de la caméra EMCCD et de l'efficacité quantique à longueur d'émission (en pratique constante sur la gamme lumineuse étudiée).

Module PALM deux couleurs

Pour la collecte de jeux de données deux-couleurs (vert/rouge), un module amovible est placé en amont de la caméra. La combinaison d'un filtre dichroïque triple bande sur le microscope et d'un filtre dichroïque passe-haut 561 nm sur le module deux-couleurs (Figure 6.5 B) permet de séparer les signaux de fluorescence vert et rouge sur les deux moitiés du capteur de la caméra en suivant le trajet optique présenté en Figure 6.5 A. Les aberrations chromatiques et géométriques à l'origine du décalage entre la position d'un fluorophore dans le canal de fluorescence vert et rouge sont corrigées par corrélation du signal vert et rouge de billes TetraSpeck (Figure 6.6).

L'utilisation de ce module permet d'imager cycliquement avec un délai de quelques dizaines de ms la population verte et rouge d'une PCFP, ce qui le rend donc particulièrement adapté à l'étude de la photoconversion vert à rouge de ces protéines.

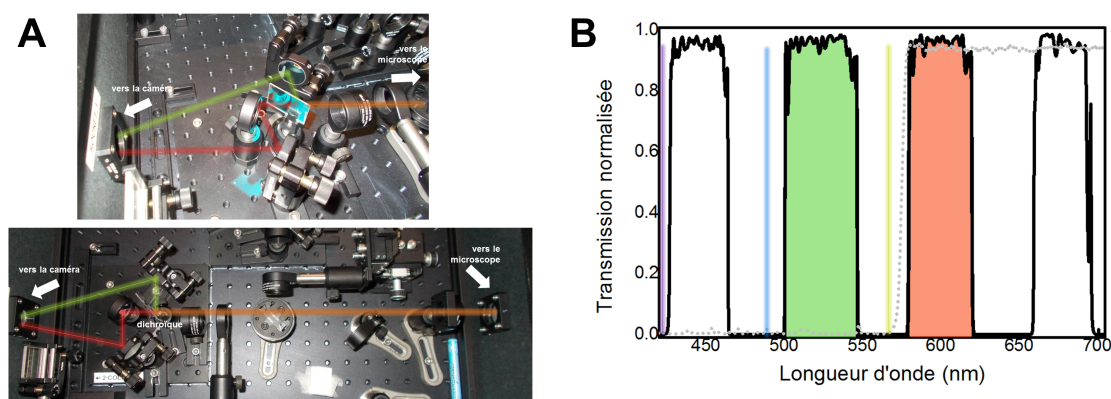


Figure 6.5 – Caractéristiques du module PALM deux-couleurs (A). Vues d'ensemble du module PALM deux-couleurs (B). Pour observer la population verte (excitée par le laser 488 nm repéré par un trait cyan) et la population rouge (excitée par le laser 561 nm repéré par un trait jaune) lors du phénomène de photoconversion (induit par le laser 405 nm repéré par le trait violet), le microscope est équipé d'un filtre dichroïque triple bande (représenté par un trait plein ; Z442/488/568RPC, Chroma Technology). Le module deux-couleurs est équipé d'un filtre dichroïque passe-haut 561 nm (représenté par un trait pointillé ; Semrock BrightLine 561 nm/ Di02-R561) permettant la séparation de la lumière verte et rouge.

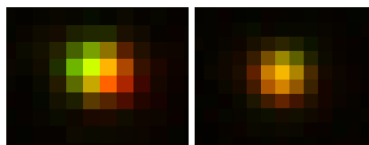


Figure 6.6 – Correction des aberrations chromatiques et géométriques (Gauche). Superposition des PSF d'une bille TetraSpeck dans le canal de fluorescence vert et dans le canal de fluorescence rouge en l'absence de correction (Droite). Après correction pour les aberrations chromatiques et géométriques, les PSF dans les deux canaux se superposent avec une imprécision inférieure à la précision de localisation.

6.2 Préparation d'échantillons pour la microscopie PALM

L'étude de protéines à l'échelle de la molécule unique contraint à la plus grande vigilance quant aux contaminations par des composés fluorescents présents notamment à la surface des lamelles de verre et dans certains tampons [Rajulapati, 2009] [Gust et al., 2014]. Ces contaminants peuvent être à l'origine de faux-positifs s'ils sont confondus avec le signal émis par un fluorophore d'intérêt. Ces faux-positifs sont à l'origine de traces additionnelles et peuvent alors conduire à des conclusions erronées quant au comportement photophysique de la protéine fluorescente à l'étude. D'autre part, les contaminants situés hors de la profondeur de champ (DoFi) contribuent à diminuer le rapport signal/bruit par une augmentation du bruit de fond.

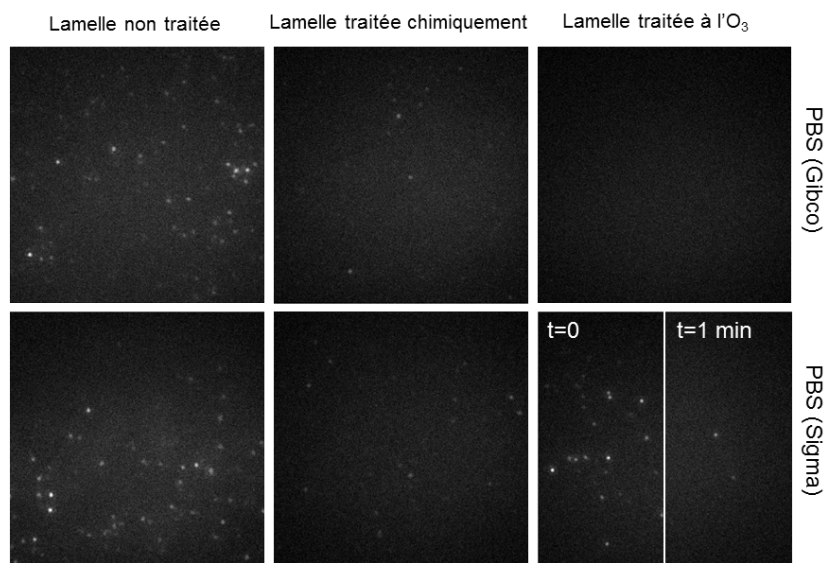


Figure 6.7 – Importance du traitement des lamelles et de la nature du milieu de montage pour la minimisation du bruit Images dans le canal de fluorescence rouge (illumination 561 nm) d'un champ de $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ de deux lamelles (traitées ou non) entre lesquelles est monté du PBS. Pour la lamelle traitée à l'ozone et en présence de PBS fait à partir de sels, après 1 minute d'illumination, le nombre de contaminant devient négligeable. Un traitement des lamelles à l'ozone et l'utilisation du PBS commercial Gibco minimise la contamination fluorescente.

6.2.1 Traitement des surfaces et des tampons

Afin de minimiser les contaminations, nous avons comparé l'efficacité de différentes méthodes de traitement des lamelles (Menzel-Gläzer, verre borosilicaté D263M de Schott AG ; épaisseur 0.13/0.16 mm) et étudié la fluorescence endogène de différents tampons (Figure 6.7). En l'absence de traitement des lamelles et quel que soit le tampon utilisé, une importante contamination est observée dans le

canal rouge de fluorescence sous illumination par laser 561 nm (densité de puissance identique à celle utilisée en PALM, $\sim 1 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ au centre du profil laser). Le traitement chimique des lamelles réduit considérablement la contamination (Figure 6.7). Ce traitement consiste en des sonications successives en bain d'acétone de qualité spectroscopique (15 min), de soude 5 M (10 min) et d'eau filtrée dé-ionisée (15 min). Le niveau de contamination minimum a été obtenu après traitement des lamelles à l'ozone (O_3) et à une lumière ultraviolette (Figure 6.7). Cette méthode de traitement consiste en l'exposition pendant 20 min des lamelles à un flux d'ozone généré dans une chambre par une intense illumination UV (four à ozone, UVOCS modèle T10X10/OES/E).

En général, la contamination est portée à son niveau minimal lors de l'utilisation du tampon PBS commercial Gibco PBS 1X pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific) plutôt qu'un tampon PBS réalisé à partir de sels dilués dans de l'eau filtrée dé-ionisée (Figure 6.7).

En routine, les lamelles sont donc traitées à l'ozone et le tampon PBS (Gibco, ThermoFischer) commercial est utilisé.

6.2.2 Immobilisation de protéines fluorescentes *in vitro*

Comme mentionné plus tôt, l'étude du comportement photophysique des protéines fluorescentes à l'échelle de la molécule unique nécessite de pouvoir retracer leurs variations de fluorescence au cours du temps. Pour cela, les protéines fluorescentes à l'étude doivent être ancrées au sein de l'échantillon au cours du temps. Nous présenterons dans cette section deux techniques principales d'immobilisation des protéines *in vitro*.

Immobilisation par capture au sein de réseaux supramoléculaires

Une première stratégie consiste en la capture des protéines par inclusion au sein d'une structure à réseau suffisamment dense pour empêcher la diffusion de ces dernières tout en permettant l'échange de solvant et de petites molécules.

Les hydrogels sont de bons candidats pour la capture de protéines par inclusion. Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydratés et hydrophiles réticulés chimiquement ou physiquement. Leur utilisation est peu coûteuse, relativement rapide à mettre en place et versatile (piégeage de protéines et de cellules) [Wang and Hsieh, 2008].

Nous avons particulièrement utilisé l'alcool poly-vinyle (PVA), un polyol dont les fonctions hydroxyles en se rapprochant sous l'effet d'une déshydratation forment entre elles des liaisons hydrogènes intra- et inter-moléculaires (dites jonctions cristallines) permettant la mise en place d'un réseau moléculaire. Les protéines fluorescentes sont diluées en concentrations nanomolaires dans une solution de PBS pH 7.4 à 1% de PVA. La solution est étalée sur une lamelle par centrifugation ou en raclant la goutte à la surface de la lamelle à la manière d'un frottis sanguin. L'hydrogel formé présente deux types de cavités : des cavités micrométriques appelées micropores observables sous microscope et des cavités nanométriques appelées nanopores dans lesquelles viennent se loger les protéines fluorescentes et invisibles sous microscope photonique (Figure 6.8).

Des expériences de FRAP révèlent l'absence de diffusion significative des protéines au sein d'un hydrogel de PVA 1% en une heure (Figure 6.9). Des expériences d'imagerie défocalisée² à l'échelle de la molécule unique révèlent par ailleurs l'absence de mobilité rotationnelle de la protéine au sein de son nanopore

2. Pour la méthode d'imagerie défocalisée voir [Toprak et al., 2006].

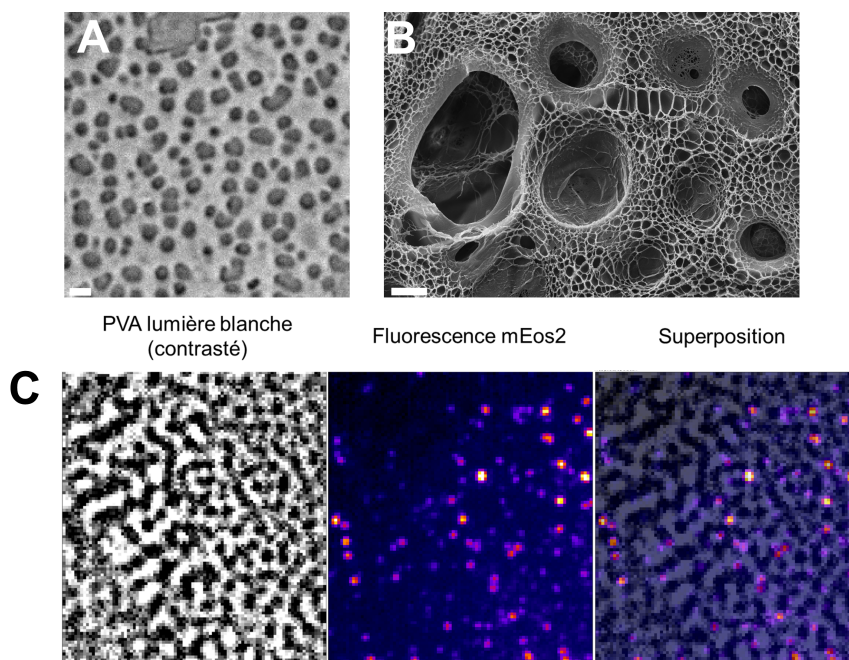


Figure 6.8 – Caractéristiques d'un hydrogel de PVA (A). Hydrogel de PVA 1% observé sous microscope photonique sous épi-illumination avec une lumière blanche (Barre d'échelle : 2 μ m) (B). Hydrogel de PVA observé en microscopie électronique à balayage. Image extraite du site <http://www.lentikats.eu/en/about-biocatalyst-cisteni> (Barre d'échelle 2 μ m). Remarquer la présence de nanopores (C). L'image de l'hydrogel de PVA sous lumière blanche est traité afin de faire apparaître les micropores en noir et les régions riches en nanopores en blanc (contraste maximum, image de gauche). La fluorescence issues de quelques molécules uniques de mEos2 sont représentées sur l'image du milieu. La superposition (à droite) de l'image en lumière blanche et en fluorescence met en évidence la présence de la protéine uniquement dans les régions riches en nanopores.

(Figure 6.10 A). Les dipôles des chromophores au sein d'un hydrogel de PVA présentent donc une orientation hétérogène et fixe au cours du temps générant une anisotropie : toutes les coordonnées sphériques (θ, ϕ) sont couvertes aléatoirement par la population (hétérogénéité de section efficace). En conditions d'anisotropie, on définit, selon l'angle θ du dipôle, une constante d'excitation k_{ex}^θ d'après l'équation 6.3.

$$k_{ex}^\theta = \frac{3}{2} k_{ex} \cos^2 \theta \quad (6.3)$$

avec k_{ex} la constante d'excitation d'un fluorophore dont le dipôle explore pendant le temps d'acquisition de l'image toutes les coordonnées θ (conditions d'isotropie).

Les protéines pour lesquelles le dipôle est orienté défavorablement par rapport au laser (*i.e.* $\theta=0$, le long de l'axe optique) ont une section efficace réduite et donc une constante d'excitation k_{ex}^θ faible (équation 6.3). Les molécules ayant leur dipôle orienté proche de l'axe optique sont alors localisées avec une mauvaise précision ($\sigma \sim \frac{1}{\sqrt{N}}$, voir équation 3.4, page 63) voire non localisées si trop peu de photons sont collectés. Le sous-échantillonnage principalement dû au photoblanchiment et alors

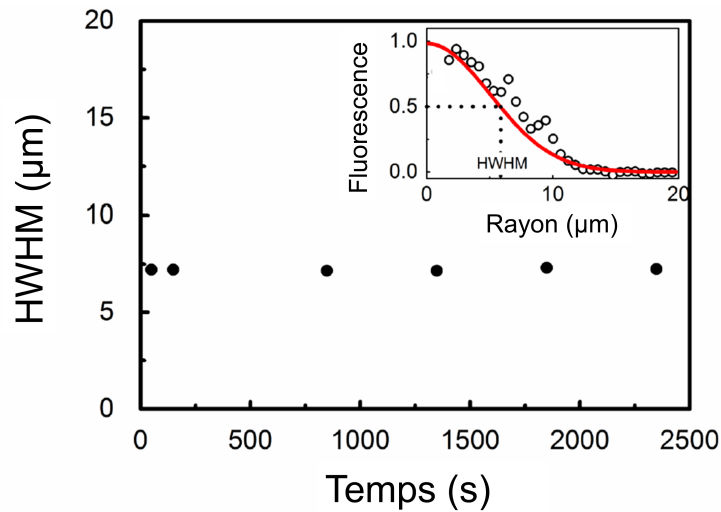


Figure 6.9 – Suivi par FRAP de la diffusion de protéines mEos2 immobilisées au sein d'un hydrogel de PVA Une région circulaire de 20 μm photoconvertie par un pulse de 20 ms de laser 405 nm est imagée par microscopie confocale (fluorescence rouge). Le maximum de fluorescence est normalisé à 1 dans la région photoconvertie. La distance entre le centre de la région et la position où l'intensité atteint 50% du maximum (notée HWHM pour *half-width at half-maximum* du profil gaussien de la fluorescence rouge dans la région photoconvertie présenté dans l'encart) est rapportée au cours du temps. En 2500 secondes, les molécules mEos2 rouges ne diffusent pas significativement au sein du réseau de PVA

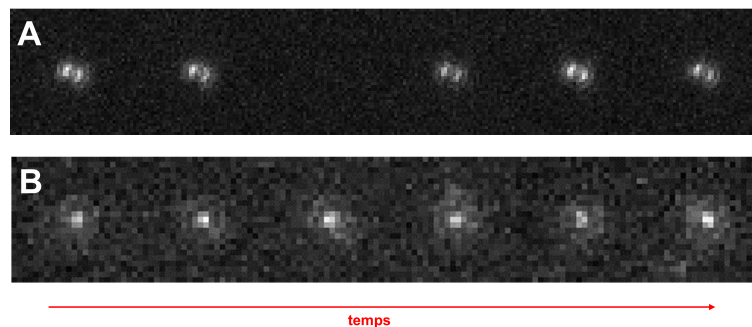


Figure 6.10 – Imagerie défocalisée de mEos2 immobilisée au sein d'un hydrogel de PVA ou immobilisée par amidification (A). Molécule unique de mEos2 immobilisée dans un hydrogel de PVA 1% sous illumination 561 nm au cours du temps observée par imagerie défocalisée. Remarquer la stabilité du dipôle au cours du temps indiquant l'absence de mobilité rotationnelle de la molécule dans son nanopore (B). Molécule unique de mEos2 immobilisée par la méthode APTES-DSS sous illumination 561 nm au cours du temps observée par imagerie défocalisée. Remarquer la liberté rotationnelle du dipôle.

dans ces conditions expérimentales plus importante. D'autre part, l'anisotropie rend les constantes cinétiques de phototransformations localement hétérogènes et peut alors avoir des conséquences sur

l'étude photophysique de la protéine fluorescente (voir page 180)³.

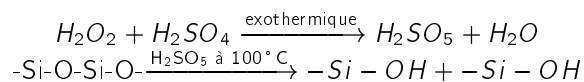
Au delà des effets mineurs d'anisotropie, cette méthode d'inclusion des protéines présente un inconvénient majeur en terme de contrôle de l'environnement. Une fois l'hydrogel formé, le tampon ne peut pas être facilement échangé contre un autre tampon présentant des conditions physico-chimiques différentes (pression partielle en dioxygène, potentiel redox, pH, salinité par exemple). Enfin, il a été rapporté que le PVA affecte la photophysique de composés organiques (augmentation du rendement quantique de fluorescence [Gryczynski et al., 1986] ; augmentation du scintillement [Zondervan et al., 2003]). Cet effet pourrait être la conséquence d'une faible diffusibilité du dioxygène au sein de l'hydrogel [Sugunan et al., 2011].

Immobilisation par amidification sur lamelles fonctionnalisées

Une seconde stratégie d'immobilisation des protéines repose sur la formation de liaisons non covalentes de forte affinité ou covalentes entre la protéine d'intérêt et la surface fonctionnalisée d'une lamelle de verre. Généralement, la formation d'un réseau de liaisons non covalentes de forte affinité entre des biotines fixées à la surface de la lamelle fonctionnalisée et des streptavidines fusionnées à l'une des extrémités terminales de la protéine permet l'immobilisation efficace et durable des protéines fluorescentes (constante de dissociation de l'ordre de 10^{-14} mol.L⁻¹) [Lee et al., 2012]. À la différence des méthodes d'immobilisation par inclusion dans un hydrogel, le milieu de montage est facilement échangeable contre un autre et les conditions environnementales alors d'avantage contrôlées. Malgré tout, cette méthode requière la construction d'une chimère streptavidine/protéine d'intérêt et l'état d'oligomérisation élevée de la streptavidine (tétramère⁴) est susceptible de modifier l'état d'oligomérisation de la protéine étudiée.

Afin de pallier les limitations imposées par la méthode d'immobilisation par affinité, nous avons développé, d'après une idée originale de Virgile Adam, une méthode d'immobilisation des protéines reposant sur la formation d'une liaison covalente entre les groupements amines libres de la protéine (NH₂ terminal, lysine et arginine) et la surface fonctionnalisée d'une lamelle. Cette méthode permet l'immobilisation aspécifique de toute protéine et un contrôle simple de l'environnement. La fonctionnalisation de la lamelle s'effectue en trois étapes principales.

Attaque à l'acide du verre (etching) La première étape permet la formation de groupements silanols (Si-OH) réactifs à la surface de la lamelle. Les lamelles plongées dans un bain 50% acide sulfurique 50% peroxyde d'hydrogène (formation d'acide peroxymonosulfurique : acide de Caro) porté à 100 °C, sont nettoyées d'éventuels contaminants organiques fluorescents et les groupements siloxanes du verre oxydés en groupements silanols (Figure 6.11 l).



3. Alternativement, pour la collecte de données à l'échelle d'ensemble, les protéines sont immobilisées au sein d'un hydrogel de polyacrylamide (PAA) en suivant le protocole utilisé par Dempsey [Dempsey et al., 2015].

4. Naturellement tétramérique, des efforts sont mis en œuvre afin de développer des variants monovalents à forte affinité de la streptavidine [Howarth et al., 2006].

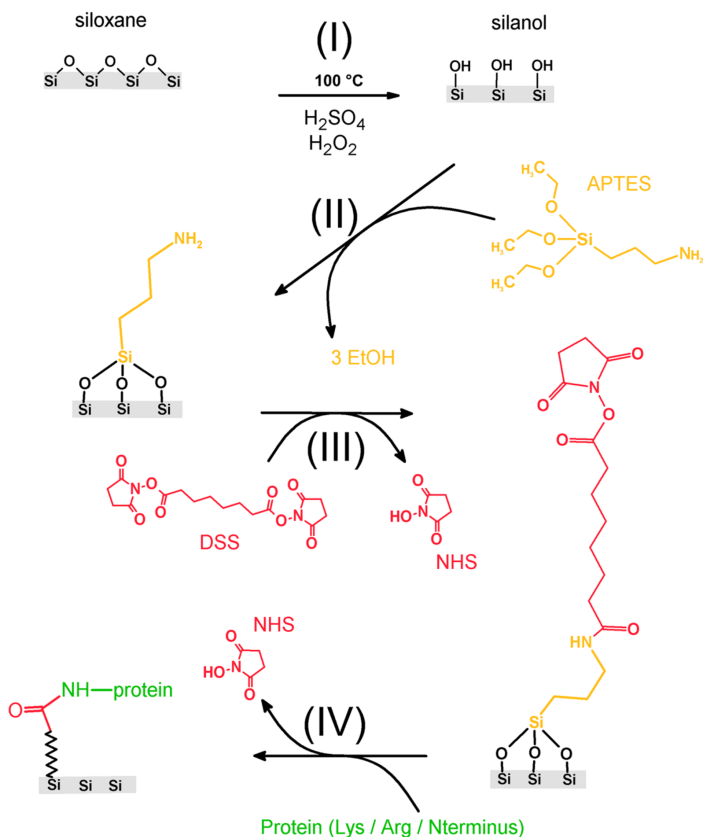


Figure 6.11 – Vue synoptique des réactions chimiques permettant l'immobilisation de protéines par liaisons covalentes à la surface de lamelles de verre

Fonctionnalisation primaire à l'APTES La deuxième étape, après rinçage des lamelles à l'eau, permet la fixation covalente à la surface de la lamelle d'un groupement porteur d'une amine réactive. Les lamelles sont plongées pendant 2 minutes dans un bain de (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) 2% dilué dans de l'acétone. L'APTES réagit avec les silanols et forme des liaisons siloxanes triples en réagissant avec les groupements hydroxyles des silanols de la surface (Figure 6.11 II).

Fonctionnalisation secondaire au DSS La troisième étape, après rinçage des lamelles à l'acétone puis à l'eau, permet la fixation covalente de molécules porteuses d'un groupe réactif aux amines (groupe N-hydroxysulfosuccinimide, NHS). Les lamelles sont recouvertes d'une solution de 100 μM disuccinimidyl subérate (DSS) dilué en DMSO pendant 1 heure (Figure 6.11 III). Le DSS est porteur de deux groupements NHS esters présentant une forte réactivité vis-à-vis des amines du fait du fort caractère nucléofuge du groupe partant. Un des deux groupements réagit avec le groupement amine libre de

l'APTES pour former une liaison amide.

Une fois les lamelles lavées abondamment au DMSO afin de retirer le DSS non fixé à la lamelle puis au tampon PBS, les lamelles sont recouvertes d'une solution de protéines diluées à des concentrations nanomolaires pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Il se forme alors des liaisons amides entre les amines libres de la protéine et les groupements NHS esters du DSS de surface (Figure 6.11 IV). Les protéines non fixées à la lamelle sont retirées par un lavage abondant au tampon PBS.

Après incubation des lamelles fonctionnalisées en présence de protéines fluorescentes, le bruit de fond augmente significativement (Figure 6.12). Cette augmentation semble être la conséquence d'une fixation des protéines sur l'autre face de la lamelle. Excitées mais en dehors de la profondeur de champ, ces fluorophores contribuent à une augmentation du bruit de fond. Aussi, le rapport signal sur bruit est légèrement plus faible avec la méthode APTES-DSS par rapport à la méthode d'immobilisation en PVA. L'optimisation technique du protocole devrait permettre d'empêcher la fonctionnalisation des deux faces de la lamelle et contribuer à significativement augmenter le rapport signal/bruit.

Cette méthode d'immobilisation à la différence de l'inclusion au sein d'un hydrogel de PVA laisse

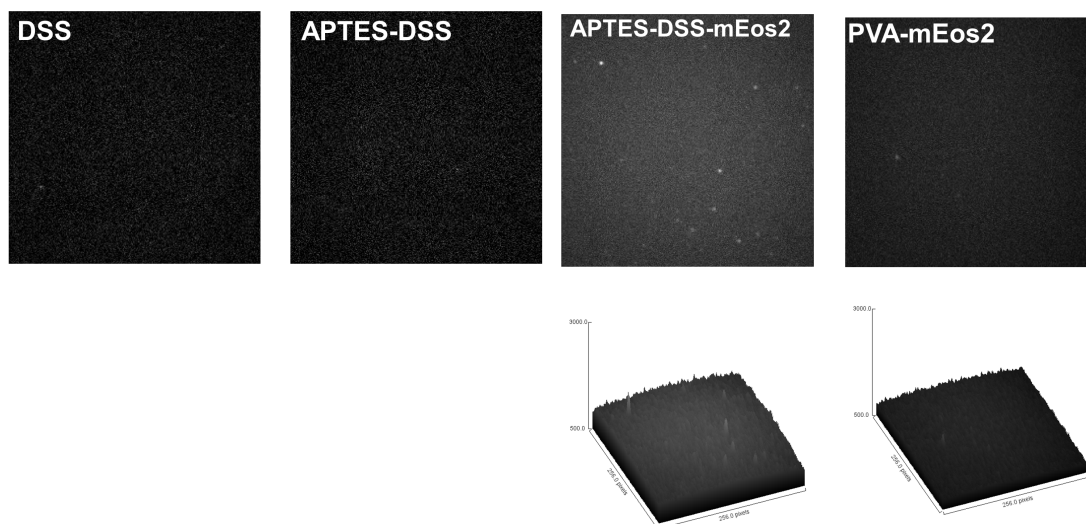
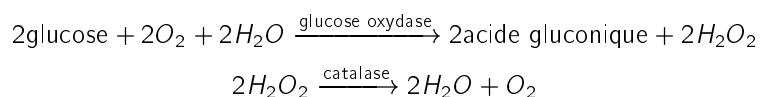


Figure 6.12 – Comparaison des méthodes d'immobilisation des protéines Toutes les images sont représentées sur une même échelle d'intensité. Remarquer la hausse significative du bruit de fond dans le cas de l'immobilisation par amidification suite à l'ajout de la protéine fluorescente.

la molécule libre de changer d'orientation au cours du temps (isotropie ; Figure 6.10 B, page 109). Potentiellement, tous les fluorophores sont alors orientés dans une orientation favorable à leur observation, limitant ainsi le sous-échantillonnage important en PVA. D'autre part, les constantes cinétiques d'excitation sont localement homogènes facilitent l'étude photophysique de la protéine fluorescente immobilisée.

Les conditions du milieu de montage pouvant être aisément contrôlées et modifiées⁵, certaines expériences ont été réalisées en conditions anaérobie. L'oxygène moléculaire dissous dans le tampon PBS est retiré d'après la réaction présentée ci-dessous grâce au système enzymatique glucose oxydase/catalase en présence de glucose (0.5 mg.mL⁻¹ glucose oxydase (Sigma Aldrich), 40 µg.mL⁻¹ catalase (Roche) and 10% (poids/volume) glucose) [van de Linde et al., 2011c].



Afin de limiter les échanges de dioxygène entre le tampon et l'atmosphère, les réactions enzymatiques de consommation de l'oxygène moléculaire sont réalisées dans un tube clos contenant un minimum d'air. Une fois le milieu de montage placé entre lame et lamelle, ces dernières sont lutées (comme pour les autres préparations) grâce à l'utilisation de valap (mélange équimassique de lanoline, vaseline et paraffine) permettant de limiter les échanges avec l'atmosphère. Les jeux de données sont collectés dans les minutes qui suivent.

Production et purification des protéines

Les protéines d'intérêt recombinantes sont produites par culture de bactéries *E. coli* de souche BL21 (DE3) (New England BioLabs Inc.). Des bactéries BL21 compétentes sont transformées par choc thermique à 42 °C avec un plasmide pRSET porteur du gène codant pour la protéine fluorescente d'intérêt et un gène de résistance à un antibiotique (ampicilline) pour la sélection. Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB agar complété en antibiotique (1 mg/mL) et incubées sur la nuit à 37 °C. Une colonie est repiquée et mise en culture au minimum 5 heures dans un milieu LB avec antibiotique à 37 °C avec agitation. 100 µL de la culture sont dilués dans 1 L de milieu LB avec antibiotique et mis en culture sur la nuit à 37 °C avec agitation. Les bactéries de la culture sont culottées par centrifugation à 5000 rpm et le culot est resuspendu dans un tampon HEPES 50 mM NaCl 300 mM pH 7.4 (tampon de lavage). Les bactéries sont lysées par sonication pulsée. Un inhibiteur de protéase (COmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) est ajouté au lysat avant centrifugation à 15 000 rpm afin de culotter les membranes et débris cellulaires. Le surnageant est alors filtré (0.4 µm) puis incubé sur une résine NTA-Ni pendant 30 min à 4 °C. La résine est chargée dans une colonne en plastique et lavée avec l'équivalent de 5 volumes de résine de tampon de lavage. Les protéines fixées aspécifiquement à la résine sont éluées par lavage de la résine avec l'équivalent de 3 volumes de résine de tampon de lavage contenant 20 mM d'imidazole. L'éluion de la protéine d'intérêt est permise par lavage avec du tampon de lavage contenant 200 mM d'imidazole. La protéine est ensuite dialysée dans des boudins 10 kDa sur la nuit à 4 °C dans un bain de 2 L minimum de tampon lavage.

5. Un tel système pourrait à l'avenir être couplé à un montage microfluidique pour permettre l'étude plus haut-débit de l'effet de l'environnement (notamment redox) sur le comportement photophysique des protéines fluorescentes.

6.2.3 Protéines en environnement cellulaire

Étant donnée la forte sensibilité du comportement photophysique vis-à-vis des conditions environnementales, l'étude du comportement photophysique (en particulier de scintillement) devrait se faire dans un environnement proche (dans l'idéal identique) à celui plus tard rencontré lors des expériences PALM quantitatives ou dynamique. Nous proposons donc de mesurer les rendements quantiques de phototransformations non seulement *in vitro* mais également *in cellulo*. Dans cette section, nous présenterons les méthodes de préparation des cellules pour l'étude photophysique des protéines fluorescentes en contexte cellulaire.

Protéines fluorescentes en bactéries

Des bactéries BL21 transformées sont mises en culture dans un milieu approprié (LB + antibiotique) pendant 3 heures avant fixation chimique par une solution de 4% paraformaldéhyde (PFA). Ce court temps de culture et l'absence d'induction permet la production de la protéine libre dans le cytoplasme à un niveau basal (fuites du promoteur fort T7 présent sur le plasmide pRSET). Ainsi, la densité de protéines fluorescentes est maintenue relativement basse. Après avoir été rincées au PBS afin de retirer le milieu de culture excédentaire, les bactéries sont incubées à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 1 heure dans une solution de 4 % paraformaldéhyde. Le fixateur chimique est retiré après centrifugation et les bactéries sont lavées abondamment avec du PBS afin de retirer l'excédent de PFA. Les bactéries sont ensuite immobilisées à la surface de la lamelle. Pour ce faire, les lamelles sont fonctionnalisées par recouvrement avec une solution de chitosane (polyoside à liaisons β à fort pouvoir de recouvrement) [Ducret et al., 2013].

L'étude de la photophysique des protéines fluorescentes en bactérie est peu commode à cause du faible volume de ces cellules (voir page 133 *sqq.*). En effet, si un minimum de 3000 molécules sont nécessaires à l'estimation correcte des rendements quantiques de phototransformation (voir page 135), cela implique que dans le volume cytoplasmique d'un colibacille ($1 \mu\text{m}^3$) une densité de 30 molécules par volume limité en diffraction (1 fL) est atteinte. Malgré les méthodes de correction développées, l'estimation correcte des rendements quantiques est très fortement compromise⁶. Il n'est alors pas envisageable de collecter des données suffisantes à l'estimation des rendements quantiques de phototransformation à partir de l'étude d'une unique bactérie. L'étude en parallèle de nombreuses bactéries exprimant la protéine fluorescente à un niveau très faible permet de contourner cet obstacle mais se heurte aux possibles effets de l'hétérogénéité inter-cellulaire (dont les variations de niveau

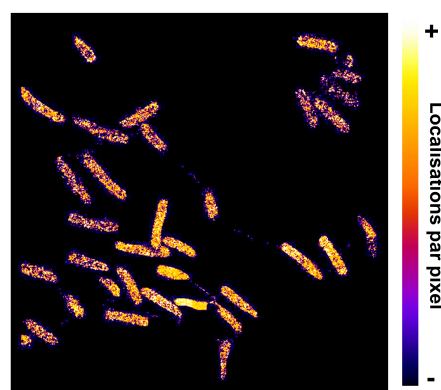


Figure 6.13 – Image super-résolue de bactéries BL21 exprimant mEos2 Image d'un champ de $25 \times 25 \mu\text{m}$ de bactérie BL21 transformées par un plasmide pRSET codant pour la PCFP mEos2. Les bactéries sont cultivées pendant 1 heure sans induction. Le nombre de localisation par pixel est représenté en fausse couleur. Remarquer la forte hétérogénéité d'expression entre bactéries et la forte concentration intracellulaire en protéine fluorescente prévenant la reconstruction des traces de fluorescence.

⁶. Entre autres, une telle densité moléculaire gêne à la reconstruction de clusters de localisations correctes (voir Figure 11.16 en Annexe, page 204).

d'expression de la protéine fluorescente de bactérie à bactérie est un indice, Figure 6.13) sur le comportement photophysique.

Étant données les techniques actuelles de localisation et de correction du scintillement, l'étude de la photophysique des protéines fluorescentes en cellules bactériennes nous semble particulièrement limitée. L'étude de la photophysique des protéines fluorescentes exprimées est nettement facilitée au sein de cellules eucaryotes de taille plus importante. Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que les conclusions faites concernant la photophysique en cellule eucaryote ne sont pas systématiquement valables en contexte procaryote à l'image des différences notables de comportement de mEos2 en cellules mammifères et en bactéries [Wang et al., 2014a]. À l'avenir, des efforts devront être menés pour permettre l'étude fine et non biaisée du comportement photophysique en bactérie.

Protéines fluorescentes en cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes, avec un volume de $\sim 2000 \mu\text{m}^3$ permettent de placer environ 2×10^5 molécules sans qu'il y en ait plus de 2 par volume limité en diffraction, facilitant ainsi fortement la mesure des rendements quantiques de phototransformation. En revanche, l'importante épaisseur de la cellule contribue à diminuer le signal/bruit des molécules uniques (les molécules en dehors de la DoFi excitées apparaissant sur la caméra comme un signal diffus (bruit de fond)). Une illumination de type TIRF ne pouvant être utilisée afin d'améliorer le rapport signal sur bruit à cause de son effet sur la densité de puissance locale (voir page 103), les cellules sont observées en champ large. Afin de limiter les problèmes de dégradation du rapport signal/bruit liés aux fluorophores situés en dehors de la profondeur de champ (DoFi), des cellules HeLa sont utilisées pour leur capacité d'étalement au substrat. La morphologie des cellules est telle que l'épaisseur de cytoplasme est relativement faible comparé à d'autres types cellulaires. Aussi, la finesse des cellules sur leurs bords permet d'augmenter le signal/bruit en diminuant le volume de cytoplasme situé en dehors de la profondeur de champ.

Les cellules sont cultivées en milieu Eagle Dulbecco modifié (DMEM, Life Technologies) complété par 10% de sérum fœtal de veau thermiquement inactivé (Life Technologies), 2 mM glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine et 1mM de pyruvate de sodium (Life Technologies) dans une atmosphère à 5% de CO_2 à 37 °C. 30 000 à 50 000 cellules sont mises en chambre LabTek II ($n=1.5$, Nalgene-Nunc) et cultivés pendant 48 heures dans le milieu DMEM enrichi afin de laisser les cellules s'étaler. 48 heures plus tard, les cellules sont transfectées par la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en utilisant 1 μg par puits de vecteurs pcDNA3 contenant la séquence codant pour la protéine fluorescente d'intérêt. 12 heures après transfection, les cellules sont nettoyées à l'aide d'un tampon PBS Gibco et fixées par une solution de PFA 4% (Sigma Aldrich) pendant 30 minutes à 37 °C puis lavées de nouveau au PBS. Les cellules sont alors directement observées.

6.3 Collecte de données PALM et localisation

Conditions expérimentales de collecte

Les conditions optimales de collecte permettant d'estimer les cinétiques de phototransformations des protéines fluorescentes à l'échelle de la molécule unique à l'aide du logiciel développé au sein de l'équipe ont été estimées par simulation (voir Figure 7.6, section 7.3, page 135).

De manière générale, les jeux de données PALM ont été collectés avec une illumination constante de laser 561 nm (~ 1 à 3 kW.cm^{-2}) pour l'excitation de la forme rouge et une illumination constante de laser 405 nm (~ 3 - 100 W.cm^{-2}) pour la photoconversion de la forme verte. Un filtre dichroïque passe-haut 561 nm combiné à un filtre passe-bande a été utilisé afin d'optimiser le rapport signal/bruit et ne pas collecter l'éventuelle fluorescence verte sous excitation par la lumière violette. Environ 10^4 images sont collectées avec un temps d'acquisition de 50 ms (sauf mention contraire). La densité moléculaire au moment de la collecte des images est maintenue minimale (dans 90% des cas : clusters composés d'une unique molécule) grâce à, soit une dilution nanomolaire de l'échantillon (*in vitro*), soit à une étape de pré-photoblanchiment (*in cellulo*).

Localisation des jeux de données

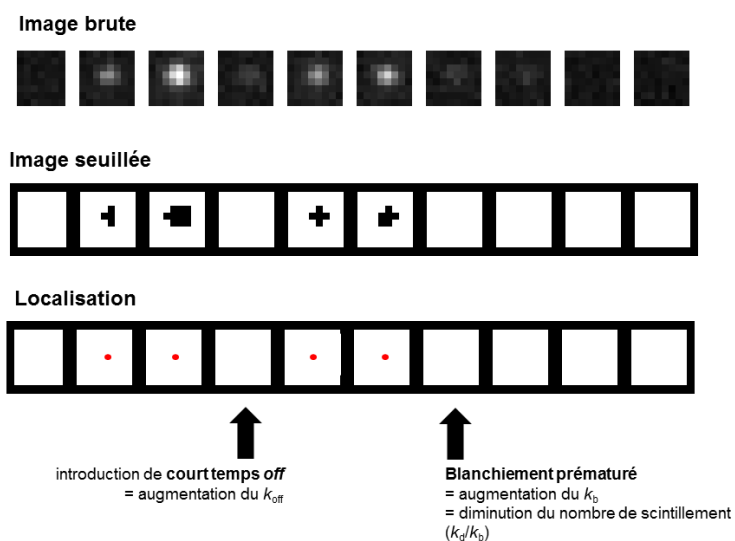


Figure 6.14 – Effet sur la photophysique de l'application d'un seuil avant localisation Dû à du scintillement ultra-rapide (temps *off* < temps d'acquisition de l'image) ou à une modification de l'orientation du dipôle du chromophore, l'intensité d'une molécule *on* peut passer en-deçà du seuil sélectionné. Cette molécule ne sera alors pas localisée introduisant selon les cas des scintillement à temps *off* très courts (plus tard exclus) soit un blanchiment prématuré, soit un allongement du temps de vie des états sombres.

Actuellement, de nombreux logiciels de localisation de molécules uniques sont disponibles gratuitement [Sage et al., 2015]. Les méthodes de localisations basées sur l'application d'un seuil d'intensité précédant l'ajustement de la réponse impulsionnelle optique par une gaussienne 2D (e.g. Quick-Palm [Henriques et al., 2010]) s'avèrent particulièrement peu performants comme le révèlent les travaux de Sage et al.. En effet, le nombre de photons émis par une molécule unique au cours du temps est variable (scintillement, protonation/déprotonation contribuent entre autres; Figure 6.14). Lorsque le fluorophore réside la plupart des 50 ms dans un état *off*, le nombre de photons émis passe en-deçà du

seuil de détection. Le fluorophore ne sera alors pas localisé (faux-positif), résultant en un tronçonnage des traces de fluorescence continues et introduisant des événements de scintillement artificiels à état *off* de court temps de vie (Figure 6.14). Dans le contexte de l'analyse fine du comportement photophysique à l'échelle de la molécule unique, il est indispensable que l'étape de localisation soit précise, c'est-à-dire sans faux-positifs ni faux-négatifs.

Afin de pallier les effets liés à la localisation précédé d'une sélection avec seuil d'intensité Dominique Bourgeois a développé, en s'inspirant des travaux menés par Aguet *et al.* [Aguet *et al.*, 2013], une méthode originale de localisation de molécules uniques à faible rapport signal/bruit. Cette nouvelle méthode s'avère particulièrement adaptée à nos besoins et à la réalité photophysique (*i.e.* fluctuation du nombre de photons émis image après image)⁷.

Détection des signaux statistiquement significatifs Dans un premier temps, les signaux statistiquement significatifs (*i.e.* correspondant probablement au signal émis par un fluorophore) sont détectés. En pratique, l'analyse est réalisée sur l'image après soustraction du bruit de fond et convolution par un filtre Laplacien de Gaussienne (LoG). Les maxima locaux de l'image convoluée sont détectés : parmi eux, une fraction correspond aux signaux statistiquement significatifs et l'autre à des variations locales du bruit. À partir de l'ajustement des zones centrées sur les maxima locaux par une fonction gaussienne « simplifiée » pouvant être conduit de manière analytique (pour les détails voir les informations supplémentaires de [Aguet *et al.*, 2013]), l'amplitude (notée A) et la déviation standard du bruit local (notée B) sont estimées. Les signaux sont considérés comme statistiquement significatifs grâce à un test-t unilatéral bivarié (test de Student) en prenant l'hypothèse nulle $H_0 = A < \kappa B$ (avec $\kappa = \sqrt{2} \cdot \text{erf}^{-1}(1 - 2\alpha)$ et α le seuil de signification fixée à une valeur inférieur à 0.05). Un masque des positions significatives est alors construit et l'image masquée est soumise à l'étape de localisation. Grâce à cette étape de détection fine, le signal issu d'un fluorophore résidant dans un état sombre la plupart du temps d'acquisition pourra être localisé évitant le tronçonnage des traces de fluorescence : les événements artéfactuels de scintillement tels que $t_{off}=1$ image sont largement écartés.

Localisation Dans un second temps, la position des fluorophores est estimée grâce à l'ajustement des signaux détectés par une Gaussienne 2D. Les localisations considérées comme statistiquement significatives et finalement conservées sont sélectionnées en appliquant la même stratégie que pour la détection. Pour chaque localisation sont obtenus les coordonnées spatiales (x,y), l'amplitude (A), l'écart type de la Gaussienne (r_0), le bruit de fond (*background*, B) et leurs incertitudes associées (notamment la déviation standard du bruit de fond appelée bruit (*noise*)). Le rapport signal/bruit local est également calculé (voir Figure 6.16).

En pratique, avec une taille de pixel $p=107$ nm, la précision de localisation de la population de molécules localisées suit une distribution normale centrée sur 25-30 nm (Figure 6.15).

Cette méthode de localisation est particulièrement efficace pour les jeux de données à rapport signal/bruit faible ou variable au cours du temps, en réduisant significativement les faux-négatifs.

7. Notre méthode a été développée en remplacement d'une précédente méthode avec seuil d'intensité avant la publication de Sage *et al.* vantant la performance de ThunderStorm [Ovesný *et al.*, 2014]. Il serait intéressant à l'avenir de comparer la performance de ces deux méthodes sans doute sensiblement identiques.

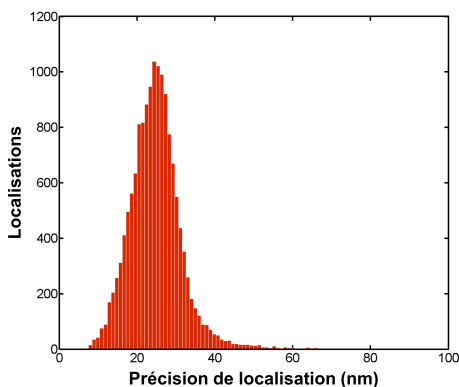


Figure 6.15 – Distribution de la précision de localisation d'un jeu PALM de mEos2 en PVA

Tri des localisations

La méthode précédemment décrite, puissante afin de réduire les faux-négatifs, présente une tendance relativement importante à sélectionner des faux-positifs. Statistiquement, des pixels de bruit de fond peuvent s'organiser dans l'espace de manière à être détectés puis localisés malgré les précautions prises. L'intégration de ces faux-positifs dans l'analyse des données est à l'origine de traces de fluorescence supplémentaires. Les paramètres issus de l'ajustement Gaussien de la PSF de ces faux-positifs peuvent différer de ceux d'un vrai fluorophore. Les localisations sont alors triées d'après ces paramètres et les valeurs s'éloignant de la distribution normale sont écartées (Figure 6.16). Pour les données collectées *in vitro* (immobilisation par amidification), les distributions des différents paramètres de localisation suivent une distribution unimodale indiquant que le signal est homogène, en d'autres termes que les localisations de type faux-positifs sont probablement rares. À l'opposé, les distributions des paramètres de localisation pour des données collectées en cellules HeLa ne suivent pas toujours une loi unimodale. En particulier, la distribution de l'écart type de la Gaussienne est nettement bimodale. En comparant avec les données *in vitro*, on observe la présence d'un pic supplémentaire à r_0 élevé. Ces localisations correspondent probablement au signal des fluorophores situés en dehors de la profondeur de champ pour lesquels la PSF est élargie bien que l'on puisse s'attendre à un continuum de r_0 . L'origine de ce pic supplémentaire reste alors à identifier à l'avenir. De manière générale, les localisations conservées pour l'analyse photophysique en cellule eucaryote ont été déterminées de manière empirique par comparaison avec les données *in vitro*.

Malgré cette étape de tri des localisations, certains faux-positifs ne sont pas écartés à ce stade. En général, les faux-positifs résultant d'une localisation stochastique de pixels de bruit de fond est à l'origine d'une localisation unique à une position donnée. Le temps de photoblanchiment de ces faux-positifs n'est alors que rarement supérieur à une image. Il est donc possible de s'affranchir des faux-positifs à ce stade en excluant de l'ajustement les traces pour lesquelles le temps de photoblanchiment est égal à une image (voir Figure 7.1, page 123).

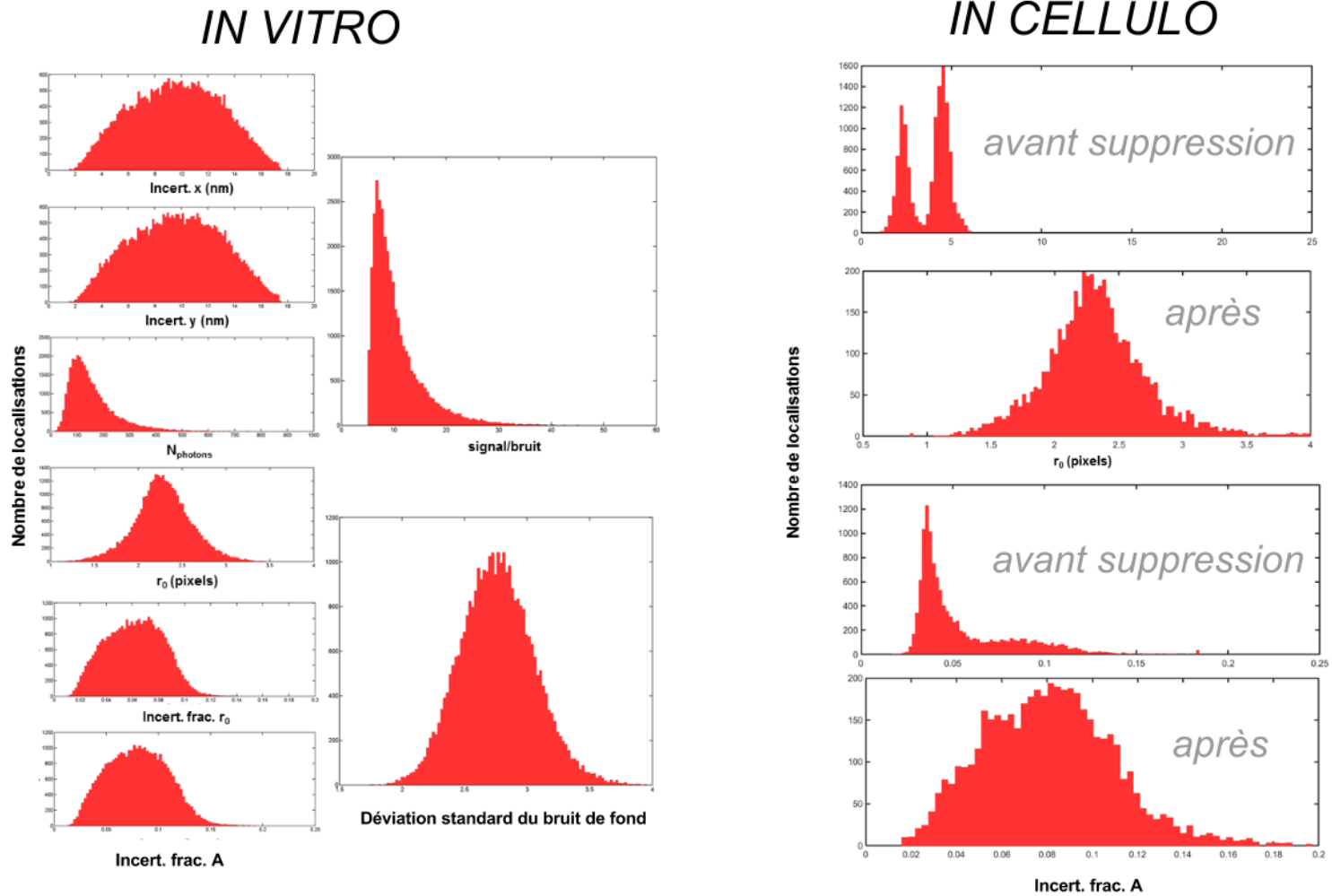


Figure 6.16 – Tri et suppression des localisations de type « faux-positifs » (Gauche). Distributions unimodales des paramètres de localisations d'un jeu de données de mEos2 collecté *in vitro* (méthode d'immobilisation par amidification). Sont représentées les distributions de l'incertitude sur la position x et y, du nombre photons émis (proportionnel à la valeur estimée de l'amplitude A), de l'écart type de la PSF ajustée (r_0), de l'incertitude fractionnaire sur l'écart type de la PSF, de l'incertitude fractionnaire sur l'amplitude, du rapport signal/bruit et de la déviation standard du bruit local (Droite). Distributions bimodales de l'écart type des Gaussiennes et de l'incertitude fractionnaire sur l'amplitude (A) des localisations d'un jeu de données de mEos2 collecté *in cellulo* (cellules HeLa). Dans ce cas, les pics n'apparaissant pas dans les données *in vitro* sont supprimés. Les distributions non représentées pour le jeu de données *in cellulo* suivent une loi unimodale.

Analyse photophysique des protéines fluorescentes

Dans ce Chapitre, nous présenterons la méthodologie employée afin de mesurer, à partir de données expérimentales collectées à l'échelle de la molécule unique, les paramètres photophysiques qui décrivent les mécanismes moléculaires des protéines fluorescentes.

7.1 Cas particulier de jeux de données peu denses

Nous nous intéresserons dans cette section au cas des échantillons de faible densité moléculaire. La stratégie présentée ci-dessous est viable lorsque la probabilité de confondre deux molécules distinctes tend vers zéro, c'est-à-dire dans le cas où la probabilité que plus d'une molécule unique réside dans un volume égale à ~ 5 fois la précision de localisation tend vers zéro.

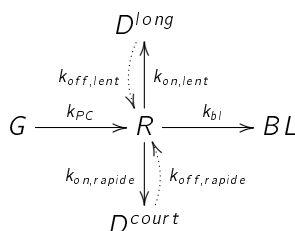
7.1.1 Regroupement des localisations en clusters

Les localisations au cours du temps d'une même molécule à la position (x,y) sont regroupées en clusters de localisations si la distance entre les localisations est inférieure à 5σ (avec σ la précision de localisation). Afin d'éviter la formation de super-clusters constitués des localisations de plusieurs molécules uniques adjacentes, les clusters sont analysés par la méthode des k-moyennes. Cette méthode permet de partitionner les n points d'un cluster en k sous-ensembles de telle sorte que la distance moyenne entre les points au sein de chaque sous-ensemble soit minimisée.

À ce stade, chaque cluster correspond donc à une molécule unique. Pour chaque cluster, il est alors possible de déterminer l'état du fluorophore (*on* ou *off*) pour chaque image : si une molécule a été localisée à l'image i alors la valeur de la trace à $t = i$ vaut 1, le fluorophore est dans son état *on*. Au contraire, la valeur de la trace à $t = i$ vaut 0, le fluorophore est dans son état *off*. La trace binaire de fluorescence au cours du temps pour chaque cluster est ainsi reconstruite (Figure 7.1).

7.1.2 Estimation des vitesses macroscopiques de phototransformation à partir des traces de fluorescence

Pour chaque trace de fluorescence sont extraits les temps caractéristiques de photoblanchiment (t_{bl} , temps pendant lequel la molécule réside dans un état fluorescent avant photoblanchiment défini comme $t_{bl} = \sum_{photocconv.}^{photobl.} t_{on}$), de scintillement $on \rightarrow off$ (t_{on} , temps avant entrée dans un état sombre) et de retour $off \rightarrow on$ (t_{off} , temps avant entrée dans un état on) (Figure 7.1). L'analyse de l'ensemble des traces permet de construire les histogrammes des occurrences de chaque temps caractéristiques (histogramme de temps de photoblanchiment : \mathcal{N}_{bl} , de scintillement $on \rightarrow off$: \mathcal{N}_{on} et de retour $off \rightarrow on$: \mathcal{N}_{off}) (Figure 7.2). Considérons le modèle cinétique suivant (en accord avec les données récentes de la littérature [Lee et al., 2012] [Rollins et al., 2015])¹ :



avec D^{long} et D^{court} les états sombres (dans la forme rouge) de long et court temps de vie respectivement, BL la forme rouge photoblanchie, R la forme rouge, G la forme verte ; $k_{off, lent}$ la vitesse macroscopique de scintillement lent $off \rightarrow on$, $k_{off, rapide}$ la vitesse macroscopique de scintillement rapide $off \rightarrow on$, k_{bl} la vitesse macroscopique de photoblanchiment de la forme rouge et k_{PC} la vitesse macroscopique de photoconversion.

À partir de l'historgramme des temps de blanchiment (\mathcal{N}_{bl}), la vitesse de photoblanchiment de la forme rouge (k_{bl}) peut être mesurée. Cependant, des corrections sont nécessaires afin de limiter l'effet de la distorsion des histogrammes de photoblanchiment par les localisations de type faux-positifs. En effet, la photophysique apparente de ces localisations est confondue avec celle de fluorophores vrais pour lesquels le photoblanchiment suit directement la photoconversion ($t_{bl}=1$ image ; voir page 118), si bien que la classe $t_{bl}=1$ image des histogrammes \mathcal{N}_{bl} est biaisée. Cette classe est alors exclut lors de l'ajustement de la fonction mono-exponentielle à l'historgramme.

À partir de l'historgramme des temps on (\mathcal{N}_{on}), la vitesse macroscopique de scintillement $on \rightarrow off$ ($k_{on} = k_{on, rapide} + k_{on, lente}$) est mesurée en ajustant l'historgramme à une fonction mono-exponentielle comme imposé par le modèle cinétique présenté ci-dessus. En pratique, les histogrammes des temps on sont affectés par la vitesse de photoblanchiment : plus le fluorophore photoblanchit rapidement, plus la probabilité qu'un événement à t_{on} long soit observé est faible. La constante cinétique extraite de l'ajustement mono-exponentiel est alors la somme des constantes cinétiques de scintillement et de photoblanchiment. La constante cinétique de scintillement k_{on} est alors calculée par soustraction de la constante cinétique de photoblanchiment à la constante cinétique issue de l'ajustement.

partir de l'historgramme des temps off (\mathcal{N}_{off}), les vitesses macroscopiques de retour off à on (vitesse de retour de l'état sombre de court temps de vie k_{off}^{rapide} et de long temps de vie k_{off}^{lente}) sont mesurées

1. La version publiée de la méthode Avilov et al. reposait sur un modèle photophysique ne faisant intervenir qu'un unique état sombre [Avilov et al., 2014]. La version présentée ici a été améliorée afin de prendre en compte l'existence de deux états sombres de temps de vie différents.

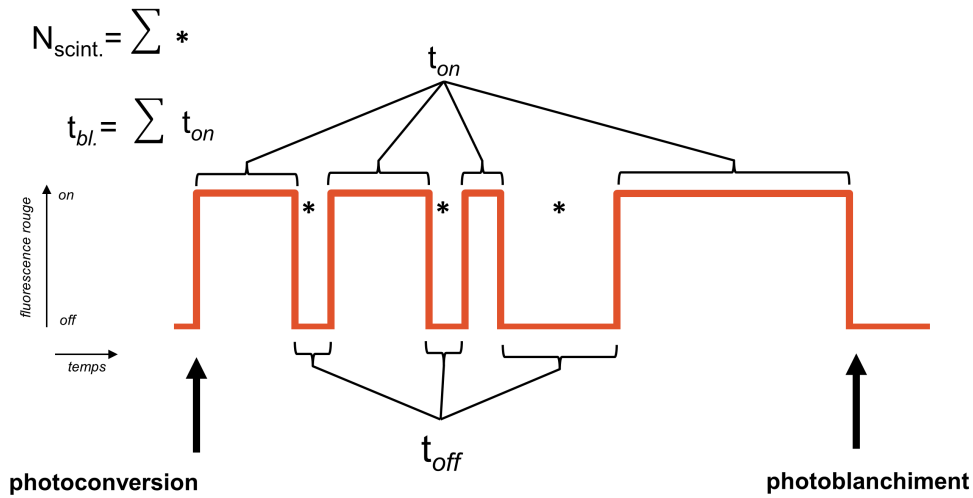


Figure 7.1 – Analyse des traces de fluorescence pour l'étude photophysique À partir d'une trace de fluorescence sont extraits les temps pendant lesquels le fluorophore est dans son état *off* (t_{off}) et dans son état fluorescent (t_{on}). Le temps avant photoblanchiment (t_{bl}) est donné par la somme des t_{on} . Le nombre d'événements de scintillement (N_{scint}) est également extrait.

en ajustant, d'après le modèle cinétique, une fonction bi-exponentielle à l'historgramme \mathcal{N}_{off} . Dans nos conditions expérimentales à l'échelle de la molécule unique, les valeurs des k_{off} mesurées prennent en compte le retour thermique et le retour actinique par la lumière 561 et 405 nm si l'état sombre y est sensible. La fraction d'état sombre de court temps de vie (f_{rapide} ; et $f_{lent} = 1 - f_{rapide}$) est estimée à partir du rapport des amplitudes du modèle bi-exponentiel.

Enfin pour chaque trace de fluorescence, le nombre d'événements de scintillement est mesuré, permettant la reconstruction de l'historgramme de distribution des probabilités de scintillement (\mathcal{N}_{scint}). Le nombre moyen d'événement de scintillement noté N_{scint} est calculé en ajustant la suite géométrique présentée en équation 7.1² à l'historgramme \mathcal{N}_{scint} .

$$P(N = n) = \eta^n (1 - \eta) \quad (7.1)$$

avec $P(N = n)$ la probabilité qu'une molécule scintille n fois et η la probabilité que la molécule entre dans un état sombre ($\eta = \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{bl}}$).

En pratique, de l'ajustement des histogrammes \mathcal{N}_{scint} est extraite la valeur de η de laquelle est calculée N_{scint} grâce à la relation suivante :

$$\eta = \frac{1}{1 + \frac{k_{bl}}{k_{on}}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{N_{scint}}} \quad (7.2)$$

Indépendamment de l'ajustement des histogrammes de distribution de probabilité de scintillement, le nombre moyen d'événement de scintillement peut être calculé comme le rapport des vitesses macro-

2. Une démonstration mathématique rigoureuse de cette relation est disponible dans les information supplémentaires de la publication de Lee *et al.* [Lee *et al.*, 2012].

scopiques de scintillement $on \rightarrow off$ (k_{on}) et de photoblanchiment (k_{bl}).

$$N_{scint} = \frac{k_{bl}}{k_{on}} \quad (7.3)$$

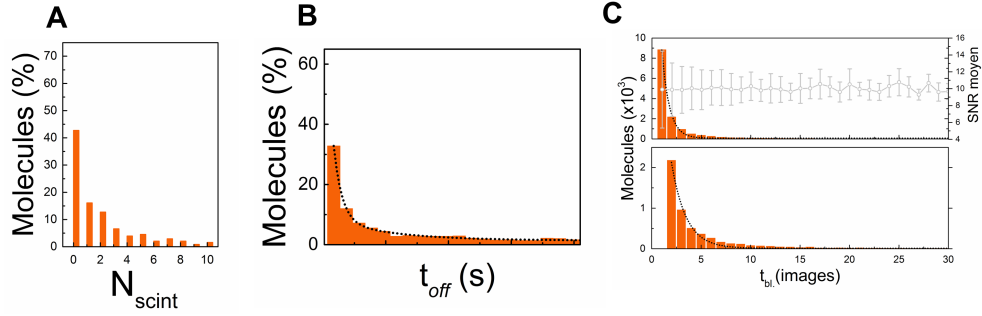


Figure 7.2 – Histogrammes et estimation des constantes cinétiques de phototransformation Des traces de fluorescence sont reconstruits : (A). l'histogramme de distribution de probabilité de scintillement (N_{scint}) à partir duquel est estimé le nombre moyen d'événements de scintillement par molécule grâce à l'ajustement par une loi géométrique, (B). l'histogramme des temps off (t_{off}) à partir duquel sont extraites les constantes cinétiques de retour $off \rightarrow on$ par ajustement de l'histogramme à une double-exponentielle et (D). l'histogramme des temps de photoblanchiment (t_{bl}) à partir duquel est extraite la constante cinétique de photoblanchiment. Le premier point de l'histogramme t_{bl} est contaminé par la localisation de faux positifs (population hétérogène de vrais-positifs et de faux-positifs comme en témoigne l'hétérogénéité forte du rapport signal sur bruit à ce point). L'ajustement du modèle cinétique est donc réalisé sur l'histogramme amputé de son premier point.

7.1.3 Calcul des rendements quantiques et vitesses microscopiques de phototransformations

Grâce à la mesure du profil laser (voir Figure 6.2 A, page 102) et de la puissance d'illumination au niveau de l'échantillon (P_{tot}), la densité de puissance surfacique peut être estimée en tout point (x_0, y_0) de l'image (équation 7.4).

$$P_{dens}(x_0, y_0) = \frac{2 \cdot P_{tot}}{\pi 2\omega_x 2\omega_y} \exp \left\{ -2 \left[\frac{(x_0 - x_c)^2}{(2\omega_x)^2} + \frac{(y_0 - y_c)^2}{(2\omega_y)^2} \right] \right\} \quad (7.4)$$

avec $2\omega_x$ et $2\omega_y$ les largeurs à $1/e^2$ de la gaussienne ajustée au profil laser, P_{tot} la puissance mesurée au niveau de l'échantillon et x_c, y_c le centre de la gaussienne ajustée au profil laser.

Connaissant la densité de puissance laser, le coefficient d'extinction de la forme étudiée à la longueur d'excitation ($\epsilon_{\lambda_{ex}}$) et la vitesse macroscopique de phototransformation ($k_{phototransf.}^{macro}$) il est alors possible de calculer les rendements quantiques de phototransformation ($\Phi_{phototransf.}$) d'après l'équation 7.5

$$\Phi_{phototransf.} = \frac{k_{phototransf.} \cdot h \cdot c \cdot N_A}{P_{dens} \cdot \lambda_{ex} \cdot \epsilon_{\lambda_{ex}}} \ln(10) \quad (7.5)$$

avec λ_{ex} la longueur d'onde d'excitation, P_{dens} la densité de puissance de la lumière d'excitation, $\epsilon_{\lambda_{ex}}$ le coefficient d'extinction molaire du fluorophore à la longueur d'onde d'excitation, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière

et N_A le nombre d'Avogadro.

Les rendements quantiques de phototransformations correspondent, à l'image du rendement quantique de fluorescence (voir page 146), à la fraction de la population de l'état excité désexcitant par phototransformation plutôt que par d'autres voies de désexcitation.

Faisons l'analogie avec la vidange d'un bassin rempli d'eau. Les molécules d'eau représentent les états excités (S_1). Trois tuyaux de même section permettent la vidange du bassin et représentent les voies de désexcitation de l'état S_1 . À chaque tuyau est associée une vitesse de vidange notée Q_i . Cette vitesse correspond à la vitesse avec laquelle le bassin se vide par ce tuyau. Par analogie, la vitesse microscopique associée au tuyau 1 est alors représentative de la facilité mécanistique avec laquelle l'état excité se désexcite par cette voie. Comment peut-on mesurer ce paramètre ?

La fraction des molécules d'eau passant par le tuyau 1 (f_1) est donnée par le rapport entre la vitesse de vidange par le tuyau 1 et la vitesse de vidange totale correspondant à la somme des vitesses pour chaque tuyau (équation 7.6).

$$f_1 = \frac{Q_1}{\sum_i Q_i} \quad (7.6)$$

Par analogie, le rendement quantique associé au tuyau 1 est alors défini comme le rapport entre la vitesse microscopique de cette voie de désexcitation et la vitesse microscopique totale de désexcitation correspondant à la somme des vitesses microscopiques de désexcitation par voie radiative et par voie non radiative (équation 7.7).

$$\Phi_1 = \frac{k_1^{micro}}{k_r + k_{nr}} = \frac{k_1^{micro}}{1/\tau} = k_1^{micro} \tau$$

Soit :

$$\Phi_{phototransf} = k_{phototransf}^{micro} \tau$$

avec τ le temps de vie de l'état excité

Il est alors possible en connaissant les rendements quantiques de phototransformations et le temps de vie de l'état excité de mesurer les vitesses microscopiques de phototransformations (vitesse microscopique de photoblanchiment (k_{bl}^{micro}), de scintillement lent $on \rightarrow off^{long}$ ($k_{on,lent}^{micro} = k_{on}^{micro} \cdot f_{lent}$, avec f_{lent} la fraction d'état sombre de long temps de vie) et rapide $on \rightarrow off^{rapide}$ ($k_{on,rapide}^{micro} = k_{on}^{micro} \cdot f_{rapide}$, avec $f_{rapide} = 1 - f_{lent}$ la fraction d'état sombre de court temps de vie)³).

7.2 Cas de jeux de données denses (e.g. in cellulose)

La stratégie présentée ci-dessus est efficace lorsque la densité moléculaire est très faible (concentration nanomolaire). Qu'en est-il de la densité moléculaire en contexte cellulaire ?

3. Le coefficient d'extinction molaire des états sombres n'étant pas connu, il n'est alors pas possible d'estimer de rendement quantique ni de vitesse microscopique de retour $off \rightarrow on$.

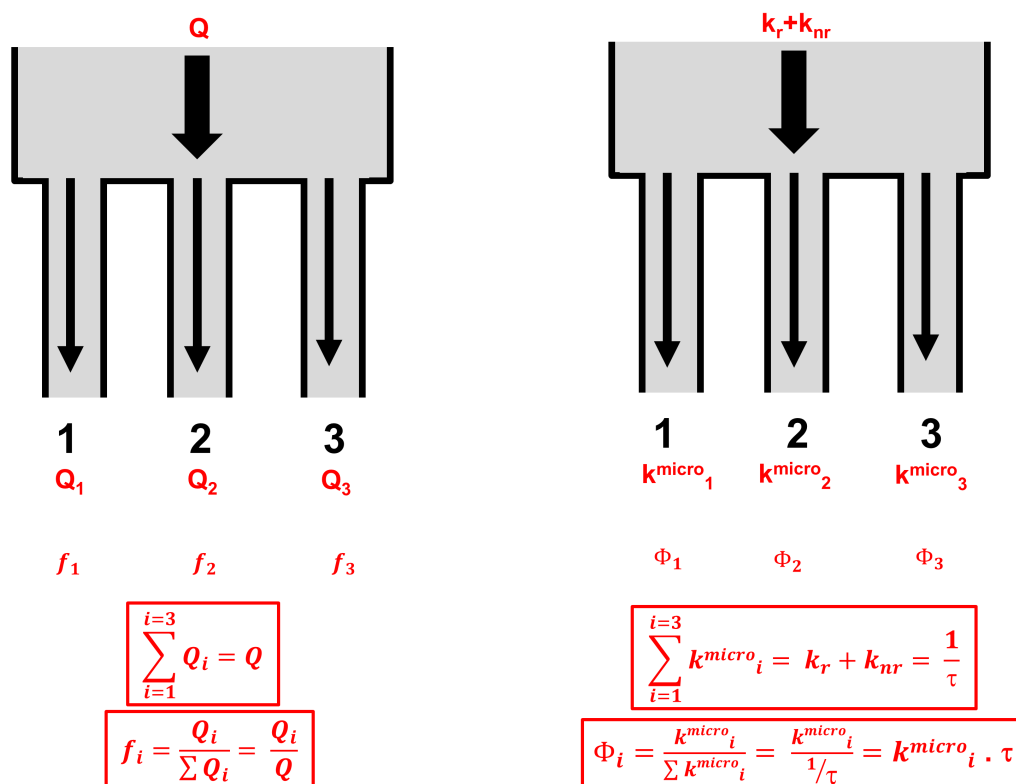


Figure 7.3 – Analogie entre la vidange d'un bassin et la désexcitation de l'état excité (Gauche). Un bassin rempli d'eau se vide par 3 tuyaux. Pour chaque tuyau peut être calculé une vitesse d'écoulement (Q_i) et une fraction de molécules d'eau transitant par le tuyau (f_i) (Droite). Désexcitation de l'état excité par 3 voies photophysiques différentes. Pour chaque voie photophysique peut être calculé une vitesse microscopique de phototransformation (k_i^{micro} ; analogue à la vitesse d'écoulement Q_i) et une fraction des états excités se désexcitant par cette voie photophysique (Φ_i).

7.2.1 Problème lié aux jeux de données denses

Si la probabilité d'avoir deux molécules au moins dans un même volume 5σ (distance limite de regroupement spatial des localisations en cluster) est élevée alors la probabilité que la trace de fluorescence reconstruite d'un cluster corresponde à la super-trace de deux molécules distinctes au moins augmente. L'analyse des traces ne peut alors plus être menée comme décrit dans la section précédente.

Calculons la probabilité de retrouver plus d'une molécule par pixel (1 pixel $\sim 110 \times 110 \text{ nm}^2$) ? Soit n molécules à arranger dans un champ de p pixels. La première molécule peut se placer partout dans les p pixels, la seconde partout dans les $p-1$ pixels restant, et ainsi de suite. Le nombre d'arrangements possibles tels qu'il y ait au maximum 1 molécule par pixel est alors donné par la formule (7.7).

$$A_n^p = \frac{p!}{(p-n)!} = p(p-1)\dots(p-n+1) \quad (7.7)$$

Le nombre total d'arrangements possibles étant de p^n , la probabilité d'avoir un arrangement tel qu'il y ait une molécule maximum par pixel (notée $P(M = 1)$) est donnée par l'équation (7.8).

$$P(M = 1) = \frac{A_n^p}{p^n} = \frac{p!}{(p - n)!p^n} \quad (7.8)$$

Dans le cas particulier d'une densité moléculaire bidimensionnelle de 2 molécules / 5 pixels (avec une taille de pixel de 110 nm soit une densité de 1 molécule / 0.06 μm^2 soit encore 16 molécules / μm^2), $P(M = 1) = \frac{2!}{3!5^2} = 0.8$. Dans ces conditions, 20% des pixels contiennent plus d'une molécule : 20% des traces reconstruites seront fausses.

Des travaux menés à l'Institut de Biologie Structurale par Maxime Jacq dans le cadre d'une collaboration avec notre équipe mettent en évidence qu'environ 670 copies de la protéine du cytosquelette bactérien (FtsZ) sont présentes dans le cytoplasme de la bactérie *Pneumococcus pneumoniae* [Jacq et al., 2015]. Étant donné que l'intégralité de la bactérie se situe dans la profondeur de champ du microscope, les 670 molécules sont projetées sur une surface d'environ $1\mu\text{m}^2$ soit une densité environ 40 fois plus élevée que la densité pour laquelle 20% des traces de fluorescence sont biaisées.

7.2.2 Méthode d'analyse itérative des traces de fluorescence

En général, la densité de molécules dans les échantillons biologiques est telle que largement plus d'une molécule réside dans un volume d'environ 5 fois la précision de localisation σ . Dans ce cas, les clusters de localisations formés après regroupement spatial et analyse des k-moyennes résultent en la concaténation des traces de fluorescence de N_{mol} molécules (super-traces) desquelles il n'est alors plus possible avec la méthode présentée dans les sections précédentes de déterminer les constantes cinétiques de phototransformations. Nous allons, dans les paragraphes suivants, décrire la méthode inspirée de celle proposée par Lee et al. [Lee et al., 2012] permettant d'estimer les rendements quantiques de phototransformation à partir de traces de fluorescence de clusters de N_{mol} molécules.

Dans les conditions d'illumination typique de la microscopie PALM, le taux d'activation est tel que la probabilité qu'une nouvelle molécule soit activée dans le même volume $5.\sigma$ avant que l'autre soit photoblanchie est non nulle⁴. Dans ces conditions et comme mentionné plus tôt (Partie II, section 4.2.2, page 87), les super-traces de fluorescence des clusters composés de N_{mol} molécules sont alors caractérisées par des t_{off} en moyenne plus courts. Le tronçonnage des super-traces de N_{mol} molécules en N_{mol} traces de molécules uniques est possible pour une valeur critique optimale τ_c ⁵ dépendante de N_{mol} et de la photophysique du fluorophore (courbe τ_c). La courbe τ_c construite par la méthode itérative de Lee et al. repose sur la connaissance *a priori* de la photophysique des protéines fluorescentes, paramètre inconnu que nous tâchons justement de déterminer. La méthode présentée en Figure 7.5 et décrite ci-dessous a alors été développée afin de combiner estimation des paramètres photophysiques et construction d'une courbe τ_c correcte.

En pratique, les super-traces de fluorescence des clusters de N_{mol} molécules sont tronçonnées en appliquant un premier temps critique arbitraire τ_c (cycle 0, Figure 7.4). Pour chaque cluster, les

4. En effet, même en l'absence de lumière violette, la photoconversion induite par la lumière 561 nm est telle que le taux d'activation est relativement défavorable à l'activation successive et séparée par un temps long (plusieurs secondes) de deux molécules résidant dans un même volume $5.\sigma$.

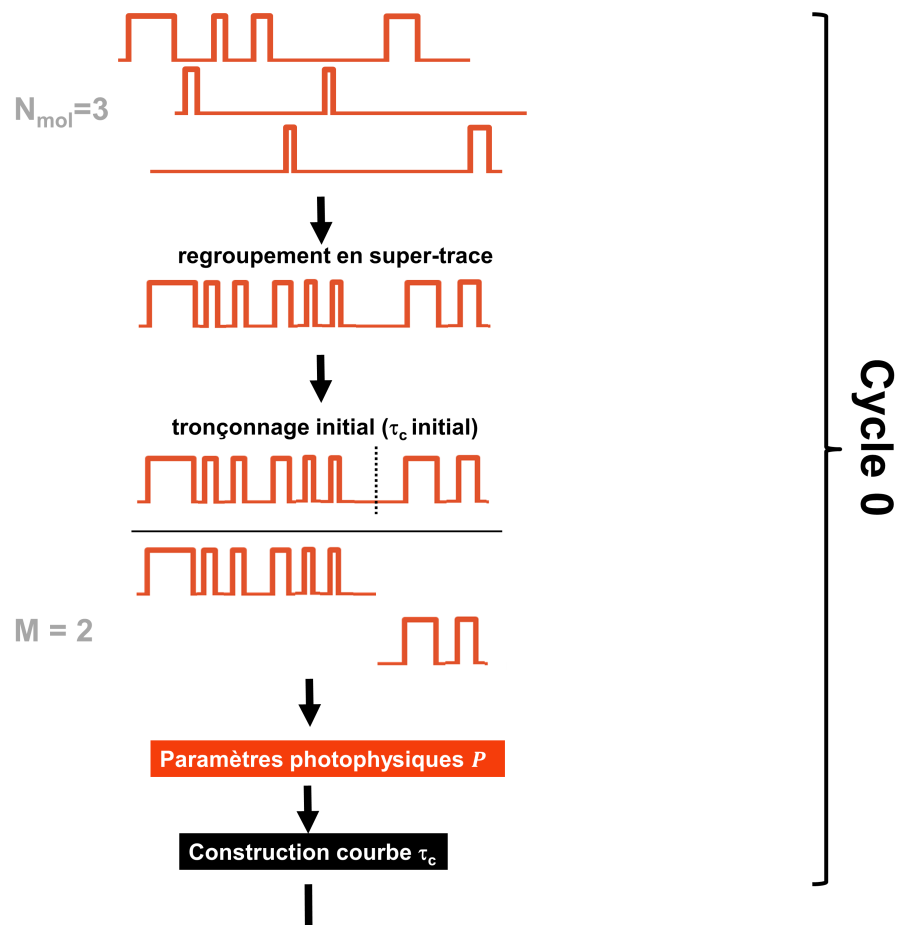
5. Pour rappel, si $t_{on-on} > \tau_c$ avec t_{on-on} le temps séparant deux créneaux sur les traces, alors la trace est découpée en deux sous-traces.

super-traces sont découpées en un nombre de traces noté M , dont la valeur correspond à la première approximation du nombre de molécules composant le cluster (cycle 0, Figure 7.4). À partir des nouvelles traces, les histogrammes de temps caractéristiques sont construits, les vitesses macroscopiques de phototransformation mesurées et les rendements quantiques calculés (voir page 122 *sqg*). À ce stade, les paramètres photophysiques estimés (notés \mathcal{P}) sont faux. Pour retrouver les paramètres photophysiques corrects, il est nécessaire de découper les super-traces de fluorescence en choisissant la valeur optimale de τ_c . Une courbe $\tau_{c,l}$ est alors construite à partir de données simulées avec les paramètres photophysiques \mathcal{P} . Pour chaque cluster, selon la valeur de M précédemment estimée, une valeur optimale de τ_c est choisie (début du cycle 1, Figure 7.4). Les traces sont alors tronçonnées en $M_{1,l}$ traces, $M_{1,l}$ étant la nouvelle approximation du nombre de molécules par cluster. Selon la valeur de $M_{1,l}$, une nouvelle valeur τ_c est choisie et les traces sont tronçonnées en $M_{2,l}$ traces. La procédure itérative se poursuit jusqu'à ce que la valeur M converge (*i.e.* $M_{i-1} \sim M_i$) (sous-cycles 1 à i , Figure 7.4).

À ce stade, à partir des nouvelles traces générées, les paramètres photophysiques sont de nouveau déterminés (notés \mathcal{P}_l) et une nouvelle courbe $\tau_{c,l,l}$ est construite à partir de données simulées avec les paramètres \mathcal{P}_l (fin du cycle 1). Les cycles décrits sont menés itérativement jusqu'à ce que les paramètres photophysiques estimés convergent ($\mathcal{P}_n \sim \mathcal{P}_{n-1}$), ce qui en général arrive après 3 à 5 cycles. Les paramètres \mathcal{P}_n sont alors les paramètres photophysiques corrigés pour l'effet de la densité moléculaire sur les traces de fluorescence et l'utilisation de la courbe $\tau_{c,n}$ permet de tronçonner les traces des clusters en $M_{i,n}$ traces avec $M_{i,n} = N_{mol}$.

Cette méthode innovante permet l'estimation des rendements quantiques de phototransformation quelque soit la densité moléculaire sans d'autre pré-requis que la connaissance de la densité de puissance locale et des coefficients d'extinction molaire des fluorophores.

Elle présente néanmoins un inconvénient majeur : la valeur t_{off} maximale doit être inférieure à la valeur maximale du τ_c optimal pour pouvoir correctement estimer les paramètres photophysiques et la stœchiométrie d'oligomères. En pratique, la valeur maximale optimale τ_c est d'environ 5 s, si bien que les événements de scintillement lent à $t_{off} > 5$ s ne sont jamais considérés comme tels mais comme l'apparition successive de deux molécules distinctes, à l'origine d'erreurs de comptage. D'autre part, cette méthode est assez peu juste lors de l'estimation de la stœchiométrie d'oligomères à nombre élevé de chaînes. En effet, pour les nombres élevés, la valeur optimale donnée par la courbe τ_c diffère peu, suggérant que la méthode atteint sa limite lorsque le nombre de molécules par cluster devient supérieur à 10.



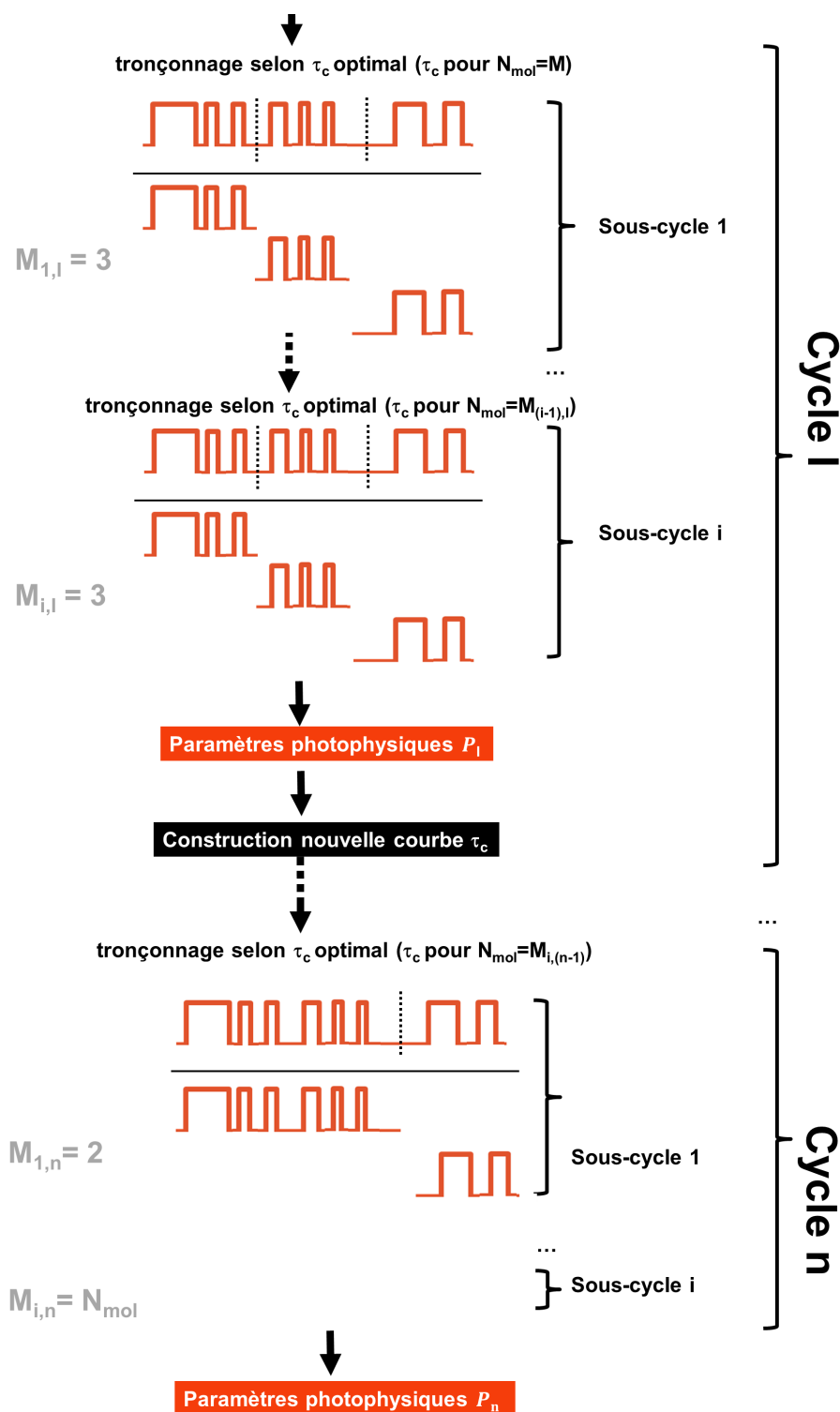


Figure 7.4 – Procédure algorithmique itérative permettant l'estimation des paramètres photophysiques des protéines fluorescentes et l'estimation du nombre de molécules par clusters

7.3 Conditions expérimentales optimales pour l'étude de la photophysique

7.3.1 Stratégie expérimentale et simulation de jeux de données

La simulation de jeux de données molécules uniques est un moyen efficace pour prédire et explorer l'effet des conditions expérimentales sur la qualité des données PALM et constitue alors un moyen efficace de vérification du fonctionnement d'un outil [Venkataramani et al., 2016]. Afin d'estimer les limites au sein desquelles peuvent varier les paramètres expérimentaux de collecte sans que la justesse de la mesure des rendements quantiques de phototransformations ne soit affectée, des données simulées dont les paramètres photophysiques sont connus ont été générées, et analysées à l'aide de la méthode présentée dans la section précédente.

Le rapport signal/bruit, le temps d'acquisition des images, la puissance laser, la densité moléculaire par image, la complétude de photoconversion et le nombre total de molécules localisées ont été pris comme variable pour la simulation des données (Figure 7.6).

Les simulations ont été réalisées grâce à un programme développé au sein du laboratoire et permettant de placer aléatoirement sur un patron donné (image ou grille nanoscopique) des fluorophores aux propriétés photophysiques connues (spectre d'émission et d'excitation, rendement quantique de fluorescence, coefficient d'extinction molaire, rendements quantiques de phototransformations (photoconversion, photoblanchiment, photocommutation, scintillement et spectre d'action des phototransformations). Les fluorophores peuvent être simulés avec différentes orientations de leurs dipôles : dipôle en rotation libre au cours du temps, dipôle à orientation fixe au cours du temps avec une distribution des orientations aléatoires au sein de la population ou dipôle à orientation fixe au cours du temps avec une orientation homogène pour l'ensemble de la population.

Le montage expérimental (microscope, lasers et caméra) est simulé par un ensemble de paramètres (voir Annexe, page 205, Table 11.3).

Les résultats d'analyse des jeux de données simulés mettent en évidence l'existence d'une fenêtre réduite de conditions expérimentales de collecte aboutissant à une estimation correcte des rendements quantiques de phototransformations (Figure 7.6).

7.3.2 Effet du signal/bruit

À faible signal/bruit, l'estimation des rendements quantiques de photoblanchiment (Φ_{bl}), de scintillement $on \rightarrow off$ (Φ_{on}) et de retour $off \rightarrow on$ (k_{off}) sont surestimés (Figure 7.6 A). Le faible signal/bruit empêche la localisation de nombreux fluorophores conduisant à un découpage des traces réelles de fluorescences en trace plus courtes. En conséquent, Φ_{bl} et Φ_{on} sont surestimés. Les défauts de localisation ponctuels sont également à l'origine de traces présentant de nombreux événements de très court temps (typiquement 1 image) conduisant à l'estimation à la hausse du k_{off} .

7.3.3 Effet du temps d'acquisition

Un temps d'acquisition court (<30 ms) réduit le rapport signal/bruit conduisant alors à une surestimation du Φ_{on} et du k_{off} pour les raisons mentionnées dans la section précédente (Figure 7.6 B).

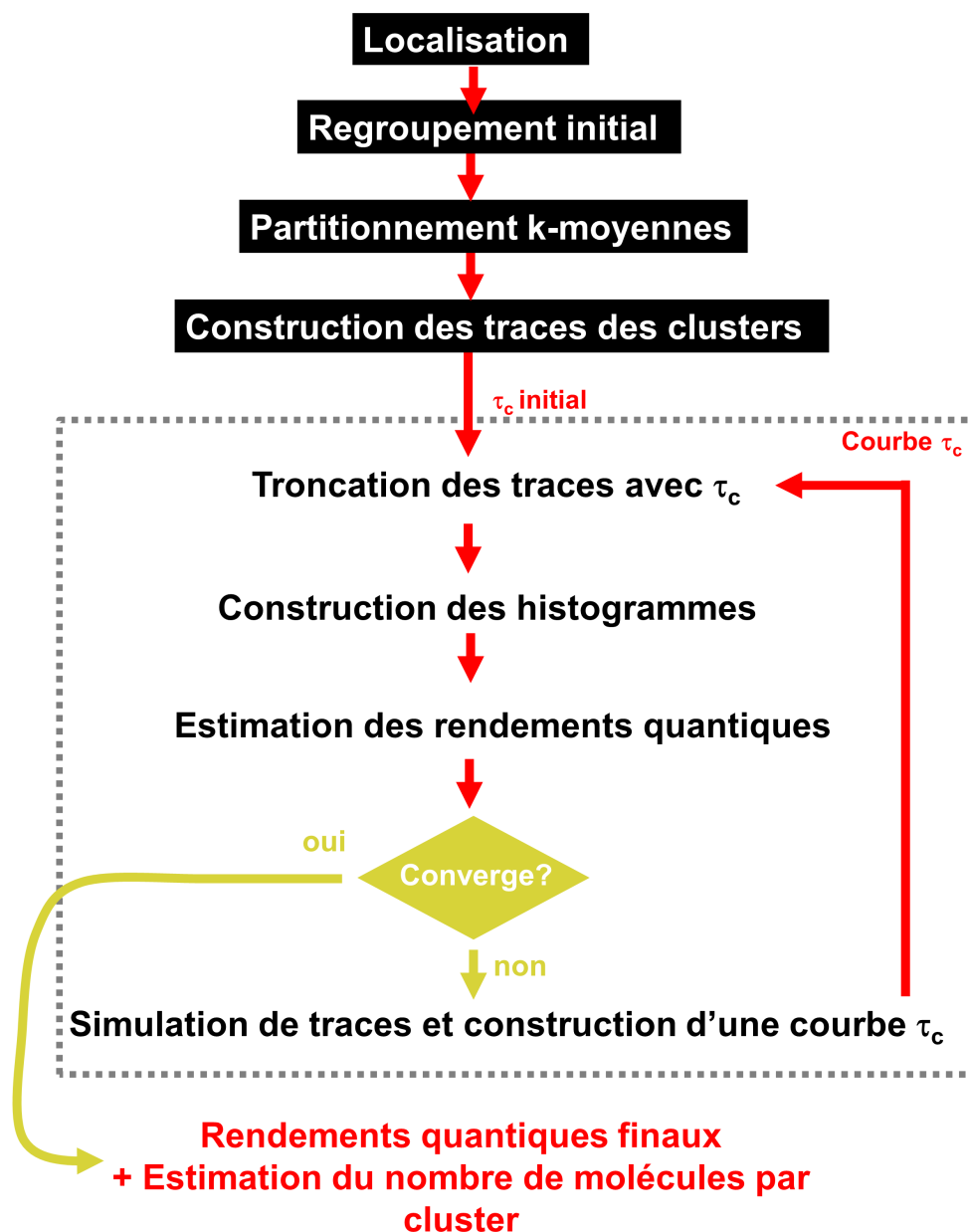


Figure 7.5 – Vue synoptique de la méthode d'analyse du comportement photophysique à l'échelle de la molécule unique. Dans un premier temps, les molécules sont localisées et regroupées en clusters. Les clusters sont partitionnés par la méthode des k-moyennes. Les super-traces de fluorescence de ces clusters sont alors construites. Un temps critique noté τ_c est appliqué à chaque trace qui est alors éventuellement tronquée en sous-traces. Les histogrammes de temps (*on*, *off* et blanchiment) sont construits et le modèle photophysique cinétique choisi ajusté ce qui permet d'estimer les rendements quantiques de phototransformation. Si les rendements quantiques de phototransformation divergent fortement de ceux estimés au cycle précédent, une courbe τ_c est construite. Cette courbe est utilisée pour tronquer les traces initiales. La même procédure itérative (délimitée par un carré pointillé gris) est appliquée et ce jusqu'à ce que les rendements quantiques de phototransformation convergent (*i.e.* les valeurs estimées changent peu d'une itération à la suivante). À ce stade, les rendements quantiques sont estimés et les traces de clusters découpées en traces de molécules uniques. Il est alors possible de compter le nombre de molécules qui composent le cluster initial.

À temps d'acquisition long (>60 ms), la résolution temporelle devient médiocre et les événements de scintillement ayant lieu pendant la collecte de l'image sont alors hors de portée. Le temps d'acquisition optimal permettant l'estimation la plus juste des rendements quantiques de fluorescence est d'environ 50 ms et a alors été choisi pour l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette thèse.

7.3.4 Effet de la densité de puissance laser

À faible densité de puissance de laser, le signal/bruit est dégradé ayant pour conséquence une surestimation de Φ_{bl} et Φ_d comme mentionné ci-dessus (Figure 7.6 C). À forte densité de puissance, la vitesse d'excitation devient si rapide que la plupart des événements ont lieu lors de l'acquisition d'une image. La résolution temporelle n'est alors plus suffisante. La densité de puissance idéale pour l'estimation des rendements quantiques de phototransformations se situe aux alentours de 1 kW.cm^2 au centre du profil laser et a alors été choisie.

7.3.5 Effet de la densité moléculaire

À faible densité moléculaire (cas typique des échantillons *in vitro* ; 1-3 molécules actives/image/ μm^2), la répartition des molécules sur la surface étudiée est telle qu'il n'y a pas recouvrement des volumes limités en diffraction de molécules distinctes (Figure 7.6 D). À très forte densité moléculaire (cas typique des échantillons biologiques denses comme le cytoplasme des bactéries ; >8 molécules actives/image/ μm^2), les défauts de localisation dus à un recouvrement des PSF ainsi que la formation de super-clusters malgré l'analyse des k-moyennes et l'analyse τ_c empêche l'étude correcte du comportement photophysique. De manière générale, une large gamme de densité moléculaire surfacique est tolérée pour satisfaire les besoins de l'étude photophysique et ce même dans les environnements cellulaires tels que le cytoplasme de cellules eucaryotes.

7.3.6 Effet de l'échantillonnage

Dans le cas d'un faible échantillonnage (nombres de molécules localisées < 3000), les rendements quantiques de phototransformations de photoblanchiment, de scintillement et de retour *off* \rightarrow *on* sont affectés par des biais statistiques et mal-estimés (Figure 7.6 F). Les histogrammes de temps *on*, de temps *off* et de temps de blanchiment sont trop bruités à cause du sous-échantillonnage pour pouvoir être convenablement ajustés par le modèle cinétique. Un minimum de 3000 molécules doivent être localisées afin de réduire les biais statistiques.

L'estimation du rendement quantique de photoconversion (Φ_{conv}) est particulièrement sensible à la complétude de photoconversion. En deçà de 40% de complétude de photoconversion, le rendement est largement sous-estimé. En effet, la variation du nombre de molécules actives au cours du temps suit la fonction :

$$N_{conv}(t) = N_0 \cdot [1 - \exp(-k \cdot \Phi_{conv} t)] \quad (7.9)$$

avec k la vitesse d'excitation de la forme verte, Φ_{conv} le rendement quantique de photoconversion et N_0 le nombre à $t=0$ de molécules dans leur état vert.

Ainsi, au début de l'expérience ($k\Phi_{conv}t \ll 1$), le nombre de molécules photoconverties varie linéairement avec le temps d'après la fonction :

$$N_{conv}(t) = N_0 \cdot k \cdot \Phi_{conv} \cdot t \quad (7.10)$$

À partir du coefficient directeur de cette fonction linéaire ($N_0 k \Phi_{conv}$), le rendement quantique de photoconversion (Φ_{conv}) ne peut pas être estimé étant donnée l'inconnue liée à N_0 .

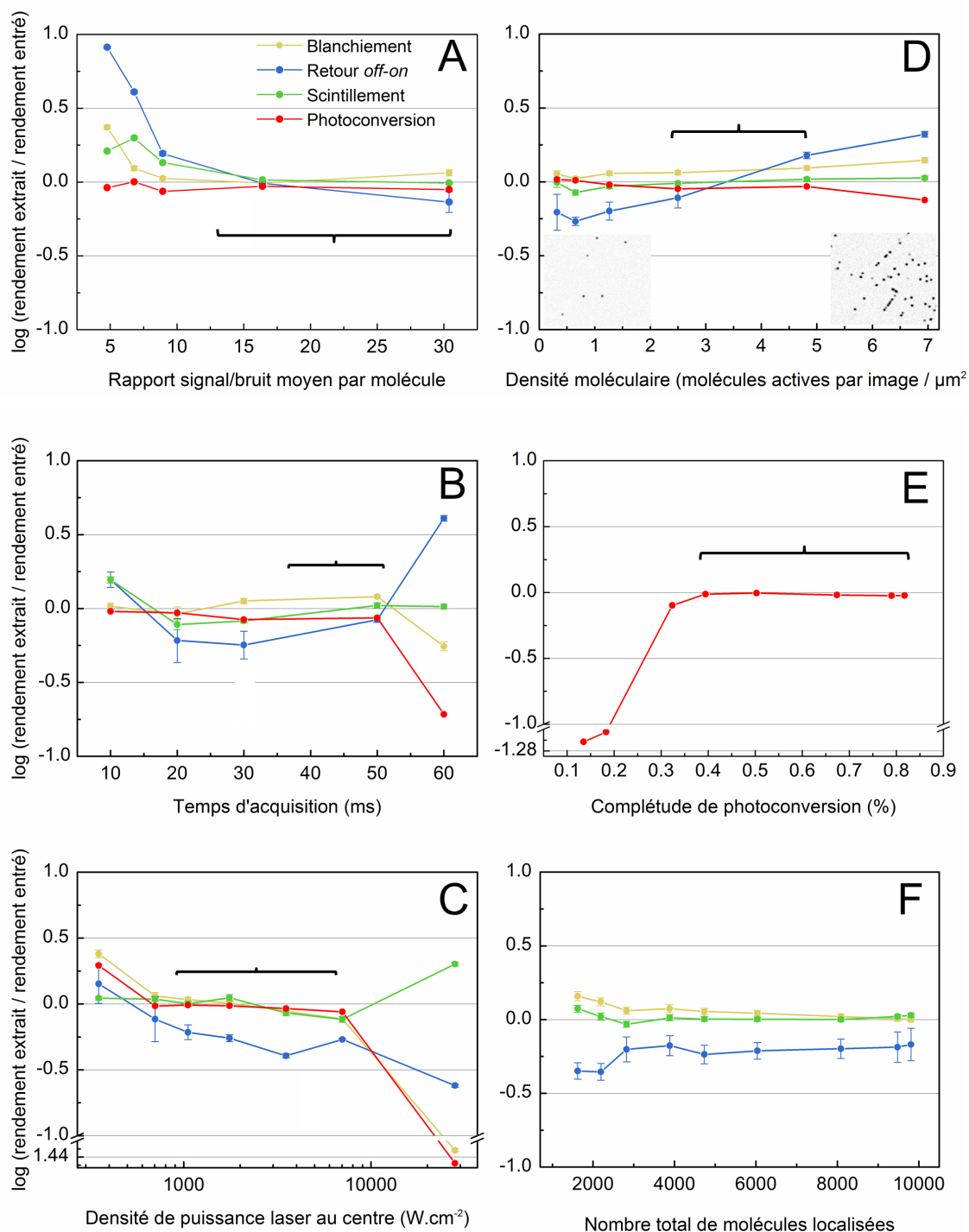


Figure 7.6 – Détermination des conditions expérimentales optimales pour l'analyse du comportement photophysique Tous les jeux de données ont été simulés avec les paramètres présentés dans le Table 11.3 (page 205) à l'exception du paramètre variable. Pour chaque paramètre (rapport signal/bruit (A), temps d'acquisition (B), densité de puissance laser (C), densité moléculaire (D), complétude de photoconversion (E) et nombre de molécules localisées (F)) l'erreur sur l'estimation des rendements quantiques de phototransformation, photoconversion, scintillement *on* \rightarrow *off* et retour *off* \rightarrow *on*) est donnée par le logarithme du rapport des rendements mesurés sur les rendements rentrés dans les simulations. Les accolades mettent en évidence les gammes au sein desquelles peuvent varier les paramètres expérimentaux sans significativement affecter la justesse de l'estimation des rendements quantiques de phototransformation. Les données expérimentales présentées dans cette thèse ont été collectées en maintenant les paramètres expérimentaux dans la gamme indiquée par les accolades.

Cristallographie aux rayons X

8.1 Cristallogenèse

Tous les cristaux obtenus ont poussé en gouttes suspendues à l'abri de la lumière à 20 °C. Les protéines utilisées ont été purifiées sur colonne d'affinité et par filtration sur gel puis concentrées à ~20 mg/mL.

8.1.1 mEos2 et mEos2-A69T

Des cristaux de mEos2 dans sa forme verte ont été obtenus dans les conditions de cristallisation précédemment rapportées Tris 0.1 M pH 8.5, chlorure de magnésium hexahydrate 0.2 M, 25% p/v PEG 3350 [Zhang et al., 2012]. La cristallogenèse du mutant mEos2-A69T dans sa forme verte a d'abord été testée dans ces mêmes conditions et des cristaux ont pu être observés. Une optimisation des conditions de cristallisation a été réalisée en testant une gamme de pH et de concentration en PEG autour de cette condition (Table 8.1). Les cristaux ayant permis la collecte des meilleurs données suite à diffraction aux rayons X sont ceux ayant poussé dans la condition Tris 0.1 M pH 9.0, chlorure de magnésium hexahydrate 0.2 M, 31% p/v PEG 3350 (Figure 8.1 ; Table 8.1).

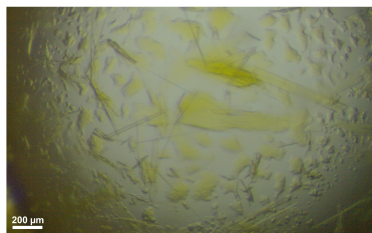


Figure 8.1 – Micrographies des cristaux de mEos2-A69T dans sa forme verte Cristaux obtenus en Tris 0.1 M pH 9.0, chlorure de magnésium hexahydrate 0.2 M, 30% p/v PEG 3350 ayant permis l'obtention de la structure présentée dans cette thèse

Table 8.1 – Conditions de cristallo-genèse de mEos2-A69T dans sa forme verte Les croix indiquent les conditions pour lesquelles des cristaux ont été obtenus. La croix marquée en gras correspond à la condition de cristallisation dans laquelle a poussé le cristal utilisé pour l'obtention de la structure présentée dans cette thèse.

pH / PEG	20%	25%	31%	PEG / pH	7.8	8	8.2
7.5				29%		X	X
8			X	31%	X	X	
8.5			X	33%	X		
9			X	35%			

8.1.2 Dendra2-T69A

La cristallo-genèse du mutant Dendra2-T69A dans sa forme verte a d'abord été testée dans les conditions de cristallisation précédemment rapportées pour Dendra2 (Tris 0.1 M pH 8.5, Mg nitrate 0.2 M, PEG 4000 30% poids/volume (p/v)) [Adam et al., 2009b]. Dans ces conditions, aucun cristal n'a pu être observé (séparation de phases et formation de sphérulites uniquement ; Figure 8.2, étape 1). Un premier crible de cristallo-genèse a alors été réalisé grâce au kit PEGRx 1 de Hampton. Dans les gouttes à condition de pH<3.5 et dans les conditions acétate de sodium trihydrate 0.1 M pH 4.5, 30% p/v polyethylene glycol monométhyl ether 5000, des précipités ont été observés (Figure 8.2, étape 2). Des cristaux ont été observés dans les gouttes acétate de sodium trihydrate 0.1 M pH 4.0, 10% p/v PEG 4000 (condition A) et acétate de sodium trihydrate 0.1 M pH 4.5, 10% p/v PEG 10000 (Figure 8.2, étape 2). Leur faible taille et leur forme en aiguille nous a conduit à l'optimisation des conditions de cristallisation en testant une gamme de pH et de concentration en PEG autour de la condition A. Des cristaux de plus grosse taille ont été obtenus dans la goutte acétate de sodium 0.1 M pH 4.1, 15% p/v PEG 4000 (condition B) (Figure 8.2, étape 3). Enfin, un dernier crible a été réalisé (crible d'additifs HR2-428 de Hampton) à partir de la condition précédente. Les meilleurs cristaux ont été obtenus en ajoutant 0.2 μ L d'une solution 10% p/v de PEG 3350 à une goutte de 2 μ L de condition B (Figure 8.2, étape 4).

La faible qualité des cristaux obtenus témoigne de la très faible tendance de Dendra2-T69A à dimériser à l'image de son parent Dendra2 pour lequel la cristallisation s'est avérée particulièrement compliquée [Adam et al., 2009b].

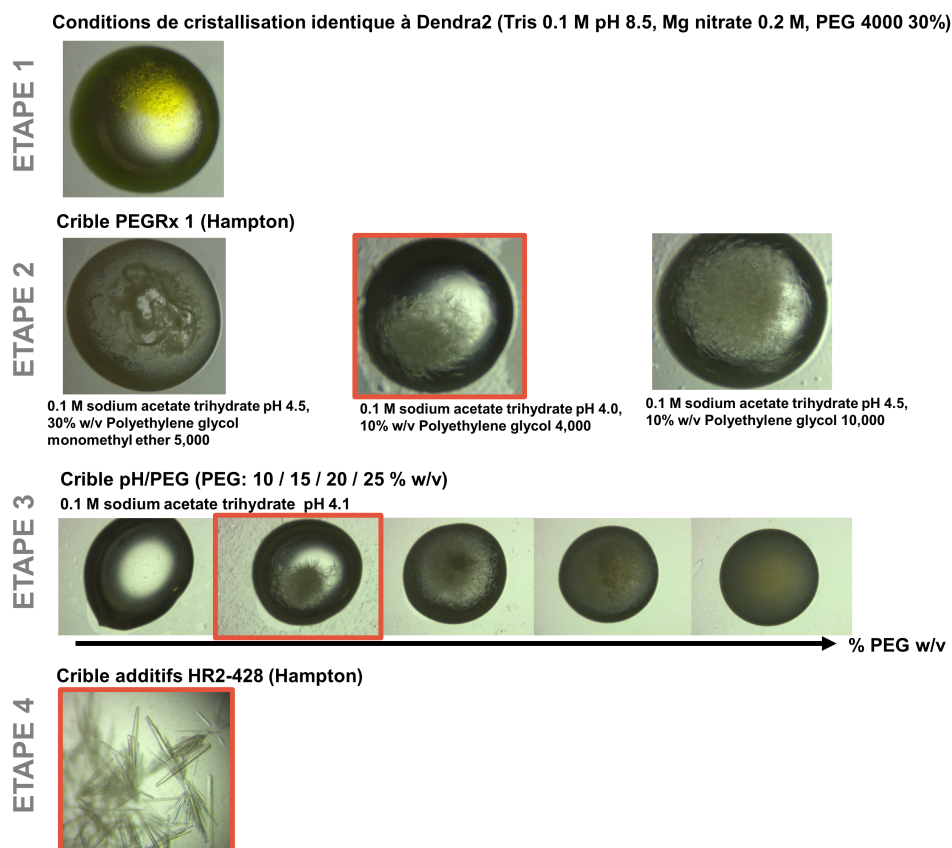


Figure 8.2 – Cristallogénèse de la protéine fluorescente photoconvertible Dendra2-T69A dans sa forme verte. Les conditions de cristallisation retenues pour l'étape suivante sont encadrées de rouge. La taille de la goutte donne l'échelle.

8.2 Collecte et traitement des données

Avant collecte, les cristaux ont été cryo-protégés par trempage dans une solution identique à la solution mère du puits complétée par 15% glycérol avant d'être plongés dans l'azote liquide.

Les données ont été collectées à l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) sur la ligne de lumière ID23-2 équipée d'un détecteur PILATUS 2M.

Les données de diffraction des rayons X pour mEos2-A69T et Dendra2-T69A ont été phasées en se basant sur les structures cristallographiques de mEos2 (code PDB : 3S05) et Dendra2 (code PDB : 2VZX) respectivement. La construction du modèle a été réalisée avec Coot [Emsley and Cowtan, 2004]. Chaque étape de reconstruction manuelle a été suivie d'une minimisation d'énergie et de l'affinement des facteurs B groupés. L'affinement et le calcul des cartes de densité électronique ont été réalisés avec Refmac [Murshudov et al., 2011] et Phenix [Adams et al., 2010]¹. Les données sur la collecte

1. L'analyse des données de diffraction a été menée par Virgile Adam.

et les statistiques d'affinement sont présentées dans les Tables 8.2 et 8.3. La structure obtenue pour Dendra2-T69A étant de moindre qualité, nous estimons que la fiabilité des conclusions faites à partir de son analyse détaillée est insuffisante.

Table 8.2 – Statistiques de la collecte et l'affinement des données cristallographiques de mEos2-A69T dans sa forme verte

mEos2-A69T	
Entrée PDB	5DTL
Collecte des données	
Ligne de lumière	ESRF/ID23-2
Longueur d'onde, Å	0.872
Groupe d'espace	P1
Dimensions de la maille	
a, Å	73.37
b, Å	96.5
c, Å	100.06
α , °	91.68
β , °	107.83
γ , °	97.38
Résolution, Å	95.45-2.7 (2.78-2.70)
R_{sym} , % ¹	10.1 (42.4)
Moyenne $I/\sigma(I)$	6.9 (1.8)
Complétude, %	95.42 (95.48)
Redondance	1.7 (1.7)
No. de réflexions uniques	67723 (6768)
Facteur B Wilson, Å ²	35.46
Affinement	
$R_{travail}/R_{libre}$ ²	0.21/0.23
Facteur B moyen, Å ²	35.6
Rmsd	
Longueur liaisons, Å	0.006
Angles liaisons, °	1.2
Stat. Ramachandran, %	
Favorisé	99
Autorisé	1
Données aberrantes	0

$$^1 R_{sym} = \frac{\sum_j \sum_h |I_{h,j} - \langle I_h \rangle|}{\sum_j \sum_h I_{h,j}}$$

² $R_{travail} = \frac{\sum_h |F_{obs} - F_{cal}|}{\sum_h F_{obs}}$, R_{libre} est calculé avec une faible fraction (5%) choisie pour faire parti d'un groupe test. Les valeurs entre parenthèses se réfèrent à la plus haute sphère de résolution.

Table 8.3 – Statistiques de la collecte et l'affinement des données cristallographiques de Dendra2-T69A dans sa forme verte

Dendra2-T69A	
Entrée PDB	Non soumis
Collecte des données	
Ligne de lumière	ESRF/ID23-2
Longueur d'onde, Å	0.872
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensions de la maille	
a, Å	56.4
b, Å	72.3
c, Å	125.7
α, °	90.0
β, °	90.0
γ, °	90.0
Résolution, Å	41.96-3.10 (3.21-3.10)
R _{sym} , % ¹	16.3 (53.1)
Moyenne I/σ(I)	6.2 (1.9)
Complétude, %	88.0 (90.0)
Redondance	2.8 (2.7)
No. de réflexions uniques	8475 (865)
Facteur B Wilson, Å ²	50.4
Affinement	
R _{travail} /R _{libre} ²	0.22/0.29
Facteur B moyen, Å ²	40.7
Rmsd	
Longueur liaisons, Å	0.011
Angles liaisons, °	1.64
Stat. Ramachandran, %	
Favorisé	93
Autorisé	6.5
Données abbérantes	0.5

$$^1 R_{sym} = \frac{\sum_j \sum_h |I_{h,j} - \langle I \rangle|}{\sum_j \sum_h I_{h,j}}$$

$$^2 R_{travail} = \frac{\sum_h |F_{obs} - F_{cal}|}{\sum_h F_{obs} R_{libre}}, \quad R_{libre} \text{ est calculé avec une faible fraction (5\%) choisie pour faire parti d'un groupe test. Les valeurs entre parenthèses se réfèrent à la plus haute sphère de résolution.}$$

Spectroscopie U.V.-visible

9.1 Spectroscopie cinétique

Les données de spectroscopie d'absorbance cinétique présentées dans cette thèse ont été collectées sur le microspectrophotomètre développé au sein du laboratoire par Martin Byrdin (CAL(A)²IDOSCOPE). Cette installation permet la collecte de spectres de fluorescence et d'absorption à une fréquence maximale d'environ 50 Hz dans des conditions d'illumination finement contrôlables (longueur d'illumination, patron temporelle d'illumination). Afin de limiter les effets liés à la diffusion des molécules au sein de l'échantillon et ne pas distordre les données cinétiques, l'intensité de l'illumination sur l'échantillon est maintenue homogène grâce à un diffuseur. La densité de puissance d'illumination est dans ce cas particulièrement faible par rapport à celle utilisée lors de la collecte de jeux de données PALM sous microscope ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$).

9.2 Mesure du temps de vie de l'état excité

Les temps de vie des états excités des protéines fluorescentes étudiées dans cette thèse et nécessaires à l'estimation des vitesses microscopiques de phototransformation (k_{micro}) ont été mesurés au Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et Raman (LASIR) à l'Université de Lille en collaboration avec Michel Sliwa (installation décrite en détails dans [Ghose et al., 2015]). Le déclin de fluorescence après excitation des formes vertes ou rouges par un laser accordable pulsé 488 nm ou 561 nm respectivement est suivi par la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (TCSPC). Les courbes de déclin de fluorescence sont ajustées à un modèle mono ou biexponentiel selon les protéines. Dans tous les cas, la fraction de la population correspondant à l'état de court temps de vie pour un modèle biexponentiel est inférieure à 5% et est alors négligée. La qualité des ajustements est évaluée par l'étude de la fonction d'autocorrélation et les résidus pondérés. Tous les ajustements ont un χ^2 réduit inférieur à 1.1.

9.3 Caractérisation spectroscopique

9.3.1 Spectre d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence

Les spectres d'émission et d'excitation présentés ont été collectés sur le lecteur de plaque Synergy Multi Mode Reader (BioTek).

Si nécessaire et notamment pour les échantillons de PCFPs photoconverties contenant de nombreux agrégats en suspension, une correction de la diffusion de Rayleigh ($A - A_{Rayleigh}$; équation 9.1) est appliquée aux spectres d'absorption après ajustement de leurs lignes de bases en utilisant le logiciel a|e.

$$A_{Rayleigh} = \log \frac{1}{1 - c\lambda^{-4}} + A_0 \quad (9.1)$$

avec $A_{Rayleigh}$ l'absorbance de composante liée à la diffusion de Rayleigh, λ la longueur d'onde, c le coefficient de proportionnalité et A_0 l'absorbance de la ligne de base à $\lambda=800$ nm du spectre à corriger.

9.3.2 Mesure du pK_a apparent du chromophore

Pour les formes vertes des protéines, le pK_a apparent des chromophores est mesuré à partir des spectres d'absorption. Pour les formes rouges, la faible quantité de protéine extensivement photoconvertie rend plus confortable la mesure du $pK_{a,app}$ à partir de spectres d'émission, nécessitant moins de matériel que l'obtention de spectre d'absorption (Figure 9.1).

Les spectres d'absorption ou d'émission sont collectés pour différents pH sur une gamme de 3.0 à 10.0. Le pic d'absorbance correspondant à la forme anionique ou le pic de fluorescence sont mesurés et reportés en fonction du pH sur un graphique. L'ajustement de l'équation de Henderson-Hasselbalch aux données donne le pK_a apparent du chromophore.

$$pH = pK_{a,app} + \log \frac{[Chro-O^-]}{1 - ([Chro-O^-])}$$

avec $[Chro - O^-]$ la concentration en chromophore anionique estimée à partir de l'intensité du pic d'absorption ou d'émission correspondant à cette forme.

9.3.3 Mesure du coefficient d'extinction molaire par la méthode de Ward

Les coefficients d'extinction molaire (ϵ) des formes vertes ont été mesurés par la méthode de dénaturation alcaline [Bokman and Ward, 1981]. Les mesures ont été faites relativement au chromophore nu servant de référence et pour lequel il a été mesuré que le coefficient d'extinction molaire est de 45 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 445 nm^{-1} . Un spectre d'absorbance est collecté à pH=7.4 puis la protéine est dénaturée par ajout de soude à 200 mM en collectant un spectre à chaque ajout de soude. L'alcalinisation

1. Seule cette méthode devrait être utilisée pour la mesure du coefficient d'extinction des chromophores des protéines fluorescentes. La mesure du coefficient d'extinction molaire à 280 nm à partir de la séquence primaire de la protéine afin d'utiliser cette valeur comme référence pour la mesure relative du coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'absorption maximale de la forme anionique du chromophore est une méthode stérile. En effet, l'estimation est particulièrement peu juste lorsque la maturation est incomplète. D'autre part, l'absorptivité du chromophore à 280 nm peut être à l'origine d'un biais significatif de la mesure.

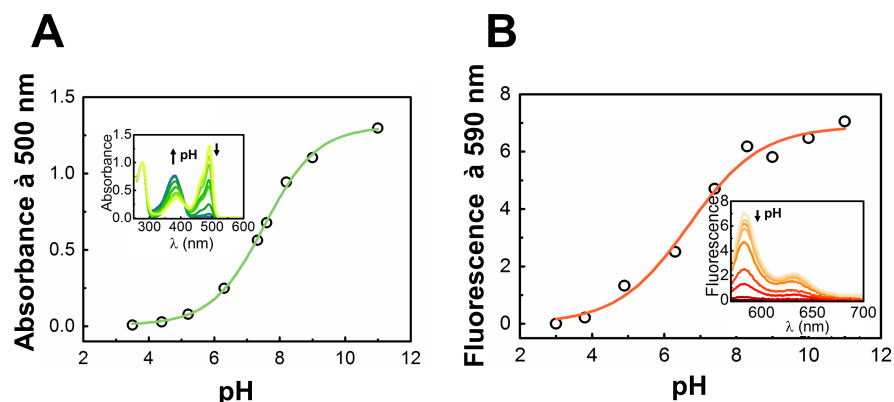


Figure 9.1 – Mesure du pK_a apparent du chromophore des formes vertes et rouges par titration Les spectres d'absorbance des protéines sont collectés dans différentes solution tamponnées sur une gamme allant de pH=3.0 à pH=10.0. Le pic d'absorbance correspondant à la forme anionique du chromophore est mesurée pour les différents pH. L'ajustement du modèle de Henderson-Hasselbalch aux courbes de titration permet d'estimer le pK_a apparent des chromophores. La même méthode est appliquée en se basant sur les spectres d'émission de fluorescence pour la forme rouge.

se poursuit jusqu'à dénaturation complète de la protéine (Figure 9.2 A). La valeur d'absorbance du pic correspondant à la forme anionique est comparée à la valeur du pic à 445 nm correspondant au chromophore nu.

Pour la forme rouge des PCFPs, la méthode de dénaturation alcaline n'est pas applicable à cause de l'absence de référence (chromophore de type GFP (Ser-Tyr-Gly) utilisé comme référence pour la forme verte). Le coefficient d'extinction molaire de la forme photoconvertie est alors mesuré relativement à la forme verte par comparaison des spectres d'absorbance (Figure 9.2 B). Cette méthode peut être à l'origine d'erreurs de mesure notamment du fait d'une photoconversion incomplète et un photoblanchiment de la forme rouge entraînant une sous-estimation du coefficient d'extinction molaire. Les conclusions alors faites à partir de paramètres prenant en compte le coefficient d'extinction molaire (*e.g.* rendements quantiques et vitesses microscopiques de phototransformation) doivent être interprétées avec précaution.

9.3.4 Mesure du rendement quantique de fluorescence par la méthode relative de Wilson et Williams

Les rendements quantiques de fluorescence ont été mesurés de manière relative par rapport à un standard (fluorescéine pour la forme verte et rhodamine 6G pour la forme rouge) [Wilson and Richards, 2009]. Le rendement quantique de fluorescence pour ces deux standards dont le spectre d'émission et d'excitation se rapprochent au mieux de ceux des formes vertes et rouges des PCFPs étudiées sont rapportés dans le Table 9.1

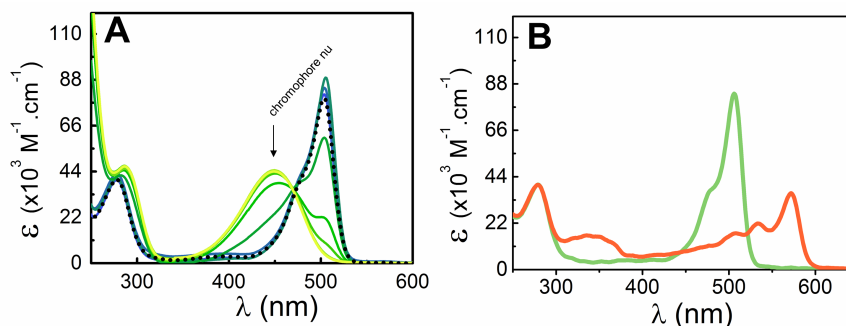


Figure 9.2 – Mesure des coefficients d'extinction molaire par la méthode de Ward (A). De la soude est ajoutée par pas dans la cuvette et un spectre est collecté (du bleu au jaune). La bande à 445 nm correspondant au chromophore nu présente sur le spectre jaune est comparée à la bande principale du spectre de la protéine fluorescente collecté à pH 7.5 (spectre pointillé) (B). Le coefficient d'extinction molaire de la forme rouge est obtenu par comparaison des spectres de la forme verte (servant ici de standard) et de la forme rouge collectés à même pH.

Emission max. (nm).	Excitation max. (nm)	Solvant	Rendement quantique de fluorescence	Référence
Fluorescéine				
515	491	NaOH 0.1 M	0.925 (@ 488 nm)	[Chudakov et al., 2007]
Rhodamine 6G				
552	530	EtOH	0.95 (@ 530 nm)	[Fischer and Georges, 1996]

Table 9.1 – Rendements quantiques de fluorescence de la fluorescéine et de la rhodamine 6G

Les spectres d'absorption d'une gamme d'échantillons (protéines fluorescentes et standard) à concentration variable sont collectés (Figure 9.1 A). La gamme est ensuite diluée de telle sorte que l'échantillon le plus concentré ait une densité optique au pic d'absorbance < 0.1 (afin d'éviter les effets de filtre interne). Les spectres d'émission de fluorescence avec excitation à $\lambda_{exc.}$ du standard de la gamme sont alors collectés (Figure 9.1 B). Pour chaque échantillon, l'absorbance à $\lambda_{exc.}$ et l'intégrale du pic d'émission de fluorescence sont mesurées et représentés graphiquement (Figure 9.1 C). Le coefficient directeur de la fonction linéaire reliant ces deux paramètres est proportionnel au rendement quantique de fluorescence (équation 9.2). Le rendement quantique de fluorescence (Φ_{fluo}) des protéines fluorescentes est alors estimé relativement au standard.

$$\phi_{fluo}^{protéine} = \phi_{fluo}^{standard} \frac{\nabla^{protéine}}{\nabla^{standard}} \frac{\eta_{protéine}^2}{\eta_{standard}^2} \quad (9.2)$$

avec ϕ_{fluo} les rendements quantiques de fluorescence, η les indices optiques des milieux dans lesquels sont dilués la protéine ou le standard et ∇ la pente de la droite reliant absorbance et fluorescence intégrée.

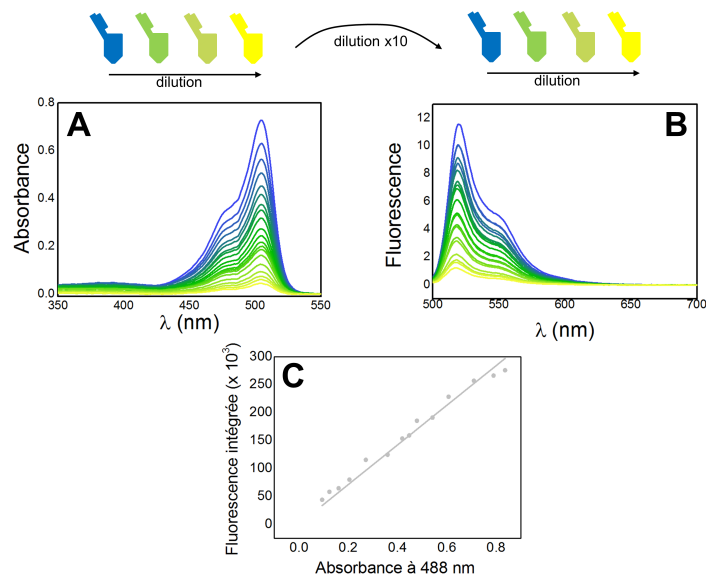


Figure 9.3 – Mesure des rendements quantiques de fluorescence par la méthode relative de Wilson et Williams (A). Les spectres d'absorbance d'une gamme de dilution sont collectés (B). La même gamme est dupliquée et diluée d'un facteur 10 afin d'éviter les effets de filtre interne ($OD_{max} < 0.1$). Les spectres d'émission de fluorescence sont collectés (C). Pour chaque point de la gamme sont mesurées l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation utilisée pour la mesure du spectre de fluorescence (ici 488 nm) et l'intégrale du pic d'émission de fluorescence. Le coefficient directeur de la droite reliant les points est comparé à celui du standard mesuré indépendamment et permet d'estimer le rendement quantique de fluorescence.

Quatrième partie :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie, nous présenterons les résultats de l'étude des mécanismes photophysiques de scintillement, de photoconversion U.V. et de photoconversion amorcée chez deux PCFPs largement utilisées aujourd'hui en microscopie PALM : mEos2 et Dendra2. Nous discuterons de l'implication des phototransformations subies par ces deux marqueurs dans le cadre des études quantitatives en microscopie de localisation.

Dans un premier Chapitre (page 151 *sqq*), nous présenterons nos travaux concernant l'importance de l'arginine 66 dans le contrôle fin du comportement de scintillement et de photoblanchiment des PCFPs. Nous mettrons l'accent sur les avantages et inconvénients de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs (mEos2-A69T et Dendra2-T69A, conçus dans le cadre de cette thèse). Enfin, nous discuterons des perspectives dans le cadre de l'ingénierie de variants optimisés pour la microscopie PALM quantitative.

Dans un second Chapitre (page 177 *sqq*), nous présenterons nos travaux concernant l'effet de l'illumination par une lumière violette sur la photoconversion et le photoblanchiment. Nous mettrons l'accent sur les phototransformations à l'origine d'une incomplétude de l'échantillonnage et d'un ralentissement de la photoconversion lors de la collecte de données PALM. Enfin, nous discuterons des perspectives de ces travaux préliminaires notamment en établissant un parallèle avec la photoconversion amorcée.

Étude du phénomène de scintillement et de photoblanchiment

Le scintillement de la forme rouge des PCFPs dans les conditions classiques d'illumination PALM (lumière 561 nm de forte densité de puissance (kW.cm^{-2}) + lumière 405 nm de basse intensité de puissance (W.cm^{-2})) complique sévèrement l'extraction de données quantitatives (Chapitre 4, page 81 *sqq*). Nous présenterons dans ce Chapitre les résultats de nos recherches sur les mécanismes sous-jacents au scintillement des PCFPs mEos2 et Dendra2.

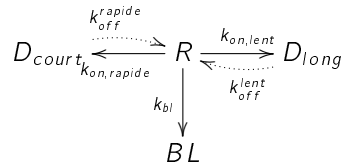
10.1 Prise de vue

Actuellement, malgré les nombreuses études ayant abouti à une caractérisation fine du scintillement des PCFPs [Annibale et al., 2010] [Lee et al., 2012] [Puchner et al., 2013] [Durisic et al., 2014] [Wang et al., 2014a] [Rollins et al., 2015], les mécanismes sous-jacents sont mal compris. Alors que de nombreux mécanismes de scintillement ont été proposés pour les fluorophores organiques et protéines fluorescentes conventionnelles, seules peu d'études proposent des mécanismes concrets à partir de résultats structuraux pour les protéines fluorescentes photomodulables [Adam et al., 2009a] [Roy et al., 2011]. Les travaux précédemment menés au sein du laboratoire suggèrent qu'un rôle central est joué par l'arginine 66 lors de la transition *on* \rightarrow *off*. En échangeant son proton avec le C_α du chromophore, l'arginine 66 de la protéine fluorescente IrisFP serait à l'origine de la distorsion réversible du chromophore qui entre alors dans un état sombre (voir Figure 2.9, page 43).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de vérifier l'importance de l'arginine 66 dans le scintillement de deux protéines fluorescentes « à la mode » en microscopie PALM : mEos2 et Dendra2.

Comparaison du scintillement de mEos2 et Dendra2

Les travaux de caractérisation photophysique menés ces dernières années sur ces deux protéines convergent vers un modèle impliquant deux états sombres peuplés depuis la forme rouge [Lee et al., 2012] [Rollins et al., 2015] : un état sombre de court temps de vie (noté D_{court} caractérisé par une constante cinétique de retour *off* \rightarrow *on* notée k_{off}^{rapide} et associée à un temps de vie moyen de ~ 60 ms) et un état sombre de long temps de vie (noté D_{long} caractérisé par une constante cinétique de retour *off* \rightarrow *on* notée k_{off}^{lent} et associée à un temps de vie moyen de $\sim 1-3$ s).



Dans le détail, le comportement de scintillement et la photorésistance de ces deux PCFPs diffèrent sensiblement [Lee et al., 2012] [Durisic et al., 2014] [Wang et al., 2014a]. La caractérisation photophysique de mEos2 et Dendra2 *in vitro* réalisée par Lee et al. révèle une photorésistance et une tendance à scintiller significativement plus importantes pour mEos2 que pour Dendra2 ($k_{bl}^{mEos2} \sim \frac{1}{3} \cdot k_{bl}^{Dendra2}$ et $k_{on}^{mEos2} \sim 2,5 \cdot k_{on}^{Dendra2}$). D'autre part, les états sombres de long temps de vie sont davantage peuplés chez mEos2 que chez Dendra2.

Le nombre de fois qu'un fluorophore scintille (noté N_{scint} , équation 10.1) est en conséquent 7 fois plus élevé pour le variant de la série Eos (en moyenne 1.4 événements de scintillement contre 0.2 pour le variant de la série Dendra).

$$N_{scint} = \frac{k_{on}}{k_{bl}} \quad (10.1)$$

Étonnamment, l'étude de ces mêmes protéines fluorescentes exprimées en environnement cellulaire (expression en fusion avec le récepteur GlyR à la surface de membranes d'oocytes de Xénope) conclut à un comportement photophysique différent de celui décrit ci-dessus [Durisic et al., 2014]. Dans ce contexte, seule 38% de la population rouge de mEos2 scintille (contre 60% d'après Lee et al.). Pour Dendra2, la différence entre les deux études est moindre (30 d'après Durisic et al. et 20% d'après Lee et al.). D'autre part, la caractérisation révèle que le nombre moyen d'événements de scintillement est identique entre les deux PCFPs ($N_{scint}=2.8$ et 2.7 pour mEos2 et Dendra2 respectivement). L'absence d'accord entre ces deux études suggère que les mécanismes de scintillement et de photoblanchiment sont affectés par l'environnement (pH, conditions redox, présence d'oxygène moléculaire par exemple) ou par les conditions d'illumination (densité de puissance des lasers 561 ou 405 nm)¹.

La sensibilité du comportement photophysique aux conditions de l'environnement semble être corroborée par les résultats de Wang et al. publiés la même année [Wang et al., 2014a]. Alors qu'en contexte bactérien mEos2 scintille en moyenne 1.6 fois plus que Dendra2 ($N_{scint}=2.8$ contre 1.7), cette différence s'estompe en contexte eucaryote ($N_{scint}=2.2$ contre 2.3).

En somme mEos2 et Dendra2 présentent des comportements de scintillement et de photoblanchiment sensiblement différents. Dendra2 avec sa faible tendance à entrer dans des états sombres de long temps de vie facilite la correction du scintillement lors du comptage moléculaire par microscopie de localisation. En pratique, Dendra2 est cependant moins utilisée que sa « concurrente » directe mEos2 qui présente elle un meilleur budget de photons (localisation plus précise). Malgré son importante tendance à scintiller qui devrait prévenir son utilisation en microscopie PALM quantitative, mEos2 est généralement préférée « par défaut » en microscopie PALM.

Notre objectif vise à comprendre l'origine de cette différence dans le but de développer une nouvelle protéine fluorescente chimère combinant les avantages respectifs de Dendra2 et mEos2.

1. Nous n'excluons pas que l'absence de congruence entre les résultats des deux études puisse être le résultat d'erreurs systématiques liées aux méthodes d'analyse des données.

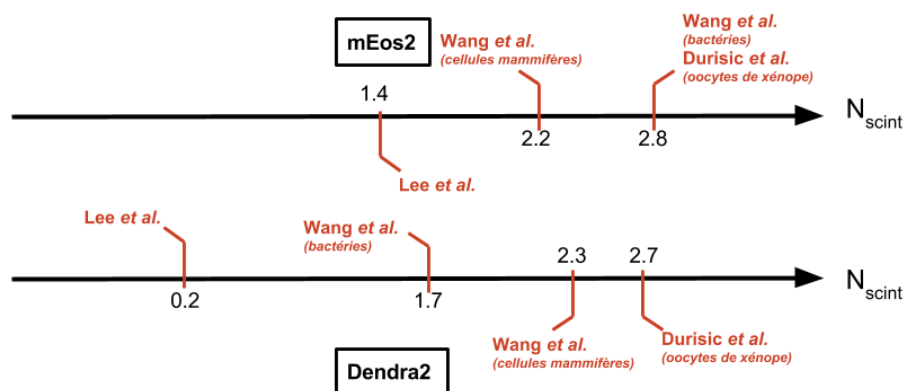


Figure 10.1 – Comparaison des valeurs de N_{scint} publiées de mEos2 et Dendra2 D'après [Lee et al., 2012] [Durisic et al., 2014] [Wang et al., 2014a].

Hypothèse de travail

La comparaison des séquences protéiques de mEos2 et Dendra2 révèle une homologie de séquence globale de seulement 72.2% qui monte à 81% en se limitant aux acides aminés situés à une distance inférieure à 4 Å du chromophore (Figure 10.2).

Les structures cristallographiques de mEos2 (code PDB :3S05) et de Dendra2 (code PDB :2VZX) sont en tout point semblables dans l'environnement immédiat du chromophore à l'exception notable de la conformation de l'arginine 66 (Arg66) (Figure 10.3). Alors que dans mEos2 l'arginine 66 adopte une conformation dite étirée dans laquelle l'amine terminale du résidu forme une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de l'imidazolinone du chromophore (Figure 10.3 A,B), l'arginine 66 de Dendra2 adopte une conformation dite recroquevillée dans laquelle l'amine terminale du résidu fait face au glutamate 212 avec lequel elle établit une double interaction potentiellement de type pont saline (Figure 10.3 C,D). La conformation adoptée par l'Arg66 chez Dendra2 résulte de l'interaction entre l'azote Ne de la chaîne latérale de l'arginine et le groupement hydroxyl porté par la thréonine en position 69.

Face à ce constat et aux vues des précédents travaux suggérant l'importance de l'arginine 66 dans la formation d'un état sombre, nous proposons l'hypothèse de travail suivante : « la différence de comportement entre mEos2 et Dendra2 est la conséquence d'une orientation différente de l'Arg66 ». L'arginine est un acide aminé remarquable du point de vue de sa réactivité biochimique. Le groupe guanidine porté par la chaîne latérale de cet acide aminé est une base forte ($pK_b=0.4$). En solution, l'arginine se trouve exclusivement sous une forme protonée cationique appelée guanidinium ($pK_a=12.5$). Le proton est alors difficilement arrachable et la chaîne latérale de l'arginine 66 est peu soumise aux échanges de protons avec son environnement. Les résidus arginines sont alors d'excellents réservoirs à protons en mesure d'être mobilisés uniquement lors de la formation à proximité d'une base forte (e.g. l'état excité du chromophore).

Dendra2	1	MNLIKEDMRVKVHMEGNVNGHAFVIEGEGNGKPKVEGTCITANLIVKEGAPLPFSYDILTAA
mEos2	1	MSAIKPDMMKIKLRMEGNVNGHAFVIEGEGNGKPKVEGKQSMILEVKEGEPLEPFADILTAA
Dendra2	61	VHYGNRVFHKYPEDIEFDYFKQSFPKGYSWERTMTFEDRGICTIRSDISLEGDCFFQNVRF
mEos2	61	FHYGNRVFHKYPDNIQDYFKQSFPKGYSWERSLTFEDGGICLARNDITMEGDTFYNKVRF
Dendra2	121	KGTNFPENGPVMQKKTLEKWPSTKLVHVRDGLLVGNINMALLEGGGHYRCDFRTTYKAK
mEos2	121	YGTNFPANGPVMQKKTLEKWPSTKMYVRDGVLEGLIEMALLEGNNAHYRCDFRTTYKAK
Dendra2	181	KVVCLEPDHFVDHRIEILGNDSYDNKVKLYEHAVARYSPLPSQVWH
mEos2	181	EKGVKLEPGYHFVDHCIEILSHDKDYDNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR

Figure 10.2 – Comparaison de séquences de mEos2 et Dendra2. Alignement des séquences protéiques de mEos2 et Dendra2 (réalisé en ligne avec CLUSTAL Omega (1.2.1) *multiple sequence alignment*). Les positions pour lesquelles les acides aminés sont conservés entre mEos2 et Dendra2 sont surlignées en noir. Les acides aminés situés à moins de 4 Å de distance du chromophore (HYG) sont repérés par une ligne rouge.

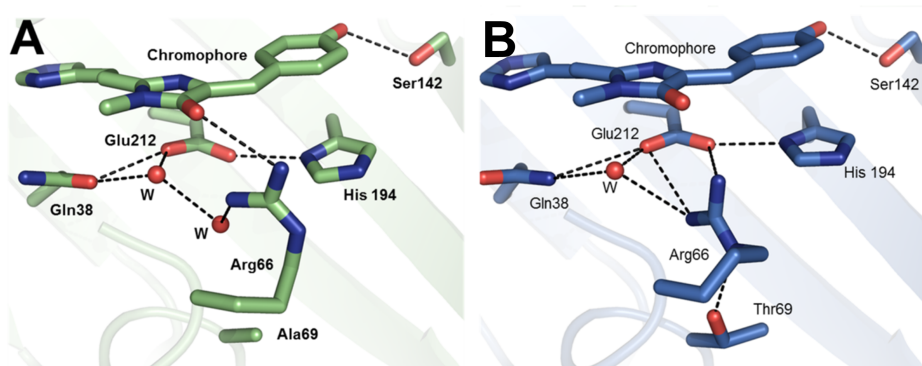


Figure 10.3 – Comparaison de structures de mEos2 et Dendra2 (A). Structure 3D de la cavité du chromophore de mEos2 dans sa forme verte (code PDB : 3S05) (B). Structure 3D de la cavité du chromophore de Dendra2 dans sa forme verte (code PDB : 2VZX). Les liaisons faibles potentielles sont représentées par des traits pointillés noirs.

Orientations de l'Arg66 et caractéristiques spectroscopiques

Les travaux effectués dans le cadre de la conception d'un variant photoconvertible vert à rouge de Dronpa mettent en évidence que la mutation ponctuelle Ala69Thr est suffisante à modifier la conformation adoptée par l'arginine 66 [Moeyaert et al., 2014]. Le changement d'orientation de l'arginine 66 (d'une conformation étirée vers une conformation recroquevillée) induit par cette mutation ponctuelle est le résultat de l'interaction du N_ε de l'arginine avec le groupement hydroxyl de la thréonine en position 69. La réorientation de l'Arg66 est accompagnée de modifications des propriétés d'absorption et d'émission du chromophore (décalage hypsochrome) et d'équilibre de protonation du chromophore (augmentation du pK_{a,app}). L'effet de l'orientation de l'arginine 66 sur les propriétés spectroscopiques avait déjà été mis en évidence par les travaux de caractérisation d'un mutant de Dendra2 (Dendra2-T69A) [Adam et al., 2009b].

Les travaux publiés avant le début de cette thèse suggèrent donc que la mutation ponctuelle de l'acide

aminé en position 69 (Thr→Ala ou Ala→Thr) a pour conséquence une réorientation de l'arginine 66 à l'origine d'une modification des caractéristiques spectroscopiques. À ce jour néanmoins l'effet de l'orientation de l'arginine 66 sur les propriétés de scintillement et de photoblanchiment n'a jamais été rapporté.

10.2 Stratégie expérimentale et caractérisation spectroscopique

Afin de vérifier notre hypothèse de travail, nous avons alors conçus deux mutants en tout point semblables à leurs parents à l'exception de l'orientation de l'arginine 66 : mEos2-Ala69Thr et Dendra2-Thr69Ala. L'exploitation ingénieuse de la mutagenèse nous permet de développer un support d'étude afin d'isoler de l'ensemble des autres acides aminés l'effet de l'arginine 66.

Comme prédit par la caractérisation du mutant pcDronpa-A69T, les mutants mEos2-A69T et Dendra2-T69A voient leurs propriétés d'absorption, d'émission de fluorescence (Figure 10.4) et d'équilibre de protonation du chromophore (Table 10.1, page 158) profondément modifiées par rapport à leur parents. Les structures cristallographiques de ces deux mutants (résolues dans le cadre de cette thèse) permettent d'assigner cette différence à une modification de la conformation de l'arginine 66 (Figure 10.5).

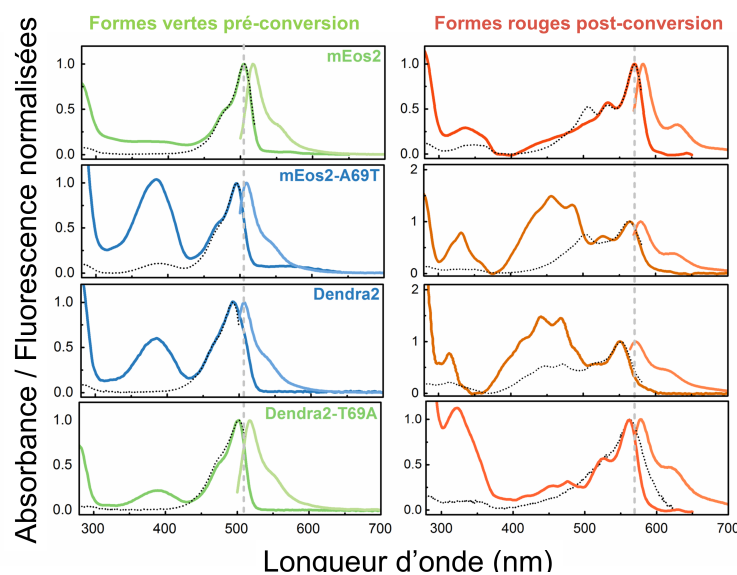


Figure 10.4 – Caractérisation spectroscopique de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs (Gauche). Spectres d'absorption (vert et bleu foncé), d'émission de fluorescence (vert et bleu clair) et d'excitation (pointillé) des formes vertes pré-photoconversion (Droite). Spectres d'absorption (rouge et orange foncé), d'émission de fluorescence (rouge et orange clair) et d'excitation (pointillé) des formes rouges obtenues après photoconversion.

Les mutants pour lesquels l'Arg66 adopte une conformation étirée (mEos2 et Dendra2-T69A) ont -dans leurs formes vertes et rouges- une absorption et une émission de fluorescence décalée vers le rouge (transition bathochrome, Figure 10.4), une valeur de $pK_{a,app}$ plus faible et une brillance physique

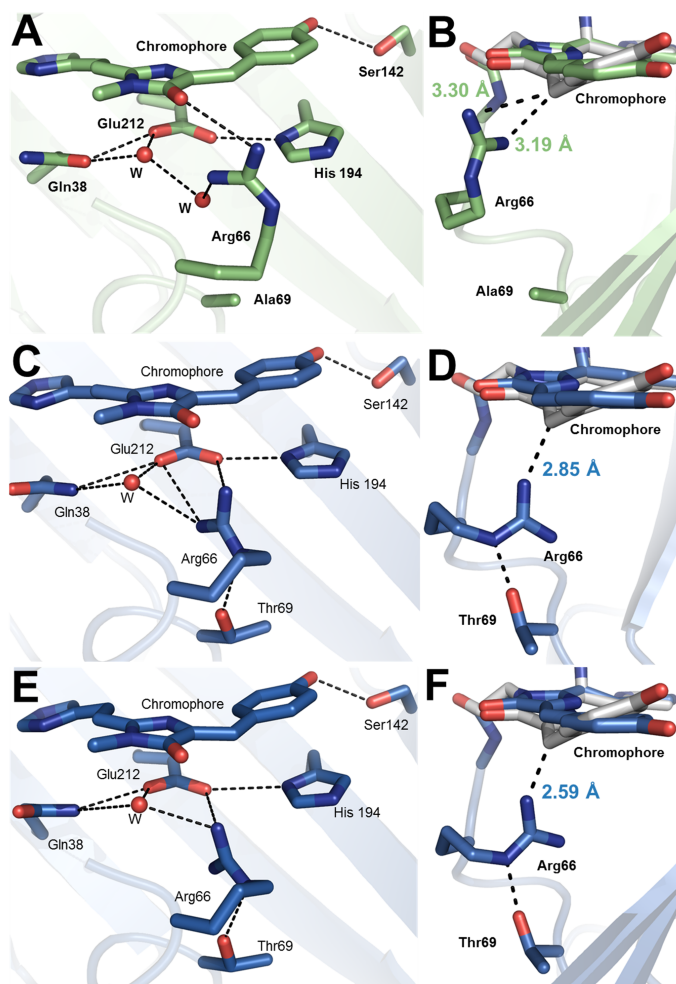


Figure 10.5 – Structures cristallographiques des formes vertes de mEos2, Dendra2 et mEos2-A69T (A, B). Points de vue différents de la structure de la forme verte de mEos2 (code PDB : 3S05) (C, D). Points de vue différents de la structure de la forme verte de mEos2-A69T (résolue dans le cadre de ces travaux de thèse ; code PDB : 5DTL) (E, F). Structure de la forme verte de Dendra2 (code PDB : 2VZX). Le chromophore de la protéine IrisFP dans son état sombre après irradiation aux rayons X (chromophore distordu à C_{α} protoné après échange de proton avec l'arginine 66) est représenté en blanc (code PDB : 3TMT). Face aux difficultés de cristallisation et à la faible qualité des cristaux obtenus, la structure de la forme rouge n'a pas été résolue. Néanmoins, les faibles modifications structurales accompagnant la photoconversion suggèrent que les conclusions structurales établies sur la base de la structure verte peuvent être élargies à la forme rouge de ces PCFPs. La structure de Dendra2-T69A n'a pu être obtenue qu'avec une résolution de piètre qualité prévenant toute conclusion fiable à partir de son analyse.

($\epsilon.\phi$) plus élevée (Table 10.1) par rapport aux mutants pour lesquels l'Arg66 adopte une conformation recroquevillée (Dendra2 et mEos2-A69T). Ces propriétés seront dites de type Eos. À l'opposé, une émission décalée vers le bleu, une valeur de $pK_{a,app}$ élevée à l'origine d'une faible brillance sont

caractéristiques du type Dendra.

Pour les mutants à propriétés de type Eos, la charge positive portée par l'Arg66 se place à proximité du chromophore, à l'origine d'une attraction des électrons de l'anneau ϕ vers l'anneau l . En conséquence, l'anneau phényl appauvri en électrons devient moins nucléophile et l'attraction d'un proton par le phénolate du chromophore est défavorisée (diminution du $pK_{a,app}$). La forte brillance physique à pH physiologique des mutants de type Eos (mEos2 et Dendra2-T69A) est alors principalement expliquée par la stabilisation de la forme anionique fluorescente. Le décalage de l'absorption du chromophore vers le rouge (*i.e.* diminution de l'énergie nécessaire à la transition $S_0 \rightarrow S_1$) s'explique par la moindre modification de la répartition des électrons le long du chromophore au cours de l'excitation (l'anneau l vers lequel se déplacent les électrons lors de l'excitation est, à l'état fondamental, déjà enrichi en électrons).

La mutation ponctuelle Ala69Thr chez mEos2 confère à cette PCFP des propriétés de type Dendra. Au contraire, la mutation Thr69Ala chez Dendra2 confère à cette dernière des propriétés de type Eos. Une simple mutation ponctuelle en modifiant l'orientation de l'arginine 66 est à l'origine d'une interversion des propriétés spectroscopiques de base entre mEos2 et Dendra2. Qu'en est-il du comportement photophysique de scintillement et de photoblanchiment à l'échelle de la molécule unique ?

Table 10.1 – Caractéristiques spectroscopiques des protéines mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leurs formes vertes et rouges

	Formes vertes							Formes rouges							
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ^1 ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_{fluo}^2	Brillance ³	$pK_{a,app}$	τ^4 (ns)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ^1 ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϵ à 561 nm ⁵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_{fluo}^2	Brillance ³	$pK_{a,app}$	τ^4 (ns)
mEos2	508	519	79,000	0.66	1.55	5.0	3.5	573	584	34,300	26,300	0.65	0.66	6.6	4.1
mEos2-A69T	495	509	24,300	0.87	0.63	8.2	3.4	565	580	11,500	10,100	0.66	0.22	7.4	4.2
Dendra2	490	507	33,300	0.53	0.52	7.5	3.3	553	573	17,300	14,100	0.74	0.38	7.9	4.4
Dendra2-T69A	502	518	42,500	0.56	0.7	6.0	3	563	578	35,400	35,400	0.64	0.67	7	4.2

¹ Coefficients d'extinction molaire des formes anioniques des chromophores (formes vertes ou rouges) à pH=7.4 (PBS) et λ_{ex} mesurés par la méthode de Ward.

² Rendement quantique de fluorescence de la forme verte mesuré relativement à la fluorescéine par la méthode de Williams

³ Brillance relative à la EGFP en prenant $\epsilon=56,000 M^{-1}.cm^{-1}$ et $\phi_{fluo.}=0.6$

⁴ Temps de vie de l'état excité

⁵ Coefficient d'extinction molaire de la forme rouge anionique du chromophore à pH=7.4 (PBS) et $\lambda_{ex}=561$ nm utilisé pour mesurer les rendements quantiques de phototransformations induites par le laser 561 nm

10.3 Conséquences de l'orientation de l'arginine 66 sur le scintillement et le photoblanchiment

Grâce à la méthode innovante d'immobilisation développée au sein du laboratoire (voir page 111), de nombreuses traces de fluorescence de qualité peuvent être collectées afin de permettre une caractérisation photophysique fine à l'échelle de la molécule unique.

10.3.1 Analyse qualitative

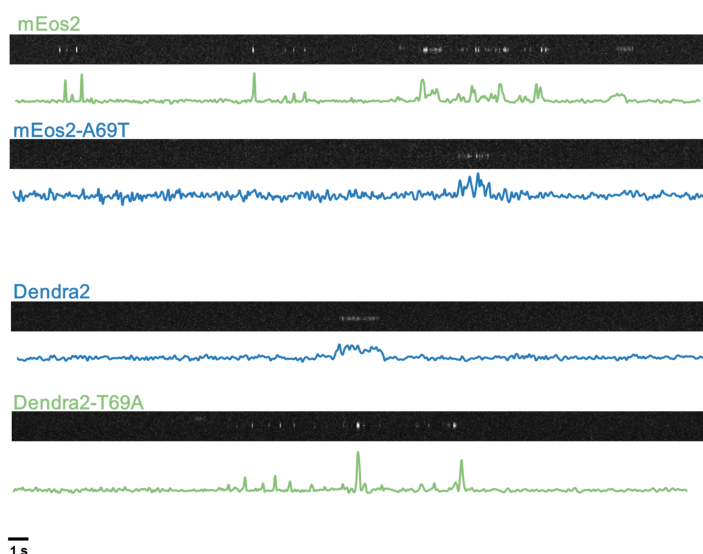


Figure 10.6 – Kymogrammes typiques de molécules uniques isolées des formes rouges immobilisées de mEos2, mEos2-A69T, Dendra2 et Dendra2-T69A

La Figure 10.6 présente sous forme de kymogrammes le comportement typique d'une molécule isolée de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs.

Globalement, l'étude des traces de fluorescence révèlent que le comportement de mEos2 et Dendra2 entre nos mains est cohérent avec celui publié par le groupe de Bustamante [Lee et al., 2012], suggérant que la méthode de fixation covalente par amidification s'avère relativement neutre vis-à-vis du comportement photophysique des protéines fluorescentes.

Qualitativement, on remarque que le mutant mEos2-A69T se comporte de manière similaire à Dendra2 alors que le mutant Dendra2-T69A se comporte de manière similaire à mEos2 : la modification de l'orientation de l'Arg66 est à l'origine d'une interversion des comportements de scintillement.

Typiquement, Dendra2 et mEos2-A69T sont peu photorésistantes et leur émission de fluorescence est entrecoupée de quelques événements de scintillement rapide (état *off* de court temps de vie) et plus rarement d'événements de scintillement lent (état *off* de long temps de vie). Au contraire, mEos2 et Dendra2-T69A sont relativement plus photorésistantes et leur émission de fluorescence est géné-

ralement entrecoupée de plusieurs événements de scintillement lent caractérisés par de très longues périodes *off*.

10.3.2 Analyse quantitative

À partir de l'analyse de nombreuses traces de fluorescence selon la méthode présentée dans le Chapitre 7 (page 121 *sqg*), nous avons mené une étude quantitative du comportement de scintillement et de photoblanchiment de ces 4 PCFPs.

Nombre moyen de scintillement

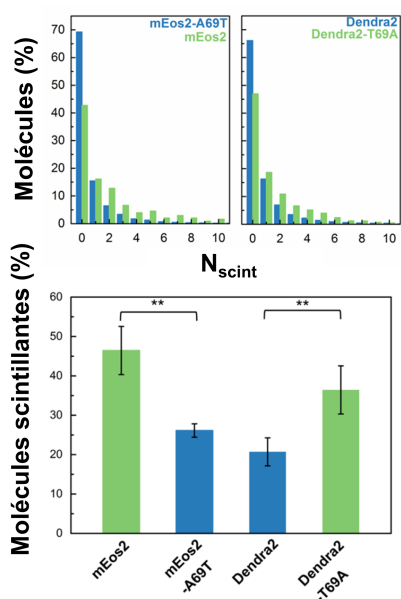


Figure 10.7 – Histogrammes de scintillement et fraction de molécules scintillantes de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge (A). Histogrammes de scintillement de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs mesurés *in vitro* (B). Fraction de la population de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs entrant au moins une fois au cours de leur vie dans un état sombre de court ou lent temps de vie (mesurée *in vitro*). Les variants à arginine 66 recroquevillée sont représentés en bleu, les variants à arginine 66 étirée en vert. **: valeur $p < 0.01$ (très significatif) ; * : valeur $p < 0.05$ (significatif). La valeur p est calculée pour un test de Student de l'égalité de l'espérance de deux variables indépendantes.

L'étude des histogrammes de distribution de probabilité de scintillement met en évidence un nombre moyen de scintillement (N_{scint}) environ 3 fois plus élevé pour mEos2 que pour Dendra2 (0.93 contre 0.29 ; Table 10.3). Dans nos conditions expérimentales de collecte et d'analyse des données, les valeurs moyennes du nombre de scintillements se positionnent au bas de l'échelle de celles publiés (Figure 10.1, page 153). Comment expliquer cette différence ? D'après l'équation 10.1 (page 152), le nombre moyen d'événements de scintillement peut être estimé à la baisse si la vitesse de photoblanchiment varie de manière non linéaire par rapport à celle de scintillement. Nos conditions d'illumination (forte densité de puissance de lumière 561 nm et illumination constante par une lumière 405 nm) placent les fluorophores dans un régime où la vitesse de photoblanchiment ne varie probablement plus de manière linéaire par rapport à celle de scintillement (photoblanchiment deux photons par exemple, voir page 32 *sqg*). La vitesse de photoblanchiment élevée relativement à celle de scintillement conduit à une diminution du nombre moyen d'événement de scintillement.

D'autre part, le nombre moyen d'événements de scintillement peut être estimé à la baisse suite à une analyse incorrecte des traces de fluorescence. Notamment, notre méthode d'analyse entraîne en général un tronçonnage en sous-traces lorsque $t_{off} > 5$ s (voir page 89) à l'origine d'une diminution du nombre moyen de scintillements. Enfin, il est important de noter que l'estimation du nombre moyen de scintillements proposée par Wang [Wang et al., 2014a] est réalisée en bactérie et en fusion avec une protéine de liaison à l'ADN s'organisant en clusters. Dans un tel contexte, le regroupement des traces de fluorescence issues de plusieurs molécules en une super-trace est hautement probable

et peut résulter en une estimation à la hausse du nombre moyen d'événements de scintillement N_{scint} .

Notre analyse révèle que les mutants pour lesquels l'Arg66 adopte une conformation recroquevillée (mEos2-A69T et Dendra2) scintillent en moyenne 2.1 à 2.4 fois moins que les mutants à Arg66 étirée (mEos2 et Dendra2-T69A) et seule une fraction inférieure à 30% de la population entre dans des états sombres contre 35 à 45% environ pour les mutants de type Eos.

Le nombre moyen d'événements de scintillement entre mEos2 et Dendra2 est interverti par simple modification de l'orientation de l'Arg66. À la lumière de l'équation 10.1, nous nous sommes intéressés aux vitesses macroscopiques de scintillement $on \rightarrow off$ et de photoblanchiment afin d'expliquer le comportement de scintillement apparent.

Vitesses macroscopiques de scintillement et de photoblanchiment

L'analyse des histogrammes des temps on (\mathcal{N}_{on}) (voir Chapitre 7, page 124) révèle une réduction significative de la vitesse de scintillement $on \rightarrow off$ lorsque l'Arg66 passe d'une conformation étirée à une conformation recroquevillée (Table 10.3, Figure 10.8 A).

En parallèle, l'analyse des histogrammes des temps de photoblanchiment (\mathcal{N}_{bl}) révèle que la même modification d'orientation de l'arginine 66 est à l'origine d'une réduction d'un facteur 1.7 de la photorésistance (Table 10.3, Figure 10.8 B).

Le faible nombre d'événements de scintillement des variants de type Dendra à Arg66 recroquevillée (mEos2-A69T et Dendra2) s'explique donc non seulement par une propension réduite à entrer dans un état sombre mais également par une propension plus élevée à photoblanchir par rapport aux variants de type Eos à Arg66 étirée (mEos2 et Dendra2-T69A).

L'étude des vitesses de phototransformation n'étant pas suffisante pour conclure quant à l'effet de l'orientation de l'Arg66 sur les mécanismes sous-jacents, les vitesses microscopiques de phototransformation (seul paramètre donnant une estimation juste des mécanismes) ont été calculées (pour rappel voir page 125).

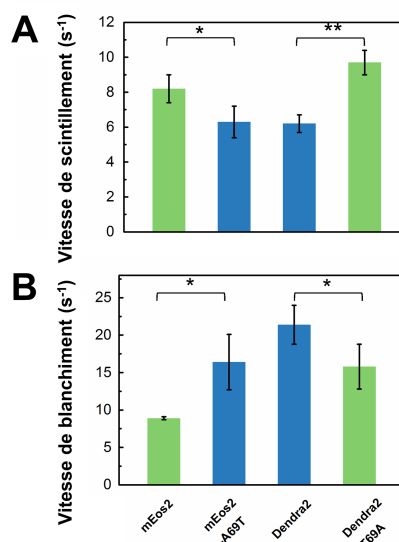


Figure 10.8 – Vitesses macroscopiques de photoblanchiment et de scintillement de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge Les vitesses macroscopiques moyennes de scintillement (A) et de photoblanchiment (B) et les écarts-types standards associés (barres d'erreurs) calculés à partir de trois échantillons indépendants sont représentés. **: valeur $p < 0.01$ (très significatif); *: valeur $p < 0.05$ (significatif). La valeur p est calculée pour un test de Student de l'égalité de l'espérance de deux variables indépendantes.

Rendements quantiques et vitesses microscopiques

Connaissant la densité de puissance laser au niveau de l'échantillon, les coefficients d'extinction molaire (ϵ) et les temps de vie des états excités (τ) (Table 10.1), les vitesses microscopiques de scintillement et de photoblanchiment sont alors estimées.

Alors que la vitesse macroscopique de scintillement estimée pour Dendra2 est inférieure à celle estimée pour mEos2 (Figure 10.8), la vitesse microscopique -véritable marqueur mécanistique- est supérieure pour Dendra2, mettant ainsi en évidence que la transition $on \rightarrow off$ est mécanistiquement favorisée chez Dendra2. Alors que la seule étude des vitesses macroscopiques de scintillement ne permet en aucun cas de conclure quant à la probabilité qu'une molécule unique passe dans un état sombre, l'étude des vitesses microscopiques (trop rarement calculées dans la littérature) permettent d'établir des conclusions fiables sur la faciliter avec laquelle une phototransformation a lieu.

Nos résultats suggèrent que dans sa conformation recroquevillée (mEos2-A69T et Dendra2), l'arginine 66 favorise mécanistiquement le photoblanchiment (Table 10.3 ; augmentation de k_{bl}^{micro} d'un facteur 4.5 entre mEos2 et mEos2-A69T et d'un facteur 3.2 entre Dendra2-T69A et Dendra2).

Dans cette même conformation, le scintillement (rapide+lent) est significativement défavorisé (Table 10.3 ; réduction de k_d^{micro} d'un facteur 2 entre mEos2 et mEos2-A69T et entre Dendra2-T69A et Dendra2). L'estimation de la fraction de molécules scintillant vers un état sombre de long temps de vie (f_{long}) permet de connaître pour chaque variant les vitesses microscopiques de scintillement lent et rapide (voir notes du Table 10.3 pour les détails). Nos résultats mettent en évidence sans équivoque que dans sa conformation recroquevillée, l'arginine 66 favorise le scintillement rapide (augmentation de $k_{d,rapide}^{micro}$ d'un facteur 3.8 entre mEos2 et mEos2-A69T et d'un facteur 2 entre Dendra2-T69A et Dendra2). Le scintillement lent lui semble moins nettement affecté par l'orientation de l'arginine 66 (augmentation d'un facteur 1,3 seulement).

Scintillement rapide vs. scintillement lent

L'analyse des histogrammes des temps off (\mathcal{N}_{off}) (voir Chapitre 7) révèle que lorsque l'arginine 66 passe d'une conformation étirée à une conformation recroquevillée, la propension à entrer dans un état sombre de long temps de vie diminue significativement (Figure 10.9 A,B). À la différence de la caractérisation menée par Lee *et al.*, notre étude ne révèle pas de différence significative entre les vitesses de retour $off \rightarrow on$ pour les différents mutants (Fi-

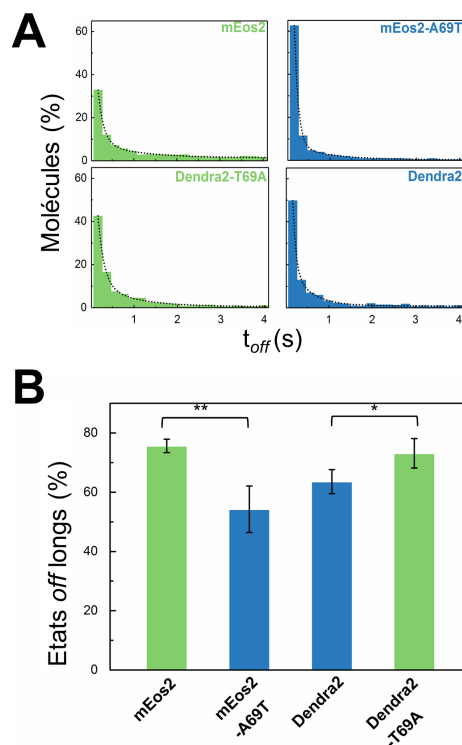


Figure 10.9 – Histogrammes \mathcal{N}_{off} et fraction des états sombres de long temps de vie de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge (A). Histogrammes de temps off \mathcal{N}_{off} ajustés par un modèle biexponentiel (courbe noire) (B). Fraction des états sombres de long temps de vie. Les valeurs moyennes et les écarts-types standards associés (barres d'erreurs) calculés à partir de trois échantillons indépendants sont représentés. * : valeur $p < 0.05$ (significatif). La valeur p est calculée pour un test de Student de l'égalité de l'espérance de deux variables indépendantes.

gure 10.10 A). Pour les mutants à rares événements de scintillement lent, l'échantillonnage des histogrammes \mathcal{N}_{off} pour les temps *off* élevé est médiocre. La qualité de l'ajustement est alors moindre et les constantes cinétiques de retour $off^{long} \rightarrow on$ sont estimées avec une erreur importante. La différence mise en avant par Lee *et al.* semble alors non significative d'autant plus que les constantes cinétiques sont rapportées sans écart-type.

Afin de mieux connaître la nature des états sombres de court et de long temps de vie, leur sensibilité aux conditions d'illumination ont été étudiées (Figure 10.10 B).

Quelque soit l'intensité d'illumination violette (405 nm), la constante cinétique de retour de la forme *off* de court temps de vie reste inchangée. Cette observation suggère que l'état sombre de court temps de vie présente une absorptivité nulle à 405 nm, qui est peut être interprétée comme le résultat d'une distorsion du chromophore (perte de planéité).

Au contraire, l'augmentation significative de la constante cinétique de retour de l'état *off* de long temps de vie lorsque l'intensité d'illumination violette croît, traduit un retour $off^{long} \rightarrow on$ photo-induit par la lumière 405 nm. Le retour photo-induit de l'état *off* de long temps de vie est confirmé à l'échelle d'ensemble (temps caractéristique de retour significativement réduit par rapport à l'expérience menée à l'obscurité ($\sim 1,5$ s contre plusieurs minutes), Figure 10.11 B) et corrobore les résultats publiés concernant le scintillement lent de mMaple [McEvoy *et al.*, 2012], mEos2 et Dendra2 [Lee *et al.*, 2012] dans leur forme rouge. En accord avec les données spectroscopiques publiées par Mc Evoy *et al.* mettant en évidence une protonation du chromophore rouge lors du scintillement lent de mMaple, l'ensemble de nos résultats suggèrent une probable protonation du chromophore qui absorbe alors avec un maximum à ~ 450 nm (voir spectres de la Figure 10.4, page 155). Étant donné l'équilibre rapide de protonation du phénolate du chromophore (temps avant déprotonation de la forme *cis*-protonée du chromophore $\sim \mu\text{s}$ [Moerner, 2002] [Haupts *et al.*, 1998]), la transition $on \rightarrow off^{long}$ s'accompagne très probablement d'une modification structurale. L'importante stabilité (plusieurs minutes) de cet état à l'obscurité corrobore l'hypothèse de modifications structurales du chromophore (Figure 10.11 A).

Étonnamment, à l'échelle d'ensemble, la diminution de fluorescence sous excitation des variants à Arg66 recroquevillée n'est pas suivie à l'obscurité d'un retour de fluorescence (Figure 10.11 A). Un tel comportement peut être interprété d'une part comme une forte stabilité de l'état sombre de ces variants, stabilité qui n'a pas pu être mise en évidence à partir de l'étude des constantes cinétiques de retour $off \rightarrow on$ étant donnée le biais statistique important. D'autre part, à l'échelle d'ensemble les conditions diffèrent fortement (immobilisation en PVA et faible densité de puissance d'excitation) si bien que le comportement peut alors sensiblement différer de celui étudié à l'échelle de la molécule unique (immobilisation par amidification et forte densité de puissance). Dans ce contexte notamment, le photoblanchiment pourrait être plus important si bien que la diminution de fluorescence sous excitation est la conséquence d'un photoblanchiment exclusivement.

10.3.3 Effet des conditions physico-chimiques

Afin de préciser davantage les voies photophysiques empruntées lors du scintillement lent, rapide et du photoblanchiment, le comportement photophysique a été étudié dans deux environnements à conditions physico-chimiques différentes : en conditions oxydantes (5 mM ferricyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6$) et en conditions anaérobie (voir page 113).

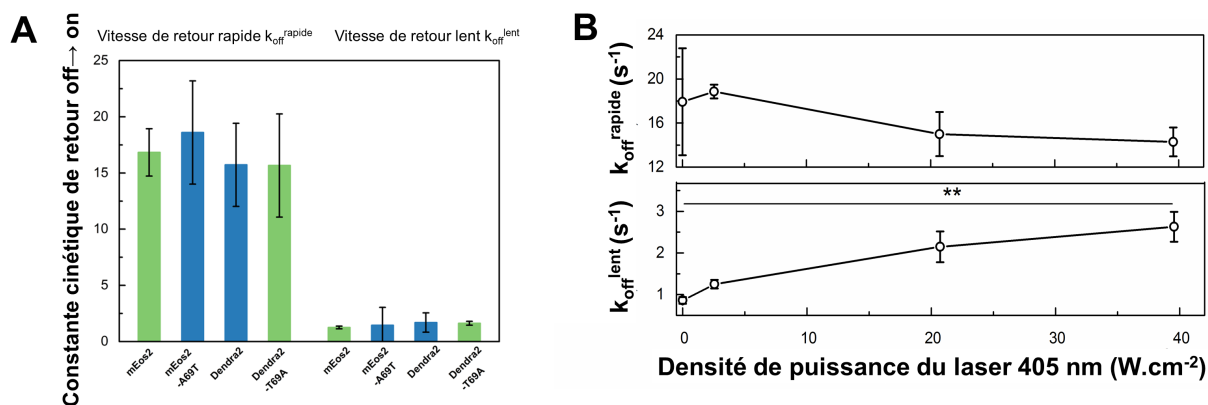


Figure 10.10 – Constantes cinétiques de retour $off \rightarrow on$ et effet de la lumière violette sur les états sombres de long temps de vie de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge (A). Constantes cinétiques de retour $off \rightarrow on$ lent et rapide mesurées *in vitro* (B). Variations de la constante cinétique de retour de la forme off de court (haut) et de long (bas) temps de vie de mEos2 *in vitro* en fonction de la densité de puissance du laser 405 nm au centre du laser. Sont représentés les valeurs moyennes et les écarts-types standards (barres d'erreurs) calculés à partir de trois échantillons indépendants. La valeur p est calculée pour un test de Student de l'égalité de l'espérance de deux variables indépendantes (** : valeur $p < 0.01$ (très significatif) ; * : valeur $p < 0.05$ (significatif)).

En présence de ferricyanure, la photorésistance de l'ensemble des variants est significativement réduite suggérant que le photoblanchiment dans les conditions d'illumination de l'expérience est sous contrôle d'une photochimie de type redox (transferts d'électrons) (Figure 10.12 A). À la lumière des travaux menés par l'équipe concernant le photoblanchiment d'IrisFP [Duan et al., 2013] (voir page 32), nos résultats suggèrent que le photoblanchiment chez mEos2 et Dendra2 sous forte intensité d'illumination pourrait également être la conséquence de réactions redox aboutissant à la décarboxylation du glutamate 212. La diminution de la photorésistance de mEos2 et Dendra2-T69A en condition anaérobie (Figure 10.12 A) renforce l'hypothèse d'un photoblanchiment par décarboxylation du glutamate 212 plutôt que par une oxydation de la méthionine 159 et de la cystéine 171 dépendante de l'oxygène moléculaire. Sachant qu'en condition anaérobie la levée d'extinction (*quenching*) de l'état triplet par l'oxygène moléculaire rallonge son temps de vie, nos résultats, conformément au modèle photophysique proposé par Duan *et al.*, suggèrent que le photoblanchiment des PCFPs mEos2 et Dendra2 implique des réactions photochimiques dans l'état triplet (T_1) conduisant à la décarboxylation du glutamate 212.

D'autre part, en conditions oxydantes la fraction de la population scintillant vers un état sombre de court temps de vie par rapport à un état sombre de long temps de vie est légèrement augmentée (Figure 10.12 B). Cette observation suggère que l'état sombre de court temps de vie est peuplé en suivant un chemin réactionnel faisant intervenir une photochimie de type redox (Figure 10.12 B). Au contraire, l'état sombre de long temps de vie semble se former sans faire intervenir de transfert d'électrons et pourrait être la conséquence de changements structuraux depuis l'état excité singulet S_1 . La plus forte propension à entrer dans un état sombre de court temps de vie en l'absence de dioxygène vient corroborer l'hypothèse d'un scintillement rapide faisant intervenir des réactions photochimiques de type redox dans l'état triplet (T_1).

Globalement, la qualité des données collectées dans ces conditions physico-chimiques est significative-

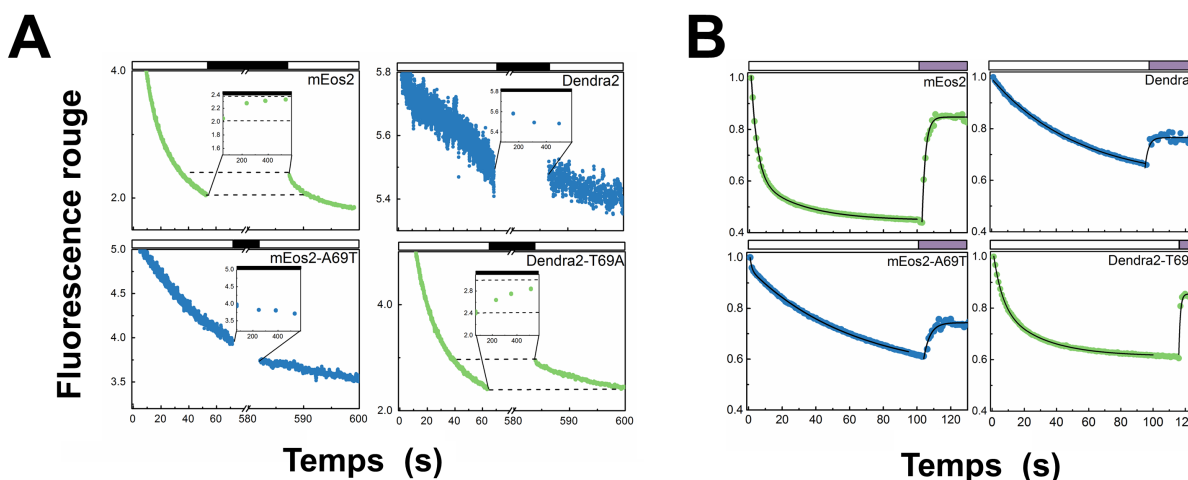


Figure 10.11 – Scintillement lent de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge à l'échelle d'ensemble (A). Les formes rouges de mEos2, Dendra2 ou de leurs variants respectifs immobilisés en PVA sont illuminées sous microscope à faible densité de puissance de laser 561 nm. L'intensité de fluorescence intégrée sur une région de l'image illuminée par une densité de puissance laser homogène est rapportée en fonction du temps. Le retour de fluorescence thermique est réalisé en l'absence de lumière à l'exception de courts pulses de laser 561 nm afin d'estimer la cinétique du retour *off* → *on* (B). La même expérience est réalisée mais la cinétique de retour *off* → *on* est mesurée en présence d'une lumière 405 nm de faible densité de puissance. L'ajustement de la cinétique de retour de fluorescence à une exponentielle met en évidence une constante de temps de retour d'environ 1,5 secondes en accord avec la cinétique mesurée à l'échelle de la molécule unique.

ment moindre que celle des données collectées en PBS. L'augmentation des constantes cinétiques de photoblanchiment réduit le budget de photons si bien que la reconstruction des traces est compliquée et fortement affecté par les faux-négatifs. En particulier, le budget de photons déjà faible des variants mEos2-A69T et Dendra2 en conditions standard (faible photorésistance) devient, en conditions anaérobie, insuffisant à la localisation correcte des fluorophores. L'augmentation du photoblanchiment dans ces conditions prévient la reconstruction sans biais des traces de fluorescence et l'analyse photophysique.

10.3.4 Analyse en cellules eucaryotes HeLa

Afin de vérifier si les hypothèses établies quant au rôle de l'arginine 66 sont valides lorsque les PCFPs sont exprimées dans un environnement cellulaire, nous avons mené la même approche de caractérisation de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs à l'échelle de la molécule unique dans le cytoplasme de cellules HeLa fixées chimiquement (Table 10.4). Globalement, une même tendance à l'intervention des comportements de scintillement et de photoblanchiment suite à la modification de l'orientation de l'arginine 66 par mutation ponctuelle en position 69 est observée.

Dans le détail, le nombre moyen d'événements de scintillement est -pour l'ensemble des variants- légèrement diminué. Cette diminution s'explique principalement par une diminution de la photorésistance, la propension à scintiller (lentement et rapidement) étant peu affectée par les conditions

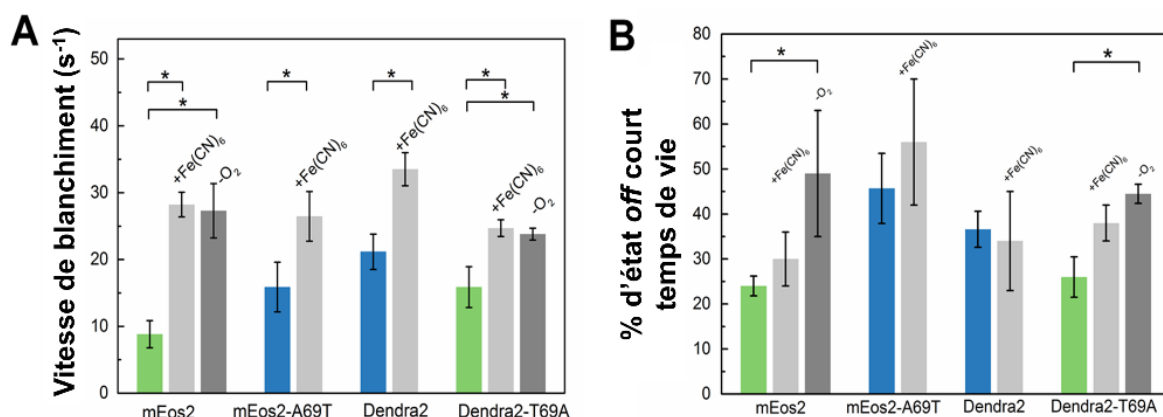


Figure 10.12 – Effets de conditions chimiques de l'environnement sur le scintillement et le photoblanchiment de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leur forme rouge. Vitesses de photoblanchiment (A) et fraction des molécules scintillant vers un état sombre de court temps de vie (B) mesurées pour les formes rouges de mEos2, Dendra2, mEos2-A69T et Dendra2-T69A immobilisées par la méthode APTES-DSS et en conditions standards (PBS pH 7.4; vert et bleu), oxydantes (5 mM Fe(CN)₆; gris clair) ou anaérobie (gris foncé). * : valeur $p < 0.05$ (significatif). La valeur p est calculée pour un test de Student de l'égalité de l'espérance de deux variables indépendantes.

physico-chimiques régnant au sein du cytoplasme des cellules HeLa. La présence de thiols intracellulaires à fort pouvoir réducteur pourrait expliquer une modification de la chimie redox à l'œuvre lors du photoblanchiment par un effet encore mal compris aujourd'hui.

10.4 Modèle et conclusion

En conclusion, notre caractérisation fine de mEos2, Dendra2 et de leurs mutants respectifs met en évidence le rôle central de l'arginine 66 dans le contrôle du photoblanchiment, du scintillement rapide et dans une moindre mesure du scintillement lent.

Photoblanchiment Lorsque l'arginine 66 adopte une conformation recroquevillée et qu'elle interagit avec le glutamate 212, le photoblanchiment (probablement par décarboxylation du résidu en position 212) est favorisé. Le rôle de l'arginine dans la catalyse de réactions de décarboxylation a précédemment été suggéré chez l'acyl-CoA déshydrogénase [Dwyer et al., 2001] [Fu et al., 2004], bien que son rôle exact soit encore largement mal compris. Chez les protéines fluorescentes, des études récentes de dynamique moléculaire mettent en évidence que la décarboxylation du glutamate est favorisée lorsque ce dernier se trouve sous sa forme carboxylate déprotonée [Ding et al., 2013]. Dans sa conformation recroquevillée, l'arginine 66 se positionne à une faible distance ($< 4 \text{ \AA}$; Table 10.2) du glutamate 212. La présence du groupe guanidinium dans l'environnement proche du glutamate a probablement pour conséquence de stabiliser sa forme déprotonée carboxylate, expliquant aussi l'augmentation de plus de 220% des vitesses microscopiques de photoblanchiment de mEos2-A69T et Dendra2 par rapport à mEos2 et Dendra2-T69A respectivement (Table 10.3). D'autre part, la présence de l'arginine

66 jouant un rôle de réservoir à proton à proximité du glutamate pourrait faciliter la protonation de l'état radicalaire intermédiaire ($\cdot\text{CH}_2$) formé au cours de la décarboxylation du résidu et ainsi favoriser la réaction pour en témoigne la forte propension à photoblanchir des PCFPs à arginine 66 recroquevillée. Enfin, l'effet électro-attracteur exercé par le groupe guanidinium à caractère électrophile fragilise probablement la liaison $\text{C}_\gamma\text{-C}_\delta$ rompue au cours de la décarboxylation.

Table 10.2 – Distance cristallographiques d'intérêt pour mEos2, Dendra2 et mEos2-A69T

	mEos2	mEos2-A69T	Dendra2
$\text{N}_\eta^{\text{Arg66}} - \text{C}=\text{O}$ <i>chromophore</i>	3.12 Å	4.15 Å	3.88 Å
$\text{N}_\eta^{\text{Arg66}} - \text{C}=\text{O}$ <i>Glu212</i>	5.8 Å	3.3 Å	3.17 Å
$\text{N}_\eta^{\text{Arg66}} - \text{C}-\text{O}$ <i>Glu212</i>	6.54 Å	3.97 Å	3.83 Å
$\text{N}_\eta^{\text{Arg66}} - \text{C}_\alpha$ <i>chromophore plan</i>	3.45 Å	3.54 Å	3.48 Å
$\text{N}_\eta^{\text{Arg66}} - \text{C}_\alpha$ <i>IrisFP chromophore distordu</i> ¹	3.19/3.30 Å ²	2.85 Å	2.59 Å

¹ Les distances rapportées pourraient être sous-estimées dû à la réponse structurale de squelette protéique lors de la distorsion du chromophore de l'état sombre de court temps de vie

² Pour mEos2, l'Arg66 adopte une conformation dans laquelle N_η^1 et N_η^2 du guanidinium se trouvent à proximité du C_α du chromophore distordu alors que pour mEos2-A69T et Dendra2, la conformation recroquevillée n'autorise qu'une interaction qu'entre le carbone benzylidène et l'un des deux N_η

Scintillement rapide Dans sa conformation recroquevillée, l'amine terminale de l'arginine 66 se positionne directement à l'aplomb du C_α du chromophore si bien que la distance entre le N_η de l'Arg66 et le C_α du chromophore dans son état distordu (supposé identique à celui obtenu pour IrisFP (code PDB : 3TMT)) est inférieure à 3 Å (Table 10.2). À la lumière des résultats précédemment obtenus par l'équipe sur le scintillement par protonation du C_α du chromophore [Adam et al., 2009a] [Roy et al., 2011], nous suggérons que l'augmentation de 100% des vitesses microscopique de scintillement rapide de mEos2-A69T et Dendra2 par rapport à mEos2 et Dendra2-T69A respectivement soit la conséquence d'une conformation idéale de l'arginine 66 pour le transfert de proton/électron entre l'amine terminale et le C_α du chromophore. L'hypothèse d'un scintillement rapide faisant intervenir un transfert de proton/électron entre Arg66 et le chromophore chez les PCFPs mEos2 et Dendra2 est corroborée d'une part par les observations en conditions oxydantes et anaérobie mettant en évidence l'implication d'un état triplet et d'autre part par l'absence d'absorptivité molaire de l'état sombre de court temps de vie suggérant la non-planéité du chromophore comme observé par Adam et al. pour IrisFP [Adam et al., 2009a].

Scintillement lent La faible variation des vitesses microscopiques de scintillement lent engendrée par les mutations ponctuelles Ala69Thr chez mEos2 et Thr69Ala chez Dendra2 (respectivement une diminution de 38% et une augmentation 33%) suggère que l'arginine 66 ne joue qu'un rôle mineur. La caractérisation de l'état sombre de long temps de vie révèle qu'il s'agit d'un état à chromophore

protoné au niveau de l'anneau ϕ (forte absorptivité molaire à 405 nm) et ayant subi des modifications structurales (temps de vie à l'obscurité de quelques minutes). À partir des données disponibles dans la littérature, il est intéressant de vérifier la validité de l'hypothèse suivante : « l'état sombre de long temps de vie des PCFPs est un état à chromophore protoné en conformation *trans* ».

L'isomérisation *cis* \rightarrow *trans* du chromophore semble être défavorisée lorsque l'arginine 66 adopte une conformation recroquevillée comme le suggèrent les résultats obtenus chez la protéine fluorescente verte Dronpa [Li et al., 2010] et mAzamiGreen (mAG) [Ebisawa et al., 2010]. Dans cette conformation, l'arginine 66 limite la mobilité de l'histidine 194 par interactions de type van der Waals. L'interaction par empilement π entre l'His194 et le phénol du chromophore contraint en conséquence l'isomérisation de ce dernier.

Raisonnons par l'absurde : si l'état sombre de long temps de vie identifié au cours de nos travaux était un état à chromophore en conformation *trans*, les variants à Arg66 recroquevillée (mEos2-A69T et Dendra2) devraient, à la lumière des données de la littérature, présenter une vitesse microscopique de scintillement lent plus faible que les mutants à Arg66 étirée (mEos2 et Dendra2-T69A). Aucune différence significative n'étant observée entre les variants, nos résultats suggèrent que l'état sombre de long temps de vie peuplé à partir de la forme rouge des PCFPs correspond à un état différent de l'état à chromophore en conformation *trans*. De plus, la vitesse relativement rapide de retour à l'obscurité de l'état sombre identifié ici vers l'état *on* (retour en quelques minutes) par rapport à celle des états sombres *trans* (retour en quelques heures) vient conforter l'hypothèse d'une nature structurale différente.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'état sombre de long temps de vie identifié au cours de cette thèse chez les PCFPs mEos2 et Dendra2 n'est pas un état pour lequel le chromophore adopte une conformation *trans*. Ce nouvel état sombre pourrait correspondre à un chromophore entortillé » (*twisted*). La torsion du chromophore par rotation autour de la liaison phényl exocyclique C-C (notée liaison *P*) pourrait résulter d'un phénomène de torsion par transfert de charge intramoléculaire (*twisted intramolecular charge transfer*, TICT) (Figure 10.13). D'autres acides aminés qui devront à l'avenir être identifiés jouent probablement un rôle important dans le contrôle du scintillement lent des PCFPs.

Finalement, les travaux menés dans le cadre de cette thèse concernant les mécanismes de scintillement et de photoblanchiment des PCFPs dans leur forme rouge ont abouti au modèle photophysique décrit en Figure 10.14. Nos travaux ont par ailleurs permis le développement d'un nouveau variant de la série Dendra jusqu'alors négligée dans le cadre du développement par mutagenèse raisonnée et aléatoire de nouvelles PCFPs optimisées.

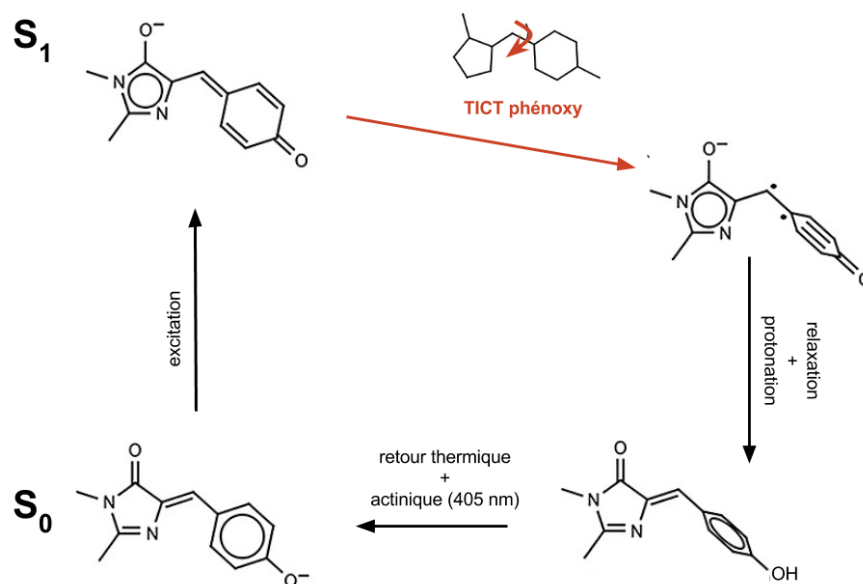


Figure 10.13 – Modèle de formation de l'état sombre de long temps de vie par torsion avec transfert de charge intramoléculaire (TICT) Une fois dans son état excité S_1 le transfert de charge de l'anneau ϕ à l'anneau l s'accompagne d'une torsion du chromophore par rotation autour de la liaison P (liaison exocyclique C-C côté phénol : TICT phénoxy). L'état à chromophore tordu se relaxe et se protone pour donner un état fondamental à phénoxy perpendiculaire au plan de l'imidazolinone. Cet état se relaxe thermiquement (plusieurs minutes) ou sous l'action d'une lumière violette (1 s) vers l'état fondamental plan. Modifié d'après [Don Paul et al., 2015].

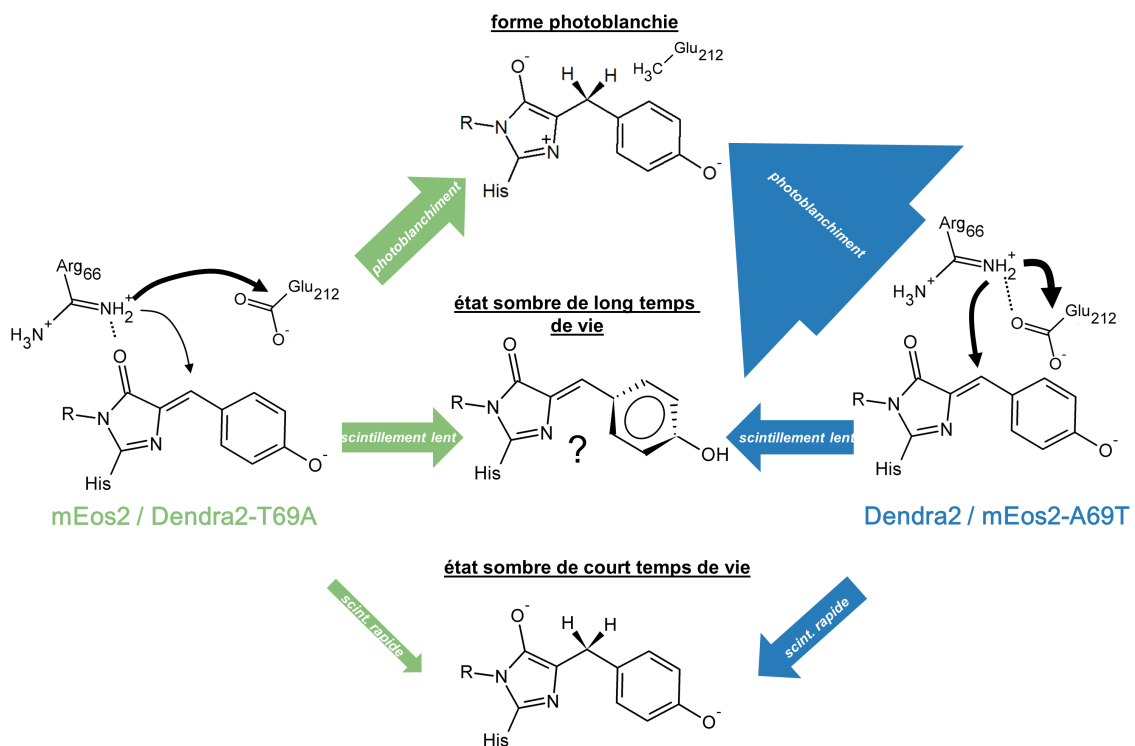


Figure 10.14 – Modèle photophysique de scintillement et photoblanchiment des PCFPs de la série Eos et Dendra dans leur forme rouge La taille des flèches colorées est proportionnelle à la valeur des vitesses microscopiques de phototransformation. Les flèches noirs représentent les transfert de proton dont la probabilité est décrite par l'épaisseur de la flèche.

	mEos2	mEos2-A69T	Dendra2	Dendra2-T69A
Budget de photons ¹	$(10\pm 1)\times 10^2$	$(4.4\pm 0.2)\times 10^2$	$(4.7\pm 0.7)\times 10^2$	$(7\pm 0.5)\times 10^2$
Nombre moyen de scintillement ²	0.93 ± 0.2	0.39 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.62 ± 0.2
Fraction de molécules scintillantes (%) ¹	46 ± 6	26 ± 6	21 ± 3	36 ± 6
Vitesse macroscopique de photoblanchiment (s^{-1}) ³	8.9 ± 0.2	16.4 ± 3.7	21.4 ± 2.6	15.8 ± 3.0
Vitesse macroscopique de scintillement (s^{-1}) ³	8.2 ± 0.8	6.3 ± 0.9	6.2 ± 0.5	9.7 ± 0.7
Rendement quantique de photoblanchiment ⁴	$(1.1\pm 0.2)\times 10^{-5}$	$(5.3\pm 1.2)\times 10^{-5}$	$(5.0\pm 0.6)\times 10^{-5}$	$(1.5\pm 0.3)\times 10^{-5}$
Rendement quantique de scintillement ⁴	$(1.0\pm 0.1)\times 10^{-5}$	$(2.0\pm 0.2)\times 10^{-5}$	$(1.4\pm 0.1)\times 10^{-5}$	$(9.0\pm 0.6)\times 10^{-5}$
Rendement quantique de scintillement rapide ⁴	$(2.4\pm 0.5)\times 10^{-6}$	$(9.2\pm 0.2)\times 10^{-6}$	$(5.2\pm 0.8)\times 10^{-6}$	$(2.4\pm 0.6)\times 10^{-6}$
Rendement quantique de scintillement lent ⁴	$(7.6\pm 0.8)\times 10^{-6}$	$(1.08\pm 0.2)\times 10^{-5}$	$(8.8\pm 0.8)\times 10^{-6}$	$(6.5\pm 0.6)\times 10^{-6}$
Vitesse microscopique de photoblanchiment (s^{-1}) ⁵	$(2.7\pm 0.5)\times 10^3$	$(12.6\pm 0.3)\times 10^3$	$(11.4\pm 0.1)\times 10^3$	$(3.5\pm 0.7)\times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement (s^{-1}) ⁵	$(2.4\pm 0.2)\times 10^3$	$(4.7\pm 0.4)\times 10^3$	$(3.1\pm 0.2)\times 10^3$	$(2.1\pm 0.1)\times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement rapide (s^{-1}) ⁵	$(0.58\pm 1.3)\times 10^3$	$(2.2\pm 0.4)\times 10^3$	$(1.2\pm 0.2)\times 10^3$	$(0.58\pm 1.5)\times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement lent (s^{-1}) ⁵	$(1.8\pm 0.2)\times 10^3$	$(2.5\pm 0.4)\times 10^3$	$(2.0\pm 0.2)\times 10^3$	$(1.5\pm 0.1)\times 10^3$
Vitesse de retour lent (s^{-1}) ⁶	1.2 ± 0.1	1.4 ± 1.6	1.7 ± 0.9	1.6 ± 0.2
Vitesse de retour rapide (s^{-1}) ⁶	16.8 ± 2.1	18.6 ± 4.6	15.7 ± 3.7	15.7 ± 4.5

¹ Le budget de photon correspond au nombre total de photons émis par la protéine avant photoblanchiment

² Le nombre moyen de scintillement est calculé comme le rapport des vitesses de scintillement et de photoblanchiment (k_{on} / k_{bl})

³ Les vitesses macroscopiques de photoblanchiment sont calculées en ajustement les histogrammes de temps de blanchiment avec un modèle mono-exponentiel. Les vitesses macroscopiques de scintillement sont estimées à partir des histogrammes de temps on après correction pour la contribution du blanchiment

⁴ Les rendements quantiques de photoblanchiment et de scintillement sont calculées à partir des vitesses macroscopiques correspondantes mesurées en corrigeant la densité de puissance du laser, la longueur d'onde et le coefficient d'extinction molaire. Les rendements quantiques de scintillement lent et rapide sont calculés comme $\Phi_{on,lent} = \Phi_{on} \cdot f_{long}$ et $\Phi_{on,rapide} = 1 - \Phi_{on,lent}$, avec Φ_{on} le rendement quantique de scintillement et f_{long} la fraction d'états sombres de long temps de vie.

⁵ Les vitesses macroscopiques de photoblanchiment, de scintillement (total, lent et rapide) sont calculées comme le rapport entre la vitesse macroscopique correspondante et le temps de vie de l'état excité ($k_{micro} = k_{macro} / \tau$, avec τ le temps de vie de l'état excité.

⁶ Les vitesses de retour depuis les états sombres de court et long temps de vie sont calculées à partir de l'ajustement des histogrammes de temps off par un modèle bi-exponentiel. Les valeurs moyennes d'un triplicat et leurs déviations standards sont rapportées dans la table.

Table 10.3 – Propriétés photophysiques de mEos2, Dendra2 et de leurs variants respectifs dans leurs formes rouges immobilisés par la méthode APTES-DSS

	mEos2	mEos2-A69T	Dendra2	Dendra2-T69A
Budget de photons ¹	$(7.0 \pm 1.3) \times 10^2$	$(3.6 \pm 0.4) \times 10^2$	$(3.5 \pm 0.2) \times 10^2$	$(5.6 \pm 1.1) \times 10^2$
Nombre moyen de scintillement ²	0.49 ± 0.07	0.34 ± 0.04	0.18 ± 0.07	0.49 ± 0.18
Fraction de molécules scintillantes (%) ¹	36 ± 14	23 ± 2.6	16 ± 3.7	30 ± 8.0
Vitesse macroscopique de photoblanchiment (s^{-1}) ³	14.6 ± 2.6	19.4 ± 2.8	23.1 ± 1.9	16.0 ± 4.3
Vitesse macroscopique de scintillement (s^{-1}) ³	7.3 ± 1.2	6.6 ± 0.2	4.3 ± 1.6	7.4 ± 1.4
Rendement quantique de photoblanchiment ⁴	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(6.3 \pm 0.9) \times 10^{-5}$	$(5.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
Rendement quantique de scintillement ⁴	$(9.1 \pm 1.5) \times 10^{-6}$	$(2.1 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(6.9 \pm 1.0) \times 10^{-5}$
Rendement quantique de scintillement rapide ⁴	$(2.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(9.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(5.2 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
Rendement quantique de scintillement lent ⁴	$(7.6 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(1.08 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(8.8 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(6.5 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
Vitesse microscopique de photoblanchiment (s^{-1}) ⁵	$(4.4 \pm 0.7) \times 10^3$	$(15.0 \pm 0.2) \times 10^3$	$(12.3 \pm 0.9) \times 10^3$	$(3.5 \pm 0.9) \times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement (s^{-1}) ⁵	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^3$	$(5.0 \pm 0.02) \times 10^3$	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^3$	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement rapide (s^{-1}) ⁵	$(0.5 \pm 0.1) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^3$	$(0.8 \pm 0.2) \times 10^3$	$(0.5 \pm 1) \times 10^3$
Vitesse microscopique de scintillement lent (s^{-1}) ⁵	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^3$	$(3.4 \pm 0.1) \times 10^3$	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^3$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^3$
Vitesse de retour lent (s^{-1}) ⁶	1.77 ± 0.4	2.13 ± 0.5	3.17 ± 1.8	1.48 ± 0.4
Vitesse de retour rapide (s^{-1}) ⁶	22.0 ± 3.3	19.1 ± 3.3	18.4 ± 7.8	18.7 ± 2.0

¹ Le budget de photon correspond au nombre total de photons émis par la protéine avant photoblanchiment

² Le nombre moyen de scintillement est calculé comme le rapport des vitesses de scintillement et de photoblanchiment (k_{on} / k_{bl})

³ Les vitesses macroscopiques de photoblanchiment sont calculées en ajustement les histogrammes de temps de blanchiment avec un modèle mono-exponentiel. Les vitesses macroscopiques de scintillement sont estimées à partir des histogrammes de temps on après correction pour la contribution du blanchiment

⁴ Les rendements quantiques de photoblanchiment et de scintillement sont calculées à partir des vitesses macroscopiques correspondantes mesurées en corrigeant la densité de puissance du laser, la longueur d'onde et le coefficient d'extinction molaire. Les rendements quantiques de scintillement lent et rapide sont calculés comme $\Phi_{on,lent} = \Phi_{on} \cdot f_{long}$ et $\Phi_{on,rapide} = 1 - \Phi_{scint.,lent}$, avec Φ_{on} le rendement quantique de scintillement et f_{long} la fraction d'états sombres de long temps de vie.

⁵ Les vitesses macroscopiques de photoblanchiment, de scintillement (total, lent et rapide) sont calculées comme le rapport entre la vitesse macroscopique correspondante et le temps de vie de l'état excité ($k_{micro.} = k_{macro.} / \tau$, avec τ le temps de vie de l'état excité.

⁶ Les vitesse de retour depuis les états sombres de court et long temps de vie sont calculées à partir de l'ajustement des histogrammes de temps off par un modèle bi-exponentiel. Les valeurs moyennes d'un triplicat et leurs déviations standards sont rapportées dans la table.

Table 10.4 – Propriétés photophysiques de mEos2, mEos2-A69T, Dendra2 et Dendra2-T69A dans leur forme rouge en environnement cellulaire (cellules HeLa fixées)

10.5 Dendra2-T69A, un variant prometteur ?

Actuellement, malgré la brillance et la photorésistance élevée des variants de la série Eos, l'utilisation de ces PCFPs pour les applications de comptage par microscopie de localisation reste sévèrement limitée par leur tendance élevée à scintiller² et à entrer dans des états sombres de long temps de vie (erreurs de sur-comptage). D'autre part, le temps de maturation élevé de mEos2 et mEos3 [Wang et al., 2014a] suggère une efficacité réduite de formation du chromophore conduisant à un marquage effectif limité et des erreurs de sous-comptage. Par ailleurs, seuls les variants récemment développés mEos3.1, mEos3.2 et mEos4a/b présentent une tendance à oligomériser réduite [Zhang et al., 2012] [Paez-Segala et al., 2015]. L'oligomérisation de la PCFP mEos2 peut être l'origine de modification de la stœchiométrie des complexes qu'elle marque et compromet alors son utilisation pour le comptage moléculaire.

Le seul représentant de la série Dendra actuellement utilisé en microscopie PALM (Dendra2) avec sa tendance réduite à oligomériser, son scintillement lent rare et sa maturation efficace [Wang et al., 2014a] en fait un outil de qualité pour les applications de comptage par microscopie de localisation. Cependant, son utilisation reste limitée par sa faible photorésistance et sa faible brillance à l'origine d'erreurs de sous-comptage.

Il ressort de cette comparaison qu'aucun variant aujourd'hui disponible ne s'avère particulièrement adapté aux applications quantitatives de la microscopie PALM. Le variant Dendra2-T69A caractérisé au cours de cette thèse présente des caractéristiques intéressantes, combinant des avantages propres à la série Dendra et à la série Eos. En effet, à l'image des variants de la série Eos, Dendra2-T69A présente une forte brillance et une bonne photorésistance. À l'image des variants de la série Dendra, Dendra2-T69A présente une très faible tendance à oligomériser et très probablement une maturation rapide (à vérifier dans le futur par des expériences complémentaires). Un unique point négatif vient actuellement fortement limiter l'utilisation massive de cette nouvelle PCFP : son importante propension à entrer dans des états sombres de long temps de vie. À l'avenir, les efforts d'ingénierie raisonnée devraient alors se concentrer sur la réduction du scintillement lent de ce variant.

Table 10.5 – Comparaison des séries Eos et Dendra pour les applications PALM quantitatives

	mEos2	mEos3	mEos2-A69T	Dendra2	Dendra2-T69A
Artéfacts liés à l'oligomérisation	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)
Sous-comptage lié au photoblanchiment	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)
Sous-comptage lié à une faible brillance	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)
Sous-comptage lié à une mauvaise maturation	(++)	(++)	NC	(-)	NC
Sur-comptage lié au scintillement lent	(++)	NC	(-)	(-)	(++)

2. Les résultats de Wang et al. suggèrent que mEos3.2 scintille en moyenne environ 2 fois plus que Dendra2 [Wang et al., 2014a]. La tendance à entrer dans des états sombres de long temps de vie n'a elle pas été étudiée chez les variants de la série mEos3. Cependant, la stricte conservation des acides aminés constituant l'environnement direct des chromophores de mEos2 et mEos3.1/2 suggère que les propriétés de scintillement et de photoblanchiment devraient probablement être conservées (voir alignement des séquences en Annexe, page 203). Actuellement aucune donnée concernant le scintillement de mEos4a/b ne sont disponibles.

10.6 Stratégies de réduction du scintillement lent

Les résultats de nos travaux suggèrent que la cavité entourant l'anneau ϕ du chromophore joue un rôle central dans le contrôle du scintillement lent par torsion du chromophore. Notamment, l'histidine 194 en assurant un solide empilement π avec l'hydroxybenzyle du chromophore pourrait limiter le scintillement lent des variants à arginine 66 recroquevillée. Afin de limiter la formation de l'état sombre de long temps de vie, nous avons développé un variant de Dendra2-T69A mimant les effets de l'arginine 66 recroquevillée sur la stabilisation de l'histidine 194. Chez le variant Dendra2-T69A l'histidine 194 interagit avec le glutamate 144 qui n'établit pas d'autres liaisons hydrogènes avec son environnement (Figure 10.15 A). Notre stratégie vise à renforcer l'interaction entre l'acide aminé en position 144 et l'His194 afin de stabiliser cette dernière, en établissant un réseau de liaisons hydrogène entre brins β adjacents. En remplaçant le glutamate 144 par une asparagine et l'isoleucine 157 par une sérine, il est attendu qu'un réseau de liaisons hydrogène relie la sérine 157 située sur un brin β à l'asparagine située sur un brin β adjacent et elle même en interaction avec l'histidine 194 (Figure 10.15 B). L'expression du mutant Dendra2-T69A-E144N-I157S en bactérie met en évidence une réduction drastique de la brillance par rapport au parent (Figure 10.15 C). Le scintillement n'a alors pas pu être étudié.

En parallèle, face au rôle central de l'arginine 66 dans le contrôle du scintillement et du photoblanchiment, nous avons conçu un mutant chez lequel le groupement guanidinium présent en position 66 (arginine) est remplacé par un groupement apolaire tout en conservant au maximum l'occupation stérique de l'arginine (leucine) : mEos2-R66L. Exprimé en bactérie, ce mutant se révèle très faiblement fluorescent. Sa caractérisation photophysique de base met en évidence une nette augmentation de la valeur de $pK_{a,app}$ du chromophore, si bien qu'à pH physiologique (pH=7.4), la plupart des chromophores résident sous leur forme neutre non fluorescente (Figure 10.16 A). Nous associons cette forte affinité de l'anneau ϕ du chromophore pour les protons à la perte de la charge positive portée par l'arginine conduisant à un enrichissement important du groupement hydroxybenzyle en électrons ce qui lui confère une propriété nucléophile. En parallèle, notre caractérisation révèle l'absence de photoconversion chez ce variant (Figure 10.16 B) suggérant un rôle central de l'arginine 66 dans les réactions catalytiques accompagnant la rupture de la liaison C-N comme suggéré précédemment avec le variant non photoconvertible pcDronpa-A69T [Moeyaert et al., 2014]. Enfin, la vitesse de scintillement lent de mEos2-R66L est significativement augmentée par rapport à celle de mEos2 (Figure 10.16 C). Nous associons l'acquisition de ces propriétés de commutateur à la formation d'un nouvel espace libéré par la mutation de l'arginine en leucine laissant davantage de liberté rotationnelle et torsionnelle à l'anneau ϕ du chromophore. Face à l'échec de la mutation R66L, nous proposons à l'avenir une investigation complète d'une bibliothèque de mutants générée par mutagenèse saturante à la position 66.

D'autre part, des essais de mutagenèse à proximité de l'histidine 62 du chromophore devraient à l'avenir être menés à la lumière des travaux de Chang et de ses collaborateurs sur la photocommutation d'une série de mutants photocommutables (mGeos) obtenus par mutagenèse de la PCFP mEos2 [Wang et al., 2014b]. Leurs résultats mettent en évidence que la modification de la taille de la cavité abritant l'extrémité opposée au groupement phénol du chromophore contrôle la photocommutation. La nature de l'état sombre étant inconnue, des efforts sont actuellement menés au sein du laboratoire par Virgile Adam afin de résoudre la structure de certains variants de la série mGeos dans leur forme *off*. Nous

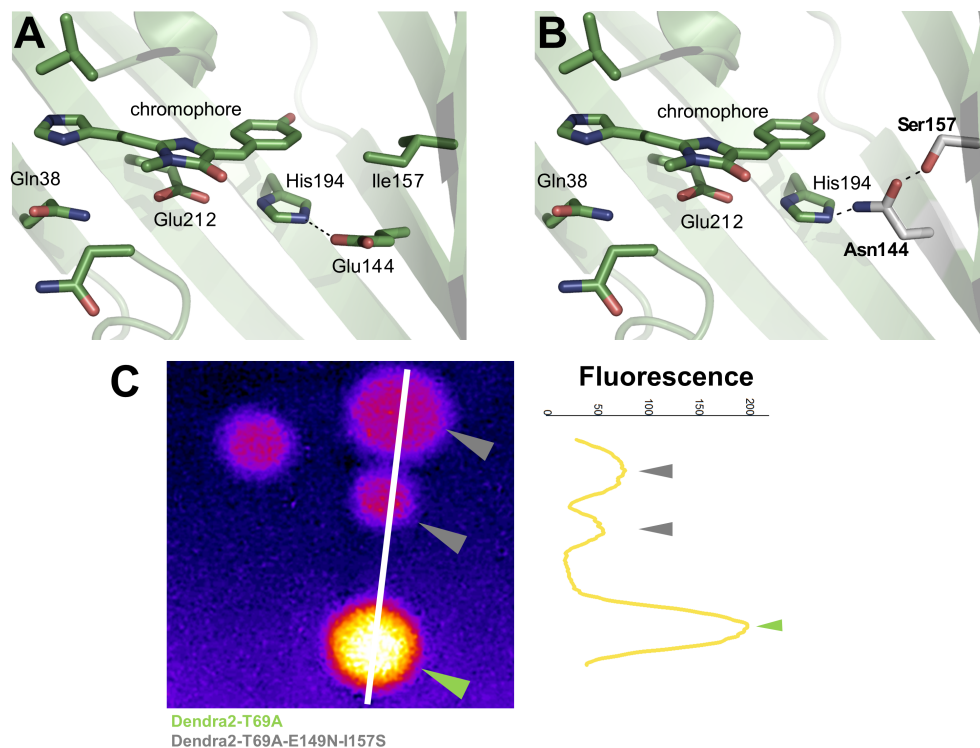


Figure 10.15 – Tentative de réduction du scintillement lent de Dendra2-T69A (A). Structure de Dendra2-T69A (B). Structure hypothétique construite à l'aide de l'outil *Mutagenesis Wizard* de PyMol du mutant conçu dans le but de réduire le scintillement lent par stabilisation de l'histidine 194 : Dendra2-T69A-E144N-I157S. La stabilisation de l'His194 par un réseau de liaisons hydrogènes devrait permettre le renforcement de l'empilement π entre l'anneau ϕ du chromophore et l'hétérocycle de l'histidine limitant la torsion du chromophore (état sombre de long temps de vie) (C). L'émission de photons de colonies de bactéries BL21 cultivées sur la nuit à 37 °C et exprimant le mutant Dendra2-T69A-E144N-I157S est moindre par rapport aux colonies exprimant le parent Dendra2-T69A (excitation par diode électro-luminescente cyan). L'origine de cette diminution de la brillance apparente en cellules bactérienne pourrait être due à une diminution de l'absorptivité molaire, du rendement quantique de fluorescence, du repliement de la protéine ou de la maturation du chromophore.

faisons actuellement l'hypothèse que l'état sombre des variants mGeos est similaire à celui observé lors du scintillement lent des PCFPs. Dans le cas où cette hypothèse vient à être confirmée, la réduction de la taille de la cavité hébergeant l'histidine 62 du chromophore des PCFPs pourrait permettre une réduction du scintillement lent.

À l'avenir, les travaux d'investigation cristallographique des états sombres des PCFPs et des variants de la série mGeos servira de base à l'élaboration d'une stratégie ingénieuse de réduction du scintillement lent des PCFPs dans leur forme rouge. Des efforts devront en parallèle être menés afin d'améliorer le repliement et la maturation du chromophore dans les conditions physico-chimiques de l'environnement d'étude afin de réduire les problèmes liés au sous-échantillonnage (diminution de la résolution et sous-comptage). Le sous-échantillonnage a également pour origine de nombreuses pho-

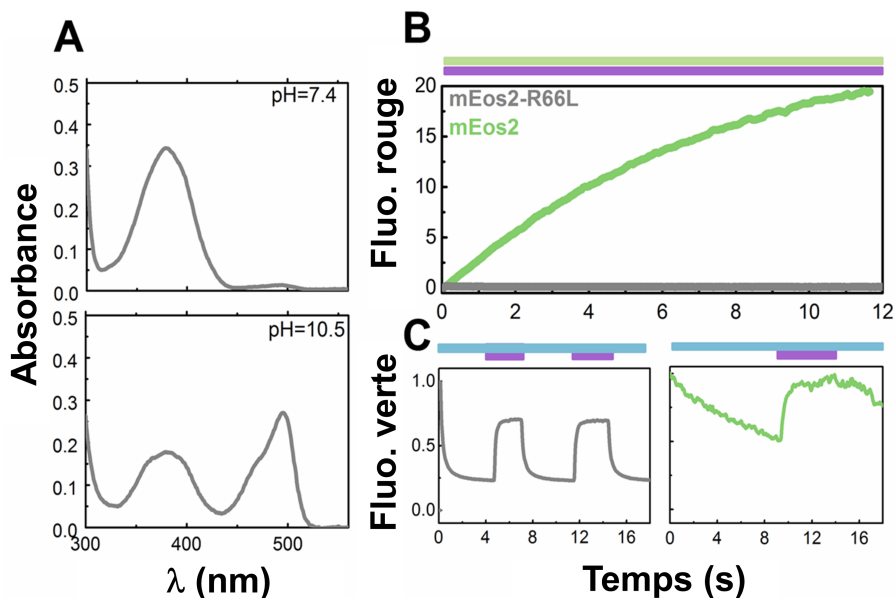


Figure 10.16 – Caractérisation du mutant mEos2-R66L (A). Spectres d'absorption de mEos2-R66L à pH 7.4 (haut) et pH 10.5 (bas) mettant en évidence une valeur élevée du pK_a de ce variant (B). Variations de la fluorescence rouge de mEos2 et de son mutant mEos2-R66L immobilisées en PVA sous illumination par une lumière violette. Noter l'absence de photoconversion du mutant mEos2-R66L (C). Variations de la fluorescence verte de mEos2 et de son mutant mEos2-R66L immobilisées en PVA sous illumination cyan (488 nm) avec périodes d'illumination violette (405 nm). Dans les mêmes conditions d'illumination que mEos2, mEos2-R66L présente un contraste élevé de scintillement lent.

totransformations que l'on qualifiera de parasite à la photoconversion. Dans le cadre du second projet de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes à l'origine de l'incomplétude et du ralentissement de la photoconversion. Les résultats de nos recherches sont présentés dans le Chapitre suivant.

Étude des mécanismes photophysiques limitant l'échantillonnage

L'échantillonnage complet d'une population de fluorophores photoconvertibles vert à rouge dans les conditions d'illumination PALM est en pratique particulièrement difficile à atteindre (Chapitre 5, page 93 *sqq*). Nous présenterons dans ce Chapitre les résultats de nos recherches sur les mécanismes limitant l'efficacité de photoconversion de la PCFP mEos2. Nous discuterons également des modalités de la voie de photoconversion amorcée récemment découverte.

11.1 Scintillement dans la forme verte et photoconversion

11.1.1 Prise de vue

Les travaux pionniers de Schäfer *et al.* sur l'étude de la photoconversion de Kaede à l'échelle de la molécule unique ont été les premiers à suggérer l'importance des phototransformations dans la forme verte des protéines fluorescentes photoconvertibles comme potentielles voies photophysiques entrant en compétition avec la photoconversion vert à rouge [Schäfer *et al.*, 2006]. Dans leurs conditions expérimentales, seule 4% de la population verte est photoconvertie alors qu'une fraction 10 fois plus importante (43%) passe dans un état sombre¹. Tout se passe comme si des phototransformations irréversibles (photoblanchiment) ou réversibles (scintillement/photocommutation) dans la forme verte des PCFPs entraînent en compétition avec la photoconversion vert à rouge.

Nous nous intéresserons dans les paragraphes suivants aux phototransformations réversibles affectant la forme verte des PCFPs et à leurs conséquences sur l'échantillonnage lors d'une collecte PALM à partir de l'étude de mEos2 choisie pour sa forte brillance facilitant l'analyse des traces de fluorescence.

11.1.2 Scintillement lent dans la forme verte de mEos2

Des expériences menées à l'échelle d'ensemble sur la protéine mEos2 immobilisée au sein d'un hydrogel de PVA mettent en évidence qu'une fraction de la population verte entre dans un état sombre réversible de long temps de vie sous illumination violette (405 nm), cyan (488 nm) ou jaune (561 nm)

1. 30% de la population verte est insensible à la lumière (sur la durée de l'expérience) et 13% passe d'un état sombre à un état vert (activation).

(Figure 11.1). À l'image des résultats présentés dans le Chapitre précédent concernant la forme rouge, la forme verte des PCFPs scintille dans les conditions d'illumination PALM.

Sous illumination cyan, le contraste pré/post illumination est élevé et seul un faible retour de l'état sombre vers l'état fluorescent est observé à l'obscurité. Suite à illumination cyan, si l'échantillon est illuminé par une lumière violette, 70% de la fluorescence initiale est restaurée en quelques secondes témoignant d'un retour *off* → *on* photo-induit par la lumière 405 nm. La cinétique de scintillement *on* → *off* de mEos2 en PVA sous illumination cyan suivie par absorbance met en évidence une protonation du chromophore vert (Figure 11.2) à l'image de ce qui a été observé pour la forme rouge de mMaple [McEvoy et al., 2012]. En somme, nos données suggèrent que l'état sombre peuplé à partir de la forme verte de mEos2 sous illumination par la lumière d'excitation (488 nm) est semblable à celui peuplé à partir de la forme rouge.

Sous illumination violette et jaune, le contraste pré/post illumination est nettement plus faible (Figure 11.1). Si l'état sombre peuplé dans ces conditions est identique à celui peuplé sous illumination cyan, sa forte absorptivité à 405 nm (et dans une moindre mesure à 561 nm) prévient la formation d'une population stable d'états sombres en favorisant la transition *off* → *on*, à l'origine d'un faible contraste. Dans les conditions d'illumination PALM (illumination 405 nm et forte densité de puissance 561 nm), nous faisons l'hypothèse que le temps de vie de l'état sombre est sensiblement réduit (quelques secondes).

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que dans les conditions d'illumination PALM, le scintillement lent de la forme verte des PCFPs n'est pas à l'origine d'un remisage important de la forme verte dans un état sombre non photoconvertible. La compétition du scintillement lent des PCFPs dans leur forme verte avec la photoconversion est donc un phénomène mineur n'ayant sans doute qu'une influence modeste sur l'efficacité d'échantillonnage.

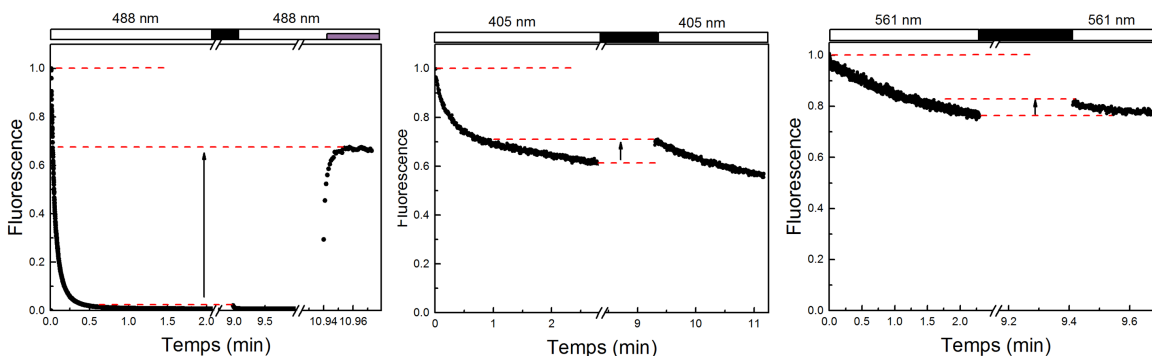


Figure 11.1 – Scintillement de la forme verte de mEos2 sous illumination 405, 488 et 561 nm La protéine mEos2 dans sa forme native pré-photoconversion (forme verte) est immobilisée au sein d'un hydrogel de PVA et illuminée par un laser 488 nm (gauche), 405 nm (centre) ou 561 nm (droite) pendant 2 minutes puis laissée à l'obscurité pendant 6 minutes. Suite à illumination à 488 nm, et sous illumination violette (405 nm), un important et rapide retour de fluorescence est observé.

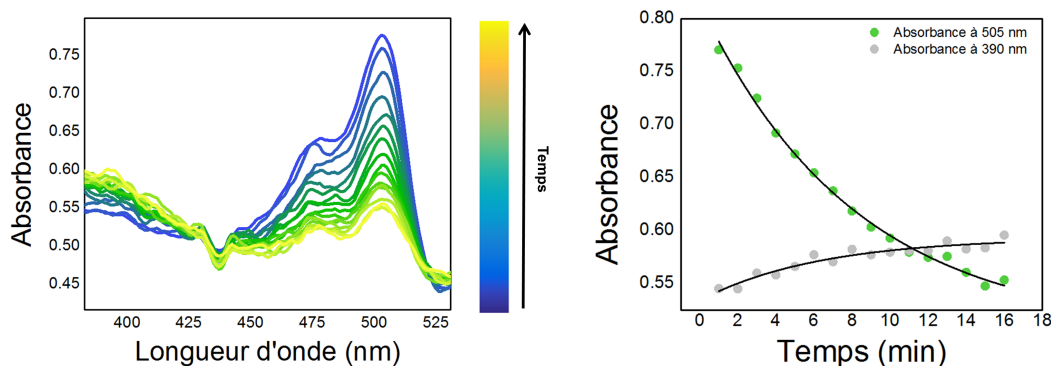


Figure 11.2 – Scintillement de la forme verte de mEos2 sous illumination cyan suivi par spectroscopie d'absorbance (A). Un hydrogel de PVA contenant mEos2 est illuminé par une faible densité de puissance de laser 488 nm et un spectre d'absorbance de l'échantillon est collecté toute les minutes (B). À partir des spectres d'absorbance, la cinétique de disparition de la forme verte anionique (absorbance à 505 nm) et d'apparition de la forme protonée (absorbance à 390 nm) est établie.

11.1.3 Distorsion des courbes cumulatives de photoconversion de mEos2

L'efficacité d'échantillonnage peut être évaluée en traçant la cinétique d'apparition des fluorophores rouges au cours du temps lors de la collecte de données PALM (courbes cumulatives de photoconversion). Après correction de l'effet de la densité moléculaire et du scintillement dans la forme rouge (par la méthode présentée page 127 *sqq*), les courbes cumulatives du nombre de molécules rouges photoconverties (N_{conv}) au cours de la collecte peuvent être reconstruites (Figure 11.3). Dans le cas d'un modèle photophysique ne faisant intervenir aucune autre phototransformation dans la forme verte que la photoconversion vert à rouge, un modèle mono-exponentiel devrait être correctement ajusté aux courbes cumulatives de photoconversion à l'échelle de la molécule unique.

Les données expérimentales collectées sous illumination de lecture (561 nm seulement) et sous illumination combinée de lecture et actinique (561+405 nm) s'éloigne du modèle photophysique ne faisant intervenir qu'une unique phototransformation dans la forme verte et un modèle bi-exponentiel y est correctement ajusté (Figure 11.3). De nombreux paramètres expérimentaux pourraient être à l'origine d'une telle distorsion des courbes cumulatives. Afin de s'assurer que cette distorsion n'est pas le fruit d'un artefact lié à l'échantillon (immobilisation en PVA) ou à l'installation (modalités d'illumination), des expériences de contrôle ont été menées.

L'absence de diffusion latérale des protéines au sein de l'hydrogel (mise en évidence par des expériences de FRAP, voir Figure 6.9 ; page 109) permet d'écarter l'hypothèse d'une distorsion induite par l'apparition au cours du temps dans la zone observée d'une nouvelle population verte (à l'origine d'une seconde phase lente dépendante de la vitesse de diffusion). Les distorsions des courbes cumulatives induites par l'immobilisation anisotrope des protéines² est minimisée par la polarisation quasi-circulaire

2. L'anisotropie des protéines au sein de l'hydrogel de PVA subdivise la population en sous-populations à vitesse de photoconversion différentes (voir page 108 *sqq*). Les protéines ayant leur dipôle dans le plan focal ont une vitesse de photoconversion plus rapide que ceux ayant leur dipôle orienté le long de l'axe optique.

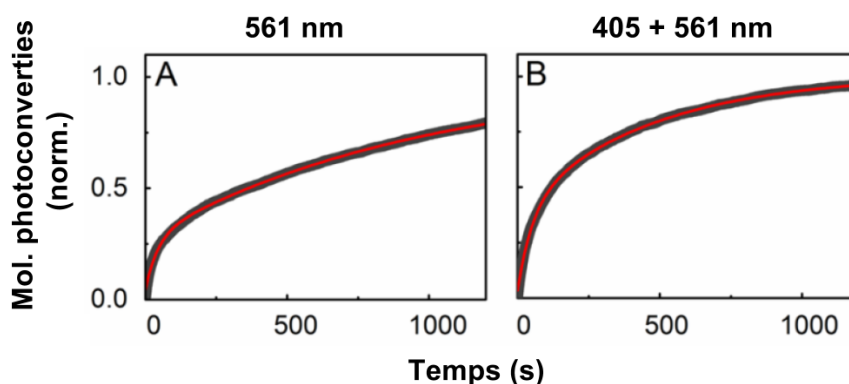


Figure 11.3 – Courbes cumulatives des molécules rouges photoconverties au cours d'une collecte PALM. Les courbes sont obtenues à partir d'un jeu de données PALM de mEos2 immobilisée au sein d'un hydrogel de PVA et illuminée par une lumière 561 nm uniquement (A) ou par une lumière 561+405 nm (B). Les données expérimentales sont présentées en gris sombre et le modèle bi-exponentiel en rouge.

des lasers (voir Figure 6.2, page 102). L'ajustement d'un modèle prenant en compte l'anisotropie des fluorophores et la polarisation circulaire aux courbes cumulatives expérimentales n'est pas satisfaisant, suggérant que d'autres effets sont à l'œuvre pour expliquer le caractère biphasique observé. Enfin, comme pour l'anisotropie, l'hétérogénéité de l'illumination le long du champ de vue subdivise la population en sous-ensembles à vitesse de photoconversion différentes si bien que la reconstruction des courbes cumulatives est sujette à distorsion. Néanmoins, les courbes cumulatives construites pour des régions illuminées de manière homogène présentent toujours un comportement biphasique, permettant d'écarter une distorsion artéfactuelle liée à l'hétérogénéité laser (voir Annexe Figure 11.17, page 206).

L'ensemble des contrôles menés suggèrent fortement qu'aucun artéfact expérimental ne suffit à expliquer le caractère biphasique des courbes cumulatives de photoconversion. La distorsion des courbes cumulatives semble alors être la conséquence de mécanismes photophysiques sous-jacents entrant en compétition avec l'interconversion vert à rouge 1 :1 dans les conditions d'illumination typiques du PALM. Le scintillement lent mis en évidence dans la section précédente à l'échelle d'ensemble ($D \longleftrightarrow G \rightarrow R$) est un mauvais candidat pour expliquer une distorsion des courbes cumulatives étant donné le temps de vie court de l'état sombre dans les conditions d'illumination PALM³.

Le comportement biphasique de la photoconversion rend la pré-illumination particulièrement influente sur la suite de la collecte de données PALM. En effet, l'exposition de l'échantillon à la lumière avant l'acquisition des images (par exemple dans le but de diminuer le densité moléculaire) est à l'origine d'un ralentissement de la vitesse de photoconversion lors de la collecte⁴ (Figure 11.4).

3. En effet, l'ajustement du modèle photophysique faisant intervenir un état sombre réversible entrant en compétition avec la photoconversion vert à rouge aux courbes cumulatives donne un temps caractéristique de retour $off \rightarrow on$ dans les conditions d'illumination PALM supérieur à 150 s, soit deux ordres de grandeur au-delà du temps de vie de l'état sombre sous illumination violette (~ 1.5 s).

4. La constante cinétique de photoconversion mesurée à partir de l'ajustement de la courbe cumulative de photoconversion comme présenté en page 133 est systématiquement sous-estimée si l'échantillon est préalablement illuminé. Les valeurs de vitesse de photoconversion publiées par Avilov *et al.* et obtenues à partir de l'ajustement de courbes

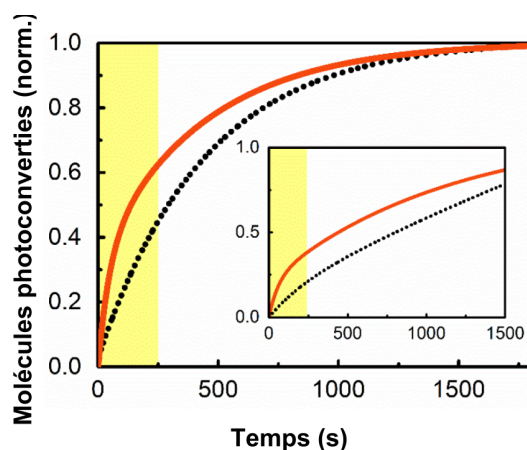


Figure 11.4 – Effet du pré-blanchiment sur les courbes cumulatives. Courbes cumulatives de jeux de données de mEos2 immobilisée en PVA et sous illumination 561+405 nm (graphique principal) ou sous illumination 561 nm (insert). Les courbes rouges correspondent aux courbes cumulatives de photoconversion obtenues à partir de l'analyse des jeux de données complets et les courbes noires pointillées à celles obtenues à partir de l'analyse des jeux ôtés de leurs 1000 premières images (mimant l'effet d'une pré-illumination). Les courbes cumulatives mimant une pré-illumination présentent une vitesse initiale d'apparition des molécules rouges plus faible pouvant conduire à une sous-estimation des rendements quantiques lors de l'ajustement avec l'équation 7.9 (voir page 133).

11.1.4 Photoconversion vert à rouge impliquant un état sombre intermédiaire de long temps de vie

Récemment, des expériences de photoconversion à l'échelle de la molécule unique inspirées des travaux de Schäfer *et al.* ont été menées au laboratoire. En accord avec ce qui a été rapporté pour Kaede, dans les conditions d'illumination nécessaires à l'observation de la population verte (illumination 488 nm) et de la population rouge (illumination 561 nm), seule une très faible fraction de la population verte est photoconvertie ($\sim 1.5\%$; Table 11.1).

Table 11.1 – Caractérisation de la photoconversion à l'aide du module deux-couleurs

	+ illumination 405 nm	- illumination 405 nm
Photoconversion directe	1.5%	1.4%
Photoconversion avec délai	4.5%	9.7%
Délai moyen (s)	6,1	8,1
Vert (<i>on</i> → <i>off</i>) / Rouge (<i>off</i>)	94%	89%

D'autre part, pour une fraction de la population verte, la perte irréversible de signal de fluorescence dans le canal vert est suivi de quelques secondes par l'apparition d'un signal de fluorescence dans le canal rouge à la même position (Figure 11.5). Pour cette population, tout se passe comme si la photoconversion vert à rouge faisait intervenir un état sombre intermédiaire de long temps de vie (> 5

cumulatives collectées après pré-illumination sont alors largement sous-estimées [Avilov *et al.*, 2014].

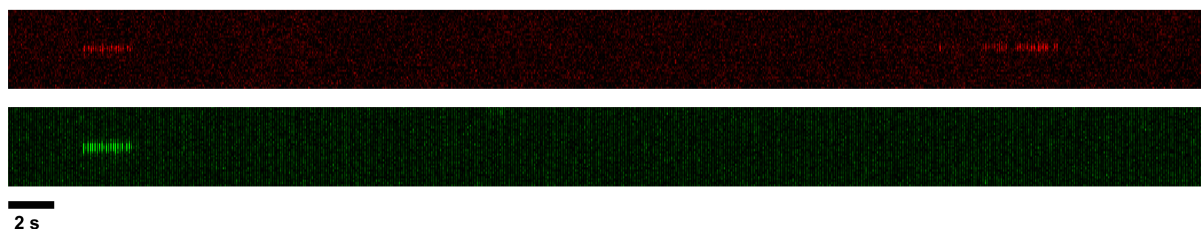
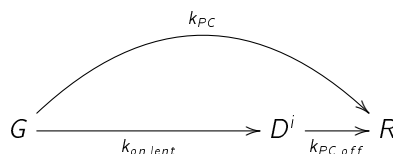


Figure 11.5 – Trace de fluorescence mettant en évidence une photoconversion avec état intermédiaire sombre Kymogramme d'une molécule unique de mEos2 immobilisée en PVA dans le canal de fluorescence vert et rouge. La présence de signal de fluorescence dans le canal rouge lorsque mEos2 se trouve dans sa forme verte est due à la queue du spectre d'émission de fluorescence de la forme verte dans le rouge.

s). La durée de vie de cet état sombre intermédiaire est réduit sous illumination violette (délai moyen passant de 8.1 s à 6.1 s) témoignant de la forte absorptivité de cet état à 405 nm (état sombre à chromophore protoné). Pour la première fois à l'échelle de la molécule unique, nos résultats mettent en évidence que la photoconversion vert à rouge passe par une état sombre intermédiaire de long temps de vie noté D^i : cette voie de photoconversion par opposition à la voie directe vert à rouge est baptisée « voie sombre indirecte ». Nous proposons le modèle cinétique suivant :



L'évolution simulée de la population de fluorophores rouges au cours du temps sous simple illumination 561 ou ou sous illumination combinée 561+405 nm d'après le modèle présenté ci-dessus est semblable (Figure 11.6) à celle observée expérimentalement sur les courbes cumulatives expérimentales (Figure 11.3). Les résultats de la simulation suggèrent donc qu'un tel modèle photophysique suffit à expliquer le comportement observé. Notamment, sous illumination simple 561 nm, la voie de photoconversion indirecte impliquant l'état sombre intermédiaire D^i est plus favorable que la voie de photoconversion par la voie directe. Dans ces conditions, l'état sombre intermédiaire est fortement peuplé dès le début de l'illumination, diminuant alors fortement le réservoir de fluorophores verts dans un état photoconvertible par voie directe. La photoconversion se fait alors principalement depuis l'état sombre et est particulièrement défavorable (temps caractéristique > 100 s). Par rapport au modèle de photoconversion n'impliquant qu'une voie directe, un important retard à la complétude est observé. Sous illumination combinée 561+405 nm, la photoconversion par voie directe est significativement plus importante, suggérant que la lumière violette favorise la voie directe de photoconversion par rapport à la voie indirecte. De plus, la lumière violette semble augmenter la vitesse de photoconversion depuis l'état sombre intermédiaire D^i (vitesse de disparition de l'état sombre intermédiaire plus élevée). Dans ces conditions d'illumination, la lumière violette permet de limiter la photoconversion par voie indirecte, d'une part en favorisant la voie directe et d'autre part en augmentant la vitesse de la transition $D^i \rightarrow R$. Le retard par rapport au modèle n'impliquant pas de photoconversion par voie indirecte est alors limité. Sous illumination simple 405 nm, la voie indirecte devient négligeable devant la voie directe.

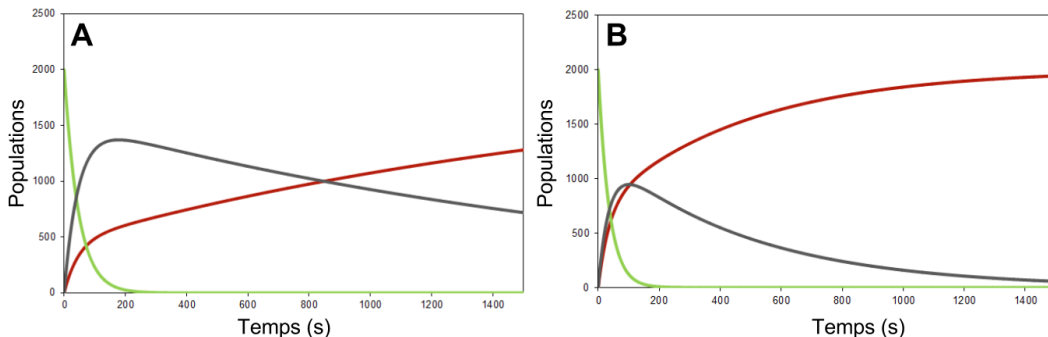
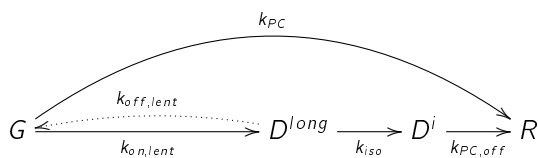


Figure 11.6 – Simulations de l'évolution de la population rouge d'après le modèle impliquant une voie vert à rouge indirecte (A). Evolution simulée sous illumination simple 561 nm de la population rouge (trait rouge), de la population verte (trait vert) et de la population de l'état sombre intermédiaire D^i d'après le modèle cinétique présenté ci-dessus (B). Evolution simulée des mêmes populations avec le même modèle cinétique sous illumination combinée 561+405 nm.

En lien avec le mécanisme de photoconversion proposé par le groupe de Wachter [Kim et al., 2015] faisant intervenir un état sombre intermédiaire à chromophore protoné entortillé et histidine 62 isomérisée (voir Figure 2.16, page 55), nous proposons le modèle affiné suivant de photoconversion.



avec k_{iso} la constante cinétique associée à l'isomérisation de l'histidine 62

L'état sombre réversible observé à l'échelle d'ensemble pourrait correspondre à l'état dont l'anneau ϕ du chromophore est protoné et positionné en dehors du plan de l'anneau l . Dans cet état, l'isomérisation $cis \rightarrow trans$ de l'histidine 62 du chromophore (associée à la constante cinétique k_{iso}) conduit à la formation de l'état sombre intermédiaire D^i qui s'engage irréversiblement dans la voie de photoconversion. Cet état sombre à histidine 62 en conformation $trans$ pourrait être particulièrement stable thermiquement à l'image de la stabilité des états sombres à chromophores isomérisés des protéines fluorescentes photocommutables. L'élimination β concertée a ensuite lieu après isomérisation $trans \rightarrow cis$ de l'histidine 62 qui semble être favorisée par la lumière violette.

En somme, nos résultats suggèrent que la photoconversion vert à rouge de la PCFP mEos2 emprunte deux voies distinctes : une voie directe rapide et une voie sombre indirecte lente. En condition de photoconversion par lumière d'excitation (561 nm), la photoconversion par la voie indirecte est favorisée. Une fraction importante de la population verte entre dans l'état sombre intermédiaire D^i sous illumination 561 nm et ne sera observée dans le canal rouge que plus tard lors de la transition $D^i \rightarrow R$ (temps caractéristique ~ 100 s). La lumière de lecture utilisée à forte densité de puissance en microscopie PALM est donc à l'origine d'un ralentissement de la photoconversion.

En présence de lumière violette, une fraction plus importante de la population verte passe par la voie

directe de photoconversion. La fraction envoyée vers l'état sombre intermédiaire par la lumière 561 nm passe plus rapidement dans l'état rouge. La lumière violette permet de limiter le remisage de la population verte dans l'état sombre intermédiaire. En parallèle, l'utilisation de lumière violette sensiblement absorbée par les chromophores vert protonés peut être à l'origine d'autres phototransformations de la forme verte, notamment un photoblanchiment à l'origine d'un sous-échantillonnage.

11.2 Photoblanchiment et incomplétude de photoconversion

11.2.1 Prise de vue

Les données de la littérature suggèrent que la photoconversion n'est jamais complète, c'est-à-dire que seule une fraction de la population verte initiale passe dans sa forme rouge [Puchner et al., 2013] [Durisic et al., 2014] [Wang et al., 2014a]. On définit la complétude de photoconversion (C_{conv}) comme le rapport entre la population verte initiale⁵ et la population rouge détectée après un temps infini. Les travaux menés au sein du groupe de Melike Lakadamyali combinant comptage des fluorophores rouges par microscopie de localisation et comptage des fluorophores verts par « photoblanchiment par pas » (*stepwise photobleaching*) lors de la photoconversion de différentes PCFPs mettent en évidence que la somme de la population rouge et de la population verte n'est pas constante au cours du temps. Ces résultats suggèrent, à l'image des travaux menés par le groupe de Petra Schwille sur Kaede, l'implication d'un troisième état issu d'une phototransformation entrant en compétition avec la photoconversion (photoblanchiment de la forme verte par la lumière actinique nécessaire à la photoconversion ou scintillement).

Nous nous proposons dans les paragraphes suivants d'étudier l'effet de la lumière actinique violette utilisée pour la photoconversion sur le photoblanchiment de la forme verte et de la forme rouge des PCFPs à partir de l'étude de la protéine mEos2.

11.2.2 Photoblanchiment post et pré-photoconversion

Afin d'évaluer l'effet de la lumière violette (405 nm) sur le photoblanchiment de la forme rouge, nous avons étudié à l'échelle de la molécule unique le temps de vie des fluorophores sous différentes conditions d'illumination. Le profil du laser 561 nm utilisé pour l'excitation des chromophores dans les expériences à l'échelle de la molécule unique est maintenu homogène sur le champ de vue (Figure 11.7 A). Dans ce contexte, les clusters de localisations sont composés d'un nombre relativement homogène de localisations sur l'ensemble du champ de vue témoignant d'une durée de vie semblable des fluorophores quelque soit la région. L'effet de la lumière d'excitation (561 nm) sur le photoblanchiment de la forme rouge est homogène. Sous double illumination (561+405 nm), le nombre de localisations par cluster est hétérogène sur l'ensemble du champ de vue et significativement plus important en périphérie qu'au centre du champ de vue témoignant d'une durée de vie réduite des fluorophores illuminés par une lumière violette plus intense (centre du profil)⁶. Ce résultat suggère que la lumière violette (405 nm)

5. Protéines fluorescentes natives à tonneau β correctement replié et chromophore mature.

6. À la faveur d'un défaut local dans l'optique du microscope, il est possible de confirmer l'hypothèse d'une augmentation du nombre de localisation (*i.e.* de la durée de vie des fluorophores) dans les régions à faible densité de puissance de laser 405 nm. Au centre du profil, une région recevant peu de lumière 405 nm (repéré par une flèche blanche) contient un cluster composé de nombreuses localisations.

est à l'origine d'un photoblanchiment de la forme rouge s'ajoutant au photoblanchiment par la lumière d'excitation. Le photoblanchiment photo-induit de la forme rouge par la lumière violette est corroboré par le suivi cinétique par absorption de la photoconversion de mEos2 sous illumination 405 nm uniquement (Figure 11.8 A). En fin de photoconversion, le réservoir de chromophores verts s'épuisant, moins de chromophores rouges tendent à être formés et leur population continue à être consommée par photoblanchiment. En conséquence, l'absorbance de la forme rouge ne varie plus linéairement par rapport à celle de la forme verte (Figure 11.8 B).

Le photoblanchiment de la forme verte des PCFPs par la lumière violette est quant à lui difficilement décelable. Toute disparition de la population verte étant le résultat de l'effet combiné du photoblanchiment et de la photoconversion il est alors compliqué d'estimer les contributions relatives des deux phototransformations à la décroissance de fluorescence verte. Afin de dé-corréler la contribution respective de la photoconversion et du photoblanchiment à la disparition de la population verte, nous avons menés des expériences de photoconversion à température cryogénique (100 K) à laquelle la rupture de la liaison C-N à l'origine de la formation du chromophore rouge est connue pour être fortement limitée [Chang et al., 2014]. Sous illumination à 405 nm (de l'ordre du W/cm²) et à 100 K, aucune variation notable de fluorescence verte ni d'absorbance à 500 nm de mEos2 n'a pu être observée, suggérant l'absence de photoblanchiment de la forme verte dans ces conditions. À l'heure actuelle, nos travaux ne permettent pas de mettre en évidence un photoblanchiment pré-photoconversion de la forme verte par la lumière violette utilisée pour la photoconversion.

Néanmoins, la forte absorptivité molaire des chromophores protonés à 405 nm ainsi que les nombreuses évidences chez d'autres protéines fluorescentes de l'effet de la lumière violette sur la décarboxylation du glutamate (*e.g.* PAGFP), suggère fortement cette même décarboxylation du Glu212 chez mEos2 sous illumination à 405 nm. Des travaux précédemment réalisés par Virgile Adam au sein du laboratoire sur EosFP viennent donner davantage de crédit à cette hypothèse. Il a en effet été montré que sous illumination à 355 nm, la glutamate de la forme verte de EosFP est largement décarboxylé [Adam, 2009].

À l'avenir, afin d'évaluer dans quelle mesure le photoblanchiment pré-conversion de la forme verte affecte le comptage par microscopie de localisation, nous proposons d'exploiter les homo-oligomères bactériens utilisés par le groupe de Mike Heilemann comme outil de calibration pour le comptage moléculaire [Finan et al., 2015]. En comptant par microscopie de localisation le nombre de monomères de ces complexes à stœchiométrie connue, nous envisageons d'estimer la fraction de la population verte de mEos2 photoblanchit sous illumination violette (rapport entre la stœchiométrie estimée par comptage et la stœchiométrie réelle de l'oligomère). Le décamère bactérien FsaA exprimé en cellules HeLa en fusion avec mEos2 est actuellement utilisé au laboratoire. Cependant, la distinction entre un photoblanchiment de la forme verte avant photoconversion et celui de la forme rouge avant détection est particulièrement délicat. Ces expériences devraient néanmoins permettre de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une sous-population verte intrinsèquement non photoconvertible. Dans le cas où une telle population existe, une fraction des monomères présents en fin d'expérience pourra alors être comptée par « photoblanchiment par pas ».

En somme, nos résultats mettent en évidence que les phototransformations irréversibles dans la forme rouge (et sans doute également dans la forme verte) dans les conditions d'illumination classique

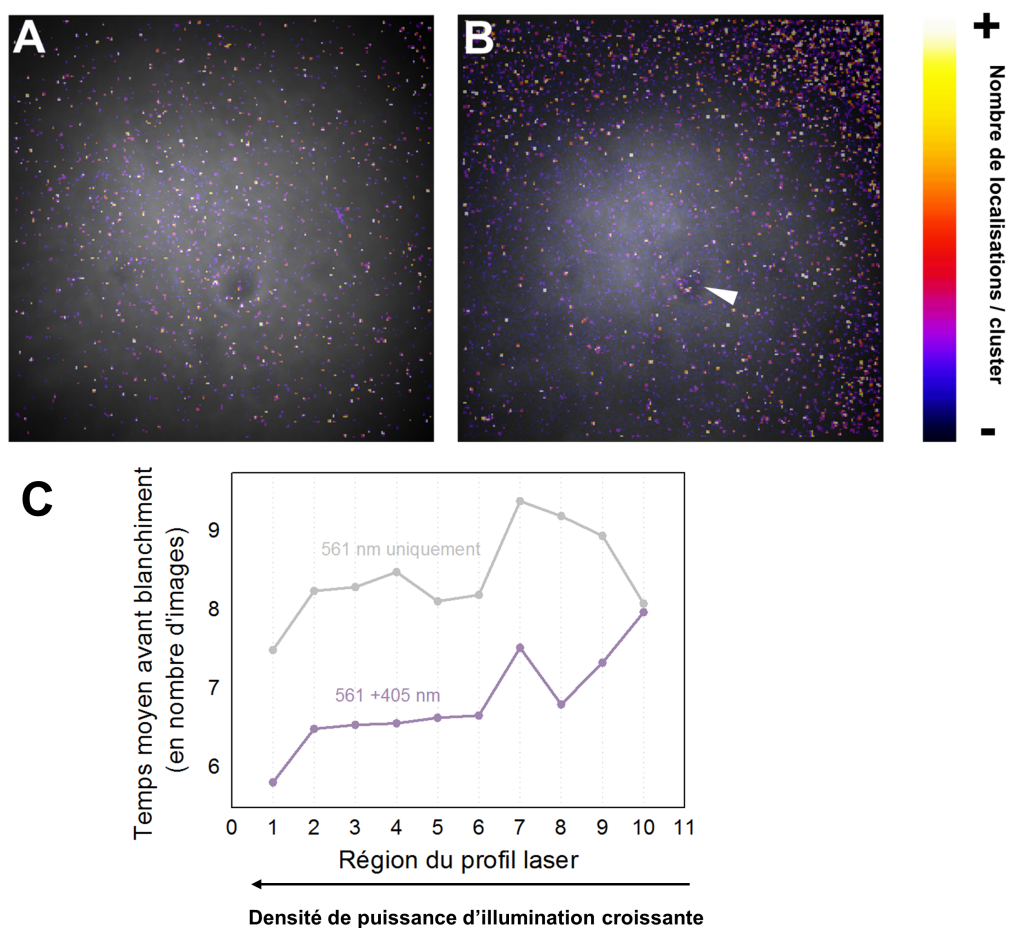


Figure 11.7 – Mise en évidence du photoblanchiment de la forme rouge sous illumination violette à l'échelle de la molécule unique (A). Hydrogel de PVA contenant la PCFP mEos2 en concentration nanomolaire illuminée par un laser 561 nm représenté en transparence sur l'image. Chaque pixel de l'image est coloré selon le nombre de localisations par pixel. Les molécules uniques apparaissent donc comme des clusters de localisations. Plus une molécule unique vit longtemps plus sa couleur tend vers le blanc (B). La même analyse est menée sous double illumination 561+405 nm (le profil du laser 405 nm est représenté par transparence sur l'image). La flèche blanche montre un défaut local du profil laser. Dans cette région, il y a une corrélation forte entre faible densité de puissance et nombre de localisations par cluster (C). Temps moyen avant photoblanchiment en fonction de la densité de puissance d'illumination. Les régions 1 (centre) à 10 (périphérie) du profil laser sont représentées en Figure 11.18 (Annexes, page 207)

de collecte de données PALM (561+405 nm) sont à l'origine d'un sous-échantillonnage introduisant alors des erreurs de comptage. À l'avenir, le développement de variants de PCFPs particulièrement photorésistants à l'illumination violette devrait permettre de gagner en finesse lors du comptage moléculaire par microscopie de localisation.

11.3. COMPARAISON DE LA PHOTOCONVERSION PAR PROCHE U.V. ET DE LA PHOTOCONVERSION PAR AMORÇAGE

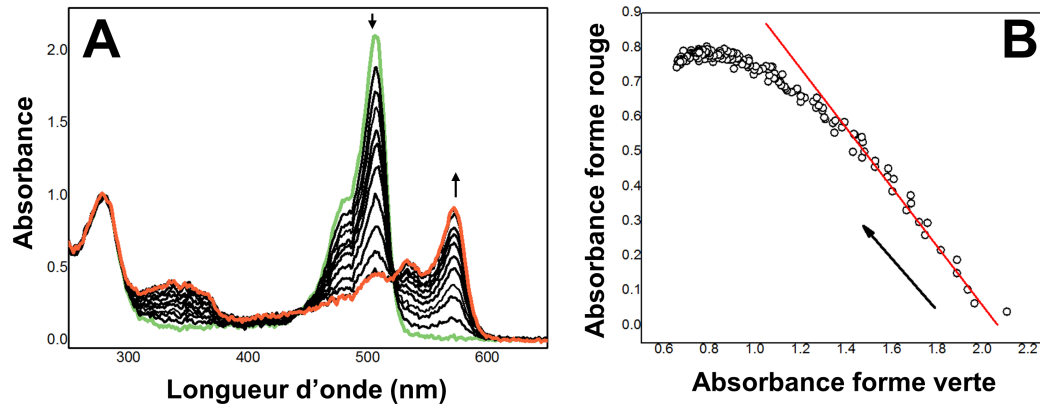
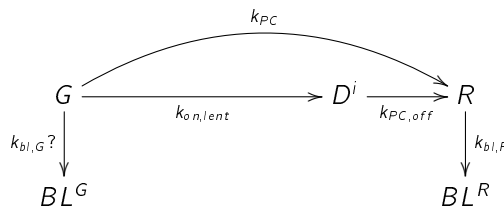


Figure 11.8 – Mise en évidence du photoblanchiment de la forme rouge sous illumination violette à l'échelle d'ensemble (A). Spectres d'absorbance collectés en cuvette sur un échantillon de mEos2 illuminé par une lumière diffuse et basse intensité de lumière violette (405 nm, $\sim 1 \mu\text{W}$). Un spectre est collecté toute les minutes (B). La variation de l'absorbance de la forme verte (505 nm) par rapport à l'absorbance de la forme rouge (570 nm) est d'abord linéaire jusqu'à ce que l'augmentation de l'absorbance rouge soit inférieure à la diminution de la forme verte. Ce comportement peut s'expliquer par un photoblanchiment plus important que la photoconversion en fin d'expérience lorsque la plupart de la population verte a été photoconvertie.

Étant donné l'effet pléiotrope⁷ de la lumière violette sur les phototransformations réversibles et irréversibles des formes verte et rouge des PCFPs, l'optimisation des modalités de photoconversion s'affranchissant de la lumière proche UV est très souhaitable.



11.3 Comparaison de la photoconversion par proche U.V. et de la photoconversion par amorçage

11.3.1 Prise de vue

L'an dernier, une nouvelle modalité de photoconversion vert à rouge s'affranchissant de la lumière proche UV a été mise en évidence par le groupe de Periklis Pantazis à l'ETH de Zürich [Dempsey et al., 2015]. En combinant illumination cyan (488 nm) et infrarouge (753 nm), la photoconversion de la PCFP Dendra2 s'avère particulièrement efficace. Dans ces mêmes conditions d'illumination, la

7. D'habitude utilisé pour décrire le fait qu'une protéine est impliquée dans de nombreux processus, nous proposons ici d'élargir l'utilisation de ce terme en qualifiant de pléiotrope les ondes lumineuses impliquées dans de nombreuses phototransformations.

PCFP mEos2 est très faiblement photoconvertie.

Ce mécanisme de photoconversion a été baptisé photoconversion amorcée après avoir mis en évidence que l'illumination cyan doit être impérativement suivie dans les dizaines de ms suivantes par une illumination infrarouge pour que la transition vert à rouge ait lieu. La lumière cyan est alors appelée lumière d'amorçage, induisant une transition de l'état vert fluorescent vers un état intermédiaire de nature inconnue de très court temps de vie (de l'ordre de la dizaine de ms) et absorbant dans l'infra-rouge. La lumière infrarouge dite lumière de photoconversion induit la transition irréversible de cet état inconnu vers l'état rouge.

L'utilisation d'une lumière actinique infrarouge permet une meilleure pénétration au sein d'échantillons épais pluricellulaires. Cette modalité de photoconversion permet alors de limiter la phototransformation à une région spatialement confinée de petite taille au sein d'un organisme (*e.g.* cellule unique) en faisant se croiser les deux lasers en microscopie confocale à l'aide d'un module adapté (voir [Dempsey et al., 2015] pour les détails de l'installation). D'autre part, en s'affranchissant de la lumière énergétique proche UV, la photoconversion amorcée limite probablement les effets phototoxiques, à la lumière de ce qui a été présenté dans les pages 96 *sqq.* À l'échelle de la molécule unique, nos résultats préliminaires mettent en évidence que la photoconversion amorcée semble être une modalité exploitable en microscopie de localisation PALM (Figure 11.9).

En combinant efficacité de photoconversion et phototoxicité limitée, la photoconversion amorcée semble être une modalité intéressante pour l'avenir de la microscopie PALM. La démocratisation de la photoconversion amorcée en microscopie PALM passera sans doute par la compréhension fine des mécanismes sous-jacents, éléments essentiels à la maîtrise d'un outil et à son exploitation optimale. Les mécanismes à l'origine de ce phénomène d'amorçage étant aujourd'hui largement mal compris, nous nous proposons de déchiffrer les voies photophysiques sous-jacentes. Ne disposant pas de laser infrarouge sur l'installation PALM de l'Institut de Biologie Structurale, l'ensemble des expériences présentées dans les pages suivantes ont été réalisées sous double illumination cyan (488 nm) / rouge (643 nm).

11.3.2 Photoconversion amorcée et scintillement rapide

Pourquoi mEos2 est très inefficacement photoconvertie sous double illumination 488 + 735 nm alors qu'il est aisé de faire passer la population verte de Dendra2 dans sa forme rouge dans ces mêmes conditions d'illumination ? Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de P. Pantazis, nous avons travaillé sur l'hypothèse suivante : « l'orientation différente de l'arginine 66 entre mEos2 et Dendra2 serait à l'origine de la différence de susceptibilité à la photoconversion amorcée de mEos2 et Dendra2 ».

Afin de vérifier notre hypothèse de travail, les mutants de mEos2 et Dendra2 pour lesquels seule l'orientation de l'arginine 66 diffère ont été réinvestis.

Alors que la photoconversion amorcée s'avère efficace pour Dendra2, elle est nulle pour Dendra2-T69A suggérant que le changement d'orientation de l'arginine 66 d'une conformation recroquevillée à une conformation étirée est fatale soit à la formation de l'état intermédiaire de court temps de vie soit à la conversion de l'état sombre en état rouge sous illumination rouge (Figure 11.10). En parallèle, alors que la photoconversion amorcée est nulle pour mEos2, elle s'avère efficace pour mEos2-A69T (Figure 11.10). En somme, les mutants à Arg66 recroquevillée ont une forte propension à photocon-

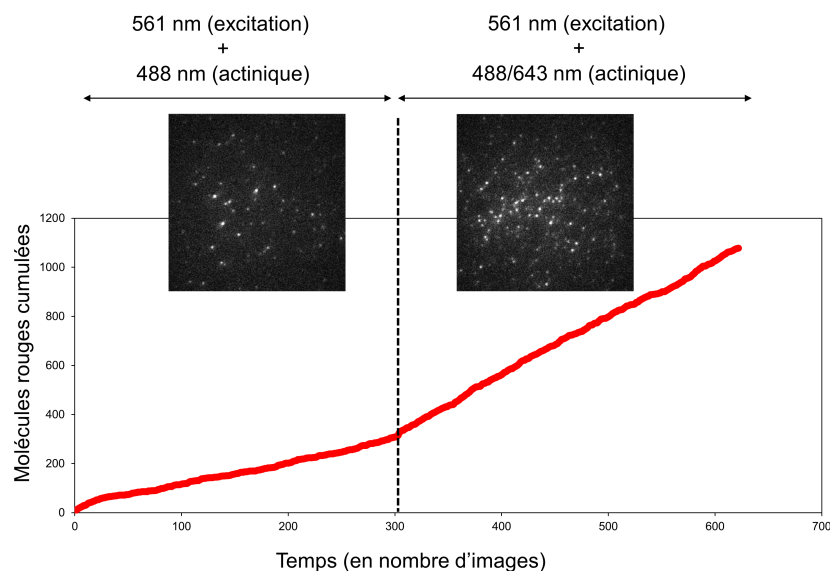


Figure 11.9 – Comparaison de la photoconversion cyan et amorcée de Dendra2 exprimée en bactérie à l'échelle de la molécule unique Courbe cumulative de photoconversion de bactéries BL21 exprimant la PCFP Dendra2 est illuminée dans un premier temps dans les conditions de photoconversion cyan proposée par [Gurskaya et al., 2006] puis dans les conditions de photoconversion amorcée. Des images typiques dans les deux régimes d'illumination sont présentées. La photoconversion est significativement plus efficace en présence de lumière rouge à même puissance de lumière cyan.

vertir sous double illumination cyan/rouge.

Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre la propension à photoconvertir par amorçage et la fraction de la population rouge entrant dans un état sombre de court temps de vie. En prenant en compte les modifications structurales minimales entre la forme verte et la forme rouge des PCFPs de la série Eos et Dendra, nous considérons comme très probable l'hypothèse selon laquelle les conclusions faites dans la forme rouge concernant le scintillement et le photoblanchiment en fonction de l'orientation de l'arginine 66 sont valables dans la forme verte. Le temps moyen avant retour de l'état sombre de court temps de vie vers l'état fluorescent est du même ordre de grandeur que le temps maximum pouvant séparer l'illumination cyan de l'illumination infrarouge pour que la transition vert à rouge reste efficace.

Lors de l'absorption d'un photon cyan par les mutants à arginine 66 recroquevillée, la probabilité d'aboutir à un état sombre de court temps de vie est 4 fois plus élevée que pour les mutants à arginine 66 étirée (comparer les vitesses microscopiques de scintillement rapide Table 10.3, page 171). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'état sombre de court temps de vie identifié par Adam et al. [Adam et al., 2009a] (état à chromophore distordu et C_{α} en conformation sp^3) puisse être l'état intermédiaire amorcée. Néanmoins, l'efficacité de photoconversion amorcée de mEos2-A69T étant plus de 10 fois supérieure à celle de mEos2, la différence de propension à entrer dans l'état sombre de court temps de vie (facteur 4) ne permet pas d'expliquer complètement le comportement observé. Nous suggérons que l'orientation de l'arginine 66 régle la photoconversion par d'autres mécanismes

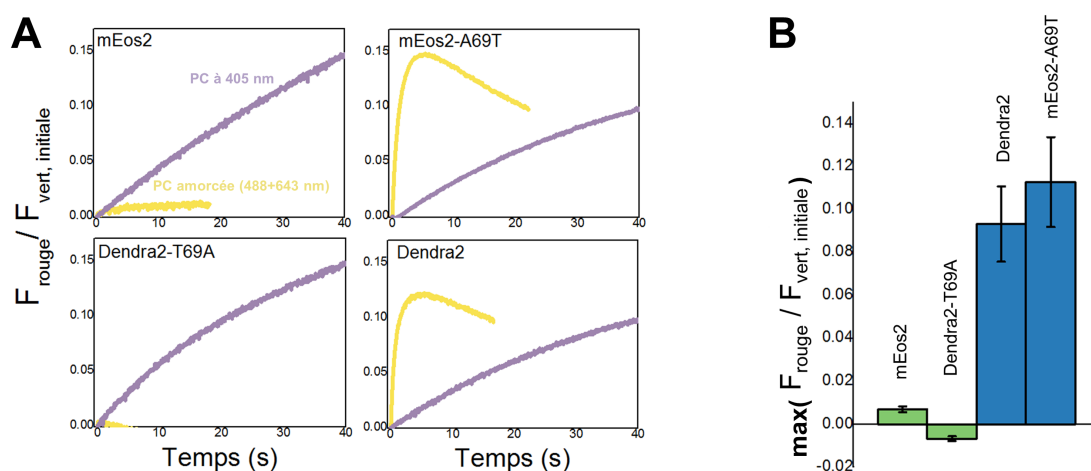


Figure 11.10 – Comparaison de l'efficacité de photoconversion amorcée en fonction de l'orientation de l'arginine 66 (A). Cinétique de formation de la forme rouge sous illumination violette (405 nm ; photoconversion proches UV) ou cyan+rouge (488 + 643 nm ; photoconversion amorcée). La fluorescence rouge émise par un échantillon de polyacrylamide contenant en concentration nanomolaire ($OD_{488nm}=0.1$) mEos2, Dendra2, mEos2-A69T ou Dendra2-T69A est normalisée par la fluorescence de la forme verte avant illumination afin de permettre une comparaison non-biaisée d'un échantillon à l'autre ($\frac{F_{\text{rouge}}}{F_{\text{verte, ini.}}}$). (B). Valeur maximale du rapport fluorescence rouge / fluorescence verte avant illumination ($\frac{F_{\text{rouge}}}{F_{\text{verte, ini.}}}$) pour chaque variant. Les valeurs offrent une approximation correcte de l'efficacité mécanistique, la densité de puissance et l'absorptivité à 488 nm étant identiques d'un variant à l'autre. Les protéines sont immobilisées au sein d'un hydrogel de polyacrylamide.

encore incompris à ce jour. Face au caractère haut risque/faible gain de ce projet d'investigation photophysique, il est probable qu'un investissement limité soit mis en œuvre à l'avenir.

L'étude de la photoconversion à bas pH (condition dans laquelle les chromophores résident principalement sous leur forme protonée) suggère qu'à la différence de la photoconversion par proche UV, la photoconversion amorcée touche la population de chromophores anioniques.

11.3.3 La photoconversion amorcée : une phototransformation impliquant un intermédiaire de court temps de vie

Afin de davantage comprendre les mécanismes photophysiques sous-jacents à la photoconversion amorcée, nous avons testé l'effet de la densité de puissance des deux longueurs d'onde utilisées (488 et 643 nm) sur l'efficacité de la transition vert à rouge pour le variant présentant la meilleure photoconversion amorcée (Figure 11.10) : mEos2-A69T.

La cinétique de formation de l'état rouge suit une courbe en cloche témoignant d'une consommation importante de la population formée dans ces conditions d'illumination. Les conditions optimales (population rouge maximale) sont atteintes à puissance de lumière rouge maximale et puissance de lumière cyan intermédiaire, suggérant l'effet important des photons 488 nm sur le photoblanchiment des chromophores rouges (Figure 11.10).

Afin de faciliter l'analyse des résultats expérimentaux, nous nous sommes intéressés à deux paramètres caractérisant la photoconversion amorcée : la vitesse initiale d'apparition de la forme rouge et

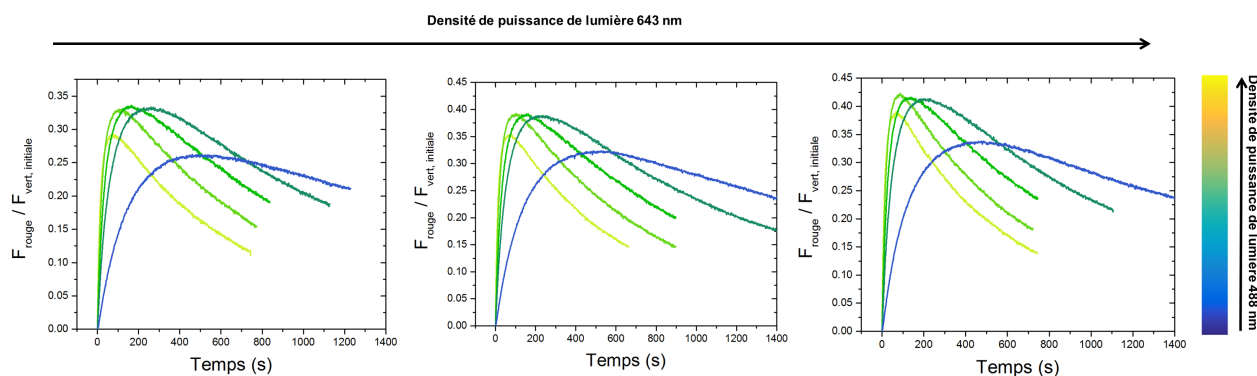
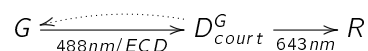


Figure 11.11 – Cinétiques de photoconversion amorcée de mEos2-A69T selon les conditions d'illumination Les cinétiques de formation de la forme rouge sous illumination cyan (488 nm) et rouge (643 nm) sont appréhendées au travers de la mesure du rapport de la fluorescence rouge / fluorescence verte initiale. La forme en cloche des courbes suggèrent la disparition de la forme rouge formée par photoblanchiment dans les conditions d'illumination.

le temps nécessaire pour atteindre le maximum de la courbe en cloche de photoconversion amorcée ($t_{max} - t_0$). Ces deux paramètres sont représentés en fonction de la puissance de laser cyan et rouge (Figure 11.12).

L'efficacité de photoconversion amorcée (vitesse initiale ou $t_{max} - t_0$) est principalement limitée par la lumière 488 nm, en accord avec un modèle d'amorçage par la lumière cyan. Nos résultats suggèrent donc que la réaction cinétiquement déterminante (ECD) de la photoconversion amorcée est celle d'amorçage vers un état intermédiaire :



La vitesse initiale de la photoconversion amorcée limitée à basse puissance de lumière rouge quelque soit l'illumination par la lumière cyan vient confirmer le modèle cinétique à deux étapes successives : un gain significatif d'efficacité de photoconversion n'est possible qu'en présence d'une forte densité de puissance de lumière de conversion. Face à l'utilisation combinée de lumières de longueurs d'onde différentes et de densité de puissance importante, nous nous interrogeons sur l'effet des conditions d'illumination sur le photoblanchiment de la population verte et rouge.

11.3.4 La photoconversion amorcée : une alternative viable à la photoconversion proche UV pour le PALM quantitatif ?

Une photophysique complexe étant à l'œuvre, faisant intervenir différentes longueurs d'onde et phototransformations, les prédictions basées sur l'analyse des cinétiques sont particulièrement difficiles et peu intuitives. Nous avons alors étudié l'implication du photoblanchiment lors de la photoconversion amorcée en simulant l'évolution de la population rouge d'après différents modèles cinétiques et en les comparant aux données expérimentales. Quatre modèles cinétiques différents ont été testés en maintenant l'illumination de photoconversion constante et en faisant varier l'illumination d'amorçage (*cf infra*). Les résultats des simulations sont présentées en Figure 11.13.

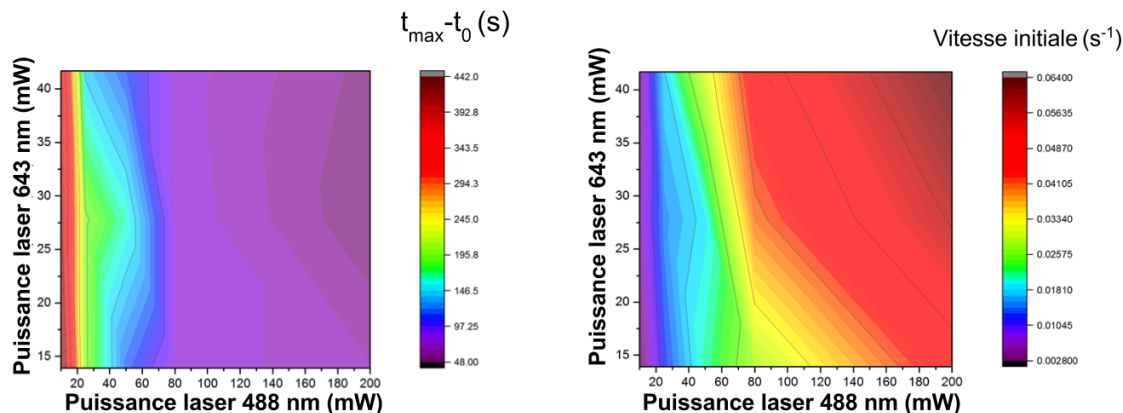
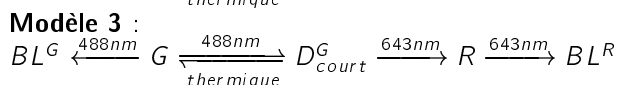
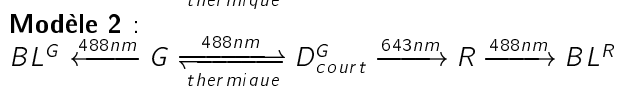
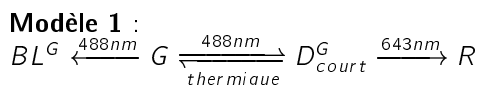


Figure 11.12 – Caractérisation de la photoconversion amorcée en fonction des conditions d'illumination À partir des cinétiques de Dendra2 présentées en Figure 11.11, le temps nécessaire à atteindre la valeur maximale du rapport $\frac{F_{\text{rouge}}}{F_{\text{vert},i}}$ noté $t_{\max} - t_0$ (gauche) ainsi que la vitesse initiale (droite) sont mesurées pour chaque couple de puissance laser cyan et rouge. Les résultats sont reportés sous forme de graphique 3D.



avec BL^G la forme photoblanchie depuis la forme verte, G la forme verte fluorescente, D_{court}^G l'état sombre de court temps de vie peuplé depuis la forme verte, R la forme rouge fluorescente et BL^R la forme photoblanchie depuis la forme rouge.

Les simulations générées avec un modèle impliquant un photoblanchiment de la forme verte et rouge par la lumière cyan et de la forme rouge par la lumière rouge (modèle 4) décrivent au mieux nos données expérimentales. Avec ce modèle, l'efficacité est optimale à densité de puissance intermédiaire de lumière cyan, en accord avec les courbes présentées en Figure 11.11.

Le photoblanchiment de la forme rouge par à la fois la lumière cyan et la lumière rouge a été mis en évidence à l'échelle de la molécule unique (Table 11.2).

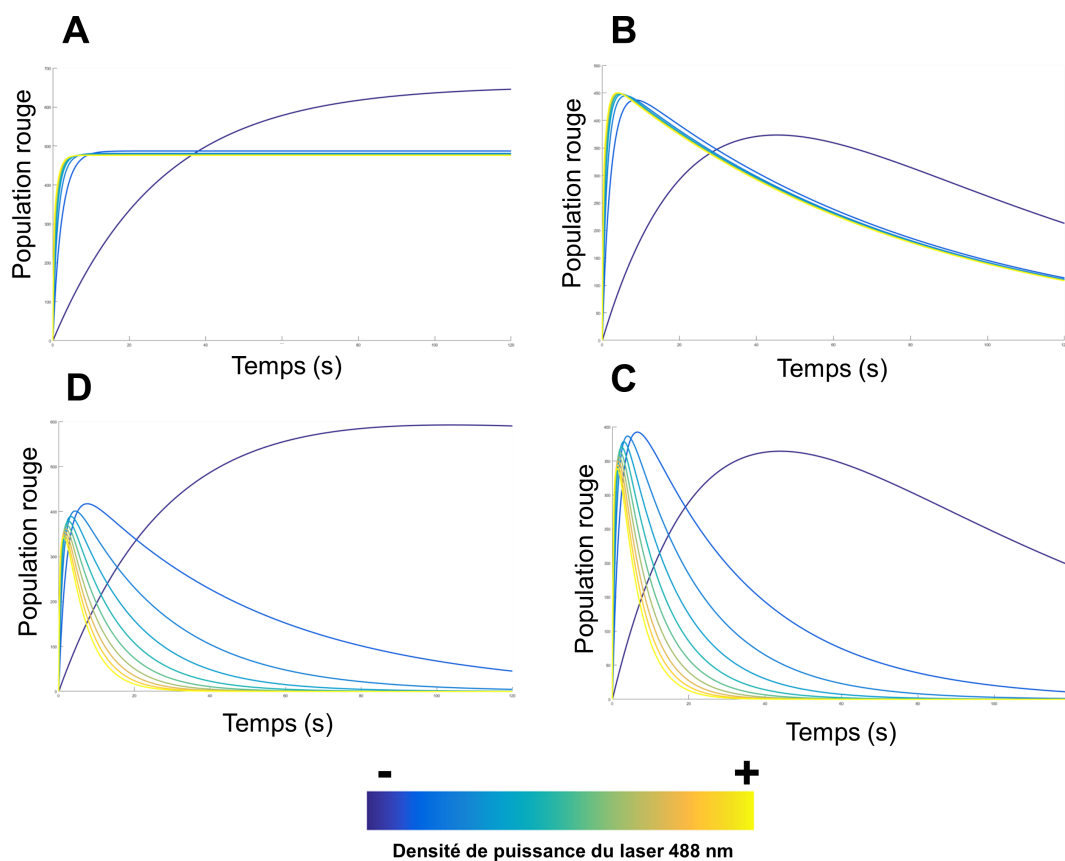


Figure 11.13 – Cinétiques de photoconversion amorcée simulées

Table 11.2 – Photoblanchiment de la forme rouge en fonction des conditions d'illumination (mesuré à l'échelle de la molécule unique *in vitro*)

Conditions d'illumination	$t_{b,1}$ moyen (ms)
561 nm	95
561 nm + 643 nm	75
561 nm + 488 nm	60

À l'avenir, le photoblanchiment de la forme verte dans les conditions d'illumination de la photoconversion amorcée devra être étudié afin d'estimer dans quelle mesure cette modalité permet de limiter les erreurs de sous-comptage par photoblanchiment pré-photoconversion par rapport à la photoconversion classique par proche UV. En d'autre terme, à même efficacité de photoconversion, le photoblanchiment de la forme verte est-il moindre sous illumination combinée cyan/rouge ou sous illumination violette ? Afin de répondre à cette question, nous proposons à l'avenir de quantifier la fraction photoblanchie de la protéine mEos2 dans les conditions d'illumination de la photoconversion amorcée en se reposant sur les homo-oligomères bactériens développés par le groupe de M. Heilemann (voir page 185).

Enfin, l'exploitation des deux voies de photoconversion (par proche UV touchant la forme protonée et par amorçage touchant la forme anionique) s'avère être un moyen efficace pour accélérer la vitesse d'apparition de la forme rouge (Figure 11.14). Dans les conditions d'illumination combinant lumières 405+488+643 nm, l'évolution de la population rouge de mEos2 au cours du temps n'est pas identique à la somme mathématique des courbes d'évolution de la population rouge obtenues dans les conditions d'illumination simple 561 nm et 488+643 nm. Ces résultats suggèrent l'existence d'effets croisés complexes. Notamment, la lumière violette en favorisant le retour *off* → *on* dans la forme verte induit par l'illumination cyan limite le remisage et place la population verte dans un état favorable à la photoconversion amorcée. Des travaux plus fins à l'avenir devraient être réalisés afin de déterminer le régime d'illumination idéale combinant illumination cyan, rouge et violette pour une efficacité de photoconversion idéale.

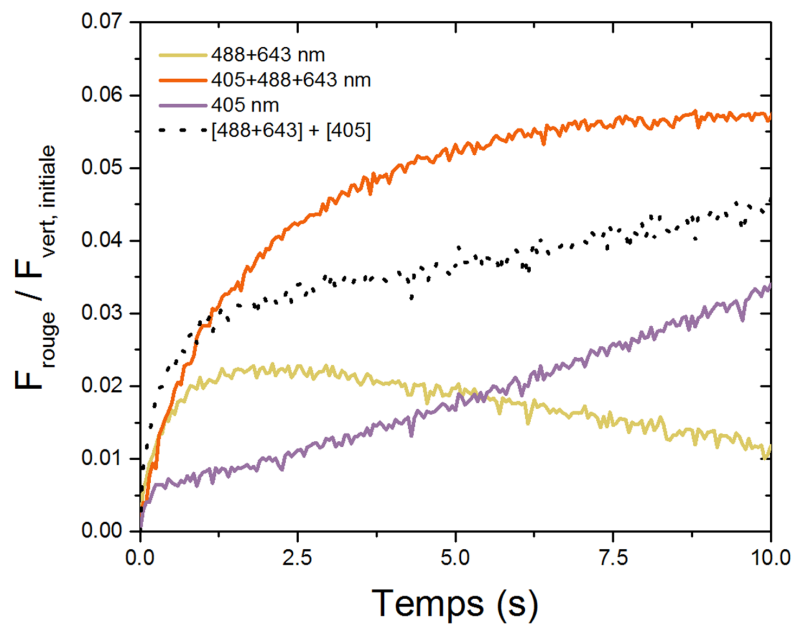


Figure 11.14 – Photoconversion combinée par amorçage et par proches UV La protéine mEos2 est immobilisée en hydrogel de polyacrylamide et exposée à une lumière violette (405 nm + 561 nm pour l'excitation des fluorophores rouges ; courbe violette), à une combinaison de lumière cyan et rouge (488+643 nm + 561 pour l'excitation des fluorophores rouges ; courbe jaune) ou à une combinaison de lumière violette, cyan et rouge (405+488+643 nm + 561 nm pour l'excitation des fluorophores ; courbe rouge). Les courbes jaune et violette sont mathématiquement additionnées pour donner la courbe noire pointillée. Remarquer la différence d'évolution entre la courbe rouge et la courbe noire pointillée.

Cinquième partie :

**CONCLUSION : VERS LE
DÉVELOPPEMENT DE PCFPs
AMÉLIORÉES POUR LA
MICROSCOPIE PALM AVANCÉE**

Les protéines fluorescentes photomodulables (PMFPs) sont des outils de choix pour l'étude fine des objets biologiques en permettant notamment de contourner la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière. Les efforts d'ingénierie de nouvelles PMFPs optimisées menés ces dernières années ont assuré -en grande partie- les avancées dans le domaine de la microscopie super-résolution. La recherche de PMFPs toujours plus brillantes, toujours plus rouges, toujours plus photorésistantes et toujours plus monomériques a constitué le Graal de l'ingénierie des protéines fluorescentes depuis des années.

Aujourd'hui la complexité croissante des questions biologiques abordées contraint les biologistes cellulaires à chercher de nouveaux outils permettant d'apporter plus qu'une simple image super-résolue de leur objet biologique fétiche. Avec le développement des techniques de microscopie de super-résolution avancée, l'ingénierie des PMFPs connaît un nouveau virage : les paramètres à optimiser ne sont plus ceux que l'on plaçait en tête de liste il y a 10 ans encore. Aujourd'hui, les efforts d'ingénierie raisonnée se concentrent sur l'optimisation de paramètres photophysiques complexes tels que le scintillement, la photocommutation ou la photoconversion. Avec cette nouvelle ère, les stratégies de mutagenèse jusqu'alors utilisées sont parfois rendues obsolètes et les approches haut-débit en l'état actuel (mutagenèse aléatoire) ne sont plus aussi prometteuses qu'auparavant.

Aujourd'hui, le développement des techniques avancées de microscopie de super-résolution repose sur la compréhension plus fine des mécanismes photophysiques des protéines fluorescentes : mieux comprendre leur fonctionnement afin d'utiliser habilement de nouvelles voies photophysiques ou bloquer des voies parasites qui limitent actuellement la puissance de la microscopie de super-résolution avancée.

Cette thèse est un exemple de mise en œuvre des nouvelles stratégies d'ingénierie des protéines fluorescentes. En reliant analyse photophysique à l'échelle de la molécule unique et étude structurale, nous avons pu mettre en évidence le rôle clé de l'arginine 66 dans le contrôle du scintillement et du photoblanchiment des protéines fluorescentes photoconvertibles anthozoaires de la série Eos et Dendra. Nous avons concentré nos efforts sur le déchiffrement des voies photophysiques complexes du scintillement des protéines fluorescentes photoconvertibles qui étaient -au début de cette thèse- encore largement mal comprises. Aujourd'hui nos travaux offrent une vue plus claire du scintillement des PCFPs malgré la persistance de zones d'ombre encore importantes notamment concernant la nature de l'état sombre de long temps de vie. Cet état fait doré et déjà l'objet d'une étude structurale et spectroscopique poussée si bien que de nouveaux indices quant à sa nature sont à notre portée. La structure de l'état sombre de long temps de vie a pu être résolue grâce au travail mené par Elke de Zitter (KU Leuven) dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de Dominique Bourgeois de l'Institut de Biologie Structurale et l'équipe de Peter Dedecker de l'Université Catholique de Louvain (KU Leuven). L'état sombre de long temps de vie peuplé suite à excitation dans la forme verte et dans la forme rouge de mEos4 met en évidence un remodelage de la cavité du chromophore similaire à celle observée lors de la photocommutation de protéines fluorescentes photocommutables qui n'est cependant pas accompagnée d'une isomérisation du chromophore. Le chromophore est principalement désordonné : tout se passe comme si le scintillement lent était le résultat d'une « isomérisation frustrée ».

De nombreuses autres questions restent actuellement en suspens et le projet initié dans le cadre de cette thèse est aujourd'hui encore un projet d'actualité : Pour quelles raisons cet état sombre

diffère-t-il de celui peuplé chez les protéines fluorescentes photocommutables ? Comment empêcher la formation de cet état sombre sans dégrader en parallèle d'autres propriétés photophysiques ?

Au cours de cette thèse, notre stratégie d'ingénierie raisonnée d'un variant optimisé pour le comptage par microscopie de localisation a échoué. On est alors en droit de se demander dans quelle mesure la stratégie d'ingénierie intelligente est viable à l'avenir. Déchiffrer les voies photophysiques en amont de la conception de variants optimisés représente un travail important à l'image de ce qui a été entrepris pendant cette thèse. L'étude photophysique fine des protéines fluorescentes est exigeante en ressources matérielles et humaines. Aboutir à un nouveau modèle du comportement d'un fluorophore demande un investissement temporel important des expérimentateurs et n'est pas forcément la garantie d'un succès. Notamment dans le cadre de cette thèse, notre modèle converge vers l'identification d'un acide aminé clé non seulement dans le contrôle du scintillement mais également dans de celui de nombreuses autres voies (photoconversion, photoblanchiment, brillance). À l'image d'une protéine qualifiée de pléiotrope lorsqu'elle intervient dans le contrôle de nombreux phénomènes biologiques, l'arginine 66 des PCFPs peut être qualifiée de pléiotrope, prévenant sévèrement la mutagenèse à cette position. Si l'étude approfondie des mécanismes photophysiques des protéines fluorescentes ne garantit pas le succès du développement direct de variants optimisées, elle est, à la différence de la mutagenèse aléatoire, la source d'un socle plein de ressources pour l'ingénierie dans un futur plus ou moins proche. D'autre part, une des limitations principale des stratégies raisonnées d'ingénierie est liée au caractère réducteur de leur approche. À l'image des travaux menés au cours de cette thèse, nos recherches se sont focalisés sur l'implication d'un unique acide aminé sur le contrôle du comportement photophysique. Il est évidemment naïf de penser qu'un unique acide aminé puisse contrôler totalement une voie photophysique. Les acides aminés au sein d'une protéine fluorescente doivent être perçus comme un réseau moléculaire dont l'interaction avec le chromophore module finement sa photophysique. Il est alors nécessaire de s'intéresser à de nombreux acides aminés ce qui limite considérablement la viabilité de ces approches étant donné le travail important que cela représente. Les approches raisonnées consistent alors nécessairement en une approche avec « œillères ». À l'opposé, les approches aléatoires sont le meilleur moyen pour identifier l'effet de mutations combinées (effet d'épistasie⁸).

Dans le cadre de cette thèse, les voies intrigantes et complexes de la photoconversion ont également été étudiées de manière préliminaires. Nos travaux ont conduit à l'existence d'une voie parallèle de photoconversion en compétition avec la voie directe d'interconversion vert à rouge faisant intervenir un état sombre de long temps de vie comme intermédiaire. Cette voie de photoconversion semble être à l'origine d'un ralentissement de la vitesse de photoconversion et s'avère donc handicapante dans le cadre d'approches PALM quantitatives. À l'avenir des efforts devront être menés afin d'affiner notre connaissance de cette nouvelle voie et permettre ainsi le développement de variants de PCFPs pour lesquels cette voie est sensiblement défavorisée par rapport à la voie directe vert à rouge. Notamment, la structure de l'état sombre intermédiaire reste encore aujourd'hui largement spéculative. À l'avenir, le piégeage de cet état sous illumination 561 nm forte et la résolution de sa structure cristallographique pourrait ouvrir la voie à l'ingénierie intelligente de nouvelles PCFPs pour lesquelles la photoconversion indirecte est largement défavorisée par rapport à la voie directe. D'autre part, une investigation

8. Pour la notion d'épistasie chez les protéines fluorescentes voir la publication récente [Sarkisyan et al., 2016].

plus systématique de la propension des PCFPs à photoconvertir *via* cette voie pourrait permettre de mettre en évidence des corrélations entre modalités photophysiques de photoconversion et structure de l'environnement du chromophore.

La photoconversion reste à l'heure actuelle une phototransformation encore bien mystérieuse et l'effet de l'environnement du chromophore (en particulier l'arginine 66) sur le contrôle des étapes catalytiques est encore largement mal compris. Comment expliquer qu'une modification de l'arginine 66 soit à l'origine d'une modification des cinétiques de photoconversion (voir Annexe, page 11.19) ? Comment expliquer que pour certaines PCFPs (pcDronpa-A69T et Kaede-A69S) le changement d'orientation de l'arginine 66 soit à l'origine d'une abolition des propriétés de photoconversion alors que chez d'autres non (mEos2-A69T) ?

Ces questions passionnantes en attente de réponses sont une porte d'entrée pour l'ingénierie intelligente de protéines fluorescentes photoconvertibles à efficacité de photoconversion améliorée.

Nos travaux sur l'étude des phénomènes photophysiques à l'origine d'un sous-échantillonnage ont mis en avant l'importance du photoblanchiment pré- et post-photoconversion par la lumière actinique violette. À l'avenir, l'étude systématique du photoblanchiment sous lumière violette devrait être menée et le choix d'une PCFP pour les applications quantitatives fait en fonction des résultats de cette caractérisation. L'ajustement du système expérimental ingénieux inspiré de celui développé par Mike Heilemann est aujourd'hui en cours au laboratoire et devrait permettre d'estimer l'étendue du photoblanchiment de la forme verte et rouge de la PCFP mEos2.

Nos résultats préliminaires concernant la nouvelle voie de photoconversion par amorçage sont particulièrement intéressants. Nos recherches pionnières à propos des mécanismes photophysiques sous-jacents mettent en évidence que cette voie fait intervenir un état sombre de court temps de vie similaire à celui mis en évidence chez la forme rouge. De nombreuses questions se posent : Quelle est la complétude par photoconversion amorcée ? Peut-on espérer améliorer la complétude de photoconversion de mEos2 en exploitant la voie de photoconversion amorcée en présence de lumière violette ?

Sixième partie :

ANNEXES

11.4 Alignement de séquences des variants de la série Eos

```

EosFP      1 -MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT
mEosFP     1 -MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT
mEos2      1 -MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT
mEos3.2    1 -MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT
mEos4a     1 MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT
mEos4b     1 MSAIKPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSM DLEVKEGGPLPFAFDILTT

EosFP      60 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR
mEosFP     60 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR
mEos2      60 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR
mEos3.2    60 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR
mEos4a     61 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR
mEos4b     61 AFHYGNRVFAEYDPDHIQDYFKQSF PKGYSWERSLTFEDGGIC IARN DITMEGDTFYNKVR

EosFP      120 FHGYNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA
mEosFP     120 FHGYNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA
mEos2      120 FHTGNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA
mEos3.2    120 FHTGNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA
mEos4a     121 FHTGNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA
mEos4b     121 FHTGNFPANGPVMQKKT LK WEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGNAHYRCD FRTTYKA

EosFP      180 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR
mEosFP     180 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR
mEos2      180 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR
mEos3.2    180 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR
mEos4a     181 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR
mEos4b     181 KEKGVKLPGYHFVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR

```

Figure 11.15 – Alignement de séquences des variants de la série Eos Le chromophore HYG est repéré par un rectangle jaune. Les acides aminés mutés et impliqué dans l'interaction entre monomères sont repérés par un trait épais noir. Les mutations par rapport à la séquence de EosFP sont repérées en rouge. Alignement réalisé à l'aide de Clustal Omega et BoxShade.

11.5 Regroupement des localisations en clusters en contexte bactérien

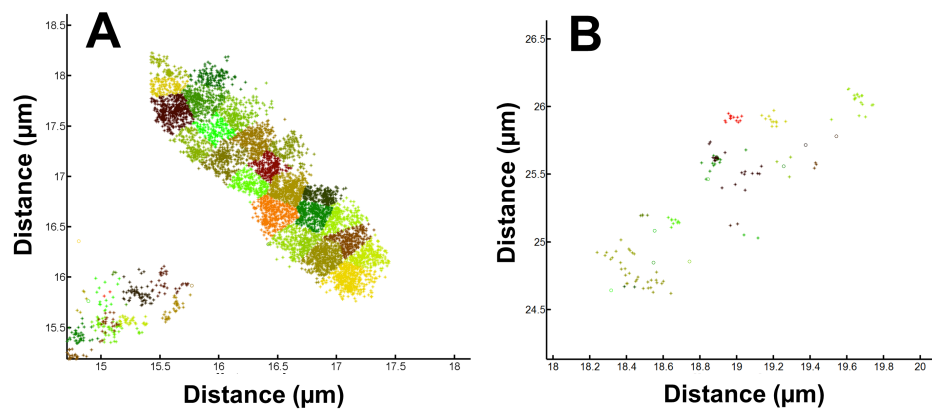


Figure 11.16 – Regroupement des localisations en clusters dans le cytoplasme d'un colibacille (A). À forte densité moléculaire telle qu'observée la plupart du temps même en l'absence d'induction chez des bactéries BL21 exprimant la protéine fluorescente mEos2 (plasmide pRSET), les localisations sont regroupées en méga-clusters prévenant l'étude du comportement photophysique (B). À densité moléculaire plus faible telle qu'observée stochastiquement pour quelques bactéries, les localisations sont globalement correctement regroupées en clusters (à l'exception de quelques super-clusters formés là où la densité moléculaire est localement importante (*e.g.* au pôle inférieur gauche de la bactérie)). Cependant, le faible nombre de localisation prévient l'analyse photophysique non biaisée du fluorophore.

11.6 Paramètres des simulations de jeux de données PALM

Table 11.3 – Paramètres utilisés pour la simulation des jeux de données PALM

Paramètres	
Puissance du laser de lecture	30 mW
FWHM du laser de lecture	50 μm
Longueur d'onde du laser de lecture	561 nm
Polarisation du laser	circulaire
Ouverture numérique de l'objectif	1.49
Indice optique de l'huile à immersion	1.51
Taille du pixel	100 x 100 nm
Bruit	2 photons/pixel/image
Auto-fluorescence	10 photons/pixel/image
Temps d'acquisition	30 ms
Nombre d'images	6000
Densité moléculaire per μm^2	545
Rendement quantique de fluorescence	0.55
Rendement quantique de photoblanchiment	5×10^{-6}
Rendement quantique de scintillement	2×10^{-5}
Vitesse de retour <i>off</i> \rightarrow <i>on</i>	20 s^{-1}

11.7 Hétérogénéité du profil laser et distorsion des courbes cumulatives

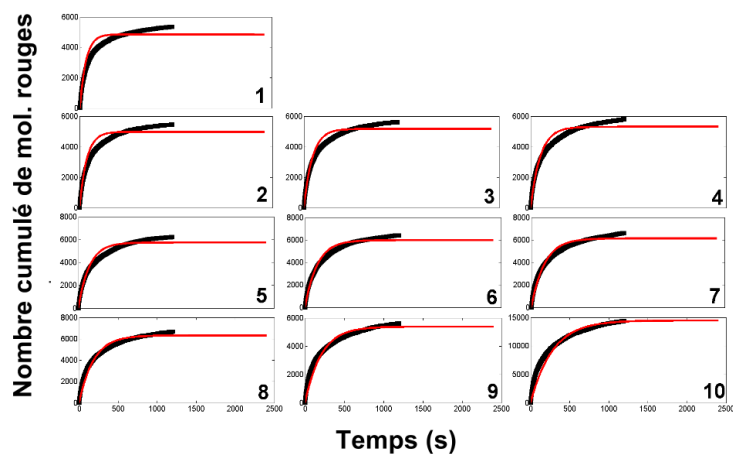


Figure 11.17 – Effet de l'hétérogénéité laser sur les courbes cumulatives de photoconversion Les courbes cumulatives sont construites à partir des molécules situées dans des régions où la densité de puissance laser est homogène. Dans ces conditions, les courbes cumulatives présentent encore un comportement biphasique suggérant que l'hétérogénéité du profil laser n'est pas suffisante à expliquer la distorsion des courbes cumulatives. Les données expérimentales sont représentées en noir et le modèle mono-exponentiel en rouge.

11.8 Découpage du profil laser en régions concentriques à illumination homogène

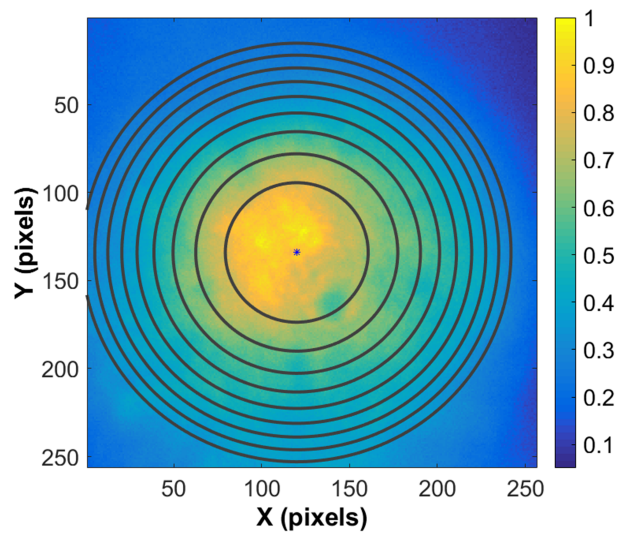


Figure 11.18 – Découpage du profil laser en régions concentriques La région centrale est numérotée 1, la région périphérique est notée 10. La densité de puissance dans chaque région est relativement homogène.

11.9 Effet de l'orientation de l'arginine 66 sur la cinétique de photoconversion

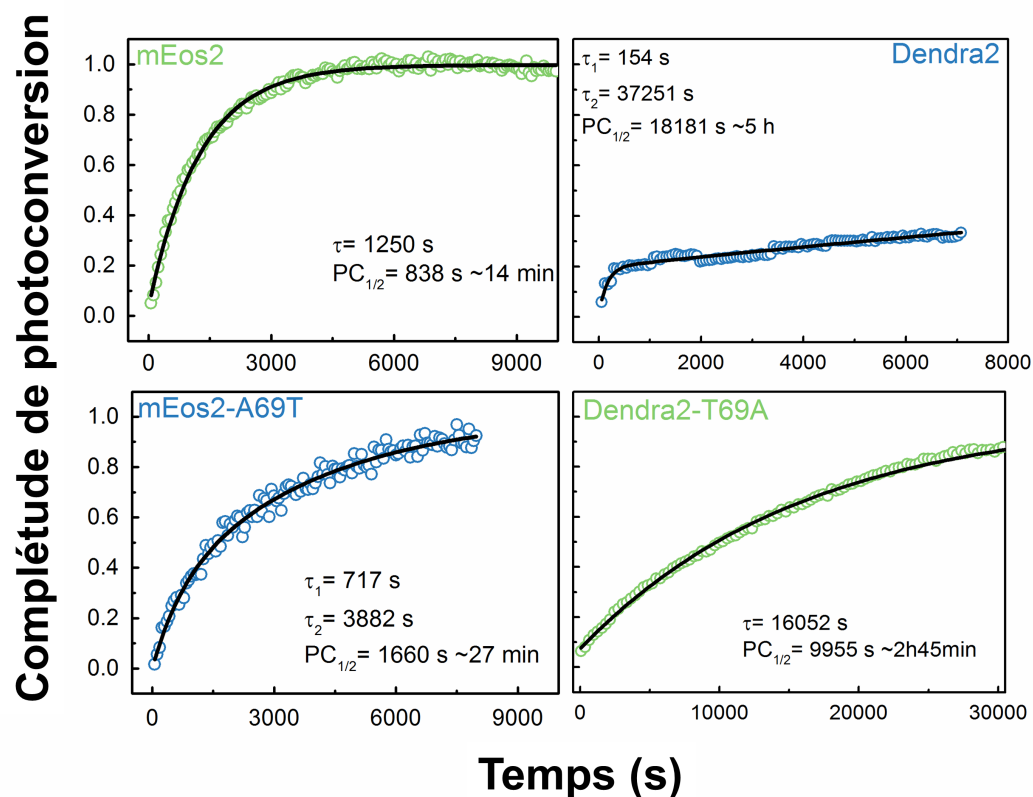


Figure 11.19 – Cinétiques de photoconversion des PCFPs mEos2, mEos2-A69T Dendra2 et Dendra2-T69A suivies par spectroscopie d'absorbance. Les spectres d'absorption des échantillons en cuvettes sont collectés sous illumination diffuse de lumière violette (405 nm) de faible intensité ($\sim 1 \mu W$). Les données sont normalisées par rapport à la valeur de l'asymptote à $+\infty$ du modèle mono- ou bi-exponentiel ajusté aux courbes. Les temps caractéristiques sont reportés ainsi que le temps de demi complétude ($PC_{1/2}$; *i.e.* temps nécessaire à ce que la moitié de la quantité attendue de fluorophores rouges soit atteinte).

11.10 Publications de thèse

11.10.1 Avilov et al., PlosOne, 2014



In cellulo Evaluation of Phototransformation Quantum Yields in Fluorescent Proteins Used As Markers for Single-Molecule Localization Microscopy

Sergiy Avilov^{1,2,3}, Romain Berardozi^{1,2,3}, Mudalige S. Gunewardene⁴, Virgile Adam^{1,2,3}, Samuel T. Hess^{4*}, Dominique Bourgeois^{1,2,3*}

1 Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France, **2** CNRS, IBS, Grenoble, France, **3** CEA, DSV, IBS, Grenoble, France, **4** Department of Physics and Astronomy, University of Maine, Orono, Maine, United States of America

Abstract

Single-molecule localization microscopy of biological samples requires a precise knowledge of the employed fluorescent labels. Photoactivation, photoblinking and photobleaching of phototransformable fluorescent proteins influence the data acquisition and data processing strategies to be used in (Fluorescence) Photoactivation Localization Microscopy ((F)-PALM), notably for reliable molecular counting. As these parameters might depend on the local environment, they should be measured *in cellulo* in biologically relevant experimental conditions. Here, we measured phototransformation quantum yields for Dendra2 fused to actin in fixed mammalian cells in typical (F)-PALM experiments. To this aim, we developed a data processing strategy based on the clustering optimization procedure proposed by Lee et al (PNAS 109, 17436–17441, 2012). Using simulations, we estimated the range of experimental parameters (molecular density, molecular orientation, background level, laser power, framerate) adequate for an accurate determination of the phototransformation yields. Under illumination at 561 nm in PBS buffer at pH 7.4, the photobleaching yield of Dendra2 fused to actin was measured to be $(2.5 \pm 0.4) \times 10^{-5}$, whereas the blinking-off yield and thermally-activated blinking-on rate were measured to be $(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ and $11.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$, respectively. These phototransformation yields differed from those measured in polyvinyl alcohol (PVA) and were strongly affected by addition of the antifading agent 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). In the presence of DABCO, the photobleaching yield was reduced 2-fold, the blinking-off yield was decreased more than 3-fold, and the blinking-on rate was increased 2-fold. Therefore, DABCO largely improved Dendra2 photostability in fixed mammalian cells. These findings are consistent with redox-based bleaching and blinking mechanisms under (F)-PALM experimental conditions. Finally, the green-to-red photoconversion quantum yield of Dendra2 was estimated to be $(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ *in cellulo* under 405 nm illumination.

Citation: Avilov S, Berardozi R, Gunewardene MS, Adam V, Hess ST, et al. (2014) *In cellulo* Evaluation of Phototransformation Quantum Yields in Fluorescent Proteins Used As Markers for Single-Molecule Localization Microscopy. PLoS ONE 9(6): e98362. doi:10.1371/journal.pone.0098362

Editor: Kurt I. Anderson, The Beatson Institute for Cancer Research, United Kingdom

Received: February 21, 2014; **Accepted:** May 1, 2014; **Published:** June 10, 2014

Copyright: © 2014 Avilov et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: D.B. acknowledges financial support by the ANR (ANR-2011-BSV5-012-01 NOBLEACH). S.T.H. and M.S.G. were supported by U.S. National Institutes of Health grants K25-AI65459 and R15-GM094713, U.S. National Science Foundation grant CHE0722759, Maine Technology Institute grants MTA1106 and MTA12061, and the Maine Economic Improvement Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sam.hess@umit.maine.edu (SH); dominique.bourgeois@ibs.fr (DB)

Introduction

Single-molecule localization fluorescence microscopy [1,2,3,4] has become a central tool to investigate cells with unprecedented spatial resolution. In (Fluorescence) Photoactivation Localization Microscopy (F)-PALM (hereafter referred to as PALM), genetically encoded phototransformable fluorescent proteins (PTFPs) are used to sequentially localize individual emitters with sub-diffraction accuracy, so as to reconstruct a super-resolved image of pointillistic character. During data-acquisition, the density of emitting fluorescent molecules depends on a number of photophysical processes, including photoactivation, reversible blinking and irreversible bleaching. A thorough characterization of these processes is particularly crucial in quantitative studies aiming at counting molecules, as recently shown for proteins forming multimeric cell machineries [5,6], found in organelles of sub-

diffraction size [7] or arranged in clusters smaller than the diffraction limit [8,9]. (For a review see [10]).

In this work, we establish the feasibility of measuring phototransformation quantum yields of PTFPs directly in cells using standard PALM microscopy. A few previous studies have measured photobleaching yields of non-phototransformable fluorescent proteins at the single-molecule level, typically *in vitro* to ensure a sufficiently sparse molecular density [11,12,13,14,15]. A wide range of values (10^{-5} – 10^{-6}) were obtained, sometimes for the same protein using different protocols [12,13]. It was proposed that the experimental conditions and notably the employed single-molecule immobilization technique could alter the photophysical properties of the FP under study. In the case of green-to-red photoconvertible fluorescent proteins (PCFPs), an important PTFP's subclass of common use in PALM microscopy, an estimate of the photobleaching quantum yield of mEosFP was obtained ($\Phi = 3 \times 10^{-3}$) using BSA surface-immobilization [16], and it was

suggested in the case of mEos2 and pcDronpa2 [17] that bulk measurements of photobleaching yields may not be valid in single-molecule microscopy conditions. The photoconversion quantum-yield of PCFPs was measured in the case of KikGR [18] and its monomeric variant mKikGR [19] in solution or in gels, giving values of the order of $\sim 5 \times 10^{-3}$. Other careful studies on e.g. Kaede [20] or EosFP [16] did not provide explicit values for photoconversion quantum yields. Recently, estimates of photoconversion efficiencies, another important parameter accounting for the total fraction of fluorescent molecules able to undergo a transition to the active (red) state, were obtained *in cellulo* for various PCFPs, but again no quantum yield was provided [21].

Since the seminal work by Dickson *et al* [22], the blinking behavior of a number of FPs was investigated by fluorescence correlation spectroscopy [12,23,24,25], concentrating on fast (\sim kHz) rather than slow blinking regimes (\sim 1–10 Hz). The occurrence of long-lasting dark states has been noticed [26,27,28], but no quantum yields for the corresponding *on-off* transitions have been reported. Long-lasting dark states of PTFPs deserve special attention because they are detrimental to PALM microscopy and single-particle tracking experiments. In PALM, clustering and molecular overcounting artifacts induced by slow blinking of mEos2 or PA-GFP have been recognized in a number of seminal studies [27,29,30]. Indeed, transient dark states with lifetimes exceeding the typical framerate in PALM data acquisition (10–50 ms) cause single emitters to appear several times during a given data acquisition. To correct for these blinking-induced artifacts, several strategies have been proposed based on grouping fluorescence bursts that appear close in space and time. Annibale *et al* [31] used an approach in which the fluorescence traces from spatially close spots are subdivided whenever an off-time exceeding a given threshold t_d is reached, resulting in a number of sub-traces $N(t_d)$. The true number of molecules is then obtained by fitting the $N(t_d)$ curve with a semiempirical model accounting for blinking. A variant of this technique based on grouping spots with Kalman filtering was developed by Lando *et al* [32]. To accurately group spots in both the temporal and spatial dimensions, Coltharp *et al* [33] used another empirical strategy based on calculating a Jaccard index as a function of two thresholding variables, t_{Thres} and d_{Thres} . The optimum t_{Thres} and d_{Thres} are then applied to the entire data set, independent of the local molecular density. Recently, an elegant method was introduced by Lee *et al* [8] that proposes to subdivide molecular fluorescence traces based on a cutoff value τ_c which is dependent on the FP photobleaching and photoblinking rates as well as the local density of molecules. The optimum cutoff value $\tau_{c,opt}$ giving rise to a minimal counting error is obtained by an iterative procedure, the actual number of molecules in each evaluated spot cluster being the unknown. In this approach, bleaching and blinking rates of the PTFPs are obtained from *in vitro* experiments in which the molecular density can be kept sparse enough to prevent spatial overlap between molecules. None of the above techniques, however, was designed to extract the actual photoblinking quantum yields of the employed PTFPs *in cellulo*.

Overall, although the importance of evaluating PTFP's photophysics in biologically relevant experimental conditions is increasingly recognized [7,32,33], a method to quantitatively evaluate their phototransformation yields in densely labeled cells is still lacking. Such *in cellulo* evaluation would facilitate accurate molecular counting and have a fundamental interest for the mechanistic investigation of FP photophysics and the future design of improved variants.

On the structural standpoint, the photoconversion mechanism of green-to-red PCFPs such as Kaede [34], Dendra2 [35,36], mEos2 [37], mKikGR [19], mClavGR2 [38], mMaple [39],

pcDronpa2 [17] and their variants has been well characterized, involving a light-induced breakage of the protein backbone next to the chromophore which results in irreversible elongation of its electron conjugation through a β -elimination reaction [16,34,40,41]. In contrast, the precise blinking and bleaching mechanisms of these FPs remain incompletely understood, despite recent structural studies of IrisFP, a variant of EosFP [42,43,44]. Overall, investigations of blinking in FPs has been lagging behind those of organic dyes typically used in (direct) STochastic Optical Reconstruction Microscopy ((d)STORM) [45,46,47]. A large body of work has demonstrated that organic dye photophysics is strongly dependent on environmental parameters such as pH, presence of molecular oxygen or redox partners, attachment to protective agents [45,47,48] and even the nature of the molecule labelled by the dye [49]. Although the 4-(*p*-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone (*p*-HBI) chromophore in fluorescent proteins is to some extent protected from the external medium by the β -barrel matrix, recent evidence has been provided that such environmental dependence also applies to FPs. Redox agents [50,51,52], pH [23,25], temperature [53], physicochemical parameters such as viscosity [54] and even external electric or acoustic fields [55] indeed have been shown to greatly modulate the photoconversion, photoblinking, photoswitching or photobleaching behavior of a number of FPs. Likewise, fixation conditions or type of fusion construct employed in biological cells could play a stringent role [56].

Performing *in cellulo* single-molecule measurements of PTFP's photophysics is not straightforward. Such measurements are typically hindered by unfavorable signal-to-noise ratio of the detected fluorescence, and by the potentially high density of labeled molecules. In PALM, due to residual activation by the readout laser beam, a sufficiently sparse distribution of activated molecules in each frame is not guaranteed. To extract phototransformation yields, the photoexcitation rates of individual molecules need to be assessed, which requires the precise knowledge of not only their extinction coefficients but also of the local laser power-density and polarization (which in turn complicates the use of a TIRF geometry). Fluorescent molecules might adopt a variety of orientations, and the strong dependences on dipole orientation of both photon absorption and fluorescence response need to be taken into account. Finally, the inhomogeneity of the chemical nanoenvironment in the cell may result in multiple photophysical behaviors coexisting within the sample.

Here, we propose a method to tackle these difficulties. To estimate the phototransformation quantum yields of green-to-red PCFPs *in cellulo*, we devised a strategy based on an extension of the τ_c optimization approach of Lee *et al* [8]. The performance of our approach was evaluated by performing extensive simulations, so as to establish a range of experimental conditions for which the method is expected to work reliably. The phototransformation yields of Dendra2 fused to actin were then measured in fixed mammalian cells, and compared to those of Dendra2 embedded in a poly-vinyl alcohol (PVA) matrix, in the presence or absence of the antifading agent 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO).

Methodology

Generation of simulated data

To generate simulated data, comprehensive PALM simulation software was written in Matlab (Figure S1, Scripts S1), with additional features as compared to similar software developed to date (see e.g. [31,33,57]). A chosen number of dye molecules are randomly placed on a defined image pattern (typically a segmented nanoscopy image), so as to control dye molecular

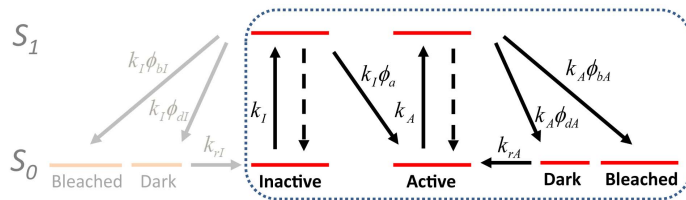


Figure 1. Photophysical model of Dendra2 phototransformations. The inactive state represents the neutral state of the green chromophore whereas the active state represents the anionic state of the photoconverted red chromophore. Fast exchange is assumed between protonated and neutral states of the chromophore. Possible bleaching pathways through the reversible dark state are neglected, as well as blinking and photobleaching pathways involving inactive molecules (in gray). doi:10.1371/journal.pone.0098362.g001

density. The photophysical properties of the fluorescent markers (mostly phototransformable fluorescent proteins) are defined in a database containing parameters such as excitation and fluorescence emission spectra, fluorescence quantum yield, phototransformation action spectra as well as photoconversion, on-off photoswitching, photoblinking and photobleaching quantum yields. Properties of the PTFP's chromophores in their anionic and neutral states are distinguished and simulations at various pHs can be performed. The orientation of the chromophore dipoles can be selected as “tumbling” (emitters are freely rotating, representative of e.g. a live cell), “fixed” (emitters assume a random orientation, but constant over time, representative of e.g. a fixed cell), or “uniform” (emitters adopt the same dipole orientation, constant over time, representative of e.g. oriented molecules in a fixed or live cell).

The experimental setup is simulated by a number of parameters describing laser illumination, microscope optical properties and detector characteristics. Four laser beams with Gaussian spatial profiles within the focal plane can be defined (i.e. for activation, switching, back-switching and readout), with chosen wavelengths, powers, polarization (circular or linear) and FWHM (full width at half maximum). Complex laser sequence patterns can be generated during data collection, such as for example pre-bleaching steps with the readout laser, and ramping-up or a Fermi profile [8] for the activation laser. The microscope is described by an objective of given numerical aperture \mathcal{NA} , which is assumed to give rise to a Gaussian point spread function (PSF) with standard full width at half maximum ($FWHM = 1.22\lambda/\mathcal{NA}$ where λ is the emission wavelength). The photon collection efficiency takes into account the orientation of the emitting dipoles based on Fourkas *et al* [58]. Transmission efficiencies of inserted emission filters, as well as overall transmission efficiency of the optical setup are also taken into account. The EMCCD detector is described by the effective pixel size, dark current noise, readout noise and gain (counts/detected photon).

PALM data sets with a defined framerate and number of frames can then be generated. For each single-molecule emission, the spatial (throughout the microscope PSF) and spectral (throughout the emission spectrum) distributions of emitted photons are calculated based on poissonian statistics. A defined level of poissonian autofluorescence background, optionally proportional to the local illumination power density, can be input. The program outputs the stack of acquisition frames, diffraction limited images, laser illumination profiles, and for each activated molecule, its x and y coordinates, fluorescence emission trace, the number of detected photons and an estimate of the signal-to-noise ratio.

Additional features, not of direct use for the current work, include possibilities to simulate dual-channel detection, two-color experiments (with two different fluorescent markers), sample drift, single-molecule Förster resonance energy transfer (FRET) between two fluorescent markers, and local activation/bleaching similar to what can be achieved with a Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) module.

Biophysical model

To extract the phototransformation yields of green-to-red photoconvertible fluorescent proteins, the photophysical model of Figure 1 is assumed. The inactive state of the marker corresponds to the green protonated chromophore whereas the active state corresponds to the red anionic chromophore. The green anionic chromophore (non-photoconvertible) and the red neutral chromophore (non-fluorescent) are thought not to play a role and are therefore not considered. However, rapid exchange between anionic and neutral chromophores relative to the acquisition framerate is assumed so that the rates of excitation in either the inactive or active states are evaluated based on extinction coefficients experimentally measured at a given pH.

Our photophysical model assumes that pathways leading to reversible dark states and to nonreversible bleached states are independent, similar to the approach taken by other groups [8,33]. In doing so, we thus neglect the hypothesis that photobleaching may follow from photochemical transformation of a long-lived dark state. Although such an hypothesis has been proposed in several photophysical schemes [59,60], we adopt this simplification based on our recent mechanistic investigations of IrisFP for which the major photobleaching pathways were suggested to differ from that leading to long-lived dark states [44].

In the model of Figure 1, the recovery from the dark to the active state is characterized by a single rate k_{rA} and does not incorporate a quantum yield. This stems from the fact that in the absence of 405 nm light (readout activation mode) or in the presence of weak 405 nm light (typically used in PALM data acquisition), the process is essentially thermally induced (ref [8] and our own data (not shown)).

Finally, the model also assumes that blinking and bleaching following excitation of the inactive chromophore are negligible (Figure 1, left gray part). Such an assumption is justified because typical photoconversion yields measured to date are at least one order of magnitude higher than blinking and bleaching yields. Thus, the pool of inactive molecules competent for photoconversion is expected to be only marginally reduced at a given time. In addition, the various states of the inactive chromophore cannot be easily separated, as none of them fluoresces upon excitation by the readout laser.

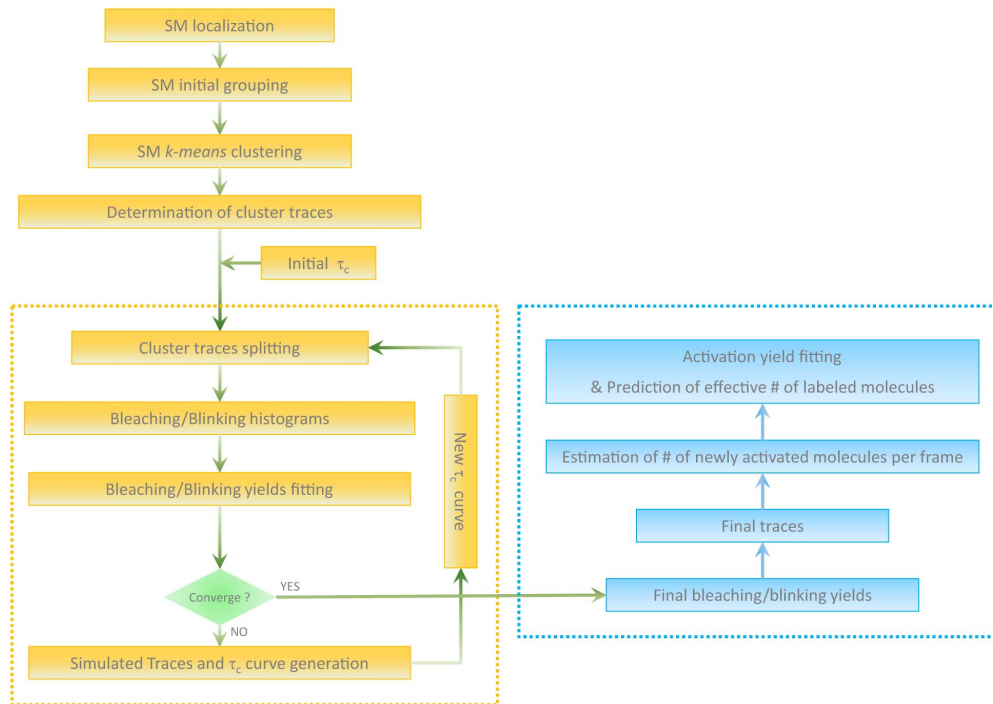


Figure 2. Sketch of the processing pipeline.
doi:10.1371/journal.pone.0098362.g002

Experimental setup

A home-built PALM set-up was used based on an Olympus IX81 microscope (Olympus, Japan) equipped with diode-pumped solid-state 405 nm (CrystaLaser LC, USA), 488 nm (SpectraPhysics, USA) and 561 nm (Cobolt Jena, Sweden) lasers. Widefield illumination was achieved by focusing the laser beams to the back focal plane of a $60\times 1.45 NA$ oil immersion apochromatic objective lens (Olympus, Japan). The intensity and time-sequence of laser illumination at the sample was tuned by an acousto-optical tunable filter (AOTF, Quanta Tech, USA). Near circular polarization of the laser beams was ensured by inserting a polychromatic quarter-wave plate downstream the AOTF. To prevent sample drift during data acquisition, the samples were placed on an IX2-NPS “nosepiece” stage (Olympus) fixed directly on the objective. Fluorescence images were acquired with an Evolve back-illuminated EMCCD camera (Photometrics, USA) controlled by the Metamorph software (Molecular Devices, USA).

Sample preparation

***In vitro* samples.** Purified Dendra2 was diluted to nanomolar concentration in a pre-photobleached 1% solution of PVA in PBS at pH 7.4. Where appropriate, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (Sigma, USA) was added to a final concentration of 10 mM. The solution was spread as a thin film on a coverslip and let to harden at ambient temperature before PALM data acquisition. Control experiments with PVA devoid of Dendra2 showed no blinking single molecule (Figure S2).

***In cellulo* samples.** Mammalian cells were grown on conventional coverslips or LabTek II 8-well chambered coverslips #1.5 (Nalgen-Nunc, USA). Before seeding the cells, LabTek chambers or coverslips were washed 3 times with 80% acetone in water, 100% methanol and milliQ water, immersed in 1 M solution of KOH overnight, and thoroughly washed with milliQ water. For expression of Dendra2-actin chimera in mammalian cells (HeLa Kyoto and Vero), we used the plasmid Dendra2-actin/pMC1 (described earlier [61]), which encodes for a humanized version of the Dendra2 gene from the pDendra2-C vector (Evrogen, Moscow, Russia). Cells were grown in complete Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM, Life technologies, USA) (4.5 g/L glucose, no phenol red) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Life technologies), 2 mM glutamine, 100 μ g/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 1 mM sodium pyruvate (all from Life technologies), in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. No vitamin was added to the cell culture medium, which however already contains a complete set of vitamins, including riboflavin and pyridoxal [52,62]. The cells were transfected with Dendra2-actin/pMC1 plasmids (0.5 μ g/well) using Lipofectamine2000 (Invitrogen, USA) or FuGeneHD (Roche, Switzerland) as transfection reagents. At 24 to 48 hours post-transfection, the cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma, USA) at 20°C for 30–60 min, washed with PBS 3 times, permeabilised with a 0.1% solution of Triton \times 100 in PBS, and washed with PBS for another 3 times. Where appropriate, DABCO (Sigma, USA) was added to a final concentration of 10 mM. Cells were kept under pre-

photobleached PBS at pH 7.4 during PALM data acquisition. The molecular oxygen level was in equilibrium with ambient atmosphere. The coverslips were mounted on microscopy slides using Parafilm gaskets and sealed with nail polish.

Data acquisition

Reference laser beam profiles were recorded before each experiment using a coverslip uniformly marked with a fluorescent pencil. PALM datasets were acquired at room temperature (20–22°C) using two illumination schemes: 1) continuous illumination with 561 nm laser, which served both to photoconvert Dendra2 fluorophores and to readout the fluorescence of the activated red form; 2) continuous illumination with 561 nm and 405 nm laser. The power density at the focal plane was measured in each experiment and was typically $\sim 5\text{--}7\text{ kW/cm}^2$ at beam center for the 561 nm laser and $\sim 0.1\text{--}1\text{ W/cm}^2$ for the 405 nm laser. Data sets were acquired at 30 ms/frame.

Processing pipeline

To determine the on-off blinking quantum yield, the off-on blinking rate, the photobleaching quantum yield as well as the photoconversion “brightness” (see below) of the fluorescent marker, the processing pipeline sketched in Figure 2 was developed in Matlab (Scripts S1).

Single-molecule localization is first performed based on standard 2-D Gaussian fitting of the diffraction-limited fluorescence spots, after rolling ball background subtraction. In addition to the precise localization of the fluorescent molecules, attention here is focused on extracting their accurate fluorescence traces. Indeed, removing a poorly localized spot from the dataset may result in introducing a glitch in a fluorescence trace, which would later be interpreted as a blinking event. Such problems may occur in the case of low signal-to-noise ratio or when multiple spots overlap at high molecular density. We modified our PALM localization software to carefully select spots judged appropriate for trace reconstruction (e.g. by setting criteria to allow center-of-mass based localization instead of rejection in the case of poor Gaussian fitting).

The next step consists of grouping localized spots found in subsequent frames, so as to constitute initial clusters of spots from which the most probably correct number of individual molecules and their associated fluorescence time traces can be extracted based on τ_c splitting. To achieve initial clustering, localized spots are first connected in space and time according to coarse threshold criteria $d(s_1, s_2) < 5\sigma$, where $d(s_1, s_2)$ is the distance between spots s_1 and s_2 and σ is the localization uncertainty, and $t(s_1, s_2) < 5\tau$ where $t(s_1, s_2)$ is the time separation between spots s_1 and s_2 and τ is the maximum expected molecular lifetime. (We noticed that a more stringent distance criteria (e.g. 3σ) repeatedly leads to misclustering events.) However, such connection patterns can quickly lead to large groups of spots that spread over unrealistically large distances, especially in densely labeled and continuous biological structures. To subdivide such groups of spots into meaningful initial clusters, we developed an algorithm based on *kmeans* clustering analysis. Figure S3 shows an example of how densely packed localized spots are distributed into initial clusters.

Once initial clusters are determined, their fluorescence time traces can be built. We then use an approach similar to that introduced by Lee et al [8] to optimally estimate the number of molecules that constitute each cluster and extract their respective time traces. This approach consists of splitting cluster traces at every off-time τ_{off} that is larger than a cutoff value τ_c , so that the molecular counting error is minimized. The optimum τ_c value has been shown to depend both on the blinking and bleaching rates of

the fluorescent label and on the number N of labels present in the cluster [8]. As N is unknown, an iterative procedure was proposed, based on the computation of an optimal “ τ_c -curve”, $\tau_{c,opt} = f(N)$, which was shown to rapidly converge to the correct number of molecules. Importantly, Lee et al construct their τ_c -curve based on photophysical parameters of the fluorescent markers that are independently measured *in vitro*. In marked contrast, our goal is precisely to assess these parameters *in cellulo*. Thus, the following global iterative procedure was developed (Figure 2, orange dashed line). First, an initial fixed τ_c value (e.g. 0.2 s) is used to split all cluster traces in the dataset so as to obtain a starting set of individual molecular fluorescence traces. These individual traces are then processed to extract bleaching and blinking histograms: $N_{bleach} = h(T_{bleach})$, $N_{on} = h(T_{on})$, $N_{off} = h(T_{off})$, where T_{bleach} , T_{on} and T_{off} represent the time before irreversible bleaching, blinking off, and blinking on, respectively, and N_{bleach} , N_{on} and N_{off} represent the number of events within given ranges of T_{bleach} , T_{on} and T_{off} . Based on our photophysical model (Figure 1), and on the proper evaluation of the spatially- and dipole-orientation-dependent molecular excitation rates (see below), these histograms can be fitted to extract a first evaluation of bleaching and on-off blinking quantum yields, as well as a rate for thermally activated off-on blinking. The self-consistency between these quantum yields can be verified by computing a blinking probability histogram, $P = h(N_{blink})$, where N_{blink} represents the number of blinking events per molecule, and which is expected to follow a geometric distribution $P(N_{blink} = n) = \eta^n (1 - \eta)$ with $\eta = \frac{\Phi_{dA}}{\Phi_{dA} + \Phi_{bA}}$ [8]. From the knowledge of Φ_{bA} , Φ_{dA} , k_A and k_{rA} it is then possible to generate a first τ_c -curve, which is used to split again the cluster traces. The whole procedure is repeated until convergence, which typically requires less than 5 cycles. At the end of the process, final quantum yields and associated standard deviations are obtained, together with a quantitative evaluation of the total number of activated molecules. The number of newly activated molecules in each frame also becomes available, which allows for an estimation of the photoconversion brightness (see below) and the total number of (correctly matured) labeling molecules in the sample.

Evaluation of excitation rates

To accurately fit bleaching and blinking histograms, a proper evaluation of the spatially- and dipole-orientation-dependent molecular excitation rate is necessary. The excitation rate [s^{-1}] of a rapidly tumbling molecule located at position (x, y) is given by: $k = \varepsilon P \lambda \frac{(10^{-6}) L n(10)}{N_A h c}$ where ε [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] is the extinction coefficient of the considered species (I or A molecules) at the excitation wavelength λ [nm], P [Wcm^{-2}] is the laser power-density at (x, y) , N_A is the Avogadro number, h is the Planck constant and c is the speed of light. In this work, chromophore extinction coefficients were derived from published reference values and fluorescence excitation or absorbance spectra at given pHs [61].

For a fixed oriented molecule with spherical coordinates θ and φ , the excitation rate of the absorbance dipole is angle dependent. For a circularly polarized laser beam whose electromagnetic field is assumed to be parallel to the objective focal plane, the excitation rate is given by: $k_\theta = \frac{3}{2} k \cos^2 \theta$, where θ is measured from the focal plane. For a linearly polarized laser beam whose electromagnetic field is in the objective focal plane and aligned with the x axis, the excitation rate becomes: $k_{\theta, \varphi} = 3k \cos^2 \theta \cos^2 \varphi$ (see Appendix S1).

To handle the spatial heterogeneity of the laser beam under widefield illumination conditions, lasers operating in the TEM₀₀

mode are assumed. In such a case, the intensity distribution is Gaussian, and experimentally recorded laser beam profiles can be fitted for their center x_c, y_c and their $1/e^2$ radii r_x, r_y . The power density at every single molecule positioned at x_0, y_0 (taken as the average of the x, y coordinates of the localized spots constituting the molecule) is then obtained as:

$$P(x_0, y_0) = \frac{2P_T}{\pi r_x r_y} \exp \left\{ -2 \left[\frac{(x_0 - x_c)^2}{r_x^2} + \frac{(y_0 - y_c)^2}{r_y^2} \right] \right\}$$

where P_T is the total power measured at sample position. We note that the assumption of Gaussian beams is typically adequate in widefield illumination conditions, but not in Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) mode. In addition, the exponential decay of the electric field amplitude along the axial direction in TIRF mode and its complex polarization pattern would prevent a reliable evaluation of local excitation rates [63]. As a consequence, proper estimation of phototransformation yields is best achieved under widefield conditions, although at the expense of a lower signal-to-noise ratio.

In practice, to obtain reliable fits of the N_{bleach} and N_{on} histograms, molecules are sorted in a limited number of annular concentric subregions R_1, R_2, \dots, R_n in which $P(x, y)$ is considered homogeneous with average power density $P_i = \langle P(x, y) \rangle_{R_i}$. Global fits of the photobleaching and on-off blinking quantum yields are then performed according to the following formula:

$$N_i(t) = N_0^i k_i \Phi \exp(-k_i \Phi t) \quad (\text{tumbling})$$

$$N_i(t) = \frac{3}{2} N_0^i k_i \Phi \times \int_0^{\pi/2} \cos^3 \theta \exp \left(-\frac{3}{2} k_i \cos^2 \theta \times \Phi t \right) d\theta \quad (\text{fixed, circular})$$

$$N_i(t) = 3N_0^i k_i \Phi \times \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} \cos^3 \theta \cos^2 \varphi \exp(-3k_i \cos^2 \theta \cos^2 \varphi \times \Phi t) d\theta d\varphi \quad (\text{fixed, linear})$$

Obtaining the thermally activated rate for return from the dark state, k_{rA} , is simpler because there is no dependence on chromophore position or dipole orientation: assuming a homogeneous population of molecules: $N(t) = N_0 k_{rA} \exp(-k_{rA} t)$.

Determination of photoconversion brightness under readout laser illumination

As already mentioned, once optimal splitting of the cluster's traces is achieved, the number of newly activated molecules per frame along data collection can be extracted. In the presence of readout excitation only, and assuming constant illumination during the acquisition time, the green-to-red photoconversion yield Φ_a as well as the total number of labeled molecules present in the investigated sample area can in principle be obtained. In the case of rapidly tumbling molecules, the accumulated number of activated molecules along time $N_A(t)$ can be fitted according to:

$$N_A(t) = N_0 [1 - \exp(-k_I \Phi_a t)]$$

where N_0 is the total number of labeled molecules and k_I is the excitation rate of inactive molecules by the readout beam. However, a difficulty is that it is practically impossible to accurately estimate the extinction coefficient of the inactive molecules (green protonated chromophores) at the readout

excitation wavelength (typically 561 nm), ϵ_{561} (Figure S3). This stems from the fact that, in this wavelength region, the absorbance spectrum of protonated green molecules (which exhibits a broad band centered at ~ 400 nm) cannot be reliably measured, even at very low pH, because not only is it very weak but also it is always obscured by residual overlapping absorbance from anionic chromophores. One solution to get around this problem is to report the photoconversion brightness, instead of the photoconversion quantum yield, defined as $\phi_a = \epsilon_{561} \Phi_a$. Indeed, the quantity that can be accurately fitted is $k_I \Phi_a$, and thus the photoconversion brightness is given by $\phi_a = 5.21 \times 10^4 k_I \Phi_a / P\lambda$. Overall, similarly to the fitting procedure for retrieving photobleaching and on-off blinking quantum yields, the photoconversion brightness and total number of labeled molecules are obtained according to the following formula:

$$N_A^t(t) = N_0^t \times [1 - \exp(-1.92 \times 10^{-5} \times \lambda P^t \times \phi_a t)] \quad (\text{tumbling})$$

$$N_A^t(t) = N_0^t \times \int_0^{\pi/2} \cos \theta \left[1 - \exp \left(-\frac{3}{2} \cos^2 \theta \times 1.92 \times 10^{-5} \times \lambda P^t \times \phi_a t \right) \right] d\theta \quad (\text{fixed, circular})$$

$$N_A^t(t) = N_0^t \times \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} \cos \theta \left[1 - \exp \left(-3 \cos^2 \theta \cos^2 \varphi \times 1.92 \times 10^{-5} \times \lambda P^t \times \phi_a t \right) \right] d\theta d\varphi \quad (\text{fixed, linear})$$

Determination of photoconversion quantum yield under 405 nm activation laser

In the presence of weak 405 nm activation, the same procedure as described above can be used as long as the density of activated

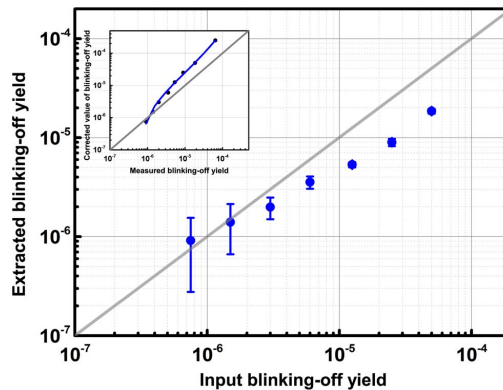


Figure 3. Accuracy of blinking-off quantum yield retrieval. Extracted blinking-off quantum yields are plotted against a range of input yields used in a series of simulated PALM data sets. Those simulated data sets were generated using parameters displayed in Table S1 (except for the varying blinking off input yield). Error bars represent fitting errors. Yield retrieval for highly blinking molecules underestimates the true values, due to the limited time-resolution in PALM experiments. For weakly blinking molecules, retrieval accuracy is superior, but precision is worsened (larger error bars) because of statistical uncertainty due to low numbers of blinking molecules. The inset shows the same curve in an inverted manner. A polynomial fit to the data points provides a potential calibration curve allowing, in real experiments, to estimate the true yield from the extracted yield. doi:10.1371/journal.pone.0098362.g003

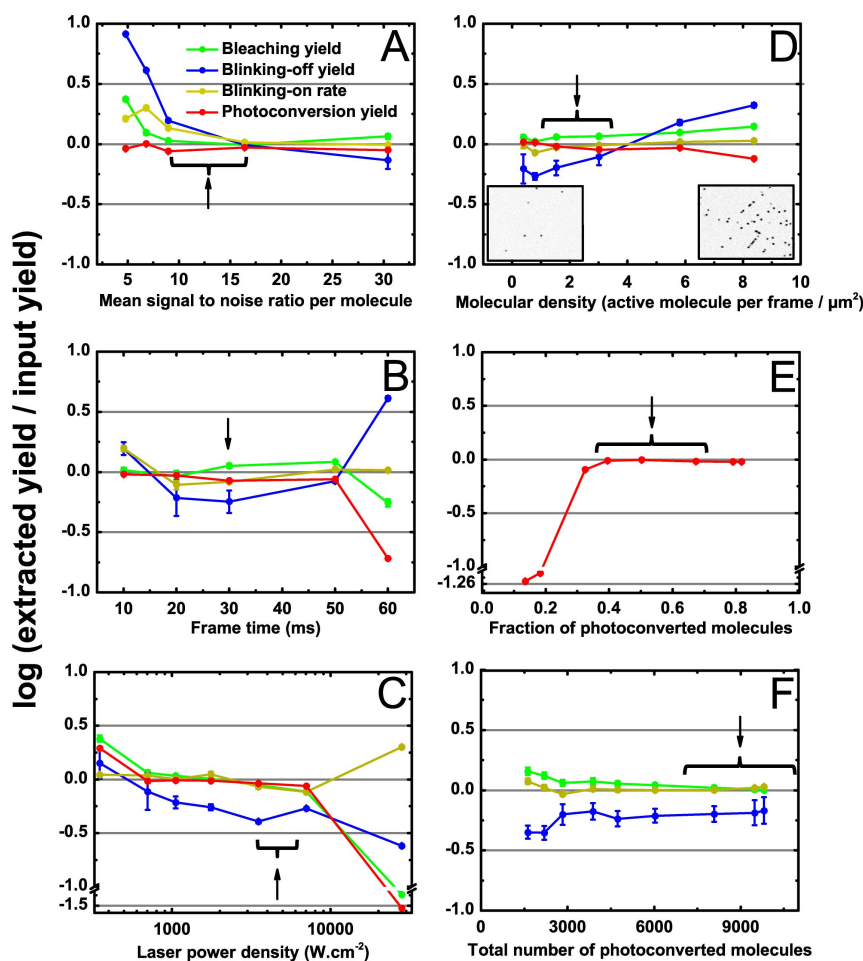


Figure 4. Effect of experimental parameters on accuracy of phototransformation yield's retrieval. In each panel, extracted phototransformation yields are plotted against a key experimental parameter (signal to noise ratio per molecule (A), frametime (B), laser power (C), molecular density per frame (D), fraction of photoconverted molecules (E) and total number of photoconverted molecules (F)). In each case, PALM datasets were simulated using parameters of Table S1 (except for the varying parameter). Black: bleaching yield, blue: blinking-off yield, gray: blinking-on rate, red: photoconversion yield. Yield retrieval accuracy is estimated by the logarithm of the ratio between true and extracted yields and error bars represent fitting errors (with 95% confidence). In D, the insets show representative simulated frames at molecular densities of 1 and 8 active molecules per frame per square micron, respectively. In E, only the extracted photoconversion yield is shown, as the input parameter is not relevant to bleaching and blinking. In F, conversely, only extracted bleaching and blinking yields are represented. Experimental data discussed in this work have been obtained within ranges of conditions indicated by braces and/or black arrows. Molecular densities per frame cannot be easily assessed for experimental data and therefore reported values are only indicative.
doi:10.1371/journal.pone.0098362.g004

molecules in each frame can be managed. An apparent photoconversion brightness $\varphi_{a,app}$ can then be extracted (which results from photoconversion by both activation and readout lasers), from which the photoconversion quantum yield at 405 nm $\Phi_{a,405}$ can be estimated as: $\Phi_{a,405} \approx \frac{\varphi_{a,app}}{\epsilon_{405}} - 1.38 \times \frac{P_{561} t_{561}}{P_{405} t_{405}} \times \frac{\varphi_{a,561}}{\epsilon_{405}}$, where P_{561} and P_{405} refer to the power densities at beam center, t_{561} and t_{405} refer to exposure times and 1.38 is the ratio of the two wavelengths.

Results

Simulated data

To test the proposed strategy for estimating phototransformation yields, we first simulated a representative PALM data set using our Matlab-based simulation software. 30000 Dendra2 molecules were randomly spread over a microtubule-mimicking pattern (corresponding to a molecular density of 545 molecules/ μm^2) and 6000 frames with 30 ms exposure were generated using circularly polarized 561 nm laser excitation. No 405 nm activation laser was

used and, under readout laser activation, the green-to-red photoconversion brightness was set to $4.3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\Phi_a = 1.2 \times 10^{-4}$; $\epsilon_{567} = 3.57 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), so that the average density of activated molecules per frame amounted to $0.22/\mu\text{m}^2$. The simulated sample was assumed to be representative of a live cell, so that each Dendra2 molecule was modeled as freely tumbling. Input values for the bleaching yield, the blinking-off yield and the thermally activated blinking-on rate were taken as 2×10^{-5} , 5×10^{-6} and 20 s^{-1} respectively, close to the experimental values that can be extracted from Lee *et al* [8]. A complete list of parameters used to generate this PALM dataset is shown in Table S1. The simulated sample is shown in Figure S1.

The dataset was then submitted to the processing pipeline described above. Erroneous phototransformation yields and blinking-on rate were deliberately input to the fitting routines as starting values (with deviations by an order of magnitude relative to true values). Five concentric regions where the laser beam can be considered homogeneous were defined as shown in Figure S5. Convergence was achieved after 3 cycles and the final retrieved values are reported in Table S2 and compared with the “true” values used in the simulation. A representative τ_c -curve is shown in Figure S6 and histograms of the correlation coefficients between true and retrieved single-molecule traces are presented in Figure S7.

The photobleaching yield was retrieved with high-fidelity, with an error less than 1%. Recovery of the blink-on rate was also satisfactory (21.9 s^{-1} , 9% error). However, a substantial discrepancy was obtained between the retrieved and the true blink-off yields. The retrieved yield (3.6×10^{-6}) was smaller than the true yield, with an error of 28%. This finding is explained by the limited time-resolution of PALM data acquisition (see Discussion S1, Figure S8, and see below). Retrieval of the photoconversion brightness was fully satisfactory (4% error), allowing at the same time to extract an accurate estimation of the number of labeled molecules present in the sample (8% error), a crucial aspect in quantitative super-resolution microscopy [9], although this retrieved number does not take into account additional effects such as reporter misfolding or presence of a non-photoconvertible fraction of the labels [7,21].

Effect of dipole orientations and laser polarization

Two additional mock data sets were generated using the same set of parameters except that this time the simulated sample was assumed to be representative of a fixed cell: each Dendra2 molecule was assigned a random dipole orientation, constant over time. In the first dataset a circular polarization of the laser beam was assumed whereas a linear polarization was chosen in the second one. In both cases, using the appropriate fitting models, the quality of yield extraction followed the same trend as for tumbling molecules, although the overall accuracy was slightly lower for circular polarization and significantly lower for linear polarization (Table S3). This deterioration follows from the strong fluctuation in the ability of each molecule to absorb photons. The results were further degraded if a fitting model corresponding to tumbling molecules was used. This can be understood by inspection of Figure S9: in the case of molecules with fixed orientations and a circularly polarized laser, a few molecules experience a higher excitation rate than the average rate experienced by a tumbling molecule (i.e. due to an absorbance dipole parallel to the objective focal plane) or a lower rate (i.e. due to an absorbance dipole along the optical axis). As a consequence, these molecules systematically exhibit shorter or longer fluorescence time traces, slightly distorting the shape of the N_{bleach} and N_{on} histograms. In the case of a linearly polarized laser, this distortion is more pronounced

(Figure S9). Likewise, the shape of the cumulative plot of the number of photoconverted molecules along time is distorted when molecules adopt fixed orientations, as compared to tumbling molecules, and more so when the excitation laser is linearly polarized (Figure S9).

These simulated data highlight the importance of taking into account fluorophore dipole orientations in such studies. Nevertheless, based on the results presented in Table S3, we anticipate that, at least when circularly polarized lasers are used, errors made by assuming a somewhat incorrect molecular orientation model (as could be the case in biological samples) should be relatively small in comparison with other sources of errors (see below).

Retrieval of blinking-off yield

The noticeable underestimation of the blinking-off quantum yield in the above simulations calls for an investigation of the range of blinking yields that can be adequately retrieved under typical PALM data acquisition parameters. To this aim, we performed a number of simulations in which the blinking-off quantum yield was systematically varied, assuming a fixed cell with circularly polarized laser, and keeping all other parameters identical to those described above. The results (Figure 3) show that retrieval of the blinking-off yield progressively deviates from (underestimates) the true value as the latter is increased. This is explained by the fact that, as the input yield is increased, more and more short on-times events are missed due to the limited time-resolution of the experiment (see Discussion S1 and Figure S8). On the other hand, for low yields on the order of 1.0×10^{-6} (or rather $\frac{\Phi_{AA}}{\Phi_{BA}} < 1$), a significant statistical uncertainty is observed, due to the fact that very few molecules experience blinking, thus giving rise to noisy N_{on} histograms. Interestingly, Figure 3 suggests that in the range $\sim 2.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$ an accurate determination of the correct yield could be retrieved if a proper calibration is done. Calibration curves of the type shown in Figure 3 may be obtained from simulated data in which experimental parameters are reproduced faithfully, notably the rate of excitation of the fluorescent molecules and the acquisition framerate. Finally, Figure S11 shows that the correct extraction of the bleaching quantum yield, photoconversion brightness and off-on blinking rate are not significantly affected by the value of the blinking-off yield, except at very high blinking yield $> 1.0 \times 10^{-4}$.

Evaluation of suitable experimental parameters

In order to estimate experimental conditions suitable for accurate determination of phototransformation yields, a number of additional simulations were performed in which the same set of yields (representative of Dendra2) were input and the following key parameters were systematically varied: background level, frame-time, laser power, molecular density and number of frames. The results are presented in Figure 4.

Background level. High autofluorescence or background noise due to out-of-focus light is a serious concern when cellular samples are investigated using a widefield geometry. Such noise may prevent the detection of many fluorescent spots, which results in a significant number of single-molecule traces being chopped into shorter traces. This in turn translates into increased apparent bleaching and blinking yields. At medium signal-to-noise ratio (SNR , defined as the photon output of individual spots divided by the standard deviation of the background over the spot area), this effect actually compensates for the underestimation resulting from time truncation (see above), explaining why errors are not at their minimum in the absence of background noise (Figure 4A). Importantly, *in vitro* data reported in this work typically match

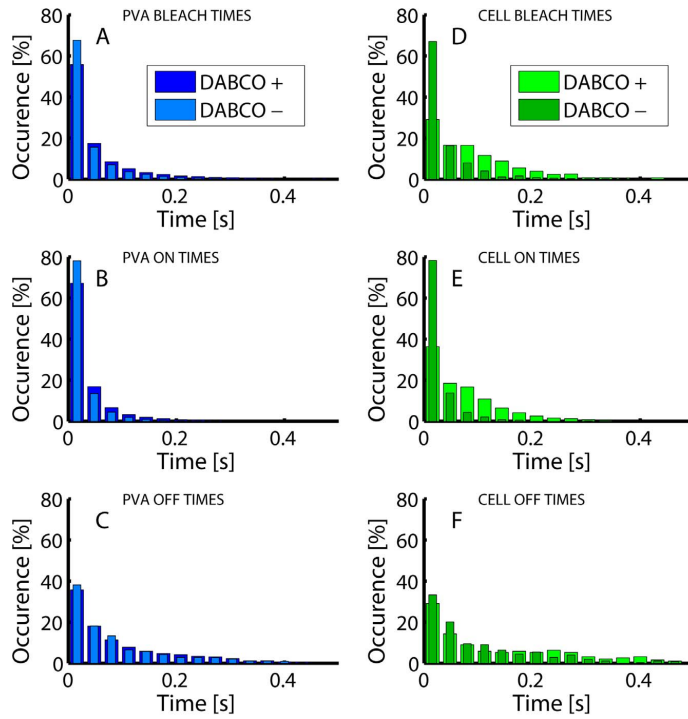


Figure 5. Representative histograms of N_{bleach} , N_{on} , N_{off} from *in vitro* and *in vivo* Dendra2 photophysics. A–C: PVA-embedded Dendra2 in the absence and in the presence of 10 mM DABCO; **D–F:** Fixed Vero cells expressing Dendra2-actin, in the absence and in the presence of 10 mM DABCO. doi:10.1371/journal.pone.0098362.g005

this medium signal-to-noise ratio ($SNR \sim 15$), whereas *in cellulo* data are slightly worse ($SNR \sim 10$), in a regime where phototransformation yields could be slightly overestimated.

Frametime. reducing the frametime enables enhanced time resolution at the expense of reduced signal-to-noise ratio. Inspection of Figure 4B reveals that, given the input value we have chosen for the yields, a good compromise is maintained in the range 10–30 ms frametime. At the shortest frametime, the reduced SNR results in a slight overestimation of the photoblinking regime, whereas at the longest frametime (60 ms) most fluorescence time traces are contained within a single frame, completely obviating the ability to recover correct yields.

Readout laser power density. Figure 4C shows that variation of the laser power density within the range 0.2–20 kW/cm^2 qualitatively has the same effect as changing the frametime. This can be easily understood, as, at low laser power, reduced SNR results in yield's overestimation, whereas at high laser power fluorescence traces get shorter due to increased photoexcitation, giving rise to insufficient time resolution.

Molecular density. In contrast to *in vitro* samples, where a sufficiently sparse distribution of immobilized fluorescent molecules can be achieved to prevent overlap of fluorescence traces, in biological samples fluorescent labels typically decorate a fine structure of interest and their local density can be very high. This translates into a substantial density of active molecules per frame. Figure 4D shows that extraction of phototransformation yields

remains successful at densities up to 7 molecules/frame/ μm^2 on our microtubule mimicking pattern (note that such densities on an essentially 1-D pattern cannot be directly compared to densities extracted from 2-D patterns [57]). At very high densities, an overestimation of the yields is observed, which results from rejection of strongly overlapped spots and heavy mix up of a large number of fluorescence traces (Figure 4D, inset). However, the results suggest that typical expression levels in biological cells do not need to be reduced to retrieve correct photophysical parameters, at least under weak 405 nm laser illumination.

Number of frames. Figure 4D shows that retrieval of the correct photoconversion brightness necessitates a substantial fraction of the total number of molecules to be photoconverted during the experiment ($>30\%$). This is explained by inspecting the exponential dependence of $N_A(t) = N_0[1 - \exp(-\alpha\phi_a t)]$ (see also Figure S10). As long as $N_A(t)$ can be approximated by a linear regime $N_A(t) \approx N_0\alpha\phi_a t$ ($\alpha\phi_a t \ll 1$, α is a constant) the unknown parameters N_0 and ϕ_a cannot be uncoupled and unreliable values are extracted. Finally, Figure 4F simply shows that for a fixed sample and in the presence of a heterogeneous laser beam a substantial number of activated molecules need to be recorded so that sufficient statistics allow reliable extraction of the phototransformation yields.

Overall, the analysis of simulated datasets presented above demonstrates that our procedure estimates the phototransformation yields with suitable accuracy and robustness in a large range

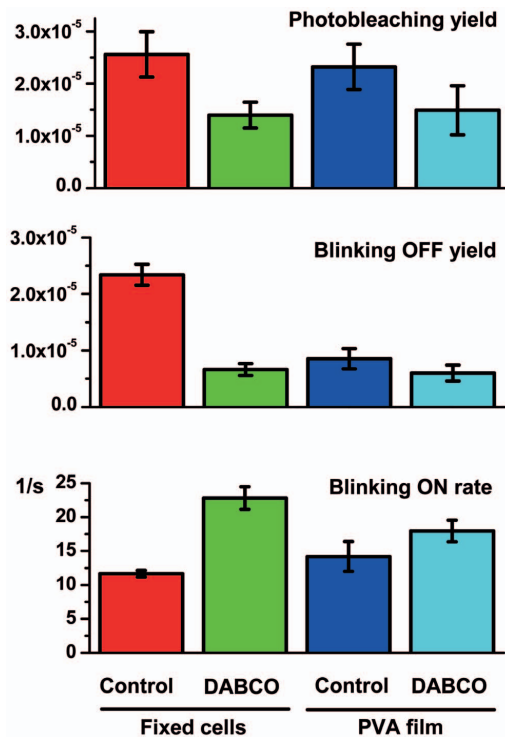


Figure 6. Phototransformation yields of Dendra2-actin expressed in mammalian cells and purified Dendra2 embedded into PVA film. Error bars indicate standard deviations. Number of samples per experiment $n = 3-5$. Cell samples are from different batches prepared independently.
doi:10.1371/journal.pone.0098362.g006

of experimental parameters. This constituted the starting point for choosing appropriate settings for real experiments and estimating the suitability of experimental data sets for analysis.

Experimental data

In vitro data. The phototransformation yields of Dendra2 were first measured *in vitro* in PVA, under conditions of typical PALM data acquisition, with or without 405 nm activation (see Data acquisition section and Figure S2). The processing pipeline with the “tumbling” model was used. Results are reported in Figures 5 to 7. The obtained values are close to those that can be deduced from the phototransformation rates reported by Lee et al [8], although a different immobilization technique was used. With bleaching and blinking-off quantum yields of $(2.3 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ and $(8.6 \pm 1.8) \times 10^{-6}$, respectively, Dendra2 exhibits a fair photostability and has a relatively low tendency to blink, with on average one out of 3.7 molecules experiencing blinking. The rate of recovery from the dark state was measured to be $14 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, corresponding to an average lifetime in the off state of 70 ms. Dark state recovery is essentially thermally driven and was found to be accelerated by 405 nm light only at laser intensities greater than $(\sim 10 \text{ W/cm}^2)$, which exceeds the values typically used in PALM acquisition, as previously demonstrated [8] (not shown). Likewise, blinking and bleaching quantum yields were not modified upon

weak 405 nm laser light illumination. Upon treatment with 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), an antifading agent commonly used in fluorescence microscopy to reduce photobleaching [64,65,66], the photobleaching and blinking-off yields slightly decreased ($\Phi_{\text{bleach}}: (1.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$; $\Phi_{\text{blink-off}}: (6.0 \pm 1.4) \times 10^{-6}$), while the blinking-on rate slightly increased ($\Phi_{\text{blink-on}}: 18 \pm 1.6 \text{ s}^{-1}$), but all these changes were not significant (Figure 6).

Finally, from the analysis of the cumulated number of photoconverted molecules over the time of PALM data acquisition (Figure 7), the photoconversion brightness of Dendra2 was measured to be $(0.9 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ under 561 nm readout laser illumination. As expected, the brightness measured under 405 nm illumination was substantially higher $((4.1 \pm 2.3) \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ and, assuming an extinction coefficient of $10250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at pH 7.4, as measured by ensemble spectroscopy, a surprisingly low photoconversion quantum yield of $(4.0 \pm 2.3) \times 10^{-5}$ could be deduced. Results are summarized in Table 1. Based on the coarse assumption of a wavelength independent quantum yield, the residual extinction coefficient of the neutral green state of the Dendra2 chromophore could be proposed to be $\sim 1.0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 561 nm at pH 7.4. However, this statement would not hold if photoconversion in the anionic green state of Dendra2 also occurs as recently suggested [67].

Eukaryotic cells

Next, we measured the phototransformation yields of Dendra2 fused to actin in fixed mammalian Vero cells. A representative PALM rendered image is shown in Figure S12 and the results of analysis are shown on Figures 5 to 7. The processing pipeline with the “fixed-circular” model was used. Importantly, experimental conditions (notably signal-to-noise ratio) were found to fall within the range suitable for accurate extraction of phototransformation yields (Figure 4). A photobleaching quantum yield of $(2.6 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ was measured, close to the value obtained in PVA. In marked contrast, the blinking-off quantum yield $(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ was found to largely exceed that measured *in vitro*, whereas the blinking-on rate $(11.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1})$ was slightly lower. Consequently, about half of the chromophores experienced blinking, a fraction significantly higher than in PVA, and also higher than the 30% ratio reported in *Xenopus* oocytes [21].

Strikingly, and in marked contrast with PVA, DABCO induced a significant enhancement of Dendra2 photostability in fixed Vero and HeLa cells. The photobleaching quantum yield was reduced nearly 2-fold $((1.4 \pm 0.2) \times 10^{-5})$, the blinking-off quantum yield was decreased more than 3-fold $((6.6 \pm 1.0) \times 10^{-6})$, whereas the blinking-on rate was increased by nearly 2-fold $(22.8 \pm 1.7 \text{ s}^{-1})$. In fact, adding DABCO to the PBS medium used for cell imaging brought the phototransformation yields of Dendra2 close to those measured in PVA alone and nearly identical to those measured in PVA plus DABCO. However, DABCO did not cause an increase of mean photon output per molecule, possibly in agreement with the previously reported quenching effect of this substance [65].

Finally, the green-to-red *in cellulo* photoconversion brightness of Dendra2 was measured to be $(0.9 \pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, under 561 nm and 405 nm illumination respectively (Figure 7). In the latter case, assuming an extinction coefficient of the neutral form of green Dendra2 at 405 nm of $10250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [36], a photoconversion yield of $\sim (1.4 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ could be deduced, even lower than in PVA (Table 1).

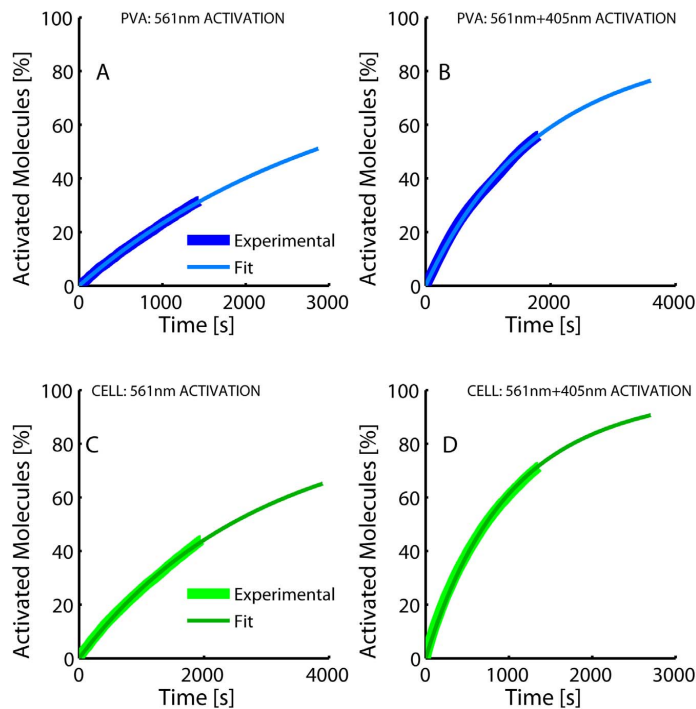


Figure 7. Representative cumulative photoconversion plots of purified Dendra2 embedded into PVA film (A, B) and Dendra2-actin expressed in mammalian cells (C, D); (illumination with 561 nm laser only (A, C) or in combination with 405 nm laser (B, D). Fitted curves are shown overlaid on experimental data.
doi:10.1371/journal.pone.0098362.g007

Discussion and Conclusions

In this work, we have developed a reliable method to evaluate *in cellulo* the photo-transformation yields of fluorescent proteins used as markers in high-resolution localization microscopy. Through extensive simulations, we have determined the range of experimental parameters suitable for accurate determination of the photobleaching yield, the blinking-off yield, the blinking-on rate as well as the photoconversion brightness of PTFPs. The method was then applied to study the *in cellulo* photophysical behavior of Dendra2 and the results were compared to those obtained in PVA. An important conclusion is that the photophysical behaviors of fluorescent proteins measured *in vitro* and *in cellulo* may differ.

Quantitative localization microscopy therefore would benefit from a preliminary investigation of the fluorescent marker's bleaching and blinking behavior in biologically relevant experimental conditions. In the case of Dendra2 fused to β -actin in fixed mammalian cells at physiological pH, we found a bleaching yield of $(2.6 \pm 0.4) \times 10^{-5}$, a blinking-off yield of $(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ and a thermally activated blinking-on rate of $11.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$. Interestingly, when the antifading agent DABCO was added at 10 mM to the PBS-based medium in which mammalian cells were mounted, the photostability of Dendra2 was largely enhanced. Reversible blinking was decreased more than 3-fold and nonreversible photobleaching was reduced by about 2-fold. Furthermore, the average duration of Dendra2 transient dark states was reduced

Table 1. Photoconversion parameters of Dendra2.

	PVA film	Mammalian cells
Photoconversion brightness (561 nm) [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$(0.9 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(0.9 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
Photoconversion brightness (405 nm) [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] [§]	$(4.1 \pm 2.3) \times 10^{-1}$	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-1}$
Photoconversion yield (405 nm) ^{§,¶}	$(4.0 \pm 2.3) \times 10^{-5}$	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-5}$

Mean values \pm SD are shown. Number of samples per experiment $n=3$.

[§]: The high SDs are attributed to inhomogeneity and weakness of the 405 nm laser beam.

[¶]: Assuming an extinction coefficient $\epsilon_{405} = 10250 \text{ Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

doi:10.1371/journal.pone.0098362.t001

from ~ 85 ms to ~ 45 ms. Thus, because less molecules will blink, and those that still blink will more rapidly return from their dark state, the use of DABCO in combination with Dendra2 may facilitate accurate molecular counting in quantitative PALM.

While redox agents and oxygen scavenging systems have been carefully evaluated in STORM/dSTORM localization microscopy to ensure optimal blinking of the organic labels [47], the chromophores of fluorescent proteins are often considered insensitive to the local environment and FP-labeled samples are commonly prepared without any additives. However, recent data clearly demonstrated that the photophysical properties of fluorescent proteins are sensitive to the environment [50,52,68,69]. Our results go along this line.

Two main scenarios can be invoked to account for the observations reported in Figure 6. Firstly, DABCO is known to retard photobleaching of various fluorophores in immunofluorescence samples, which was explained by hampering diffusion of oxygen and other reactive oxygen species (ROS) capable of destroying the fluorophore [64,65,66]. In addition, PVA is known to also hamper diffusion of oxygen [4]. Thus, a reduced oxygen level could possibly explain the enhanced photostability in PVA or in DABCO-enriched PBS if blinking and bleaching mechanisms under PALM experimental conditions are oxygen dependent. Alternatively, DABCO is also an electron acceptor and it has been shown that PVA may be involved in electron-transfer processes to/from organic dyes in their excited states, thereby affecting the blinking properties of these dyes [70,71]. Thus, our results could as well be explained by redox effects.

Our previous investigations of IrisFP, a PTFP which shares high sequence-homology and structural-similarity with Dendra2 [42,43,44], lead us to suggest that this latter scenario predominates. Under high-intensity illumination as typically used in localization microscopy (>0.1 kW/cm²) structural studies indeed revealed that IrisFP photobleaching essentially follows a redox-driven process associated with the decarboxylation of the conserved Glu212 residue (IrisFP numbering) [44]. This photodestruction pathway leads to a non-reversible 2-electron photoreduction of the chromophore, likely to be modulated by the local redox environment. The process is oxygen-independent, in contrast to the photobleaching pathway observed at lower illumination levels typical of standard widefield microscopy. Likewise, our investigations of blinking in IrisFP [42,43] also suggested a redox process in which the FP chromophore undergoes a transient loss of electron conjugation at the methylene bridge, followed by proton transfer. DABCO and PVA could play a role in such mechanisms. Further investigations will need to be carried out to confirm or infirm this hypothesis. Preliminary *in cellulo* experiments performed under anaerobic conditions suggest that indeed the measured Dendra2 phototransformation yields do not depend on oxygen significantly.

More generally, it will be interesting in the future to carry out more systematic studies of the effects of DABCO and other antifading agents such as e.g. trolox, on photoblinking and photobleaching of various fluorescent proteins. In addition, in the present study we have not looked at a possible dependence on DABCO of the Dendra2 photoconversion brightness. It will be informative in future experiments to investigate the possible redox dependence of green-to-red photoconversion in various PCFPs, as reported for example in mEos2 [51].

The phototransformation yields in Dendra2 reported in this work fall within the range of values determined for other PTFPs by various ensemble or single molecule methods. Although yields measured in the exact conditions of biological PALM experiments are expected to be most informative, their accuracy could be

affected by various complications not accounted for in the present work, such as local heterogeneity of the laser beam, nonuniform background, highly anisotropic distribution of PTFP's dipole orientations, or misestimation of laser power density due to optical aberrations. Importantly, extinction coefficients are not measured *in vivo*, are pH dependent and are difficult to estimate accurately. Reliable measurements of phototransformation quantum yields require finding a good compromise between high signal-to-noise ratio of the recorded fluorescence and sufficient time-resolution to faithfully reconstruct single-molecule traces. In particular, we have shown that the limited time-resolution of PALM experiments may significantly bias the retrieval of blinking-off quantum yields, although such bias could possibly be corrected by generating calibration curves from simulated data. For example, in the case of the fixed Vero cells, applying the calibration curve of Figure 3 (inset) would suggest a blinking-off quantum yields of $(6.7 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ and $(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ in the absence and presence of DABCO, respectively, meaning that DABCO induces a drop in blinking by a factor ~ 5 . However, one should bear in mind that a proper calibration needs to faithfully account for a high number of experimental parameters, and we propose that more thorough investigations should be conducted before corrections can be confidently applied. Perhaps even more important, cell to cell variability always remains an issue to take into account and it cannot be excluded that sample preparation protocols as well as specific experimental conditions (e.g. temperature or presence of vitamins in the cell culture medium [52]) may exert an influence on the extracted phototransformation yields. Therefore well-defined artificial environments with single-molecule or even bulk measurements will continue to provide valuable reference values that should not be overlooked.

Within all these limitations, our extensive simulations suggest that accurate phototransformation quantum yields can be retrieved if they fall within reasonable ranges and that reliable comparative studies between different samples or various environmental conditions can be conducted.

Within the precision of our measurements, Dendra2 molecules displayed a homogeneous photophysical behavior, as N_{bleach} , N_{on} and N_{off} histograms could be satisfactorily fit with mono-exponential models. This is in contrast with other findings made *in vitro* where recovery to the fluorescent state exhibited a biphasic behavior [8], the mechanistic interpretation of which remains unclear. Our data suggest that various conformational states of Dendra2, if they exist, interconvert at rates that exceed the measured macroscopic rates.

Our simplified photophysical scheme (Figure 1) may also be refined in the future to extract more accurate phototransformation yields. With more statistically significant data, multiphasic bleaching and blinking processes could be pinpointed [72], and the possibility that bleaching may directly follow from blinking [59,60] could be investigated. One observation is that the recovered green-to-red photoconversion brightness (or yields) for Dendra2 appears lower than expected based on the few reported bulk experiments on this protein [67] and other PCFPs [18,19]. The photoconversion quantum yields measured here under 405 nm activation are of the same order of magnitude as the photobleaching or blinking-off quantum yields. This calls for an experimental strategy in which bleaching and blinking in the green state of the fluorophores are taken into account, as well as further photophysical processes that may be responsible for the generally observed limited overall photoconversion efficiency, as recently shown [21].

Finally, the present study opens the door to a more systematic investigation of the influence of environmental parameters on the

photophysical behavior of markers or interest for single-molecule localization microscopy. The technique may for example be extended to the case of organic dyes [73], allowing a precise assessment of the effects of various blinking cocktails used in techniques such as dSTORM.

Supporting Information

Figure S1 View of our Matlab-based PALM simulation software.
(PDF)

Figure S2 Representative frames from a PALM dataset of a “blank” PVA sample devoid of Dendra2 molecules (left) and a PVA sample containing Dendra2 (right).
(PDF)

Figure S3 Representative example of spot’s clustering by the *k*-means algorithm.
(PDF)

Figure S4 Absorption spectrum of Dendra2 in its green state collected at acidic pH, after deconvolution of a residual contribution by the chromophore in its anionic state.
(PDF)

Figure S5 Rendered PALM image of the simulated microtubule sample (top) and 2D profile of the simulated laser beam (bottom).
(PDF)

Figure S6 Final τ_c -curve extracted from a PALM data set generated with the parameters shown in Table S1.
(PDF)

Figure S7 (A) Representative example of single-molecule trace reconstruction. (B) correlation histogram between the retrieved single-molecule traces and true simulated traces. (C) correlation histogram between the retrieved single-molecule traces and rounded true simulated traces.
(PDF)

Figure S8 Effects of limited time-resolution on the determination of photo transformation yields.
(PDF)

Figure S9 Representative N_{bleach} histograms for tumbling molecules (A), fixed- molecules under circularly polarized laser (B), and fixed molecules under linearly polarized laser (C).
(PDF)

Figure S10 Plots of cumulative activation for tumbling molecules (A), fixed molecules under circularly polar-

ized laser (B), and fixed molecules under linearly polarized laser (C).

(PDF)

Figure S11 Errors in retrieved photobleaching yield, *on-off* blinking rate and photoconversion yield (or brightness) upon varying the input *off-on* blinking yield.

(PDF)

Figure S12 Rendered PALM image of Dendra2- β -actin in a fixed HeLa cell under widefield illumination conditions.

(PDF)

Appendix S1 Excitation rate of fixed molecules.

(PDF)

Discussion S1 Underestimation of blinking-off quantum yield.

(PDF)

Scripts S1 Matlab scripts for simulation of PALM data sets and for the extraction of phototransformation yields.

(ZIP)

Table S1 Parameters used to generate simulated PALM data sets.

(PDF)

Table S2 Comparison between phototransformation yields retrieved from true single-molecule traces, rounded true traces and experimental traces.

(PDF)

Table S3 Comparison between phototransformation yields retrieved from simulated data sets with tumbling molecules and fixed molecules.

(PDF)

Acknowledgments

The authors thank Travis Gould and Fabrice Senger for useful discussions and help with initial measurements. S.A acknowledges the EMBL Grenoble Outstation for access to mammalian cell culture facility.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SA MG SH DB. Performed the experiments: SA MG VA. Analyzed the data: SA DB. Contributed reagents/materials/analysis tools: VA DB. Wrote the paper: DB SA MG. Wrote data analysis pipeline: DB. Performed simulations: RB DB. Developed instrumentation: VA.

References

1. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, et al. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642–1645.
2. Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal* 91: 4258–4272.
3. Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3: 793–795.
4. van de Linde S, Heilemann M, Sauer M (2012) Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol 61 63: 519–540.
5. Ori A, Banterle N, Iskar M, Andres-Pons A, Escher C, et al. (2013) Cell type-specific nuclear pores: a case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines. *Mol Syst Biol* 9: 648.
6. Nan X, Collisson EA, Lewis S, Huang J, Tamguney TM, et al. (2013) Single-molecule superresolution imaging allows quantitative analysis of RAF multimer formation and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 18519–18524.
7. Puchner EM, Walter JM, Kasper R, Huang B, Lim WA (2013) Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16015–16020.
8. Lee SH, Shin JY, Lee A, Bustamante C (2012) Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 17436–17441.
9. Gunzenhauser J, Olivier N, Pengo T, Manley S (2012) Quantitative super-resolution imaging reveals protein stoichiometry and nanoscale morphology of assembling HIV-Gag virions. *Nano Lett* 12: 4705–4710.

10. Furstenberg A, Heilemann M (2013) Single-molecule localization microscopy-near-molecular spatial resolution in light microscopy with photoswitchable fluorophores. *Phys Chem Chem Phys* 15: 14919–14930.
11. Harms GS, Cognet L, Lommerse PH, Blab GA, Schmidt T (2001) Autofluorescent proteins in single-molecule research: applications to live cell imaging microscopy. *Biophys J* 80: 2396–2408.
12. Schenk A, Ivanchenko S, Rocker C, Wiedenmann J, Nienhaus GU (2004) Photodynamics of red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 86: 384–394.
13. Wiedenmann J, Schenk A, Rocker C, Girod A, Spindler KD, et al. (2002) A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11646–11651.
14. Peterman EJG, Brasselet S, Moerner WE (1999) The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein. *Journal of Physical Chemistry A* 103: 10553–10560.
15. Kubitschek U, Kuckmann O, Kues T, Peters R (2000) Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. *Biophys J* 78: 2170–2179.
16. Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Rocker C, et al. (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15905–15910.
17. Moeyaert B, Nguyen Bich N, De Zitter E, Rocha S, Clays K, et al. (2014) Green-to-Red Photoconvertible Dronpa Mutant for Multimodal Super-resolution Fluorescence Microscopy. *ACS Nano*.
18. Tsutsui H, Karasawa S, Shimizu H, Nukina N, Miyawaki A (2005) Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *Embo Reports* 6: 233–238.
19. Habuchi S, Tsutsui H, Kochaniak AB, Miyawaki A, van Oijen AM (2008) mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PLoS One* 3: e3944.
20. Dittrich PS, Schafer SP, Schille P (2005) Characterization of the photoconversion on reaction of the fluorescent protein Kaede on the single-molecule level. *Biophys J* 89: 3446–3455.
21. Durisic N, Laparra-Cuervo L, Sandoval-Alvarez A, Borbely JS, Lakadamyali M (2014) Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate. *Nat Methods*.
22. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE (1997) On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388: 355–358.
23. Haupts U, Maiti S, Schille P, Webb WW (1998) Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13573–13578.
24. Heikal AA, Hess ST, Baird GS, Tsien RY, Webb WW (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11996–12001.
25. Liu Y, Kim HR, Heikal AA (2006) Structural basis of fluorescence fluctuation dynamics of green fluorescent proteins in acidic environments. *J Phys Chem B* 110: 24138–24146.
26. David CC, Dedecker P, De Cremer G, Verstraeten N, Kint C, et al. (2012) Spectroscopic characterization of Venus at the single molecule level. *Photochem Photobiol Sci* 11: 358–363.
27. Annibale P, Scarselli M, Kodyan A, Radenovic A (2010) Photoactivatable Fluorescent Protein mEos2 Displays Repeated Photoactivation after a Long-Lived Dark State in the Red Photoconverted Form. *J Phys Chem Lett* 1: 1506–1510.
28. Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, et al. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5: 545–551.
29. Annibale P, Vanni S, Scarselli M, Rothlisberger U, Radenovic A (2011) Identification of clustering artifacts in photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* 8: 527–528.
30. Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Skoko D, Renz M, Veatch SL, et al. (2011) Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nature Methods* 8: 969–975.
31. Annibale P, Vanni S, Scarselli M, Rothlisberger U, Radenovic A (2011) Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking. *PLoS One* 6: e22678.
32. Lando D, Endesfelder U, Berger H, Subramanian L, Dunne PD, et al. (2012) Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during G2 in fission yeast. *Open Biol* 2: 120078.
33. Coltharp C, Kessler RP, Xiao J (2012) Accurate construction of photoactivated localization microscopy (PALM) images for quantitative measurements. *PLoS One* 7: e51725.
34. Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A (2002) An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12651–12656.
35. Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, et al. (2006) Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol*.
36. Adam V, Nienhaus K, Bourgeois D, Nienhaus GU (2009) Structural basis of enhanced photoconversion yield in green fluorescent protein-like protein Dendra2. *Biochemistry* 48: 4905–4915.
37. McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL (2009) A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods* 6: 131–133.
38. Hoi H, Shaner NC, Davidson MW, Cairo CW, Wang J, et al. (2010) A monomeric photoconvertible fluorescent protein for imaging of dynamic protein localization. *J Mol Biol* 401: 776–791.
39. McEvoy AL, Hoi H, Bates M, Platonova E, Cranfill PJ, et al. (2012) mMaple: a photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities. *PLoS One* 7: e51314.
40. Tsutsui H, Shimizu H, Mizuno H, Nukina N, Furuta T, et al. (2009) The E1 Mechanism in Photo-Induced beta-Elimination Reactions for Green-to-Red Conversion of Fluorescent Proteins. *Chem Biol* 16: 1140–1147.
41. Lelimosin M, Adam V, Nienhaus GU, Bourgeois D, Field MJ (2009) Photoconversion of the Fluorescent Protein EosFP: A Hybrid Potential Simulation Study Reveals Intersystem Crossings. *J Am Chem Soc*.
42. Adam V, Carpentier P, Violot S, Lelimosin M, Darnault C, et al. (2009) Structural basis of X-ray-induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* 131: 18063–18065.
43. Roy A, Field MJ, Adam V, Bourgeois D (2011) The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein. *J Am Chem Soc* 133: 18586–18589.
44. Duan C, Adam V, Byrdin M, Ridard J, Kieffer-Jaquinod S, et al. (2013) Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein. *J Am Chem Soc* 135: 15841–15850.
45. Ha T, Tinnefeld P (2012) Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol 61 63: 595–617.
46. Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, Bates M, Zhuang XW (2011) Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat Methods* 8: 1027–+.
47. van de Linde S, Sauer M (2013) How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chem Soc Rev*.
48. Altman RB, Zheng Q, Zhou Z, Terry DS, Warren JD, et al. (2012) Enhanced photostability of cyanine fluorophores across the visible spectrum. *Nat Methods* 9: 428–429.
49. Nangueri S, Flottmann B, Herrmannsdorfer F, Thomas K, Heilemann M (2014) Single-molecule super-resolution imaging by tryptophan-quenching-induced photoswitching of phalloidin-fluorophore conjugates. *Microsc Res Tech*.
50. Endesfelder U, Malkusch S, Flottmann B, Mondry J, Liguzinski P, et al. (2011) Chemically induced photoswitching of fluorescent probes—a general concept for super-resolution microscopy. *Molecules* 16: 3106–3118.
51. Saha R, Verma PK, Rakshit S, Saha S, Mayor S, et al. (2013) Light driven ultrafast electron transfer in oxidative redding of Green Fluorescent Proteins. *Sci Rep* 3: 1580.
52. Bogdanov AM, Bogdanova EA, Chudakov DM, Gorodnicheva TV, Lukyanov S, et al. (2009) Cell culture medium affects GFP photostability: a solution. *Nat Methods* 6: 859–860.
53. Wong FHC, Banks DS, Abu-Arish A, Fradin C (2007) A molecular thermometer based on fluorescent protein blinking. *J Am Chem Soc* 129: 10302–+.
54. Kao YT, Zhu X, Min W (2012) Protein-flexibility mediated coupling between photoswitching kinetics and surrounding viscosity of a photochromic fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3220–3225.
55. Baldini G, Cannone F, Chirico G (2005) Pre-unfolding resonant oscillations of single green fluorescent protein molecules. *Science* 309: 1096–1100.
56. Ganguly S, Clayton AH, Chattopadhyay A (2011) Fixation alters fluorescence lifetime and anisotropy of cells expressing EYFP-tagged serotonin1A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 234–237.
57. Wolter S, Endesfelder U, van de Linde S, Heilemann M, Sauer M (2011) Measuring localization performance of super-resolution algorithms on very active samples. *Optics Express* 19: 7020–7033.
58. Fourkas JT (2001) Rapid determination of the three-dimensional orientation of single molecules. *Opt Lett* 26: 211–213.
59. Widengren J, Chmyrov A, Eggeling C, Lof Dahl PA, Seidel CAM (2007) Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* 111: 429–440.
60. Vogelsang J, Kasper R, Steinhauer C, Person B, Heilemann M, et al. (2008) A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie-International Edition* 47: 5465–5469.
61. Adam V, Moeyaert B, David CC, Mizuno H, Lelimosin M, et al. (2011) Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications. *Chem Biol* 18: 1241–1251.
62. Bogdanov AM, Kudryavtseva EI, Lukyanov KA (2012) Anti-fading media for live cell GFP imaging. *PLoS One* 7: e53004.
63. Axelrod D (2003) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Biophotonics*, Pt B 361: 1–33.
64. Ono M, Murakami T, Kudo A, Ishiki M, Sawada H, et al. (2001) Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49: 305–312.
65. Valnes K, Brandtzaeg P (1985) Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J Histochem Cytochem* 33: 755–761.
66. Johnson GD, Davidson RS, McNamee KC, Russell G, Goodwin D, et al. (1982) Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J Immunol Methods* 55: 231–242.

67. Makarov NS, Cirloganu C, Perry JW, Lukyanov KA, Soltsev KM (2014) Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of green-to-red photo-conversion of fluorescent protein Dendra2. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 280: 5–13.
68. Bogdanov AM, Mishin AS, Yampolsky IV, Belousov VV, Chudakov DM, et al. (2009) Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. *Nat Chem Biol* 5: 459–461.
69. Malkani N, Schmid JA (2011) Some secrets of fluorescent proteins: distinct bleaching in various mounting fluids and photoactivation of cyan fluorescent proteins at YFP-excitation. *PLoS One* 6: e18586.
70. Zondervan R, Kulzer F, Orlinskii SB, Orrit M (2003) Photoblinking of rhodamine 6G in poly(vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet. *Journal of Physical Chemistry A* 107: 6770–6776.
71. Yeow EK, Melnikov SM, Bell TD, De Schryver FC, Hofkens J (2006) Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface. *J Phys Chem A* 110: 1726–1734.
72. Dean KM, Lubbeck JL, Binder JK, Schwall LR, Jimenez R, et al. (2011) Analysis of Red-Fluorescent Proteins Provides Insight into Dark-State Conversion and Photodegradation. *Biophys J* 101: 961–969.
73. Zhao ZW, Roy R, Gebhardt JC, Suter DM, Chapman AR, et al. (2014) Spatial organization of RNA polymerase II inside a mammalian cell nucleus revealed by reflected light-sheet superresolution microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 681–686.

11.10.2 Adam et al., COCB, 2014



Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges

Virgile Adam^{1,2,3}, Romain Berardozzi^{1,2,3}, Martin Byrdin^{1,2,3} and Dominique Bourgeois^{1,2,3}



In fluorescence microscopy, the photophysical properties of the fluorescent markers play a fundamental role. The beauty of phototransformable fluorescent proteins (PTFPs) is that some of these properties can be precisely controlled by light. A wide range of PTFPs have been developed in recent years, including photoactivatable, photoconvertible and photoswitchable fluorescent proteins. These smart labels triggered a plethora of advanced fluorescence methods to scrutinize biological cells or organisms dynamically, quantitatively and with unprecedented resolution. Despite continuous improvements, PTFPs still suffer from limitations, and mechanistic questions remain as to how these proteins precisely work.

Addresses

¹ Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France

² CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France

³ CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France

Corresponding authors: Adam, Virgile (virgile.adam@ibs.fr) and Bourgeois, Dominique (dominique.bourgeois@ibs.fr)

Current Opinion in Chemical Biology 2014, 20:92–102

This review comes from a themed issue on Molecular imaging

Edited by Christian Eggeling and Mike Heilemann

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 25th June 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.016>

1367-5931/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Fluorescent proteins (FPs) are central to biology, allowing specific, multicolor and nondisruptive labeling in living cells, tissues and whole organisms [1,2]. Yet, they display highly complex photophysics. For example, it was shown that GFP itself can undergo photoactivation [3], photoconversion [4] and photoswitching [5], in addition to blinking [6], and photobleaching [7]. These low-yield processes have mostly been perceived as nuisances, until the discovery of fluorescent proteins from Anthozoa species completely changed our view. Starting with Kaede in *Trachyphyllia geoffroyi* and EosFP in *Lobophyllia hemprichii*, well-behaved green-to-red photoconvertible FPs soon suggested a huge potential for dynamical tracking experiments and super-resolution localization micro-

scopy, and were rapidly developed into a whole palette of highly performing variants. Likewise, after the discovery of the reversibly switchable asFP595 in *Anemonia sulcata*, the engineering of monomeric Dronpa from *Echinophyllia* sp. revolutionized the field, and was followed by the release of many variants opening up a continuously growing panel of applications, from biotechnology to optogenetics. In the meantime, GFP itself was turned into a highly efficient photoactivatable protein named photoactivatable green fluorescent protein (PA-GFP) and different hues followed, adequate for example in pulse-chase microscopy approaches. PTFPs developed in the last two years are summarized in Table 1. The present paper mainly focuses on future challenges in the field of PTFPs. For a comprehensive view on PTFPs's mechanisms, engineering and applications, the reader is directed to the many exhaustive reviews published recently [1,2,8–12]. We start by recapitulating the three different classes of PTFPs, emphasizing recent mechanistic insight. Then, based on three fascinating examples from recent literature, we highlight important flaws that PTFPs still face today. We list a series of mechanistic questions still to be investigated, and we propose perspectives for further developments of PTFPs.

PTFPs classes and mechanisms

In PTFPs, three main classes are distinguished. Photoactivatable fluorescent proteins (PAFPs) undergo non-reversible light-induced activation from a non-fluorescent to a fluorescent state; photoconvertible FPs (PCFPs) exhibit non-reversible conversion between two fluorescent states with distinct emission colors; and reversibly switchable FPs (RSFPs) can be photoswitched back and forth between a fluorescent on-state and a non-fluorescent off-state. In PAFP and PCFP, the phototransformations involve covalent modifications of the fluorescent protein whereas in RSFPs only conformational rearrangements of the chromophore and its environment take place. The basic mechanisms involved are illustrated in Figure 1. It should be noted that PCFPs and RSFPs of anthozoan origin often share remarkably high sequence identity and structural similarity. This allowed the development of PTFPs combining both photoconversion and photoswitching properties [13] and the re-engineering of PCFPs into RSFPs [14] or vice versa [15].

Table 1

Properties of important PTFPs developed during the last two years.

Protein (oligomerization)	Parent protein [wild-type]	Source organism	Chromophore	λ_{max} ex/em (nm) ^a		ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹) ^a		Φ_{fluor} ^a		Brightness ^b		pK _a		Actinic light (nm) ^c	Ref.	
				PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST			
Photocconvertible fluorescent proteins (PCFPs)																
mEos3.1 (M)	mEos2 [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	505/513	570/580	88.4	33.5	0.83	0.62	218%	62%	5.2	6.0	405	[31]	
mEos3.2 (M)	mEos2 [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	507/516	572/580	63.4	32.2	0.84	0.55	159%	53%	5.4	5.8	405	[31]	
mMaple (M)	mClavGR2	<i>Clavularia</i> sp.	HYG	489/505	566/583	15	30	0.74	0.56	33%	50%	8.2	7.3	405	[41]	
pcDronpa (T)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia</i> sp. SC22	HYG	505/517	569/581	115	75	0.85	0.68	291%	190%	5.5	6.3	405		
pcDronpa2 (T)	Dronpa [22G]	<i>Echinophyllia</i> sp. SC22	HYG	504/515	569/583	100	105	0.83	0.68	248%	213%	5.8	6.1	405		
PSmOrange2 (M)	mOrange [DsRed]	<i>Discosoma</i> sp.	TYG	546/561	619/651	51	18.9	0.61	0.38	95%	23%	6.6	5.4	488	[22]	
Reversibly switchable fluorescent proteins (RSFPs)																
(-) modBFP (M)	mKalama1 [GFP]	<i>A. victoria</i>	SYG	390/455	NA	27	NA	0.33	NA	26%	NA	5.5	ND	405	514	[29]
(-) mInisGFP (M)	InisFP [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	HYG	488/516	NA	47	18	0.63	NA	89%	NA	5.3	>10	473	405	[34]
(-) mGeoS-M (M)	mEos2 [EosFP]	<i>L. hemprichii</i>	MYG	503/514	NA	51.6	NA	0.85	NA	131%	NA	4.5–5.0	ND	488	405	[14]
(-) rsEGFP2 (M)	EGFP [GFP]	<i>A. victoria</i>	AYG	478/503	NA	61	NA	0.30	NA	~60%	NA	ND	ND	488	405	[28]
(-) rsCherryRev 1.4 (M)	rsCherryRev [DsRed]	<i>Discosoma</i> sp.	MYG	572/609	NA	ND	NA	ND	NA	ND	NA	5.5	592	430	30	
(+) PAIRFP1 (D)	AIPCD [AtBphP2]	<i>A. tumefaciens</i> C58	Billiverdin	659/703	690/717	48.7	67.1	NA	0.048	9.6%	ND	4.6	5.2	–	660/750	[40]
(+) PAIRFP2 (D)	AIPCD [AtBphP2]	<i>A. tumefaciens</i> C58	Billiverdin	657/708	692/719	39.5	63.6	NA	0.047	8.9%	ND	4.7	5.4	–	660/750	[40]

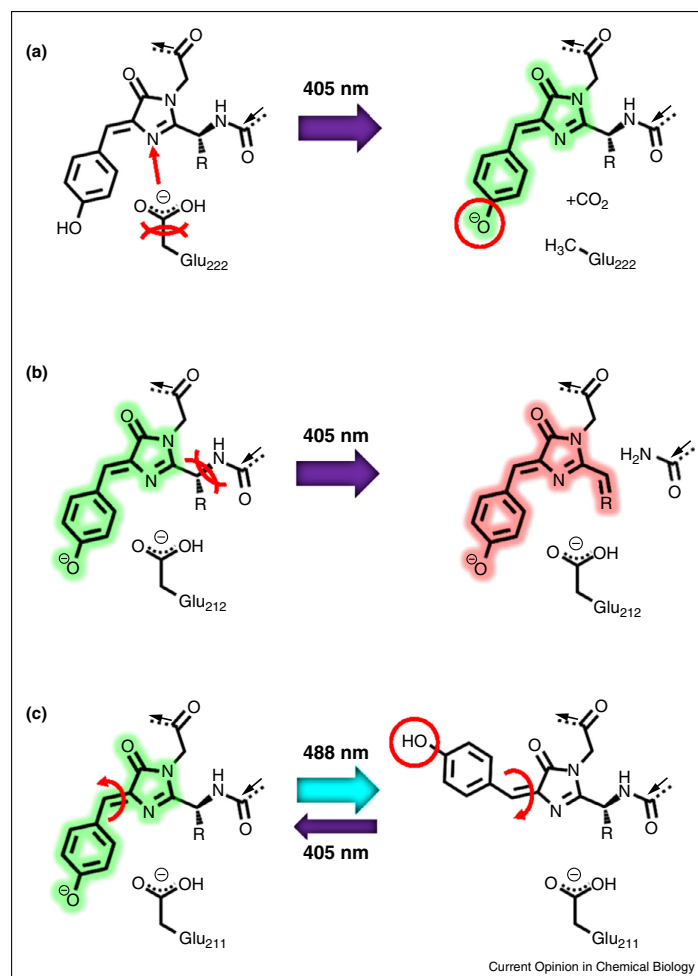
Note: The table summarizes the photophysical properties of PTFPs prior (PRE) and after (POST) their phototransformation. It is noteworthy that in the last two years, to the authors' knowledge, no PAFPs have been developed. M, monomer; D, dimer; T, tetramer; NA, not applicable; ND, not determined. The sign of the photoswitching in RSFPs is depicted by (-) for negative and (+) for positive switching.

^a Abbreviations: λ_{max} ex/em, maximum of excitation/emission spectrum; ϵ , molar extinction coefficient; Φ_{fluor} , fluorescence quantum yield.

^b Brightness is the product of fluorescence quantum yield and molar extinction coefficient expressed in % of the EGFP brightness.

^c Wavelengths required for irreversible (PCFPs) or reversible (RSFPs) transitions.

Figure 1



Basic mechanisms for the three classes of PTFPs. **(a)** PAFPs: the case of PA-GFP is shown where the Glu222 is decarboxylated and the chromophore is activated to an anionic/fluorescent form (R = serine). **(b)** PCFPs: the case of EosFP is shown, where photoinduced cleavage of the backbone extends the conjugated system (R = histidine). **(c)** RSFPs: the case of Dronpa is shown where the chromophore can be photoswitched between a *cis* anionic fluorescent form and a *trans* protonated non-fluorescent form (R = cysteine). Important features are depicted in red.

PAFPs: photoactivatable fluorescent proteins

PATagRFP [16] and PAmKate [17] are the latest introduced PAFPs, with a red (595 nm) and far red (628 nm) fluorescence emission in their activated state, respectively. Despite a relatively low brightness, these two proteins could successfully be used in multicolor localization microscopy experiments [16,17]. Whereas the photoactivation mechanisms of PA-GFP and PAmCherry are relatively well-established, involving decarboxylation

of the fully conserved Glu222 through photo-Kolbe reactions, those of PATagRFP and PAmKate remain to be deciphered. In PATagRFP, the presence of oxygen is required to promote chromophore oxidation, like in PAmCherry. The reaction involves uncharacterized intermediate states and the consecutive absorption of two near-UV photons (consecutive two-photon absorption (CTPA), e.g. at 405 nm [16], not to be confused with the simultaneous absorption of two photons, commonly referred as

TPA). In fact, Glu222 decarboxylation in PA-GFP is also mainly a CTPA process [18,19], raising the question how weak 405-nm light still activates PA-GFP. Interestingly, Glu222 decarboxylation can cause photobleaching in some anthozoan PCFPs or RSFPs [20**], instead of photoactivation.

PCFPs: photoconvertible fluorescent proteins

Whereas well-known green-to-red PCFPs emit below 600 nm in their photoconverted state, the recently introduced PSmOrange [21] and PSmOrange2 [22*] shift their emissions from orange to the dark red region (660 nm) upon illumination at 488 nm. The photoconversion mechanisms of these two proteins remain to be precisely established but appear to involve CTPA, like PATagRFP, as well as the presence of oxidizing agents in the nanoenvironment. This is in stark contrast to the mechanism of Kaede-like PCFPs, in which backbone breakage and elongation of the chromophoric π -system results from absorption of a single UV-violet photon and can be prevented by addition of electron acceptors in the medium [23]. The engineering of a least-evolved ancestral PCFP [24**] and ultrafast spectroscopic investigations [25,26] contributed to clarify the mechanism by which green-to-red PCFPs photoconvert. Evidence is growing that a histidine-containing and protonated chromophore embedded in a 'typical' anthozoan-FP chromophore pocket does not guarantee efficient photoconversion and that the local charge network [24**] as well as global conformational dynamics, for example, due to the oligomeric structure of PCFPs [15*] play key roles. In Dendra2, the mechanism by which the anionic chromophore may also promote photoconversion remains unclear. Of major concern is the observation that photoconversion in green-to-red PCFPs is always incomplete (meaning that only a fraction of PCFPs in a sample is able to achieve photoconversion) [27*], complicating quantitative molecular counting using photoactivated localization microscopy (PALM) (see [9] and Figure 2b). The mechanistic explanation, and a possible cure, for such incomplete photoconversion are still lacking.

RSFPs: reversibly switchable (or photochromic) fluorescent proteins

RSFPs offer the widest range of applications [10,12], and therefore many efforts have been devoted recently to extend their panel [13,14,15*,22*,28*,29–31] and tackle their mechanisms [15*,20*,32–35]. Photoswitching in RSFPs is generally based on an intrinsic property of the isolated chromophore: light-induced *cis-trans* isomerization. Therefore photoswitching tends to naturally occur to some extent in many FPs, and has been successfully restored by engineering in both hydrozoan and anthozoan RSFPs. Depending on whether photon absorption at the peak excitation wavelength induces off-switching, on-switching, or has no switching effect, RSFPs are referred to as negative [36], positive [37], or

decoupled [38], respectively, each having their pros and cons. Recent findings concern the heavily debated mechanism by which chromophore isomerization couples to chromophore protonation in negative or positive anthozoan switchers. Several pieces of evidence from ultrafast IR and UV-vis spectroscopy now suggest that (de)protonation of the chromophore in Dronpa [35] or Padron [33] is a ground state process that follows isomerization, although other authors disagree [34]. Another interesting finding is that negative switchers such as Padron are capable of efficient photoswitching at cryogenic temperatures [32], potentially opening up nanoscopy applications at such low temperatures. Recent engineering efforts have also aimed at increasing the switching speed and fatigue resistance (i.e. the number of achievable photo cycles before photobleaching) of RSFPs of use for example in applications based on reversible saturable optical fluorescence transitions (RESOLFT) imaging [28*,39] (see below and Figure 2c). Blue and infrared RSFPs have been developed that, despite their low brightness, offer exciting perspectives for extracting weak signals by demodulation [29] or difference imaging (see [40] and Figure 2a) in conditions of high autofluorescence.

PTFPs applications

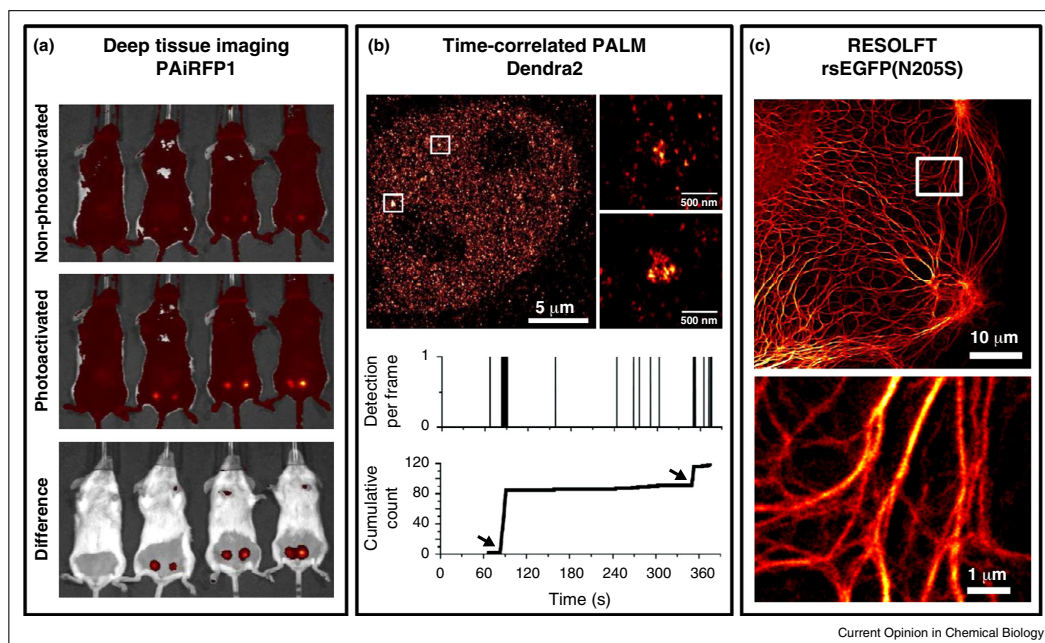
PTFPs are presently used in a very wide panel of applications [1,2,8–12] that cannot be exhaustively reviewed here. One recent evolution is that attention is now often paid to optimizing PTFPs for several applications instead of only one, allowing to obtain complementary results with a single construct [15*,41,42]. In this regard, bi-photochromic PTFPs such as NijiFP or Dendra2-M159A [13] or three-way highlighters like pcDronpa2 [15*] are versatile members that may offer novel applications in the future.

In the following, we take advantage of three outstanding papers to highlight three major challenges that PTFPs' research will face in the next years.

Expanding the PTFPs toolbox with infrared-emitting members

Far-red-shifted variants are a necessary ingredient in deep-tissue or live-animal imaging. In a recent tour-de-force, Piatkevitch *et al.* [40] developed an infrared-RSFP by exploiting the photocycle of phytochromes between red (Pr) and far-red (Pfr) states. The photosensory core domain of a bacterial phytochrome was engineered to provide PAiRFP1 and PAiRFP2, which can be reversibly switched by 660-nm light into a Pfr-like state emitting fluorescence at ~ 718 nm. Despite their low fluorescence quantum yield and suboptimal contrast ratio (fluorescence in the off state amounts to $\sim 20\%$ of that in the on-state), the two proteins facilitate deep-tissue imaging: the difference between images recorded in the on and off state of the markers can be computed to highlight for

Figure 2



Using PTFPs for deep-tissue imaging, counting macromolecules in dense clusters and developing video-rate nanoscopy. **(a)** *In vivo* imaging using PAiRFP1. Overlay of bright-field and fluorescence images of a control mouse (left) and mice bearing a 10-day old PAiRFP1-expressing tumor before and after photoactivation. The difference between 'non-photoactivated' and 'photoactivated' images emphasizes the contrast enhancement allowed by PAiRFP1. Reproduced from [40], with permission. **(b)** PALM image of Dendra2-RPB1 depicting the heterogeneous distribution of Pol II in the nucleus, with zooms on two Pol II clusters. The time-dependent detection of Dendra2 molecules in a Pol II cluster and the corresponding cumulative detection profile are shown. Reproduced from [43] with permission and with data kindly provided by I. Izeddin. **(c)** Live-cell imaging with parallelized RESOLFT nanoscopy using the N205S-variant of rsEGFP in a living PtK2 cell expressing the keratin19-rsEGFP(N205S) fusion protein. A zoomed view of the area within the white square (top) is also shown (below). Reproduced from [49], with permission and with data kindly provided by A. Chmyrov.

example a labeled tumor region (Figure 2a). In general, far-red and infrared FPs all suffer from a low fluorescence quantum yield (~5% for PAiRFP1/2), possibly due to the many degrees of freedom in elongated chromophores, promoting a multitude of non-radiative de-excitation pathways. Thus far, iPTFPs are therefore inappropriate for single molecule detection and a challenge for the future will be to engineer iPTFPs of high-brightness suitable for localization microscopy.

Mastering Dendra2 photophysics to monitor transient clustering of ribonucleic acid (RNA) polymerase in live cells

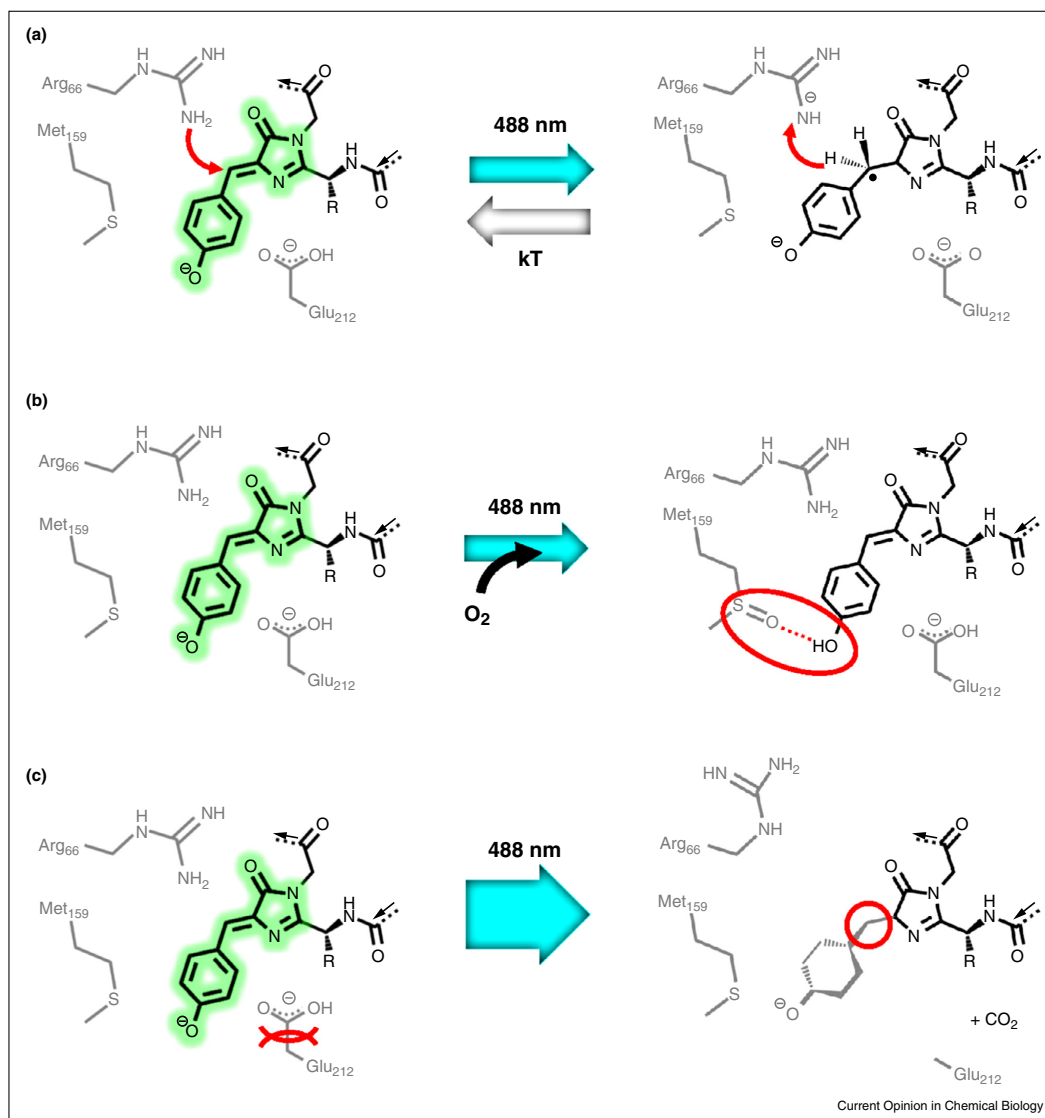
Localization microscopy has recently turned into a quantitative method to count macromolecules within cells, assess their stoichiometries or monitor their clustering patterns. The work by Cisse *et al.* [43] illustrates this trend, introducing time-correlated PALM (TCPALM) to

dynamically measure the clustering of RNA polymerase II (Pol II) in the nuclei of live human cells. By analyzing the temporal sequence of single-molecule detections in individual clusters, it was shown that 'nuclear transcription factories' made of Pol II clusters continuously assemble and disassemble (Figure 2b). To confidently interpret the results, Cisse *et al.*, however, had to pay crucial attention to the complex photophysics of the employed PCFP marker, Dendra2. Like many other PCFPs, Dendra2 stochastically switches to long-lived dark states once photoconverted, which confuses quantitative studies because each molecule may be counted more than once. A number of methods have been proposed to tackle this difficulty, but they are all statistical by nature and thus remain imperfect [9]. There is yet no clear understanding of the exact mechanism giving rise to this slow blinking, and the nano-environmental sensitivity of the process remains to be assessed. A combination of structural

[44,45] and single-molecule [46,47] data on mEos2, Dendra2 and IrisFP suggests that a blinking mechanism in anthozoan PTFPs could involve a transient protonation of carbon C_α of the chromophore methylene bridge via the

nearby Arg66 (Figure 3a). Alternatively, the long dark states could relate to a residual propensity to *cis-trans* chromophore isomerization. Another difficulty in Cisse *et al.* is that the exact numbers of Pol II molecules forming

Figure 3



Phototransformation mechanisms associated with blinking and bleaching in IrisFP. (a) Blinking involves a thermally-reversible photoinduced proton exchange between Arg66 and the methylene bridge of the chromophore. (b) Bleaching under weak-illumination involves an oxygen-dependent mechanism that results in sulfoxidation of the Met159 and trapping of the chromophore in a protonated/non-fluorescent form. (c) Bleaching under strong-illumination conditions results in the decarboxylation of Glu212, conformational change of the chromophore pocket and disordering of the chromophore in a sp³ hybridization state (R = histidine). Important features are depicted in red.

the clusters could not be extracted because of the sub-optimal photoconversion efficiency of Dendra2: a number of labeled Pol II molecules never get photoconverted and are thus not counted. Elegant methods have been proposed recently to evaluate the problem in various PCFPs [27*] and to correct for it [48], but the underlying photo-physics remains mysterious.

Thus, challenges for the future will be to better understand the complex blinking and photoconversion behavior of PCFPs and engineer low-blinking and fully photoconvertible variants.

Video-rate super-resolution microscopy with RSFPs

The concomitant development of sophisticated optical setups and dedicated RSFPs has considerably advanced the nanoscopy approach named RESOLFT [28*,39,49]. By employing RSFPs with long on-state and off-state lifetimes, RESOLFT requires considerably less light than STED nanoscopy to break the diffraction barrier, but at the expense of a reduced time-resolution. However, employing RSFPs with high switching speed such as Dronpa-M159T [39] or rsEGFP2 [28*] allowed relatively fast dynamic RESOLFT imaging. Chmyrov *et al.* [49] demonstrated that video-rate RESOLFT nanoscopy could be achieved on very large field-of-views by designing a highly parallelized setup based on orthogonal and incoherently crossed standing light waves. The spectacular images (Figure 2c) were obtained with rsEGFP(N205S), a slow switching variant of rsEGFP that, by emitting about twice the number of photons per cycle, allowed obtaining images of excellent signal-to-noise ratio. Slow-switching variants such as rsEGFP(N205S) deliver high quality images but limit the achievable acquisition rate, which in the present case was more than compensated by the parallelized optical setup. Noteworthy, the light intensity and the cellular environment influence the switching properties of RSFPs [28*] and many other photophysical parameters (e.g. brightness, expression level, maturation rate, contrast ratio) determine the achievable image quality. Another crucial aspect in RESOLFT is that the resolution enhancement is limited by the fatigue resistance of the RSFP, calling for more photostable RSFPs (and PTFPs in general). Progress in this direction has been achieved by directed evolution [28*] and by recent investigations on IrisFP revealing that two completely different photobleaching mechanisms occur in anthozoan PTFPs [20**]. At light levels typical of standard widefield microscopy ($\ll 100 \text{ W/cm}^2$), IrisFP photobleaching involves an oxygen-dependent mechanism, whereas at light levels employed in PALM microscopy ($\gg 100 \text{ W/cm}^2$) an oxygen-independent CTPA process dominates (Figure 3b,c). It remains unknown whether similar scenarios occur in hydrozoan PTFPs such as rsEGFP or at higher light levels typical of RESOLFT nanoscopy.

Overall, challenges for the future will be to rationally design high-contrast-ratio, fast-switching, high-brightness and fatigue-resistant RSFPs.

Further mechanistic questions

Fluorescent molecules are highly sensitive to their environment. Although the role of the environment surrounding organic dyes has drawn considerable research efforts, for example to develop direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) [50], its importance in PTFPs has been underestimated. Yet, the β -barrel embedding the chromophore in FPs is generally flexible and permeable. Oxygen [16,21,51] and small buffer components such as ethylene glycol [52] can reach the chromophore, while vitamins in the medium may accelerate photobleaching [53]. There is more and more evidence that the efficiency of phototransformations are influenced by the cellular and/or redox microenvironment, as shown for the oxidative redding of enhanced green fluorescent protein (EGFP) [23,53], the photoconversion of mEos2 [54], or the photoswitching of rsEGFP variants [28*]. However, the precise proton and electron pathways, oxygen routes or role of cavities within PTFP structures remain to be determined. Influences of the solvent on the blinking and bleaching behaviors of PTFPs have also been observed, for example, in the presence of redox active molecules such as monoethanolamine (MEA) [55]. In all these cases, the barrel could act as relaying networks via H-bonds or redox active amino acids. Further deciphering such mechanisms in PTFPs will necessitate the development of new theoretical and experimental approaches. Quantitative *in cellulo* and *in vitro* investigations of PTFP's photophysics at the single-molecule and ensemble levels should be pursued jointly, possibly in combination with nanofluidic approaches or optimized sol-gel matrices to cleanly control the PTFP nanoenvironment. Modeling methods would have to be adapted to adequately reproduce low yield processes while taking into account environmental factors. Amazing new perspectives for ultrafast structural investigations seem to be ahead by using X-ray free-electron lasers (XFEL) for visible pump/X-ray probe experiments on PTFPs.

Perspectives for future PTFPs

Fluorescence appears much more widespread in oceans than previously thought, as even vertebrates such as fishes have been found to emit fluorescence [56]. Putative FPs of these organisms probably undergo entirely different fluorescence mechanisms than those involved in GFP-like types, thus offering the opportunity for considerable enlargement of the FP toolbox. A recent example is UnaG, a protein of about half the size of GFP, discovered in a freshwater eel and that fluoresces green upon reversible binding of bilirubin [57]. Another alternative to conventional FPs resides in the increasing use of light, oxygen, or voltage-sensing (LOV) flavoprotein domains [58] whose covalently linked flavin chromophore does not

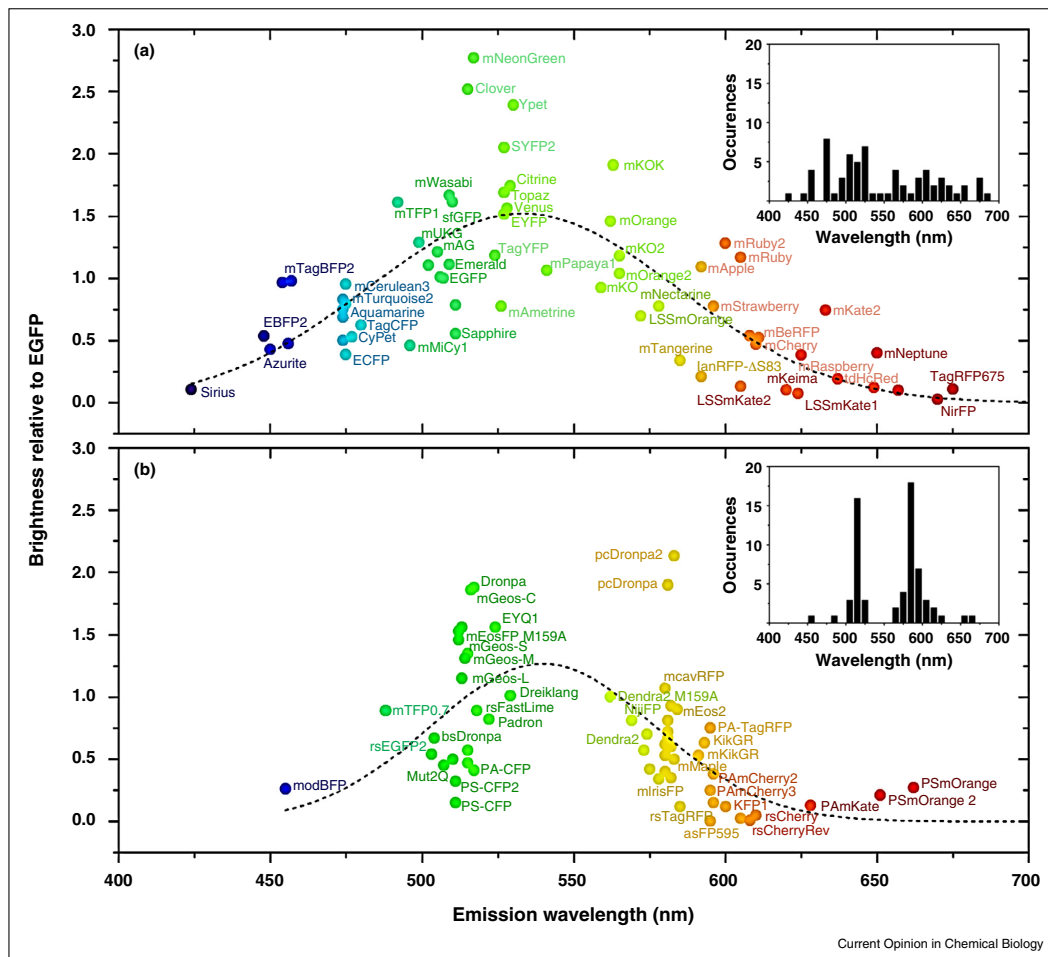
require oxygen to mature. Amongst other advantages, their small size allows the exploration of tight cellular compartments as recently demonstrated for the bacterial periplasm [59]. Engineering these new types of FPs so that they become phototransformable represents a future quest.

Yet, existing PTFPs have still much to offer and will continue to be refined by genetic engineering. Under-appreciated improvements such as codon optimizations or

adaptations of C and N termini are possible solution to rescue non-functional genetic fusions and to explore 'FP-hostile' (e.g. acidic or oxidative) organelles or organisms.

PTFPs also need to see their color palette expanded. The incorporation of non-natural amino acids is a promising route as they can form novel chromophores [60,61]. Plotting the brightness of PTFPs versus their emission color (Figure 4), it appears that, despite recent efforts

Figure 4



Brightness distribution of conventional FPs and PTFPs as a function of their emission colors. (a) Conventional FPs and (b) PTFPs are represented by points and labels that are colored to the approximate appearance to the naked eye. The dashed bell-shaped curves highlight the general distributions of brightness. This figure is an extended version of a figure inspired by [1]. Note that a few labels are omitted for sake of readability and that PTFPs are represented in their activated form only. The absence of PTFPs emitting in the 530–560-nm window is apparent. The histograms (insets) represent the distribution of FPs and PTFPs as a function of their emission wavelengths (bin-width = 15 nm).

[29,40], most PTFPs concentrate nowadays in the green and orange range of emission, leaving the violet/blue and red/far red regions weakly populated. Even more strikingly, the few PTFPs engineered from yellow FPs such as EYQ1 [62] or Dreiklang [38] ended up with green variants and it appears that, unlike conventional FPs, yellowish PTFPs emitting between 530 and 560 nm are totally missing. This absence is particularly noteworthy since this is precisely the wavelength range where the brightness is expected to be the highest [1] so that the engineering of bright yellow PTFPs remains a challenge.

In conclusion, unfolding the full potential of PTFPs will continue to keep developers busy for a while — provided continued funding is made available!

Acknowledgments

The authors acknowledge V. Verkhusha, I. Izeddin and A. Chmyrov for providing raw images to adapt Figure 2. Institutional grants from the CNRS, CEA and UJF and financial support by the ANR (ANR-2011-BSV5-012-01 NOBLEACH) are acknowledged.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Dedecker P, De Schryver FC, Hofkens J: **Fluorescent proteins: shine on, you crazy diamond.** *J Am Chem Soc* 2013, **135**:2387-2402.
 2. Nienhaus K, Ulrich Nienhaus G: **Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution.** *Chem Soc Rev* 2014, **43**:1088-1106.
 3. van Thor JJ, Gensch T, Hellingwerf KJ, Johnson LN: **Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222.** *Nat Struct Biol* 2002, **9**:37-41.
 4. Elowitz MB, Surette MG, Wolf PE, Stock J, Leibler S: **Photoactivation turns green fluorescent protein red.** *Curr Biol* 1997, **7**:809-812.
 5. Sinnecker D, Voigt P, Hellwig N, Schaefer M: **Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins.** *Biochemistry* 2005, **44**:7085-7094.
 6. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE: **On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein.** *Nature* 1997, **388**:355-358.
 7. White J, Stelzer E: **Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells.** *Trends Cell Biol* 1999, **9**:61-65.
 8. Zhou XX, Lin MZ: **Photoswitchable fluorescent proteins: ten years of colorful chemistry and exciting applications.** *Curr Opin Chem Biol* 2013, **17**:682-690.
 9. Sengupta P, van Engelenburg SB, Lippincott-Schwartz J: **Superresolution imaging of biological systems using photoactivated localization microscopy.** *Chem Rev* 2014, **114**:3189-3202.
 10. Bourgeois D, Adam V: **Reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view.** *IUBMB Life* 2012, **64**:482-491.
 11. Bourgeois D, Regis-Faro A, Adam V: **Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins.** *Biochem Soc Trans* 2012, **40**:531-538.
 12. Adam V: **Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application?** *Histochem Cell Biol* 2014, **142**:19-41.
 13. Adam V, Moeyaert B, David CC, Mizuno H, Lelimosin M, Dedecker P, Ando R, Miyawaki A, Michiels J, Engelborghs Y *et al.*: **Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications.** *Chem Biol* 2011, **18**:1241-1251.
 14. Chang H, Zhang M, Ji W, Chen J, Zhang Y, Liu B, Lu J, Zhang J, Xu P, Xu T: **A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:4455-4460.
 15. Moeyaert B, Nguyen Bich N, De Zitter E, Rocha S, Clays K, Mizuno H, van Meervelt L, Hofkens J, Dedecker P: **Green-to-red photoconvertible Dronpa mutant for multimodal super-resolution fluorescence microscopy.** *ACS Nano* 2014, **8**:1664-1673.
- Directed-evolution and structure-driven rational design were employed to design pcDronpa2, a high-brightness (unfortunately tetrameric) three-way highlighter that combines green-to-red photoconversion and photochromism in the green state. A large panel of methods, from crystallography to single-molecule localization microscopy were used and interesting mechanistic considerations are proposed.
16. Subach FV, Patterson GH, Renz M, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV: **Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**:6481-6491.
 17. Gunewardene MS, Subach FV, Gould TJ, Penoncello GP, Gudheti MV, Verkhusha VV, Hess ST: **Superresolution imaging of multiple fluorescent proteins with highly overlapping emission spectra in living cells.** *Biophys J* 2011, **101**:1522-1528.
 18. Langhojer F, Dimler F, Jung G, Brixner T: **Ultrafast photoconversion of the green fluorescent protein studied by accumulative femtosecond spectroscopy.** *Biophys J* 2009, **96**:2763-2770.
 19. Ding L, Chung LW, Morokuma K: **Reaction mechanism of photoinduced decarboxylation of the photoactivatable green fluorescent protein: an ONIOM(QM:MM) study.** *J Phys Chem B* 2013, **117**:1075-1084.
 20. Duan C, Adam V, Byrdin M, Ridard J, Kieffer-Jaquinod S, Morlot C, Arcizet D, Demachy I, Bourgeois D: **Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein.** *J Am Chem Soc* 2013, **135**:15841-15850.
- Combining X-ray crystallography, optical spectroscopy, mass spectrometry and simulations, the authors find that the type of damage inflicted on a PTFP by visible light is dependent on its intensity: at low flux an oxygen-dependent mechanism prevails, whereas higher flux favors reductive chromophore destruction.
21. Subach OM, Patterson GH, Ting LM, Wang Y, Condeelis JS, Verkhusha VV: **A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange.** *Nat Methods* 2011, **8**:771-777.
 22. Subach OM, Entenberg D, Condeelis JS, Verkhusha VV: **A FRET-facilitated photoswitching using an orange fluorescent protein with the fast photoconversion kinetics.** *J Am Chem Soc* 2012, **134**:14789-14799.
- Optimizing the absorption wavelength and photoconversion rate of the orange-to-deep-red switcher PSmOrange, the authors succeed in triggering photoconversion by FRET from a green emitting FP, thus creating a 'memory' of a transient interaction.
23. Saha R, Verma PK, Rakshit S, Saha S, Mayor S, Pal SK: **Light driven ultrafast electron transfer in oxidative redding of green fluorescent proteins.** *Sci Rep* 2013, **3**:1580.
 24. Kim H, Grunkemeyer TJ, Modi C, Chen L, Fromme R, Matz MV, Wachter RM: **Acid-base catalysis and crystal structures of a least evolved ancestral GFP-like protein undergoing green-to-red photoconversion.** *Biochemistry* 2013, **52**:8048-8059.
- 13 mutations were shown to be necessary and sufficient to evolve GFP into a hydrozoan PCFP. Structural and biochemical studies convincingly suggest a green-to-red photoconversion mechanism in which Glu222 abstracts a proton from His65 in the excited state and transfers it to Phe64 via Gln42 to promote bond cleavage and chromophore extension. The quadrupolar network consisting of Glu222, His203, Glu148 and Arg69, as well as the residue Gln42 are proposed to play an essential role in the process.

25. Fron E, Van der Auweraer M, Moeyaert B, Michiels J, Mizuno H, Hofkens J, Adam V: **Revealing the excited-state dynamics of the fluorescent protein Dendra2.** *J Phys Chem B* 2013, **117**:2300-2313.
26. Fron E, Sliwa M, Adam V, Michiels J, Rocha S, Dedecker P, Hofkens J, Mizuno H: **Excited state dynamics of the photoconvertible fluorescent protein Kaede revealed by ultrafast spectroscopy.** *Photochem Photobiol Sci* 2014, **13**:867-874.
27. Durisic N, Laparra-Cuervo L, Sandoval-Alvarez A, Borbely JS, Lakadamyali M: **Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate.** *Nat Methods* 2014, **11**:156-162.
- An interesting example of in cellulo evaluation of PTFP's photophysics at the single molecule level. A nanotemplate approach allowed to precisely evaluate the photoconversion and photoactivation efficiencies of a variety of PCFPs and PAFPs. A maximum of 60% photoconversion efficiency was demonstrated for mEos2.
28. Grotjohann T, Testa I, Reuss M, Brakemann T, Eggeling C, Hell SW, Jakobs S: **rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells.** *eLife* 2012, **1**:e00248.
- In a mutagenesis effort, the authors obtained a double mutant of their EGFP-based reversibly switchable fluorescent protein (rsEGFP) whose photoswitching efficiency is improved. The resulting variant called rsEGFP2 makes it possible to accelerate the RESOLFT acquisition times up to 250 times. Furthermore, with a similar brightness as compared to its parent, rsEGFP2 is two times more resistant to photofatigue and its chromophore is 9 times faster to achieve maturation.
29. Jablonski AE, Vegh RB, Hsiang JC, Bommarium B, Chen YC, Soltsev KM, Bommarium AS, Tolbert LM, Dickson RM: **Optically modulatable blue fluorescent proteins.** *J Am Chem Soc* 2013, **135**:16410-16417.
30. Lavoie-Cardinal F, Jensen NA, Westphal V, Stiel AC, Chmyrov A, Bierwagen J, Testa I, Jakobs S, Hell SW: **Two-color RESOLFT nanoscopy with green and red fluorescent photochromic proteins.** *Chemphyschem* 2014, **15**:655-663.
31. Zhang M, Chang H, Zhang Y, Yu J, Wu L, Ji W, Chen J, Liu B, Lu J, Liu Y *et al.*: **Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins.** *Nat Methods* 2012, **9**:727-729.
32. Faro AR, Carpentier P, Jonasson G, Pompidor G, Arcizet D, Demachy I, Bourgeois D: **Low-temperature chromophore isomerization reveals the photoswitching mechanism of the fluorescent protein Padron.** *J Am Chem Soc* 2011, **133**:16362-16365.
33. Fron E, Van der Auweraer M, Hofkens J, Dedecker P: **Excited state dynamics of photoswitchable fluorescent protein Padron.** *J Phys Chem B* 2013, **117**:16422-16427.
34. Gayda S, Nienhaus K, Nienhaus GU: **Mechanistic insights into reversible photoactivation in proteins of the GFP family.** *Biophys J* 2012, **103**:2521-2531.
35. Warren MM, Kaucikas M, Fitzpatrick A, Champion P, Sage JT, van Thor JJ: **Ground-state proton transfer in the photoswitching reactions of the fluorescent protein Dronpa.** *Nat Commun* 2013, **4**:1461.
36. Ando R, Mizuno H, Miyawaki A: **Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting.** *Science* 2004, **306**:1370-1373.
37. Andresen M, Stiel AC, Folling J, Wenzel D, Schonle A, Egner A, Eggeling C, Hell SW, Jakobs S: **Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1035-1040.
38. Brakemann T, Stiel AC, Weber G, Andresen M, Testa I, Grotjohann T, Leutenegger M, Plessmann U, Urlaub H, Eggeling C *et al.*: **A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:942-947.
39. Testa I, Urban NT, Jakobs S, Eggeling C, Willig KI, Hell SW: **Nanoscopy of living brain slices with low light levels.** *Neuron* 2012, **75**:992-1000.
40. Piatkevich KD, Subach FV, Verkhusha VV: **Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome.** *Nat Commun* 2013, **4**:2153.
41. McEvoy AL, Hoi H, Bates M, Platonova E, Cranfill PJ, Baird MA, Davidson MW, Ewers H, Liphardt J, Campbell RE: **mMaple: a photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities.** *PLoS One* 2012, **7**:e51314.
42. Jensen NA, Danz JG, Willig KI, Lavoie-Cardinal F, Brakemann T, Hell SW, Jakobs S: **Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein Dreiklang.** *Chemphyschem* 2014, **15**:756-762.
43. Cisse II, Izeddin I, Causse SZ, Boudarene L, Senecal A, Muresan L, Dugast-Darzacq C, Hajj B, Dahan M, Darzacq X: **Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells.** *Science* 2013, **341**:664-667.
44. Adam V, Lelimosin M, Boehme S, Desfonds G, Nienhaus K, Field MJ, Wiedenmann J, McSweeney S, Nienhaus GU, Bourgeois D: **Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:18343-18348.
45. Roy A, Field MJ, Adam V, Bourgeois D: **The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein.** *J Am Chem Soc* 2011, **133**:18586-18589.
46. Lee SH, Shin JY, Lee A, Bustamante C: **Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:17436-17441.
47. McKinney SA, Murphy CS, Hazelwood KL, Davidson MW, Looger LL: **A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein.** *Nat Methods* 2009, **6**:131-133.
48. Puchner EM, Walter JM, Kasper R, Huang B, Lim WA: **Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:16015-16020.
49. Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, Ratz M, d'Este E, Jakobs S, Eggeling C, Hell SW: **Nanoscopy with more than 100,000 'doughnuts'.** *Nat Methods* 2013, **10**:737-740.
50. van de Linde S, Sauer M: **How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching.** *Chem Soc Rev* 2014, **43**:1076-1087.
51. Regmi CK, Bhandari YR, Gerstman BS, Chapagain PP: **Exploring the diffusion of molecular oxygen in the red fluorescent protein mCherry using explicit oxygen molecular dynamics simulations.** *J Phys Chem B* 2013, **117**:2247-2253.
52. von Stetten D, Batot GO, Noirclerc-Savoye M, Royant A: **Alteration of fluorescent protein spectroscopic properties upon cryoprotection.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012, **68**:1578-1583.
53. Bogdanov AM, Kudryavtseva EI, Lukyanov KA: **Anti-fading media for live cell GFP imaging.** *PLoS One* 2012, **7**:e53004.
54. Izeddin I, Specht CG, Lelek M, Darzacq X, Triller A, Zimmer C, Dahan M: **Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe.** *PLoS One* 2011, **6**:e15611.
55. Endesfelder U, Malkusch S, Flottmann B, Mondry J, Liguzinski P, Verveer PJ, Heilemann M: **Chemically induced photoswitching of fluorescent probes—a general concept for super-resolution microscopy.** *Molecules* 2011, **16**:3106-3118.
56. Sparks JS, Schelly RC, Smith WL, Davis MP, Tchernov D, Pieribone VA, Gruber DF: **The covert world of fish biofluorescence: a phylogenetically widespread and phenotypically variable phenomenon.** *PLoS One* 2014, **9**:e83259.
57. Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi Y, Shimogori T, Miyawaki A: **A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle.** *Cell* 2013, **153**:1602-1611.

102 **Molecular imaging**

58. Wingen M, Potzkei J, Endres S, Casini G, Rupprecht C, Fahlke C, Krauss U, Jaeger KE, Drepper T, Gensch T: **The photophysics of LOV-based fluorescent proteins – new tools for cell biology.** *Photochem Photobiol Sci* 2014, **13**:875-883.
59. Zhang LC, Risoul V, Latifi A, Christie JM, Zhang CC: **Exploring the size limit of protein diffusion through the periplasm in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 using the 13 kDa iLOV fluorescent protein.** *Res Microbiol* 2013, **164**: 710-717.
60. Liu X, Li J, Hu C, Zhou Q, Zhang W, Hu M, Zhou J, Wang J: **Significant expansion of the fluorescent protein chromophore through the genetic incorporation of a metal-chelating unnatural amino acid.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2013, **52**:4805-4809.
61. Groff D, Wang F, Jockusch S, Turro NJ, Schultz PG: **A new strategy to photoactivate green fluorescent protein.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, **49**:7677-7679.
62. Abbruzzetti S, Bizzarri R, Luin S, Nifosi R, Storti B, Viappiani C, Beltram F: **Photoswitching of E222Q GFP mutants: “concerted” mechanism of chromophore isomerization and protonation.** *Photochem Photobiol Sci* 2010, **9**:1307-1319.

11.10.3 Berardozzi et al., JACS, 2015

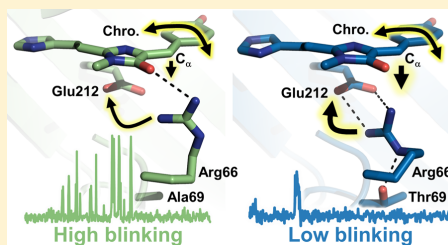
Arginine 66 Controls Dark-State Formation in Green-to-Red Photoconvertible Fluorescent Proteins

Romain Berardozi, Virgile Adam,* Alexandre Martins, and Dominique Bourgeois*

[†]Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Photoactivated localization microscopy (PALM) is a powerful technique to investigate cellular nanostructures quantitatively and dynamically. However, the use of PALM for molecular counting or single-particle tracking remains limited by the propensity of photoconvertible fluorescent protein markers (PCFPs) to repeatedly enter dark states. By designing the single mutants mEos2-A69T and Dendra2-T69A, we completely swapped the blinking behaviors of mEos2 and Dendra2, two popular PCFPs. We combined X-ray crystallography and single-molecule microscopy to show that blinking in mEos2 and Dendra2 is largely controlled by the orientation of arginine 66, a highly conserved residue in Anthozoan PCFPs. The Arg66 side-chain conformation affects the bleaching and the *on-to-off* transition quantum yields, as well as the fraction of molecules entering long-lived dark states, resulting in widely different apparent blinking behaviors that largely modulate the efficiency of current blinking correction procedures. The present work provides mechanistic insight into the complex photophysics of Anthozoan PCFPs and will facilitate future engineering of bright and low-blinking variants suitable for PALM.



INTRODUCTION

Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins (PCFPs) have become popular markers to investigate cellular structures at the nanoscale with photoactivated localization microscopy (PALM).^{1,2} Beyond standard PALM-based applications with fixed or live cells, PCFPs are employed in advanced applications such as a quantitative PALM (q-PALM), to measure protein copy-number or stoichiometry at the single-molecule level,³ or single-particle tracking PALM (spt-PALM), to extract diffusion traces from a large pool of target molecules.⁴ However, the pronounced tendency of PCFPs to transiently enter dark states (i.e., to “blink”) complicates the use of PALM, notably to investigate cellular nanostructures quantitatively and dynamically. Indeed, a photoconverted (red) PCFP experiencing multiple blinking cycles before irreversible bleaching may be confounded with multiple non-blinking molecules, causing clusterization artifacts in super-resolved images and counting errors in q-PALM.⁵ In spt-PALM, the accurate tracking of highly mobile target molecules is complicated by prolonged dark periods of the PCFP labels, during which molecular trajectories are lost.⁶ Photoblinking affects all fluorescent proteins (FPs) and was first reported in green fluorescent protein (GFP) variants.⁷ Blinking photophysics in FPs have been studied by fluorescence correlation spectroscopy (FCS),^{8–12} steady-state,^{13,14} time-resolved,^{14,15} single-molecule,^{16–20} structural,²¹ and theoretical^{12,22,23} approaches, and have been found to span a wide range of time scales from fast (~ 1 – 100 kHz)^{8–11} to slow (~ 0.1 – 10 Hz).^{16,17,24} Changes in chromophore protonation, isomeric state, or spin state have been proposed to be

responsible for photoblinking,²⁵ but a detailed understanding of blinking mechanisms in FPs is currently lacking.

Blinking can be somewhat reduced by controlling the PCFP’s nanoenvironment,^{18,26} but this is generally not a viable strategy in live cells. A number of sophisticated algorithms have been proposed to correct for blinking in PALM data,^{18,19,27–29} but the efficiency of these procedures drops abruptly when the labeling density increases, or, importantly, when the *on*-state recovery rate decreases. Recovery rates below 1 s^{−1}, typically observed in all PCFPs for a fraction of the molecules, are thus particularly difficult to deal with.

The successful design of “low-blinking” PCFPs would constitute an important breakthrough for PALM-based applications. However, the difficulty in setting up efficient screening protocols to assess blinking properties¹⁵ renders the use of directed-evolution approaches challenging, and rather prompts at engineering efforts based on rational design. Hence, gaining more mechanistic insight into the photophysics of PCFP’s blinking is desirable.

Our earlier work on IrisFP, a PCFP derived from EosFP that displays, in addition to photoconversion, reversible photo-switching properties in both its green and red states,³⁰ suggested the existence of a radical-based transient dark state in which the C_α atom of the chromophore methylene bridge adopts a sp³ configuration, giving rise to a distorted, nonfluorescent chromophore.^{22,31} Crystallographic data and quantum chem-

Received: September 21, 2015

Published: December 17, 2015

ical/molecular mechanical calculations suggested that Arg66, a highly conserved residue in PCFPs of Anthozoan origin, located in the close vicinity of the chromophore, might directly influence this blinking behavior by transiently donating a proton to the C_{α} atom. Moreover, Arg66 was proposed to play a possible role in photobleaching, notably through photo-oxidative pathways involving decarboxylation of the conserved Glu212.^{22,32–34}

Interestingly, Dendra2 and mEos2, two of the most popular PCFPs in which Arg66 adopts different conformations,^{21,35} display significantly different blinking and bleaching behaviors.^{19,20} In mEos2, like in IrisFP, Arg66 interacts with the carbonyl group of the chromophore imidazolinone ring. *In vitro* immobilized mEos2 displays a high propensity to blink, is relatively resistant to photobleaching, and an important fraction of mEos2 dark states are long-lived.¹⁹ Conversely, Dendra2, in which Arg66 interacts with the glutamate 212, exhibits a relatively low propensity to blink, is poorly resistant to photobleaching, and its dark states are mainly short-lived.¹⁹ These differences, however, appear to be modulated by the sample-specific nano-environment.^{18,20}

Previous work has shown that it is possible to control the conformation of Arg66 through substitution of the residue at position 69, which, depending on its nature, may or may not interact with Arg66.^{21,36} This strategy was used to demonstrate that the orientation of Arg66 in EosFP,²¹ Dendra2,²¹ and pcDronpa³⁶ tunes the electron density pattern along the chromophore in both the ground and excited states, resulting in shifts of the excitation/emission maxima and protonation equilibrium (pK_a). Here, to isolate the influence of the Arg66 conformation on blinking and bleaching in mEos2 and Dendra2, we designed the single mutants mEos2-A69T and Dendra2-T69A and performed combined single-molecule and crystallographic measurements. The results highlight the profound influence of Arg66 in controlling the entire photophysical behavior of Anthozoan PCFPs and provide general insight into the molecular mechanisms of dark-state formation in these essential markers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental procedures are described in detail in the Supporting Information.

RESULTS

Steady-State Spectroscopy. As expected, the single substitution of the alanine at position 69 by a threonine turns mEos2 into a Dendra2-like emitter by inducing a hypsochromic shift of the absorption and fluorescence emission maxima and by stabilizing the protonated chromophore for both the green and red forms (Table S1, Figures S1–S4). Likewise, the reverse mutation T69A turns Dendra2 into a mEos2-like emitter (Table S1, Figures S1–S4). The Dendra2-T69A chromophore resides mainly in its anionic fluorescent form at physiological pH, leading to an increased rate of photon emission compared to its parent Dendra2.

***In Vitro* Single-Molecule Measurements Using a Novel Immobilization Assay.** In order to investigate the blinking behavior of mEos2, Dendra2 and their respective variants, we developed a single-molecule assay. FPs were immobilized by covalent cross-linking of their N termini and solvent-exposed amine groups (lysine and arginine residues) to a glass coverslide functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES)

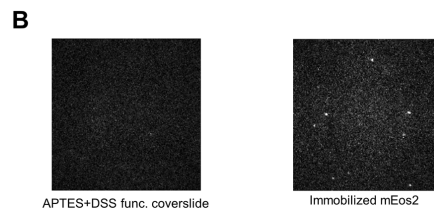
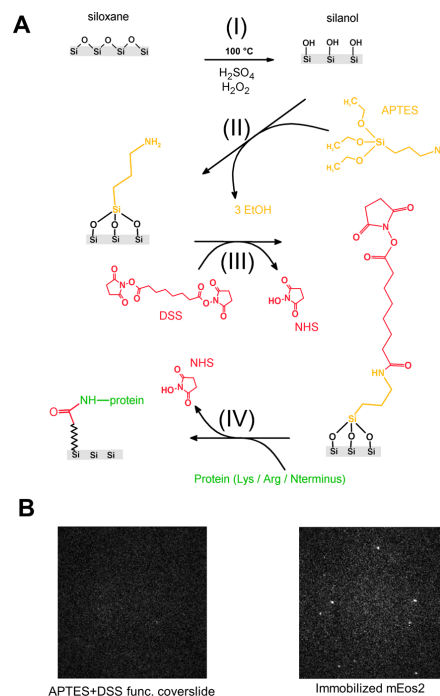


Figure 1. (A) Scheme of the functionalization method used to immobilize single molecules by means of double covalent bonding. (B) Functionalized coverslides devoid of mEos2 show no red fluorescence contamination (left). In the presence of photoconverted mEos2, fluorescence from immobilized single molecules can be identified (right). (Images are displayed on the same intensity scale.)

and disuccinimidyl suberate (DSS) (Figure 1A; see Supporting Information for details). This new method allows immobilization of any molecule carrying free amine functions without requiring any particular fixation tag such as biotine, while allowing full control of environmental conditions (oxygen content, redox conditions, and pH among others) by simply changing the mounting medium. This method allows recording of single-molecule fluorescence time traces with high signal-to-noise ratio (Figure 1B) while potentially avoiding adverse effects linked to matrix embedding.³⁷ Agreement between photophysical parameters measured on mEos2 and Dendra2 using either a biotin/streptavidin immobilization assay¹⁹ or our method suggests a neutral effect of DSS anchoring on FPs' photophysics.

Figure 2A shows characteristic kymograms and fluorescence time traces of immobilized single-molecules in a PBS pH 7.4 buffer. Dendra2 and mEos2-A69T show a low tendency to blink before irreversible bleaching. In contrast, Dendra2-T69A and mEos2 show a marked tendency to blink with short *on*-times punctuated by several *off*-times before bleaching. The change in brightness caused by the single-substitutions at position 69 also appears evident. To precisely assess the effect of the A69T and T69A mutations on the blinking and bleaching behavior of mEos2 and Dendra2, we measured the average number of blinks experienced by a molecule, as well as the macroscopic blinking/

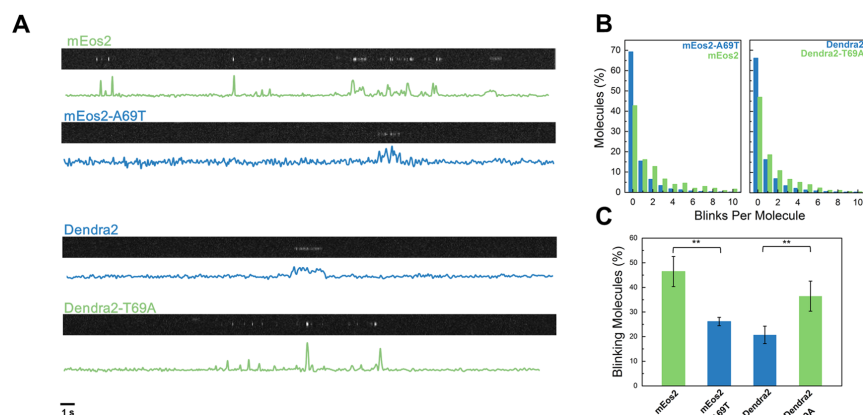


Figure 2. Blinking behavior of *in vitro* immobilized mEos2, Dendra2 and their respective variants. (A) Characteristic kymograms and fluorescence time traces of single-molecules. (B) Histograms of the number of blinks experienced by single-molecules. (C) Fraction of molecules that experience at least one blinking event during their lifetime. Data shown as mean \pm standard deviation of triplicate experiments. * p -value ≤ 0.05 , ** p -value ≤ 0.01 obtained for two-independent-samples t -tests.

Table 1. Blinking and Bleaching Properties of Immobilized mEos2, Dendra2, and Their Respective Variants Measured *in Vitro* (PBS, pH 7.4) in Their Photoconverted Red Form

	mEos2	mEos2-A69T	Dendra2	Dendra2-T69A
photon budget ^a	$(10 \pm 1) \times 10^2$	$(4.4 \pm 0.2) \times 10^2$	$(4.7 \pm 0.7) \times 10^2$	$(7 \pm 0.5) \times 10^2$
average blinks per molecule ^b	0.93 ± 0.2	0.39 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.62 ± 0.2
fraction of blinking molecules (%)	46 ± 6	26 ± 1	21 ± 3	36 ± 6
bleaching macroscopic rate (s^{-1}) ^c	8.9 ± 0.2	16.4 ± 3.7	21.4 ± 2.6	15.8 ± 3.0
blinking macroscopic rate (s^{-1}) ^c	8.2 ± 0.8	6.3 ± 0.9	6.2 ± 0.5	9.7 ± 0.7
bleaching quantum yield ^d	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(5.3 \pm 1.2) \times 10^{-5}$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^{-5}$
blinking quantum yield ^d	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(9.0 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
fast blinking quantum yield ^d	$(2.4 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(9.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(5.2 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
slow blinking quantum yield ^d	$(7.6 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(1.08 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(8.8 \pm 0.8) \times 10^{-6}$	$(6.5 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
bleaching microscopic rate (s^{-1}) ^e	$(2.7 \pm 0.5) \times 10^3$	$(12.6 \pm 0.3) \times 10^3$	$(11.4 \pm 0.1) \times 10^3$	$(3.5 \pm 0.7) \times 10^3$
blinking microscopic rate (s^{-1}) ^e	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^3$	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^3$	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^3$	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^3$
fast blinking microscopic rate (s^{-1}) ^e	$(0.58 \pm 1.3) \times 10^3$	$(2.2 \pm 0.4) \times 10^3$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^3$	$(0.58 \pm 1.5) \times 10^3$
slow blinking microscopic rate (s^{-1}) ^e	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^3$	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^3$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^3$
slow recovery rate (s^{-1}) ^f	1.2 ± 0.1	1.4 ± 1.6	1.7 ± 0.9	1.6 ± 0.2
fast recovery rate (s^{-1}) ^f	16.8 ± 2.1	18.6 ± 4.6	15.7 ± 3.7	15.7 ± 4.5
fraction of long-lived dark states (%)	76 ± 2	54 ± 8	63 ± 4	73 ± 5

^aPhoton budget is calculated as the number of photons detected during the lifetime of the protein. ^bAverage number of blinks is calculated as the ratio between blinking and bleaching rates (k_d/k_{bl}). ^cMacroscopic bleaching rates are calculated by fitting the bleach-time histograms with a monoexponential model (see Figure S7 and Experimental Procedures for details). Macroscopic blinking rates are estimated from *on*-time histograms after correcting for the contribution of bleaching. ^dBlinking and bleaching quantum yields are derived from the measured macroscopic rates after correcting for laser power density, laser wavelength, and molar extinction coefficients of red chromophores (as reported in Table S1). Slow and fast blinking quantum yields are calculated as $\varphi_{\text{blink,slow}} = \varphi_{\text{blink}} f_{\text{long}}$ and $\varphi_{\text{blink,fast}} = \varphi_{\text{blink}} (1 - f_{\text{long}})$, respectively, with φ_{blink} the blinking quantum yield and f_{long} the fraction of long-lived dark states. ^eMicroscopic rates are calculated as the ratio between phototransformation's quantum yields and excited state lifetimes (see Table S1). ^fSlow and fast recovery rates are obtained by fitting the *off*-time histograms with a double-exponential model (Figure 4A and Figure S7). Values are given as mean \pm standard deviation from triplicate experiments.

bleaching rates based on the analysis of single-molecule fluorescence time traces retrieved with a refined version of the method proposed by Lee et al.^{18,19}

The single-substitutions A69T in mEos2 and T69A in Dendra2 essentially swap the blinking propensities of the two PCFPs (Figure 2B,C). The average number of blinks per molecule in mEos2 (0.93) drops by a factor of 2.4 in the A69T mutant (Table 1). Accordingly, the fraction of mEos2-A69T molecules that experience blinking is reduced by a factor of 1.8 (26% vs 46% for mEos2). In contrast, the single substitution

T69A in Dendra2 increases the average number of blinks experienced by a molecule by a factor of 2.1 and the fraction of blinking molecule by a factor of 1.6. Interestingly, while Dendra2-T69A displays an overall photophysical behavior similar to that of mEos2 (Table S1), it is fully monomeric at high concentration (Figure S5), whereas mEos2 is known to dimerize.³⁵

The observed number of blinks of a FP, as shown in Figure 2, is dictated by both its reversible dark-state conversion and its irreversible bleaching kinetics ($\langle N_{\text{blink}} \rangle = k_d/k_{bl}$, with k_d the dark-

state-conversion and k_{bl} the bleaching rates¹⁹). We measured k_d and k_{bl} for Dendra2, mEos2, and their respective mutants by fitting the *on*-time and bleach-time histograms reconstructed from the single-molecule fluorescence time traces (Figure S6), according to the kinetic model presented in Figure S7. The single-substitution A69T in mEos2 results in a 1.8-fold increase in the bleaching rate and a 1.3-fold decrease in the dark-state-conversion rate (Figure 3A,B, Table 1). In contrast, the

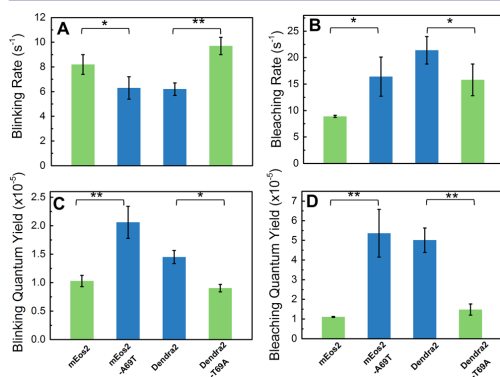


Figure 3. Blinking (A) and bleaching (B) rates measured for *in vitro* immobilized mEos2, Dendra2 and their respective variants. Blinking (C) and bleaching (D) quantum yields retrieved after correcting for local laser power densities and molar extinction coefficients of the anionic red forms at the excitation wavelength (reported in Table S1). Data shown as mean \pm standard deviation of triplicate experiments. **p*-value ≤ 0.05 , ***p*-value ≤ 0.01 obtained for two-independent-samples *t*-tests.

Dendra2-T69A mutant displays a 1.3 times decrease in the bleaching rate and a 1.6-fold increase in the dark-state-conversion rate (Figure 3A,B, Table 1). Correcting for the excitation rates, which depend on local laser power density and extinction coefficients at the excitation wavelength (Table S1), the quantum yields of bleaching and dark-state-conversion can be estimated (for details see ref 18). Due to the large differences in extinction coefficients, which mostly result from substantial deviations in chromophore pK_a s, it appears that the bleaching quantum yields of Dendra2 and mEos2-A69T largely exceed those of mEos2 and Dendra2-T69A and that, more surprisingly, their dark-state-conversion quantum yields also stand above, although to a lower extent (Table 1, Figure 3C,D). The reduced observed number of blinks in Dendra2 and mEos2-A69T relative to mEos2 and Dendra2-T69A thus results from strongly increased bleaching, not from reduced conversion to reversible dark states.

Next, we analyzed the *off*-time distributions of the four PCFP variants. As shown by others,^{19,38} the *off*-time histograms are well fitted by a double-exponential model, suggesting the existence of two dark states characterized by different lifetimes (Figure 4A, Figure S8). The data show that mEos2 and Dendra2-T69A enter more frequently into long-lasting dark states (76% and 73% of the blinking population, respectively) compared to mEos2-A69T and Dendra2 (54% and 63% of the population, respectively) (Figure 4B, Table 1). The *on*-state recovery rates do not significantly vary between all variants (Figure S8A), suggesting that the same dark states are populated and that their thermodynamics is not strongly affected by the

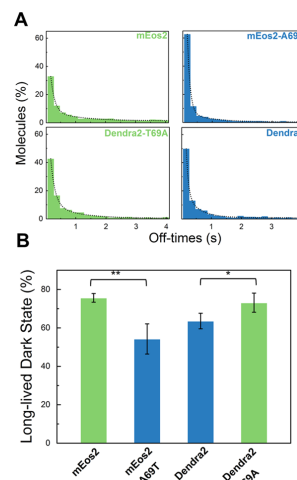


Figure 4. Behavior of dark-state populations of *in vitro* immobilized mEos2, Dendra2, and their respective variants. (A) *Off*-time distributions fitted by a double-exponential model represented as black dotted lines. (B) Fractions of blinking molecules entering a long-lived dark state. Data shown as mean \pm standard deviation of triplicate experiments. **p*-value ≤ 0.05 , ***p*-value ≤ 0.01 obtained for two-independent-samples *t*-tests.

orientation of Arg66. Furthermore, in agreement with previous reports,¹⁹ we found that only the slow recovery rate is influenced by 405 nm light (Figure S8B). Taking into account the fraction of molecules that enter short and long-lived dark states, respectively, the quantum yields for fast and slow blinking can be obtained (Table 1).

To relate our single-molecule data with the bulk behavior of our PCFPs, we performed additional measurements at the ensemble level. In the case of mEos2 and Dendra2-T69A, the data clearly suggest that a large fraction of the population enters a dark state that recovers on the several minutes to seconds time scale in the absence or presence of 405 nm light, respectively (Figure S9). For Dendra2 and mEos2-A69T, in contrast, a lower fraction of the population enters a dark state, with similar recovery rates in the presence of 405 nm light.

The data are thus consistent with the ensemble-level dark state corresponding to the long-lived dark state evidenced at the single-molecule level. The lower amount of recovery observed in Figure S9 for Dendra2 and mEos2-A69T also fully agrees with photobleaching being higher in the case of these two variants. However, the ensemble data are not consistent with the magnitude of the photobleaching quantum yields measured at the single-molecule level. Considering the large difference in laser excitation intensities used in ensemble and single-molecule experiments, this finding is in line with a nonlinear photobleaching mechanism that depends on the subsequent absorption of two photons.

In order to get further insights into the blinking and bleaching mechanisms, we investigated their sensitivity to the local nano-environment, which can be conveniently performed using our immobilization assay. We characterized the photophysical behavior of our PCFPs at the single-molecule level in anaerobic conditions using a glucose/glucose oxidase/catalase O₂-

scavenging system, and in a strong oxidizing environment using $\text{Fe}(\text{CN})_6$. For both conditions, a significant drop in the signal-to-noise ratio of the data was noticed for all variants. The bleaching quantum yield of mEos2 in the absence of oxygen was found significantly increased compared to normal oxygenated conditions (Figure S10). This suggests that under the strong illumination conditions used in PALM, bleaching mainly occurs through an oxygen-independent mechanism likely to involve the triplet state, the lifetime of which is increased in the absence of O_2 . Consistently, in the presence of $\text{Fe}(\text{CN})_6$, the bleaching quantum yield strongly increased, highlighting the sensitivity of the chromophore to redox-driven photochemistry. In parallel, the fraction of mEos2 molecules experiencing fast blinking relative to slow blinking was found increased in both anaerobic and oxidative conditions. These findings are consistent with fast blinking also involving triplet state redox chemistry, while slow blinking could be triggered by conformational dynamics occurring in the singlet excited state. Similar findings were found for all variants (Figure S10).

In Cellulo Single-Molecule Measurements. To assess the effect of the cellular environment, we performed single-molecule measurements on fixed HeLa cells expressing mEos2, Dendra2, or their respective variants free in the cytoplasm. Arg66 was found to control the mean number of blinks, the rates of bleaching and dark-state conversion, and the fraction of molecules entering the long-lived dark state in a similar manner as was found *in vitro* (Table S2, Figures S11 and S12). Despite rather strong variability between individual measurements, which we attribute to intercellular heterogeneity, a tendency for increased bleaching was noticed, when compared to the *in vitro* results. This could result from the redox-active cytoplasmic environment.

Crystallographic Studies. In order to get insights into how Arg66 controls the bleaching and blinking mechanisms at play in the studied PCFPs, we solved the crystallographic structure of mEos2-A69T (green form, PDB access code: 5DTL) and compared it to those of mEos2 (PDB access code: 3S05) and Dendra2 (PDB access code: 2VZX). The structure of mEos2-A69T confirms that the single mutation on residue 69 was sufficient to transform the chromophore environment of mEos2 into the one of Dendra2 (Figure 5). In mEos2, Arg66 adopts a stretched conformation toward the chromophore in which the guanidinium moiety interacts with the carbonyl group of the imidazolinone ring while standing 6.5 Å away from the carboxyl group of Glu212. The distance between the N_{η} atoms and the chromophore C_{α} atom is ~ 3.5 Å (Figure 5, Table 2). This distance shrinks to ~ 3.2 Å for $N_{\eta 1}$ in a model inspired from blinked IrisFP³¹ in which the chromophore is placed in a distorted sp^3 geometry (Figure 5B, Table 2). In comparison, in Dendra2 and mEos2-A69T, the conformation adopted by the Arg66 side chain is curled, as a result of the interaction between the hydroxyl group of Thr69 and the ϵ -amine of the guanidinium moiety (Figure 5C,E). Consequently, the $N_{\eta 1}$ atom now forms a salt bridge with the carboxyl group of Glu212. In this conformation the guanidinium does not interact with the imidazolinone carbonyl of the chromophore but points directly below the methylene bridge so that the distance between atom $N_{\eta 1}$ of Arg66 and atom C_{α} of the chromophore shrinks from ~ 3.5 to < 2.9 Å in a putative distorted blinked state, largely below the distance measured for mEos2 (Figure 5D,F). Overall, in Dendra2 and mEos2-A69T, Arg66 appears to be in a more favorable position to promote decarboxylation of Glu212 and to donate a proton to the C_{α} atom in a coupled electron-/

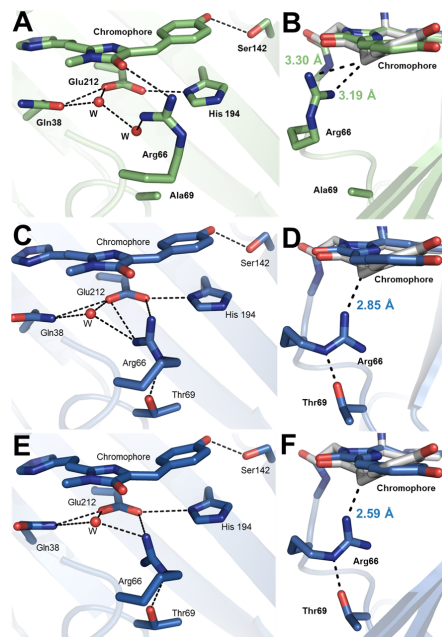


Figure 5. Crystallographic structures of mEos2 (A,B), Dendra2 (C,D), and mEos2-A69T. (E,F) Hydrogen bonds are represented as black dotted lines. Distorted chromophores (light gray in B, D, and F) are attributed to a short-lived dark state. The geometry of the distorted chromophores was taken from the X-ray structure of an IrisFP short-lived dark state (PDB access code: 3TMT²²) and chromophore alignments were performed by least-squares minimization.

Table 2. Distances (Å) between Key Atoms Involved in Bleaching and Blinking, from Crystallographic Structures

	mEos2	mEos2-A69T	Dendra2
$N_{\eta}^{\text{Arg66}} - \text{C}=\text{O}^{\text{chromophore}}$	3.12	4.15	3.88
$N_{\eta}^{\text{Arg66}} - \text{C}=\text{O}^{\text{Glu212}}$	5.8	3.3	3.17
$N_{\eta}^{\text{Arg66}} - \text{C}-\text{O}^- \text{Glu212}$	6.54	3.97	3.83
$N_{\eta}^{\text{Arg66}} - C_{\alpha}^{\text{planar chromophore}}$	3.45	3.54	3.48
$N_{\eta}^{\text{Arg66}} - C_{\alpha}^{\text{IrisFP distorted chromophore}}$	3.19/3.30 ^b	2.85	2.59

^aThe reported distances may be underestimated due to the structural response of the FP scaffold to the distortion of the chromophore in the short-lived dark state. ^bFor mEos2, Arg66 adopts a conformation in which $N_{\eta 1}$ and $N_{\eta 2}$ stand close to the benzylidene carbon in the distorted state, while in mEos2-A69T and Dendra2, the curled-up conformation allows an interaction between the benzylidene carbon and only one out of the two N_{η} .

proton-transfer process.²² We note that although these conclusions derive from crystallographic structures obtained in the green states of the PCFPs, they are expected to remain valid in the red states, as green-to-red photoconversion is known to imply only very minor structural reorganization around the chromophore, and thus does not substantially modify the Arg66 interaction pattern.²

Design of mEos2-R66L. In a quest for low-blinking and photostable PCFP variants, we sought to design a mEos2 mutant in which the nature of the residue at position 66 would avoid any electrostatic interaction and proton exchange with

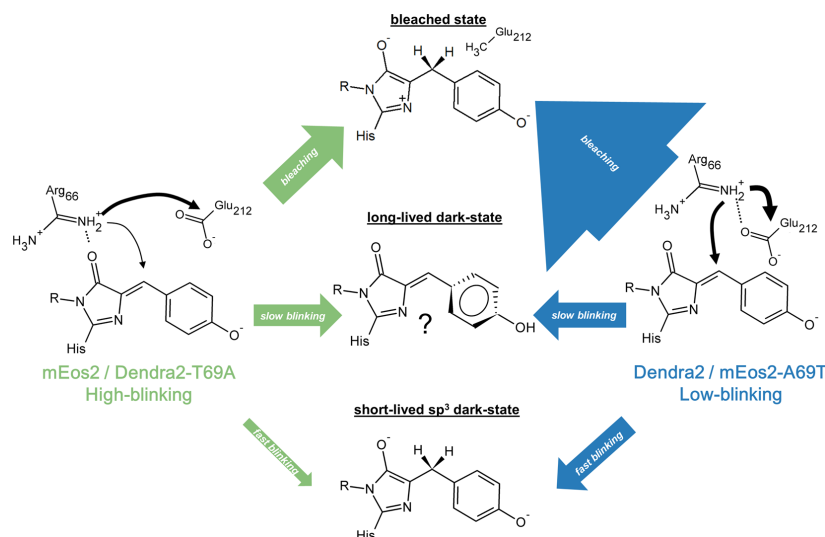


Figure 6. Proposed phototransformations in mEos2-like and Dendra2-like PCFPs. The thickness of the arrows reflects the measured microscopic rates of the considered phototransformations. Black arrows are indicative of proton transfers.

either the chromophore or Glu212. The almost isosteric variant mEos2-R66L could be successfully engineered but the chromophore was found mainly protonated at pH 7.4 and did not show detectable photoconversion to a red form under 405-nm illumination (Figure S13). Moreover, in its green form, this variant showed a pronounced photochromic behavior under alternating illumination with 488- and 405-nm light, similarly to the mGeos³⁹ or SkyJan-S⁴⁰ variants (Figure S13). These data show that Arg66, in addition to blinking and bleaching, also plays an essential role in green-state photoswitching and in green-to-red photoconversion, suggesting that mutating this residue is unlikely to be a viable strategy to rationally engineer improved PCFPs.

DISCUSSION

The combined analysis of the single-molecule and crystallographic data reveals how the single residue Arg66 precisely controls blinking and bleaching in Anthozoan PCFPs and provides insight into the associated molecular mechanisms. Notably, quantitative analysis of the single-molecule fluorescence traces allows extracting the quantum yields of the studied phototransformations in the experimental conditions of localization microscopy. Microscopic rates can then be obtained as $k = \phi/\tau$, with ϕ the quantum yield and τ the excited-state lifetime. These microscopic rates, reported in Table 1, provide an absolute measure of the propensity to enter a given phototransformation pathway. Hence, they provide general guidelines for a fair mechanistic comparison between our four variants (Figure 6).

The much higher microscopic bleaching rate of Dendra2 and mEos2-A69T as compared to Dendra2-T69A and mEos2 (>220% increase) strongly suggests that the orientation of Arg66 controls the bleaching mechanism. Our findings are consistent with the hypothesis that Arg66 favors Glu212 decarboxylation when its guanidinium group directly interacts with this residue through a salt bridge. In IrisFP, Glu212

decarboxylation has been shown to be a dominant photobleaching pathway under high-intensity laser illumination (\sim kW/cm²), as typically employed in single-molecule localization microscopy. This mechanism is oxygen independent and involves the triplet state as a starting point, in line with the increased bleaching we observed in mEos2 under anaerobic conditions. Glu212 decarboxylation in FPs has been proposed to proceed from the carboxylate conjugate form of the glutamate⁴¹ through a Kolbe-like photoreaction that involves a \cdot CH₂ radical intermediate^{22,33,42} followed by protonation to form a final methyl group. In Dendra2 and mEos2-A69T, the strong saline interaction between the positively charged Arg66 and the Glu212 likely results in a stabilization of the conjugate base of the carboxylic acid function carried by the glutamate, accounting for the higher microscopic bleaching rates. Moreover, the electrophilic Arg66 guanidinium moiety may also favor Glu212 decarboxylation via an electron-withdrawing effect that would result in a weakening of the C_γ-C_δ bond. In addition, Arg66 could provide the final proton to the \cdot CH₂ species, as it does to the C_α atom in case of blinking, as described above.²² Interestingly, such scenario is corroborated by the higher photoresistance of mOrange relative to its parent DsRed, in which the conformation of the amine-carrying residue Lys70 (66 in PCFPs) is not interacting anymore with Glu215 (212 in PCFPs).^{24,34}

The higher propensity of Dendra2 and mEos2-A69T to switch from the *on* state to the short-lived dark state, compared to Dendra2-T69A and mEos2 (>100% increase), together with the crystallographic observation of a reduced distance between Arg66 and atom C_α of the putatively distorted chromophore, strongly suggest that the short-lived dark state corresponds to a radical-based chromophore in which the C_α atom is protonated and sp³-hybridized. This is further substantiated by our observation that recovery from the short-lived dark state is not accelerated by 405-nm light illumination (Figure S8B), in line with the distorted state in IrisFP not absorbing visible

light.³¹ In such a mechanism, the shorter distance in Dendra2 and mEos2-A69T between the N_{β} atom of Arg66 and atom C_{α} of the chromophore would favor proton tunneling in a coupled electron-/proton-transfer pathway.²² Furthermore, such a redox-based mechanism, also proposed to involve the triplet state as a starting point,²² would not be discouraged in anaerobic conditions, as observed.

The long-lived dark state responds to stimulation by 405-nm light and is thus assigned to a hydroxy-phenol protonated state of the chromophore. The percent changes in the propensity of Dendra2 and mEos2-A69T to switch to this state, relative to Dendra2-T69A and mEos2 are relatively moderate (+33% and +38% increase in rates, respectively), suggesting that Arg66 does not play a major role in the associated mechanism. The limited accuracy of our phototransformation quantum yields resulting from potential residual systematic errors in the determination of the molar extinction coefficients in the red state of PCFPs indeed prevents us to consider the observed changes significant. A first candidate for the long-lived dark state could be the *trans* protonated form of the chromophore. However, several arguments argue against this hypothesis. First, it has been reported for Dronpa that the *trans* isomer of the chromophore is more likely populated if the Arg66 and the imidazolinone ring interact, as it does in mEos2, by favoring single bond τ -rotation.⁴³ Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) revealed a weakening of the Arg66-imidazolinone bond during *cis*–*trans* isomerization, explaining why Arg66 can easily lose interaction with the chromophore in the *trans* state.⁴⁴ Second, the presence of an interaction between Arg66 and Thr69, as in Dendra2, has been proposed to reduce formation of the *trans* isomer in monomeric Azami Green (mAG).⁴⁵ In such curled conformation, Arg66 stands closer to His194 that thus gets clogged due to stronger van der Waals interactions, limiting chromophore isomerization. Thus, if our long-lived dark state would correspond to a *trans* chromophore, we would expect significantly higher microscopic rates for mEos2 and Dendra2-T69A, contrary to our findings. Furthermore, *trans* chromophore conformations in reversibly switchable FPs are typically highly stable, with lifetimes up to many hours in the dark, at variance with our ensemble-level experiments.

The above-mentioned observations lead us to attribute slow blinking in our PCFP variants to a protonated *cis* or twisted state. As the planar *cis* protonated form is expected to live for only microseconds,^{8,25} a yet-uncharacterized twisted ground-state protonated form appears more likely. Such a form could possibly be reached via twisted internal charge transfer (TICT) involving rotation around the chromophore phenoxy exocyclic C–C bond. The importance of TICT pathways, and their coupling with chromophore protonation has been recognized in several studies.^{46–48} Due to the lack of interaction between Arg66 and the imidazolinone carbonyl moiety in Dendra2 and mEos2-A69T, a more pronounced single-bond character of the phenoxy bond is expected in these variants, favoring engagement into a phenoxy TICT channel and consistent with the relative microscopic rates we measured. Moreover, a phenyl twisted conformer of the chromophore may relax to a ground state predicted to be long-lived.⁴⁷ Importantly, twisting through TICT channels is strongly governed by the electronic nature of the chromophore surrounding, and again the different Arg66 orientations in our variants could play an important role in this respect, similarly to what has been proposed in the chromoprotein Phanta and its variants.⁴⁹ Finally, a long-lived dark state reached through a TICT channel would be consistent

with a singlet, rather than triplet, excited-state process, in line with our data. Nevertheless, further experimental and theoretical investigations are needed to test this proposal.

CONCLUSION

We have shown that the conserved amino acid Arg66 controls the entire range of photophysical properties in Anthozoan PCFPs: brightness, photoconversion, photoblinking and photobleaching. Exchanging the conformation of Arg66 in mEos2 and Dendra2, which only share 72.2% sequence identity, is sufficient to completely swap the photophysical behaviors of these two PCFPs. Thus, the reason for which mEos2 is currently preferred for applications requiring high photon counts, whereas Dendra2 is better suited for molecular counting or tracking experiments can be essentially related to the different conformations of Arg66.

In the course of this work, we have also introduced a simple *in vitro* single-molecule immobilization assay based on disuccinimidyl suberate cross-linking that allows full control of the physicochemical environment while avoiding the need for any protein engineering. Another outcome of this study is the design of Dendra2-T69A. This variant combines the high photon budget of mEos2 with the fully natural monomeric character of Dendra2. As natural monomers have been found preferable to engineered monomers,⁵⁰ Dendra2-T69A could advantageously replace mEos2 or possibly even its advanced variants³⁵ in applications requiring maximized photon output but in which the latter PCFPs affect fusion gene functionality.

This work provides insight into photobleaching and blinking mechanisms in green-to-red photoconvertible FPs of Anthozoan origin. Under the laser illumination conditions used in localization microscopy, Glu212 decarboxylation appears to be a main pathway for redox-induced photobleaching.^{33,41} Chromophore distortion and twisting are likely candidates for short-lived and long-lived dark-state formation, respectively. Further comparative studies with other recently developed PCFPs^{35,36,51,52} and possibly in live cells should be performed to confirm these hypotheses and provide an even more refined picture of the complex blinking and bleaching mechanisms at play in these smart labels. Engineering of bright and low-blinking PCFPs displaying efficient green-to-red photoconversion is likely to be challenged by the central role of Arg66. Dendra2-T69A could nevertheless be a favorable starting template. Mutations increasing the steric hindrance or altering the electrostatic potential around the phenoxy moiety of the chromophore in order to reduce phenoxy ring twisting should be envisaged to design optimized variants for counting and tracking purpose.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/jacs.5b09923.

Experimental methods and material on single-molecule data acquisition and processing, crystal growth, X-ray data collection, and structure determination, including Tables S1–S3 and Figures S1–S13 (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*virgile.adam@ibs.fr

*dominique.bourgeois@ibs.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work used the platforms of the Grenoble Instruct Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Support for this work comes from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-BSVS-012-01 NOBLEACH). We thank Christine Ebel and Aline LeRoy for ultracentrifugation analysis and Michel Sliwa (LASIR, Université Lille 1) for his precious help in measuring the excited-state lifetimes.

■ REFERENCES

- (1) Sengupta, P.; van Engelenburg, S. B.; Lippincott-Schwartz, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3189.
- (2) Adam, V.; Berardozi, R.; Byrdin, M.; Bourgeois, D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 92.
- (3) Sengupta, P.; Jovanovic-Talman, T.; Lippincott-Schwartz, J. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 345.
- (4) Manley, S.; Gillette, J. M.; Lippincott-Schwartz, J. *Methods Enzymol.* **2010**, *475*, 109.
- (5) Annibale, P.; Vanni, S.; Scarselli, M.; Rothlisberger, U.; Radenovic, A. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 527.
- (6) Lane, L. A.; Smith, A. M.; Lian, T.; Nie, S. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 14140.
- (7) Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. *Nature* **1997**, *388*, 355.
- (8) Hapts, U.; Maiti, S.; Schwill, P.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13573.
- (9) Heikal, A. A.; Hess, S. T.; Baird, G. S.; Tsien, R. Y.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11996.
- (10) Liu, Y.; Kim, H. R.; Heikal, A. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24138.
- (11) Schenk, A.; Ivanchenko, S.; Rocker, C.; Wiedenmann, J.; Nienhaus, G. U. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 384.
- (12) Vegh, R. B.; Bravaya, K. B.; Bloch, D. A.; Bommarius, A. S.; Tolbert, L. M.; Verkhovskiy, M.; Krylov, A. I.; Soltsev, K. M. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4527.
- (13) Sinnecker, D.; Voigt, P.; Hellwig, N.; Schaefer, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7085.
- (14) McAnaney, T. B.; Zeng, W.; Doe, C. F.; Bhanji, N.; Wakelin, S.; Pearson, D. S.; Abbyad, P.; Shi, X.; Boxer, S. G.; Bagshaw, C. R. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5510.
- (15) Manna, P.; Jimenez, R. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4944.
- (16) David, C. C.; Dedecker, P.; De Cremer, G.; Verstraeten, N.; Kint, C.; Michiels, J.; Hofkens, J. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 358.
- (17) Annibale, P.; Scarselli, M.; Kodyan, A.; Radenovic, A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1506.
- (18) Avilov, S.; Berardozi, R.; Gunewardene, M. S.; Adam, V.; Hess, S. T.; Bourgeois, D. *PLoS One* **2014**, *9*, e98362.
- (19) Lee, S. H.; Shin, J. Y.; Lee, A.; Bustamante, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17436.
- (20) Durisic, N.; Laparra-Cuervo, L.; Sandoval-Alvarez, A.; Borbely, J. S.; Lakadamyali, M. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 156.
- (21) Adam, V.; Nienhaus, K.; Bourgeois, D.; Nienhaus, G. U. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4905.
- (22) Roy, A.; Field, M. J.; Adam, V.; Bourgeois, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18586.
- (23) Vegh, R. B.; Bloch, D. A.; Bommarius, A. S.; Verkhovskiy, M.; Pletnev, S.; Iwai, H.; Bochenkova, A. V.; Soltsev, K. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 12472.
- (24) Shaner, N. C.; Lin, M. Z.; McKeown, M. R.; Steinbach, P. A.; Hazelwood, K. L.; Davidson, M. W.; Tsien, R. Y. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 545.
- (25) Moerner, W. E. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 910.
- (26) Vogelsang, J.; Cordes, T.; Forthmann, C.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8107.
- (27) Lando, D.; Endesfelder, U.; Berger, H.; Subramanian, L.; Dunne, P. D.; McColl, J.; Klenerman, D.; Carr, A. M.; Sauer, M.; Allshire, R. C.; Heilemann, M.; Laue, E. D. *Open Biol.* **2012**, *2*, 120078.
- (28) Annibale, P.; Vanni, S.; Scarselli, M.; Rothlisberger, U.; Radenovic, A. *PLoS One* **2011**, *6*, e22678.
- (29) Coltharp, C.; Kessler, R. P.; Xiao, J. *PLoS One* **2012**, *7*, e51725.
- (30) Adam, V.; Lelimosin, M.; Boehme, S.; Desfonds, G.; Nienhaus, K.; Field, M. J.; Wiedenmann, J.; McSweeney, S.; Nienhaus, G. U.; Bourgeois, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 18343.
- (31) Adam, V.; Carpentier, P.; Violot, S.; Lelimosin, M.; Darnault, C.; Nienhaus, G. U.; Bourgeois, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18063.
- (32) Adam, V.; Moeyaert, B.; David, C. C.; Mizuno, H.; Lelimosin, M.; Dedecker, P.; Ando, R.; Miyawaki, A.; Michiels, J.; Engelborghs, Y.; Hofkens, J. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1241.
- (33) Duan, C.; Adam, V.; Byrdin, M.; Ridard, J.; Kieffer-Jaquinod, S.; Morlot, C.; Arcizet, D.; Demachy, I.; Bourgeois, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15841.
- (34) Fron, E.; Van der Auweraer, M.; Moeyaert, B.; Michiels, J.; Mizuno, H.; Hofkens, J.; Adam, V. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 2300.
- (35) Zhang, M.; Chang, H.; Zhang, Y.; Yu, J.; Wu, L.; Ji, W.; Chen, J.; Liu, B.; Lu, J.; Liu, Y.; Zhang, J.; Xu, P.; Xu, T. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 727.
- (36) Moeyaert, B.; Nguyen Bich, N.; De Zitter, E.; Rocha, S.; Clays, K.; Mizuno, H.; van Meervelt, L.; Hofkens, J.; Dedecker, P. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1664.
- (37) Piwonski, H.; Sokolowski, A.; Waluk, J. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 2477.
- (38) Rollins, G. C.; Shin, J. Y.; Bustamante, C.; Presse, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E110.
- (39) Chang, H.; Zhang, M.; Ji, W.; Chen, J.; Zhang, Y.; Liu, B.; Lu, J.; Zhang, J.; Xu, P.; Xu, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 4455.
- (40) Zhang, X.; Chen, X.; Zeng, Z.; Zhang, M.; Sun, Y.; Xi, P.; Peng, J.; Xu, P. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2659.
- (41) Ding, L.; Chung, L. W.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 1075.
- (42) van Thor, J. J.; Gensch, T.; Hellingwerf, K. J.; Johnson, L. N. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 37.
- (43) Li, X.; Chung, L. W.; Mizuno, H.; Miyawaki, A.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3328.
- (44) Warren, M. M.; Kaucikas, M.; Fitzpatrick, A.; Champion, P.; Sage, J. T.; van Thor, J. J. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1461.
- (45) Ebisawa, T.; Yamamura, A.; Kameda, Y.; Hayakawa, K.; Nagata, K.; Tanokura, M. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66*, 485.
- (46) Altoe, P.; Bernardi, F.; Garavelli, M.; Orlandi, G.; Negri, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3952.
- (47) Drobizhev, M.; Hughes, T. E.; Stepanenko, Y.; Wnuk, P.; O'Donnell, K.; Scott, J. N.; Callis, P. R.; Mikhaylov, A.; Dokken, L.; Rebane, A. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 688.
- (48) Olsen, S.; Smith, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2054.
- (49) Don Paul, C.; Traore, D. A.; Olsen, S.; Devenish, R. J.; Close, D. W.; Bell, T. D.; Bradbury, A.; Wilce, M. C.; Prescott, M. *PLoS One* **2015**, *10*, e0123338.
- (50) Yu, D.; Baird, M. A.; Allen, J. R.; Howe, E. S.; Klassen, M. P.; Reade, A.; Makhijani, K.; Song, Y.; Liu, S.; Murthy, Z.; Zhang, S. Q.; Weiner, O. D.; Kornberg, T. B.; Jan, Y. N.; Davidson, M. W.; Shu, X. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 763.
- (51) Paez-Segala, M. G.; Sun, M. G.; Shtengel, G.; Viswanathan, S.; Baird, M. A.; Macklin, J. J.; Patel, R.; Allen, J. R.; Howe, E. S.; Piszczek, G.; Hess, H. F.; Davidson, M. W.; Wang, Y.; Looger, L. L. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 215.
- (52) McEvoy, A. L.; Hoi, H.; Bates, M.; Platonova, E.; Cranfill, P. J.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Ewers, H.; Liphardt, J.; Campbell, R. E. *PLoS One* **2012**, *7*, e51314.

Bibliographie

- [Abbe, 1873] Abbe, E. (1873). Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1) :413–418.
- [Abbruzzetti et al., 2005] Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., Bologna, S., Campanini, B., Raboni, S., Bettati, S., , and Mozzarelli, A. (2005). Kinetics of acid-induced spectral changes in the GFPmut2 chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 127(2) :626–635. PMID : 15643887.
- [Adam, 2009] Adam, V. (2009). *Mechanistic studies of photoactivatable fluorescent proteins : a combined approach by crystallography and spectroscopy*. PhD thesis, Université Joseph-Fourier Grenoble I.
- [Adam et al., 2009a] Adam, V., Carpentier, P., Violot, S., Lelimosin, M., Darnault, C., Nienhaus, G. U., and Bourgeois, D. (2009a). Structural basis of X-ray-induced transient photobleaching in a photoactivatable green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 131(50) :18063–18065.
- [Adam et al., 2010] Adam, V., Mizuno, H., Grichine, A., Hotta, J.-i., Yamagata, Y., Moeyaert, B., Nienhaus, G. U., Miyawaki, A., Bourgeois, D., and Hofkens, J. (2010). Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins. *Journal of biotechnology*, 149(4) :289–298.
- [Adam et al., 2011] Adam, V., Moeyaert, B., David, C. C., Mizuno, H., Lelimosin, M., Dedecker, P., Ando, R., Miyawaki, A., Michiels, J., Engelborghs, Y., and Hofkens, J. (2011). Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications. *Chemical Biology*, 18(10) :1241–1251.
- [Adam et al., 2009b] Adam, V., Nienhaus, K., Bourgeois, D., and Nienhaus, G. U. (2009b). Structural basis of enhanced photoconversion yield in green fluorescent protein-like protein Dendra2. *Biochemistry*, 48(22) :4905–4915.
- [Adams et al., 2010] Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2010). Phenix : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 66(2) :213–221.
- [Aglyamova et al., 2011] Aglyamova, G. V., Hunt, M. E., Modi, C. K., and Matz, M. V. (2011). Multi-colored homologs of the green fluorescent protein from hydromedusa *Obelia* sp. *Photochemical Photobiological Science*, 10 :1303–1309.
- [Aguet et al., 2013] Aguet, F., Antonescu, C. N., Mettlen, M., Schmid, S. L., and Danuser, G. (2013). Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Developmental Cell*, 26(3) :279–291. 23891661[pmid] Dev Cell.

- [Ai et al., 2014] Ai, H. W., Baird, M. A., Shen, Y., Davidson, M. W., and Campbell, R. E. (2014). Engineering and characterizing monomeric fluorescent proteins for live-cell imaging applications. *Nature Protocols*, 9(4) :910–928.
- [Aitken et al., 2008] Aitken, C. E., Marshall, R. A., and Puglisi, J. D. (2008). An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophysical Journal*, 94(5) :1826–1835.
- [Altman et al., 2012] Altman, R. B., Zheng, Q., Zhou, Z., Terry, D. S., Warren, J. D., and Blanchard, S. C. (2012). Enhanced photostability of cyanine fluorophores across the visible spectrum. *Nature Methods*, 9(5) :428–429. 10.1038/nmeth.1988.
- [Ambrose et al., 1994] Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Keller, R. A., and Martin, J. C. (1994). Alterations of single molecule fluorescence lifetimes in near-field optical microscopy. *Science*, 265(5170) :364–367.
- [Amsterdamsky et al., 1984] Amsterdamsky, C., Aubry, J., and Panico, R. (1984). Bioluminescence et chimiluminescence. *L'actualité chimique*, pages 31–39.
- [Ando et al., 2007] Ando, R., Flors, C., Mizuno, H., Hofkens, J., and Miyawaki, A. (2007). Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on *dronpa* mutants. *Biophysical Journal*, 92(12) :L97 – L99.
- [Ando et al., 2002] Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2002). An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20) :12651–12656.
- [Ando et al., 2004] Ando, R., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004). Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, 306(5700) :1370–1373.
- [Annibale et al., 2012] Annibale, P., Scarselli, M., Greco, M., and Radenovic, A. (2012). Identification of the factors affecting co-localization precision for quantitative multicolor localization microscopy. *Optical Nanoscopy*, 1(1) :1.
- [Annibale et al., 2010] Annibale, P., Scarselli, M., Kodiyan, A., and Radenovic, A. (2010). Photoactivatable fluorescent protein mEos2 displays repeated photoactivation after a long-lived dark state in the red photoconverted form. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(9) :1506–1510.
- [Annibale et al., 2011a] Annibale, P., Vanni, S., Scarselli, M., Rothlisberger, U., and Radenovic, A. (2011a). Identification of clustering artifacts in photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 8(7) :527–528.
- [Annibale et al., 2011b] Annibale, P., Vanni, S., Scarselli, M., Rothlisberger, U., and Radenovic, A. (2011b). Quantitative photo activated localization microscopy : unraveling the effects of photo-blinking. *PLoS One*, 6(7) :e22678.
- [Arosio and Ratto, 2014] Arosio, D. and Ratto, G. M. (2014). Twenty years of fluorescence imaging of intracellular chloride. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8 :258.
- [Aubin, 1979] Aubin, J. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(1) :36–43.
- [Avilov et al., 2014] Avilov, S., Berardozzi, R., Gunewardene, M. S., Adam, V., Hess, S. T., and Bourgeois, D. (2014). In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy. *PLoS ONE*, 9(6) :e98362.

- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9) :1055.
- [Baker et al., 2010] Baker, S. M., Buckheit, R. W., and Falk, M. M. (2010). Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins : tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biology*, 11(1) :1–10.
- [Bates et al., 2007] Bates, W. M., Huang, B., Dempsey, G. T., and Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845) :1749–1753. 17702910[pmid] Science.
- [Bautz, 2005] Bautz, A. M. (2005). La bioluminescence chez les animaux. *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences*, 44 :1–4.
- [Benke and Manley, 2012] Benke, A. and Manley, S. (2012). Live-cell dstorm of cellular DNA based on direct DNA labeling. *Chemical Biological Chemistry*, 13(2) :298–301.
- [Benson et al., 1979] Benson, R., Meyer, R., Zaruba, M., and McKhann, G. M. (1979). Cellular autofluorescence—is it due to flavins ? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(1) :44–48.
- [Berg et al., 2009] Berg, J., Hung, Y. P., and Yellen, G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP : ADP ratio. *Nature Methods*, 6(2) :161–166.
- [Bernas et al., 2005] Bernas, T., Robinson, J. P., Asem, E. K., and Rajwa, B. (2005). Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin. *Journal of biomedical optics*, 10(6) :064015–064015.
- [Bernas et al., 2004] Bernas, T., Zarebski, M., Cook, R., and Dobrucki, J. (2004). Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin : role of anoxia and photon flux. *Journal of microscopy*, 215(3) :281–296.
- [Betzig et al., 1987] Betzig, E., Isaacson, M., and Lewis, A. (1987). Collection mode near-field scanning optical microscopy. *Applied physics letters*, 51(25) :2088–2090.
- [Betzig et al., 2006] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645.
- [Betzig and Trautman, 1992] Betzig, E. and Trautman, J. K. (1992). Near-field optics : microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science*, 257(5067) :189–195.
- [Bizzarri et al., 2010] Bizzarri, R., Serresi, M., Cardarelli, F., Abbruzzetti, S., Campanini, B., Viappiani, C., and Beltram, F. (2010). Single amino acid replacement makes *æquorea victoria* fluorescent proteins reversibly photoswitchable. *Journal of the American Chemical Society*, 132(1) :85–95. PMID : 19958004.
- [Bogdanov et al., 2016] Bogdanov, A. M., Acharya, A., Titelmayer, A. V., Mamontova, A. V., Bravaya, K. B., Kolomeisky, A. B., Lukyanov, K. A., and Krylov, A. I. (2016). Turning on and off photoinduced electron transfer in fluorescent proteins by π -stacking, halide binding, and Tyr145 mutations. *Journal of the American Chemical Society*, 138(14) :4807–4817.
- [Bogdanov et al., 2009a] Bogdanov, A. M., Bogdanova, E. A., Chudakov, D. M., Gorodnicheva, T. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2009a). Cell culture medium affects GFP photostability : a solution. *Nature Methods*, 6(12) :859–860.

- [Bogdanov et al., 2009b] Bogdanov, A. M., Bogdanova, E. A., Chudakov, D. M., Gorodnicheva, T. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2009b). Cell culture medium affects GFP photostability : a solution. *Nature Methods*, 6(12) :859–60.
- [Bogdanov et al., 2009c] Bogdanov, A. M., Mishin, A. S., Yampolsky, I. V., Belousov, V. V., Chudakov, D. M., Subach, F. V., Verkhusha, V. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2009c). Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. *Nature Chemical Biology*, 5(7) :459–461. 19396176[pmid] Nat Chem Biol.
- [Bokman and Ward, 1981] Bokman, S. H. and Ward, W. W. (1981). Renaturation of Aequorea green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(4) :1372–1380.
- [Booth et al., 2015] Booth, M., Andrade, D., Burke, D., Patton, B., and Zurauskas, M. (2015). Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy. *Microscopy*, page dfv033.
- [Bornfleth et al., 1998] Bornfleth, H., Saetzler, K., Eils, R., and Cremer, C. (1998). High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 189(2) :118–136.
- [Bourgeois and Adam, 2012] Bourgeois, D. and Adam, V. (2012). Reversible photoswitching in fluorescent proteins : a mechanistic view. *IUBMB life*, 64(6) :482–491.
- [Boyle, 1666] Boyle, R. (1666). *Observations and Tryals about the Resemblances and Differences Between a Burning Coal and a Shining Wood*, volume 2.
- [Brakemann et al., 2011] Brakemann, T., Stiel, A. C., Weber, G., Andresen, M., Testa, I., Grotjohann, T., Leutenegger, M., Plessmann, U., Urlaub, H., Eggeling, C., Wahl, M. C., Hell, S. W., and Jakobs, S. (2011). A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. *Nature Biotechnology*, 29(10) :942–947.
- [Bronstein et al., 1994] Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., and Kricka, L. J. (1994). Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry*, 219(2) :169–181.
- [Bulina et al., 2003] Bulina, M. E., Verkhusha, V. V., Staroverov, D. B., Chudakov, D. M., and Lukyanov, K. A. (2003). Hetero-oligomeric tagging diminishes non-specific aggregation of target proteins fused with anthozoa fluorescent proteins. *Biochemical Journal*, 371(1) :109–114.
- [Burnette et al., 2011] Burnette, D. T., Sengupta, P., Dai, Y., Lippincott-Schwartz, J., and Kachar, B. (2011). Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52) :21081–21086.
- [Calebiro et al., 2013] Calebiro, D., Rieken, F., Wagner, J., Sungkaworn, T., Zabel, U., Borzi, A., Cocucci, E., Zürn, A., and Lohse, M. J. (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled g-proteincoupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2) :743–748.
- [Campbell et al., 2002] Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12) :7877–7882.

- [Campbell and Choy, 2001] Campbell, T. N. and Choy, F. Y. (2001). The effect of pH on green fluorescent protein : a brief review. *Molecular Biology Today*, 2(1) :1–4.
- [Carter et al., 2004] Carter, R. W., Schmale, M. C., and Gibbs, P. D. (2004). Cloning of anthozoan fluorescent protein genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 138(3) :259–270.
- [Chalfie, 1994] Chalfie, M. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Trends in Genetics*, 10(5) :151.
- [Chang et al., 2014] Chang, Y.-W., Chen, S., Tocheva, E. I., Treuner-Lange, A., Löbach, S., Søggaard-Andersen, L., and Jensen, G. J. (2014). Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nature Methods*, 11(7) :737–739.
- [Chen et al., 2005] Chen, I., Howarth, M., Lin, W., and Ting, A. Y. (2005). Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nature Methods*, 2(2) :99–104. 10.1038/nmeth735.
- [Chen et al., 2002] Chen, T.-S., Zeng, S.-Q., Luo, Q.-M., Zhang, Z.-H., and Zhou, W. (2002). High-order photobleaching of green fluorescent protein inside live cells in two-photon excitation microscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(5) :1272–1275.
- [Chen et al., 2012] Chen, Z., Jing, C., Gallagher, S. S., Sheetz, M. P., and Cornish, V. W. (2012). Second-generation covalent TMP-tag for live cell imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 134(33) :13692–13699. PMID : 22873118.
- [Chudakov et al., 2003] Chudakov, D. M., Feofanov, A. V., Mudrik, N. N., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2003). Chromophore environment provides clue to kindling fluorescent protein riddle. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9) :7215–7219.
- [Chudakov et al., 2007] Chudakov, D. M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2007). Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nature Protocols*, 2.
- [Chudakov et al., 2004] Chudakov, D. M., Verkhusha, V. V., Staroverov, D. B., Souslova, E. A., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2004). Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nature Biotechnology*, 22.
- [Coffman and Wu, 2012] Coffman, V. C. and Wu, J.-Q. (2012). Counting protein molecules using quantitative fluorescence microscopy. *Trends in biochemical sciences*, 37(11) :499–506.
- [Cole et al., 1996] Cole, N., Smith, C. L., Sciaky, N., Terasaki, M., et al. (1996). Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*, 273(5276) :797.
- [Cole, 2013] Cole, N. B. (2013). Site-specific protein labeling with SNAP-tags. *Current Protocols in Protein Science*, pages 30–1.
- [Coltharp et al., 2012] Coltharp, C., Kessler, R. P., and Xiao, J. (2012). Accurate construction of photoactivated localization microscopy (PALM) images for quantitative measurements. *Plos One*, 7(12) :e51725.
- [Coons et al., 1941] Coons, A. H., Creech, H. J., and Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2) :200–202.

- [Costantini et al., 2012] Costantini, L. M., Fossati, M., Francolini, M., and Snapp, E. L. (2012). Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic*, 13(5) :643–649. 22289035[pmid] *Traffic*.
- [Cox et al., 2012] Cox, S., Rosten, E., Monypenny, J., Jovanovic-Talisman, T., Burnette, D. T., Lippincott-Schwartz, J., Jones, G. E., and Heintzmann, R. (2012). Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nature Methods*, 9(2) :195–200.
- [Craggs, 2009] Craggs, T. D. (2009). Green fluorescent protein : structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, 38 :2865–2875.
- [Cranfill et al., 2016] Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., de Gruiter, H. M., Kremers, G.-J., Davidson, M. W., Ustione, A., and Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods*, advance online publication.
- [Dalal et al., 2008] Dalal, R. B., Digman, M. A., Horwitz, A. F., Vetri, V., and Gratton, E. (2008). Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode. *Microscopy research and technique*, 71(1) :69–81.
- [Das et al., 2007] Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007). Membrane protein stoichiometry determined from the step-wise photobleaching of dye-labelled subunits. *Chemical Biological Chemistry*, 8(9) :994–999.
- [Davenport and Nicol, 1955] Davenport, D. and Nicol, J. (1955). Luminescence in hydromedusae. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 144(916) :399–411.
- [David et al., 2012] David, C. C., Dedecker, P., Cremer, G. D., Verstraeten, N., Kint, C., Michiels, J., and Hofkens, J. (2012). Spectroscopic characterization of venus at the single molecule level. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 11(2) :358–363.
- [Dedecker et al., 2013] Dedecker, P., De Schryver, F. C., and Hofkens, J. (2013). Fluorescent proteins : shine on, you crazy diamond. *Journal of the American Chemical Society*, 135(7) :2387–2402.
- [Deheyn et al., 2007] Deheyn, D. D., Kubokawa, K., McCarthy, J. K., Murakami, A., Porrachia, M., Rouse, G. W., and Holland, N. D. (2007). Endogenous green fluorescent protein (gfp) in amphioxus. *The Biological Bulletin*, 213(2) :95–100.
- [Dempsey et al., 2011] Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M., and Zhuang, X. (2011). Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nature Methods*, 8(12) :1027–1036.
- [Dempsey et al., 2015] Dempsey, W. P., Georgieva, L., Helbling, P. M., Sonay, A. Y., Truong, T. V., Haffner, M., and Pantazis, P. (2015). In vivo single-cell labeling by confined primed conversion. *Nature Methods*, 12(7) :645–648.
- [Dertinger et al., 2010] Dertinger, T., Heilemann, M., Vogel, R., Sauer, M., and Weiss, S. (2010). Superresolution optical fluctuation imaging with organic dyes. *Angewandte Chemie*, 122(49) :9631–9633.
- [Dickson et al., 1997] 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(6640) :355–358.
- [Dietz et al., 2013] Dietz, M. S., Haße, D., Ferraris, D. M., Göhler, A., Niemann, H. H., and Heilemann, M. (2013). Single-molecule photobleaching reveals increased met receptor dimerization upon ligand binding in intact cells. *BMC Biophysics*, 6(1) :1–9.

- [Ding et al., 2013] Ding, L., Chung, L. W., and Morokuma, K. (2013). Reaction mechanism of photoinduced decarboxylation of the photoactivatable green fluorescent protein : an ONIOM (QM : MM) study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(4) :1075–1084.
- [Don Paul et al., 2015] Don Paul, C., Traore, D. A., Olsen, S., Devenish, R. J., Close, D. W., Bell, T. D., Bradbury, A., Wilce, M. C., and Prescott, M. (2015). X-ray crystal structure and properties of Phanta, a weakly fluorescent photochromic GFP-like protein. *PloS One*, 10(4) :e0123338.
- [Donner et al., 2012] Donner, J. S., Thompson, S. A., Kreuzer, M. P., Baffou, G., and Quidant, R. (2012). Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano letters*, 12(4) :2107–2111.
- [Doudna and Charpentier, 2014] Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213) :1258096.
- [Dove et al., 2001] Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., and Ranganathan, S. (2001). Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral reefs*, 19(3) :197–204.
- [Duan et al., 2013] Duan, C., Adam, V., Byrdin, M., Ridard, J., Kieffer-Jaquinod, S., Morlot, C., Arcizet, D., Demachy, I., and Bourgeois, D. (2013). Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 135(42) :15841–15850.
- [Ducret et al., 2013] Ducret, A., Théodoly, O., and Mignot, T. (2013). Single cell microfluidic studies of bacterial motility. *Bacterial Cell Surfaces : Methods and Protocols*, pages 97–107.
- [Durisic et al., 2012] Durisic, N., Godin, A. G., Wever, C. M., Heyes, C. D., Lakadamyali, M., and Dent, J. A. (2012). Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *The Journal of Neuroscience*, 32(37) :12915–12920.
- [Durisic et al., 2014] Durisic, N., Laparra-Cuervo, L., Sandoval-Alvarez, A., Borbely, J. S., and Lakadamyali, M. (2014). Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanomplate. *Nature Methods*, 11(2) :156–62.
- [Duwé et al., 2015] Duwé, S., De Zitter, E., Gielen, V., Moeyaert, B., Vandenberg, W., Grotjohann, T., Clays, K., Jakobs, S., Van Meervelt, L., and Dedecker, P. (2015). Expression-enhanced fluorescent proteins based on enhanced green fluorescent protein for super-resolution microscopy. *ACS nano*, 9(10) :9528–9541.
- [Dwyer et al., 2001] Dwyer, T. M., Rao, K. S., Westover, J. B., Kim, J.-J. P., and Ferman, F. E. (2001). The function of Arg-94 in the oxidation and decarboxylation of glutaryl-Coa by human glutaryl-Coa dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1) :133–138.
- [Ebisawa et al., 2010] Ebisawa, T., Yamamura, A., Kameda, Y., Hayakawa, K., Nagata, K., and Tanokura, M. (2010). The structure of mag, a monomeric mutant of the green fluorescent protein azami-green, reveals the structural basis of its stable green emission. *Acta Crystallographica Section F : Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(5) :485–489.
- [Edwald and Veatch, 2013] Edwald, E. and Veatch, S. L. (2013). Differential oligomeric nature of mEos2 and mEos3.2 fluorescent proteins is consequential to diffusion and confinement of membrane probes. *The FASEB Journal*, 27(1 Supplement) :1024–2.
- [Eggeling et al., 1998] Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., and Seidel, C. (1998). Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection : Evidence of two-step photolysis. *Analytical Chemistry*, 70(13) :2651–2659.

- [Eggeling et al., 2013] Eggeling, C., Willig, K. I., and Barrantes, F. J. (2013). Sted microscopy of living cells—new frontiers in membrane and neurobiology. *Journal of neurochemistry*, 126(2) :203–212.
- [Ehmann et al., 2014] Ehmann, N., van de Linde, S., Alon, A., Ljaschenko, D., Keung, X. Z., Holm, T., Rings, A., DiAntonio, A., Hallermann, S., Ashery, U., et al. (2014). Quantitative super-resolution imaging of bruchpilot distinguishes active zone states. *Nature communications*, 5.
- [El Khatib et al., 2016] El Khatib, M., Martins, A., Bourgeois, D., Colletier, J.-P., and Adam, V. (2016). Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm. *Scientific reports*, 6.
- [Ellinger and Hirt, 1929] Ellinger, P. and Hirt, A. (1929). Mikroskopische untersuchungen an lebenden organen. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 145(4-6) :193–210.
- [Emsley and Cowtan, 2004] Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 60(12) :2126–2132.
- [Endesfelder et al., 2013] Endesfelder, U., Finan, K., Holden, S. J., Cook, P. R., Kapanidis, A. N., and Heilemann, M. (2013). Multiscale spatial organization of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 105(1) :172–181.
- [Endesfelder et al., 2011] Endesfelder, U., Malkusch, S., Flottmann, B., Mondry, J., Liguzinski, P., Verveer, P. J., and Heilemann, M. (2011). Chemically induced photoswitching of fluorescent probes a general concept for super-resolution microscopy. *Molecules*, 16(4) :3106.
- [Engel et al., 2009] Engel, B. D., Ludington, W. B., and Marshall, W. F. (2009). Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length : revisiting the balance-point length control model. *The Journal of Cell Biology*, 187(1) :81–89.
- [Ester et al., 1996] Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., Xu, X., et al. (1996). A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In *Kdd*, volume 96, pages 226–231.
- [Evdokimov et al., 2006] Evdokimov, A. G., Pokross, M. E., Egorov, N. S., Zaraisky, A. G., Yampolsky, I. V., Merzlyak, E. M., Shkoporov, A. N., Sander, I., Lukyanov, K. A., and Chudakov, D. M. (2006). Structural basis for the fast maturation of arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Reports*, 7(10) :1006–1012.
- [Fehr et al., 2002] Fehr, M., Frommer, W. B., and Lalonde, S. (2002). Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15) :9846–9851.
- [Fernez-Suz et al., 2007] Fernez-Suz, M., Baruah, H., Martz-Hernez, L., Xie, K. T., Baskin, J. M., Bertozzi, C. R., and Ting, A. Y. (2007). Re-directing lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes. *Nature biotechnology*, 25(12) :1483–1487. 18059260[pmid] Nat Biotechnol.
- [Feulgen and Volt, 1924] Feulgen, R. and Volt, K. (1924). Über den mechanismus der nuclealfärbung. i mitteilung. über den nachweis der reduzierenden gruppen in den kernen partiell hydrolysierter mikroskopischer präparate. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für physiologische Chemie*, 135(5-6) :249–252.

- [Filonov et al., 2011] Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L.-M., Zhang, J., Kim, K., and Verkhusha, V. V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature biotechnology*, 29(8) :757–761.
- [Finan et al., 2015] Finan, K., Raulf, A., and Heilemann, M. (2015). A set of homo-oligomeric standards allows accurate protein counting. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(41) :12049–12052.
- [Fischer and Georges, 1996] Fischer, M. and Georges, J. (1996). Fluorescence quantum yield of rhodamine 6g in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. *Chemical physics letters*, 260(1) :115–118.
- [Forbes and Jockusch, 2009] Forbes, M. W. and Jockusch, R. A. (2009). Deactivation pathways of an isolated green fluorescent protein model chromophore studied by electronic action spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47) :17038–17039. PMID : 19904948.
- [Fourrage et al., 2014] Fourrage, C., Swann, K., Garcia, J. R. G., Campbell, A. K., and Houlston, E. (2014). An endogenous green fluorescent protein–photoprotein pair in clytia hemisphaerica eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer. *Open biology*, 4(4) :130206.
- [Fricke et al., 2015] Fricke, F., Beaudouin, J., Eils, R., and Heilemann, M. (2015). One, two or three? probing the stoichiometry of membrane proteins by single-molecule localization microscopy. *Scientific reports*, 5.
- [Fron et al., 2013] Fron, E., Van der Auweraer, M., Moeyaert, B., Michiels, J., Mizuno, H., Hofkens, J., and Adam, V. (2013). Revealing the excited-state dynamics of the fluorescent protein Dendra2. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(8) :2300–2313.
- [Fu et al., 2004] Fu, Z., Wang, M., Paschke, R., Rao, K. S., Frerman, F. E., and Kim, J.-J. P. (2004). Crystal structures of human glutaryl-coa dehydrogenase with and without an alternate substrate : structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry*, 43(30) :9674–9684.
- [Gelles et al., 1988] Gelles, J., Schnapp, B. J., and Sheetz, M. P. (1988). Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331(6155) :450–453.
- [Ghose et al., 2015] Ghose, A., Rebarz, M., Maltsev, O. V., Hintermann, L., Ruckebusch, C., Fron, E., Hofkens, J., M, Y., Naumov, P., Sliwa, M., and Didier, P. (2015). Emission properties of oxyluciferin and its derivatives in water : Revealing the nature of the emissive species in firefly bioluminescence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(6) :2638–2649. PMID : 25364813.
- [Giemsa, 1904] Giemsa, G. (1904). Eine vereinfachung und vervollkommnung meiner methylenblau-eosin-färbemethode zur erzielung der romanowsky-nochtschen chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie*, 32 :307–313.
- [Giordano et al., 2002] Giordano, L., Jovin, T. M., Irie, M., and Jares-Erijman, E. A. (2002). Diheteroarylethenes as thermally stable photoswitchable acceptors in photochromic fluorescence resonance energy transfer (pcFRET). *Journal of the American Chemical Society*, 124(25) :7481–7489.
- [Godin et al., 2014] Godin, A. G., Lounis, B., and Cognet, L. (2014). Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging. *Biophysical Journal*, 107(8) :1777–1784.

- [Goedhart et al., 2012] Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M. A., van Weeren, L., Gadella Jr, T. W., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature communications*, 3 :751.
- [Gordon et al., 2004] Gordon, M. P., Ha, T., and Selvin, P. R. (2004). Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17) :6462–6465.
- [Graham et al., 2014] Graham, T. G. W., Wang, X., Song, D., Etson, C. M., van Oijen, A. M., Rudner, D. Z., and Loparo, J. J. (2014). ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Development*, 28(11) :1228–1238.
- [Greenbaum et al., 2000] Greenbaum, L., Rothmann, C., Lavie, R., and Malik, Z. (2000). Green fluorescent protein photobleaching : a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biological chemistry*, 381(12) :1251–1258.
- [Greenfield et al., 2009] Greenfield, D., McEvoy, A. L., Shroff, H., Crooks, G. E., Wingreen, N. S., Betzig, E., and Liphardt, J. (2009). Self-organization of the Escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. *PLoS Biol*, 7(6) :e1000137.
- [Griffin et al., 2000] Griffin, B. A., Adams, S. R., Jones, J., and Tsien, R. Y. (2000). Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FIAsh. *Methods in enzymology*, 327 :565–578.
- [Grotjohann et al., 2011] Grotjohann, T., Testa, I., Leutenegger, M., Bock, H., Urban, N. T., Lavoie-Cardinal, F., Willig, K. I., Eggeling, C., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2011). Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature*, 478(7368) :204–208. 10.1038/nature10497.
- [Grotjohann et al., 2012] Grotjohann, T., Testa, I., Reuss, M., Brakemann, T., Eggeling, C., Hell, S. W., and Jakobs, S. (2012). rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells. *eLife*, 1 :e00248.
- [Grußmayer et al., 2014] Grußmayer, K. S., Kurz, A., and Herten, D.-P. (2014). Single-molecule studies on the label number distribution of fluorescent markers. *Chemphyschem*, 15(4) :734–742.
- [Gryczynski et al., 1986] Gryczynski, I., Kawski, A., Gryczynski, Z., and Gloyna, D. (1986). Photo-physics of derivatives of trans-stilbenes in poly(vinyl alcohol) films. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions 2*, 82 :1879–1884.
- [Gunewardene et al., 2011] Gunewardene, M. S., Subach, F. V., Gould, T. J., Penoncello, G. P., Gudheti, M. V., Verkhusha, V. V., and Hess, S. T. (2011). Superresolution Imaging of Multiple Fluorescent Proteins with Highly Overlapping Emission Spectra in Living Cells. *Biophysical Journal*, 101 :1522–1528.
- [Gunzenhäuser et al., 2012] Gunzenhäuser, J., Olivier, N., Pengo, T., and Manley, S. (2012). Quantitative super-resolution imaging reveals protein stoichiometry and nanoscale morphology of assembling HIV-Gag virions. *Nano letters*, 12(9) :4705–4710.
- [Gurskaya et al., 2001] Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Terskikh, A., Matz, M. V., Labas, Y. A., Martynov, V. I., Yanushevich, Y. G., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A. (2001). GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS letters*, 507(1) :16–20.

- [Gurskaya et al., 2006] Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2006). Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature Biotechnology*, 24(4) :461–465.
- [Gust et al., 2014] Gust, A., Zander, A., Gietl, A., Holzmeister, P., Schulz, S., Lalkens, B., Tinnefeld, P., and Grohmann, D. (2014). A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research. *Molecules*, 19(10) :15824–15865.
- [Gustafsson, 2000] Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2) :82–87.
- [Gustafsson, 2005] Gustafsson, M. G. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy : wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37) :13081–13086.
- [Ha and Tinnefeld, 2012] Ha, T. and Tinnefeld, P. (2012). Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. *Annual Review of Physical Chemistry*, 63(1) :595–617. PMID : 22404588.
- [Habuchi et al., 2005] Habuchi, S., Cotlet, M., Gensch, T., Bednarz, T., Haber-Pohlmeier, S., Rozenski, J., Dirix, G., Michiels, J., Vanderleyden, J., Heberle, J., et al. (2005). Evidence for the isomerization and decarboxylation in the photoconversion of the red fluorescent protein dsred. *Journal of the American Chemical Society*, 127(25) :8977–8984.
- [Habuchi et al., 2008] Habuchi, S., Tsutsui, H., Kochaniak, A. B., Miyawaki, A., and Van Oijen, A. M. (2008). mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PloS one*, 3(12) :e3944.
- [Haddock et al., 2010a] Haddock, S. H., Moline, M. A., and Case, J. F. (2010a). Bioluminescence in the sea. *Marine Science*, 2.
- [Haddock et al., 2010b] Haddock, S. H. D., Mastroianni, N., and Christianson, L. M. (2010b). A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum ctenophora. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 277(1685) :1155–1160.
- [Harvey, 1921] Harvey, E. N. (1921). Studies on bioluminescence. XIII. luminescence in the coelenterates. *Biological Bulletin*, 41(5) :280–287.
- [Hastings, 1996] Hastings, J. W. (1996). Chemistries and colors of bioluminescent reactions : a review. *Gene*, 173(1) :5–11.
- [Haugsten et al., 2014] Haugsten, E. M., Brech, A., Liestøl, K., Norman, J. C., and Wesche, J. (2014). Photoactivation approaches reveal a role for Rab11 in FGFR4 recycling and signalling. *Traffic*, 15(6) :665–683.
- [Haupts et al., 1998] Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., and Webb, W. W. (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23) :13573–13578.
- [Hayashi et al., 2007] Hayashi, I., Mizuno, H., Tong, K. I., Furuta, T., Tanaka, F., Yoshimura, M., Miyawaki, A., and Ikura, M. (2007). Crystallographic evidence for water-assisted photo-induced peptide cleavage in the stony coral fluorescent protein kaede. *Journal of molecular biology*, 372(4) :918–926.

- [Heidbreder et al., 2012] Heidbreder, M., Zander, C., Malkusch, S., Widera, D., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Nair, D., Choquet, D., Sibarita, J.-B., and Heilemann, M. (2012). TNF- α influences the lateral dynamics of TNF receptor I in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(10) :1984 – 1989.
- [Heikal et al., 2000] Heikal, A. A., Hess, S. T., Baird, G. S., Tsien, R. Y., and Webb, W. W. (2000). Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins : Coral red (dsred) and yellow (citrine). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22) :11996–12001. 4334[PI] 11050231[pmid] Proc Natl Acad Sci U S A.
- [Heilemann et al., 2002] Heilemann, M., Herten, D. P., Heintzmann, R., Cremer, C., Müller, C., Tinnefeld, P., Weston, K. D., Wolfrum, J., and Sauer, M. (2002). High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Analytical chemistry*, 74(14) :3511–3517.
- [Heilemann et al., 2009] Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., and Sauer, M. (2009). Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(37) :6903–6908.
- [Heilemann et al., 2008] Heilemann, M., Van De Linde, S., Schüttpeitz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(33) :6172–6176.
- [Heim et al., 1995] Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516) :663–664.
- [Heim and Tsien, 1996] Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology*, 6(2) :178–182.
- [Heimstädt, 1911] Heimstädt, O. (1911). Das fluoreszenzmikroskop. *Z Wiss Mikrosk*, 28 :330–337.
- [Heisenberg, 1932] Heisenberg, W. (1932). *The physical principles of the quantum theory*. Chicago University Press.
- [Hell and Wichmann, 1994] Hell, S. W. and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11) :780–782.
- [Henderson et al., 2007] Henderson, J. N., Ai, H. W., Campbell, R. E., and Remington, S. J. (2007). Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16) :6672–6677.
- [Henderson et al., 2009] Henderson, J. N., Gepshtein, R., Heenan, J. R., Kallio, K., Huppert, D., and Remington, S. J. (2009). Structure and mechanism of the photoactivatable green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 131(12) :4176–4177.
- [Hendrickson et al., 1989] Hendrickson, W. A., Pähler, A., Smith, J. L., Satow, Y., Merritt, E. A., and Phizackerley, R. P. (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7) :2190–2194.

- [Henriques et al., 2010] Henriques, R., Lelek, M., Fornasiero, E. F., Valtorta, F., Zimmer, C., and Mhlanga, M. M. (2010). Quickpalm : 3d real-time photoactivation nanoscopy image processing in imagej. *Nature Methods*, 7(5) :339–340.
- [Hess et al., 2006] Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., and Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11) :4258–4272.
- [Hirose et al., 1999] Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M. (1999). Spatiotemporal dynamics of inositol 1, 4, 5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science*, 284(5419) :1527–1530.
- [Hofmann et al., 2005] Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2005). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49) :17565–17569.
- [Hohng et al., 2004] Hohng, S., , and Ha, T. (2004). Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 126(5) :1324–1325. PMID : 14759174.
- [Hoi et al., 2010] Hoi, H., Shaner, N. C., Davidson, M. W., Cairo, C. W., Wang, J., and Campbell, R. E. (2010). A monomeric photoconvertible fluorescent protein for imaging of dynamic protein localization. *Journal of Molecular Biology*, 401(5) :776 – 791.
- [Hooke, 1665] Hooke, R. (1665). *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses :with observations and inquiries thereupon*. Royal Society of Science. <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/904> — Errata : p. [10] — Pritzel (2nd) | 4198.
- [Howarth et al., 2006] Howarth, M., Chinnapen, D. J., Gerrow, K., Dorrestein, P. C., Grandy, M. R., Kelleher, N. L., El-Husseini, A., and Ting, A. Y. (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nature Methods*, 3(4) :267–273.
- [Hu and Kerppola, 2003] Hu, C.-D. and Kerppola, T. K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology*, 21(5) :539–545.
- [Hu et al., 2013] Hu, Y. S., Zhu, Q., Elkins, K., Tse, K., Li, Y., Fitzpatrick, J. A., Verma, I. M., and Cang, H. (2013). Light-sheet bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells. *Optical Nanoscopy*, 2(1) :1.
- [Huang et al., 2009] Huang, B., Bates, M., and Zhuang, X. (2009). Super resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78 :993–1016. 19489737[pmid] Annu Rev Biochem.
- [Huang et al., 2008] Huang, B., Wang, W., Bates, M., and Zhuang, X. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864) :810–813.
- [Hunt et al., 2010] Hunt, M. E., Scherrer, M. P., Ferrari, F. D., and Matz, M. V. (2010). Very bright green fluorescent proteins from the pontellid copepod *Pontella mimocerami*. *PloS one*, 5(7) :e11517.
- [Inoué, 2004] Inoué, S. (2004). Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein *æquorin* is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine. *FEBS letters*, 577(1-2) :105–110.

- [Jacq et al., 2015] Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Di Guilmi, A.-M., Vernet, T., and Morlot, C. (2015). Remodeling of the z-ring nanostructure during the streptococcus pneumoniae cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy. *MBio*, 6(4) :e01108–15.
- [Jiang et al., 2016] Jiang, W.-X., Dong, X., Jiang, J., Yang, Y.-H., Yang, J., Lu, Y.-B., Fang, S.-H., Wei, E.-Q., Tang, C., and Zhang, W.-P. (2016). Specific cell surface labeling of GPCRs using split GFP. *Scientific reports*, 6.
- [Jiménez-Banzo et al., 2008] Jiménez-Banzo, A., Nonell, S., Hofkens, J., and Flors, C. (2008). Singlet oxygen photosensitization by EGFP and its chromophore HBDI. *Biophysical Journal*, 94(1) :168–172.
- [Jones et al., 2012] Jones, A. M., Ehrhardt, D. W., and Frommer, W. B. (2012). A never ending race for new and improved fluorescent proteins. *BMC biology*, 10(1) :1.
- [Jungmann et al., 2016] Jungmann, R., Avendaño, M. S., Dai, M., Woehrstein, J. B., Agasti, S. S., Feiger, Z., Rodal, A., and Yin, P. (2016). Quantitative super-resolution imaging with qpaint. *Nature Methods*.
- [Kalaidzidis, 2009] Kalaidzidis, Y. (2009). Multiple objects tracking in fluorescence microscopy. *Journal of mathematical biology*, 58(1-2) :57–80.
- [Kao et al., 2012] Kao, Y.-T., Zhu, X., and Min, W. (2012). Protein-flexibility mediated coupling between photoswitching kinetics and surrounding viscosity of a photochromic fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9) :3220–3225.
- [Karasawa et al., 2004a] Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004a). Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal*, 381(1) :307–312.
- [Karasawa et al., 2004b] Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2004b). Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal*, 381(1) :307–312.
- [Karasawa et al., 2003] Karasawa, S., Araki, T., Yamamoto-Hino, M., and Miyawaki, A. (2003). A green-emitting fluorescent protein from galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36) :34167–34171.
- [Kawaguti, 1969] Kawaguti, S. (1969). Effect of the green fluorescent pigment on the productivity of the reef corals. *Micronesica*, 5(313) :121.
- [Kelmanson and Matz, 2003] Kelmanson, I. V. and Matz, M. V. (2003). Molecular basis and evolutionary origins of color diversity in great star coral *montastraea cavernosa* (scleractinia : Faviida). *Molecular Biology and Evolution*, 20(7) :1125–1133.
- [Kenworthy, 2001] Kenworthy, A. K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, 24(3) :289–296.
- [Keppler et al., 2006] Keppler, A., Arrivoli, C., Sironi, L., and Ellenberg, J. (2006). Fluorophores for live cell imaging of AGT fusion proteins across the visible spectrum. *Biotechniques*, 41(2) :167.
- [Kim, 2012] Kim, H. (2012). *Color Evolution of Kaede-type Red Fluorescent Proteins*. PhD thesis, Arizona State University.

- [Kim et al., 2013] Kim, H., Grunkemeyer, T. J., Modi, C., Chen, L., Fromme, R., Matz, M. V., and Wachter, R. M. (2013). Acid–base catalysis and crystal structures of a least evolved ancestral GFP-like protein undergoing green-to-red photoconversion. *Biochemistry*, 52(45) :8048–8059.
- [Kim et al., 2015] Kim, H., Zou, T., Modi, C., Dörner, K., Grunkemeyer, T. J., Chen, L., Fromme, R., Matz, M. V., Ozkan, S. B., and Wachter, R. M. (2015). A hinge migration mechanism unlocks the evolution of green-to-red photoconversion in GFP-like proteins. *Structure*, 23(1) :34–43.
- [Kim et al., 2008] Kim, Y., Ho, S. O., Gassman, N. R., Korlann, Y., Landorf, E. V., Collart, F. R., and Weiss, S. (2008). Efficient site-specific labeling of proteins via cysteines. *Bioconjugate chemistry*, 19(3) :786–791.
- [Kirkpatrick et al., 2005] Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A., and Gygi, S. P. (2005). The absolute quantification strategy : a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*, 35(3) :265–273.
- [Kirkpatrick and Baez, 1948] Kirkpatrick, P. and Baez, A. V. (1948). Formation of optical images by X-rays. *JOSA*, 38(9) :766–774.
- [Kiskowski et al., 2009] Kiskowski, M. A., Hancock, J. F., and Kenworthy, A. K. (2009). On the use of ripley's k-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophysical Journal*, 97(4) :1095–1103.
- [Kiyama et al., 2016] Kiyama, M., Saito, R., Iwano, S., Obata, R., Niwa, H., and Maki, S. (2016). Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin. *Current topics in medicinal chemistry*.
- [Klar et al., 2000] Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A., and Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15) :8206–8210.
- [Klein et al., 2011] Klein, T., Loschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S., and Sauer, M. (2011). Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nature Methods*, 8(1) :7–9.
- [Kneen et al., 1998] Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A. (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal*, 74(3) :1591–1599.
- [Knoll and Ruska, 1932] Knoll, M. and Ruska, E. (1932). Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78(5-6) :318–339.
- [Kottke et al., 2010] Kottke, T., van de Linde, S., Sauer, M., Kakorin, S., and Heilemann, M. (2010). Identification of the product of photoswitching of an oxazine fluorophore using fourier transform infrared difference spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(21) :3156–3159.
- [Kredel et al., 2008] Kredel, S., Nienhaus, K., Oswald, F., Wolff, M., Ivanchenko, S., Cymer, F., Jeromin, A., Michel, F. J., Spindler, K.-D., Heilker, R., et al. (2008). Optimized and far-red-emitting variants of fluorescent protein eqfp611. *Chemistry & biology*, 15(3) :224–233.
- [Kremers et al., 2009] Kremers, G.-J., Hazelwood, K. L., Murphy, C. S., Davidson, M. W., and Piston, D. W. (2009). Photoconversion in orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods*, 6(5) :355–358.
- [Kreusch et al., 1994] Kreusch, A., Neubüser, A., Schiltz, E., Weckesser, J., and Schulz, G. (1994). Structure of the membrane channel porin from *Rhodospirillum rubrum* at 2.0 Å resolution. *Protein Science*, 3(1) :58–63.
- [Kwok et al., 2016] Kwok, S. J., Choi, M., Bhayana, B., Zhang, X., Ran, C., and Yun, S.-H. (2016). Two-photon excited photoconversion of cyanine-based dyes. *Scientific reports*, 6.

- [Kwon et al., 2015] Kwon, J., Hwang, J., Park, J., Han, G. R., Han, K. Y., and Kim, S. K. (2015). Resolft nanoscopy with photoswitchable organic fluorophores. *Scientific reports*, 5.
- [Labas et al., 2002] Labas, Y. A., Gurskaya, N. G., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A., and Matz, M. V. (2002). Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7) :4256–4261.
- [Landgraf et al., 2012] Landgraf, D., Okumus, B., Chien, P., Baker, T. A., and Paulsson, J. (2012). Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization. *Nature Methods*, 9(5) :480–482. 10.1038/nmeth.1955.
- [Lando et al., 2012] Lando, D., Endesfelder, U., Berger, H., Subramanian, L., Dunne, P. D., McColl, J., Klenerman, D., Carr, A. M., Sauer, M., Allshire, R. C., Heilemann, M., and Laue, E. D. (2012). Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during g2 in fission yeast. *Open Biology*, 2(7) :120078.
- [Lang et al., 2012] Lang, K., Davis, L., Torres-Kolbus, J., Chou, C., Deiters, A., and Chin, J. W. (2012). Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction. *Nature chemistry*, 4(4) :298–304.
- [Lawrimore et al., 2011] Lawrimore, J., Bloom, K. S., and Salmon, E. D. (2011). Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome. *The Journal of cell biology*, 195(4) :573–582.
- [Leake et al., 2006] Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., and Armitage, J. P. (2006). Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature*, 443(7109) :355–358.
- [Lee et al., 2012] Lee, S.-H., Shin, J. Y., Lee, A., and Bustamante, C. (2012). Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43) :17436–17441.
- [Leiderman et al., 2006] Leiderman, P., Huppert, D., and Agmon, N. (2006). Transition in the temperature-dependence of GFP fluorescence : from proton wires to proton exit. *Biophysical Journal*, 90(3) :1009–1018.
- [Lelimosin et al., 2009] Lelimosin, M., Adam, V., Nienhaus, G. U., Bourgeois, D., and Field, M. J. (2009). Photoconversion of the fluorescent protein EosFP : a hybrid potential simulation study reveals intersystem crossings. *Journal of the American Chemical Society*, 131(46) :16814–16823.
- [Lenn et al., 2011] Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M., and Ying, L. (2011). Measuring the stoichiometry of functional pspa complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching. *Chemical Communications*, 47 :400–402.
- [Letschert et al., 2014] Letschert, S., Göhler, A., Franke, C., Bertleff-Zieschang, N., Memmel, E., Doose, S., Seibel, J., and Sauer, M. (2014). Super-resolution imaging of plasma membrane glycans. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(41) :10921–10924.
- [Levet et al., 2015] Levet, F., Hosy, E., Kechkar, A., Butler, C., Beghin, A., Choquet, D., and Sibarita, J.-B. (2015). Sr-tesseler : a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods*, 12(11) :1065–1071.
- [Li et al., 2010] Li, X., Chung, L. W., Mizuno, H., Miyawaki, A., and Morokuma, K. (2010). Primary events of photodynamics in reversible photoswitching fluorescent protein dronpa. *The journal of physical chemistry letters*, 1(23) :3328–3333.

- [Lippincott-Schwartz et al., 2003] Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., and Patterson, G. H. (2003). Photobleaching and photoactivation : following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*, page S7.
- [Liu et al., 2006] Liu, Y., Kim, H.-R., , and Heikal, A. A. (2006). Structural basis of fluorescence fluctuation dynamics of green fluorescent proteins in acidic environments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(47) :24138–24146.
- [Liu et al., 2015] Liu, Z., Lavis, L. D., and Betzig, E. (2015). Imaging live-cell dynamics and structure at the single-molecule level. *Molecular cell*, 58(4) :644–659.
- [Lohman and Remington, 2008] Lohman, J. R. and Remington, S. J. (2008). Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments. *Biochemistry*, 47(33) :8678–8688.
- [Los et al., 2008] Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., and Wood, K. V. (2008). Halotag : A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chemical Biology*, 3(6) :373–382. PMID : 18533659.
- [Löschberger et al., 2014] Löschberger, A., Franke, C., Krohne, G., van de Linde, S., and Sauer, M. (2014). Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution. *Journal of Cell Science*, 127(20) :4351–4355.
- [Löschberger et al., 2012] Löschberger, A., van de Linde, S., Dabauvalle, M.-C., Rieger, B., Heilmann, M., Krohne, G., and Sauer, M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *Journal of Cell Science*, 125(3) :570–575.
- [Lukinavicius et al., 2014] Lukinavicius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Gottfert, F., Ta, H., Guther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., Blaukopf, C., Sommer, C., Gerlich, D. W., Arndt, H.-D., Hell, S. W., and Johnsson, K. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods*, 11(7) :731–733.
- [Lukosz and Marchand, 1963] Lukosz, W. and Marchand, M. (1963). Optischen abbildung unter überschreitung der beugungsbedingten auflösungsgrenze. *Journal of Modern Optics*, 10(3) :241–255.
- [Lukyanov et al., 2000] Lukyanov, K. A., Fradkov, A. F., Gurskaya, N. G., Matz, M. V., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Markelov, M. L., Zaraisky, A. G., Zhao, X., Fang, Y., Tan, W., and Lukyanov, S. A. (2000). Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34) :25879–25882.
- [Ma et al., 2007] Ma, X., Wang, Q., Jiang, Y., Xiao, Z., Fang, X., and Chen, Y.-G. (2007). Lateral diffusion of tgf-beta type i receptor studied by single-molecule imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1) :67 – 71.
- [Ma et al., 2012] Ma, Y., Sun, Q., Li, Z., Yu, J.-G., and Smith, S. C. (2012). Theoretical studies of chromophore maturation in the wild-type green fluorescent protein : Oniom (dft : Mm) investigation of the mechanism of cyclization. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(4) :1426–1436.
- [Ma et al., 2010] Ma, Y., Sun, Q., Zhang, H., Peng, L., Yu, J.-G., and Smith, S. C. (2010). The mechanism of cyclization in chromophore maturation of green fluorescent protein : A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(29) :9698–9705. PMID : 20593847.

- [Ma et al., 2016] Ma, Y., Zhang, H., Sun, Q., and Smith, S. C. (2016). New insights on the mechanism of cyclization in chromophore maturation of wild-type green fluorescence protein : A computational study. *The Journal of Physical Chemistry B*.
- [Magliery et al., 2005] Magliery, T. J., Wilson, C. G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A. D., and Regan, L. (2005). Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap : scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1) :146–157.
- [Malkani and Schmid, 2011] Malkani, N. and Schmid, J. A. (2011). Some secrets of fluorescent proteins : distinct bleaching in various mounting fluids and photoactivation of cyan fluorescent proteins at yfp-excitation. *PLoS One*, 6(4) :e18586.
- [Manley et al., 2008] Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 5(2) :155–157.
- [Marchuk et al., 2012] Marchuk, K., Guo, Y., Sun, W., Vela, J., and Fang, N. (2012). High-precision tracking with non-blinking quantum dots resolves nanoscale vertical displacement. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14) :6108–6111. PMID : 22458433.
- [Margolin, 2012] Margolin, W. (2012). The price of tags in protein localization studies. *Journal of Bacteriology*, 194(23) :6369–6371.
- [Masuda et al., 2006] Masuda, H., Takenaka, Y., Yamaguchi, A., Nishikawa, S., and Mizuno, H. (2006). A novel yellowish-green fluorescent protein from the marine copepod, *chiridius poppei*, and its use as a reporter protein in hela cells. *Gene*, 372 :18–25.
- [Matz et al., 1999] Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoan species. *Nat Biotech*, 17(10) :969–973. 10.1038/13657.
- [Matz et al., 2006] Matz, M. V., Marshall, N. J., and Vorobyev, M. (2006). Are corals colorful? *Photochemistry and Photobiology*, 82(2) :345–350.
- [Maurel et al., 2010] Maurel, D., Banala, S., Laroche, T., and Johnsson, K. (2010). Photoactivatable and photoconvertible fluorescent probes for protein labeling. *ACS chemical biology*, 5(5) :507–516.
- [McEvoy et al., 2012] McEvoy, A. L., Hoi, H., Bates, M., Platonova, E., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Davidson, M. W., Ewers, H., Liphardt, J., and Campbell, R. E. (2012). mmaple : A photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities. *PLoS ONE*, 7(12) :1–15.
- [McKinney et al., 2009] McKinney, S. A., Murphy, C. S., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., and Looger, L. L. (2009). A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods*, 6.
- [Meyer and Schindler, 1988] Meyer, T. and Schindler, H. (1988). Particle counting by fluorescence correlation spectroscopy. simultaneous measurement of aggregation and diffusion of molecules in solutions and in membranes. *Biophysical Journal*, 54(6) :983.
- [Miesenböck et al., 1998] Miesenböck, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689) :192–195.

- [Miyawaki et al., 1997] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882–887.
- [Mizuno et al., 2003] Mizuno, H., Mal, T. K., Tong, K. I., Ando, R., Furuta, T., Ikura, M., and Miyawaki, A. (2003). Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Molecular cell*, 12(4) :1051–1058.
- [Mizuno et al., 2008] Mizuno, H., Mal, T. K., Wälchli, M., Kikuchi, A., Fukano, T., Ando, R., Jayakanthan, J., Taka, J., Shiro, Y., Ikura, M., et al. (2008). Light-dependent regulation of structural flexibility in a photochromic fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27) :9227–9232.
- [Moerner, 2002] Moerner, W. (2002). A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(5) :910–927.
- [Moeyaert et al., 2014] Moeyaert, B., Bich, N. N., Zitter, E. D., Rocha, S., Clays, K., Mizuno, H., van Meervelt, L., Hofkens, J., and Dedecker, P. (2014). Green-to- photoconvertible Dronpa mutant for multimodal super-resolution fluorescence microscopy. *ACS Nano*, 8(2) :1664–1673. PMID : 24410188.
- [Mooney et al., 2013] Mooney, C. R. S., Horke, D. A., Chatterley, A. S., Simperler, A., Fielding, H. H., and Verlet, J. R. R. (2013). Taking the green fluorescence out of the protein : dynamics of the isolated GFP chromophore anion. *Chemical Science*, 4 :921–927.
- [Morikawa et al., 2016] Morikawa, T. J., Fujita, H., Kitamura, A., Horio, T., Yamamoto, J., Kinjo, M., Sasaki, A., Machiyama, H., Yoshizawa, K., Ichimura, T., et al. (2016). Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it. *Scientific reports*, 6.
- [Morise et al., 1974] Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., and Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *æquorea*. *Biochemistry*, 13(12) :2656–2662.
- [Morozova and Yurkovskaya, 2010] Morozova, O. B. and Yurkovskaya, A. V. (2010). Intramolecular electron transfer in the photooxidized peptides tyrosine-histidine and histidine-tyrosine : A time-resolved cidnp study. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(43) :7996–7999.
- [Mortensen et al., 2010] Mortensen, K. I., Churchman, L. S., Spudich, J. A., and Flyvbjerg, H. (2010). Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nature Methods*, 7(5) :377–381. 10.1038/nmeth.1447.
- [Murshudov et al., 2011] Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011). Refmac5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D : Biological Crystallography*, 67(4) :355–367.
- [Muyldermans, 2013] Muyldermans, S. (2013). Nanobodies : natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry*, 82 :775–797.
- [Nakajima et al., 2010] Nakajima, Y., Yamazaki, T., Nishii, S., Noguchi, T., Hoshino, H., Niwa, K., Viviani, V. R., and Ohmiya, Y. (2010). Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS One*, 5(4) :e10011.
- [Nan et al., 2013a] Nan, X., Collisson, E. A., Lewis, S., Huang, J., Tamgüney, T. M., Liphardt, J. T., McCormick, F., Gray, J. W., and Chu, S. (2013a). Single-molecule superresolution imaging allows

- quantitative analysis of raf multimer formation and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46) :18519–18524.
- [Nan et al., 2013b] Nan, X., Collisson, E. A., Lewis, S., Huang, J., Tamgüney, T. M., Liphardt, J. T., McCormick, F., Gray, J. W., and Chu, S. (2013b). Single-molecule superresolution imaging allows quantitative analysis of raf multimer formation and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46) :18519–18524.
- [Nanda and Lorsch, 2014] Nanda, J. S. and Lorsch, J. R. (2014). Labeling a protein with fluorophores using nhs ester derivitization. *Methods in enzymology*, 536 :87–94.
- [Nienhaus et al., 2005] Nienhaus, K., Nienhaus, G. U., Wiedenmann, J., and Nar, H. (2005). Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26) :9156–9159.
- [Nieuwenhuizen et al., 2015] Nieuwenhuizen, R. P., Bates, M., Szymborska, A., Lidke, K. A., Rieger, B., and Stallinga, S. (2015). Quantitative localization microscopy : Effects of photophysics and labeling stoichiometry. *PloS one*, 10(5) :e0127989.
- [Niu and Yu, 2008a] Niu, L. and Yu, J. (2008a). Investigating intracellular dynamics of ftsz cytoskeleton with photoactivation single-molecule tracking. *Biophysical Journal*, 95(4) :2009 – 2016.
- [Niu and Yu, 2008b] Niu, L. and Yu, J. (2008b). Investigating intracellular dynamics of ftsz cytoskeleton with photoactivation single-molecule tracking. *Biophysical Journal*, 95(4) :2009–2016.
- [Nomarski, 1952] Nomarski, G. (1952). Interféromètre apolarisation. *French patent*, 1 :123.
- [Nowotschin et al., 2009] Nowotschin, S., , and Hadjantonakis, A.-K. (2009). Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC Developmental Biology*, 9(1) :1–12.
- [Nyquist, 1928] Nyquist, H. (1928). Certain topics in telegraph transmission theory.
- [Olivier et al., 2013] Olivier, N., Keller, D., Rajan, V. S., Gönczy, P., and Manley, S. (2013). Simple buffers for 3D STORM microscopy. *Biomedical Optics Express*, 4(6) :885–899.
- [Ormö et al., 1996] Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R., and Remington, S. (1996). Crystal structure of the *æquorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280) :1392.
- [Oswald et al., 2007] Oswald, F., Schmitt, F., Leutenegger, A., Ivanchenko, S., D'Angelo, C., Salih, A., Maslakova, S., Bulina, M., Schirbeck, R., Nienhaus, G. U., Matz, M. V., and Wiedenmann, J. (2007). Contributions of host and symbiont pigments to the coloration of reef corals. *FEBS Journal*, 274(4) :1102–1122.
- [Ovesný et al., 2014] Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z., and Hagen, G. M. (2014). Thunderstorm : a comprehensive imagej plug-in for palm and storm data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics*, 30(16) :2389–2390.
- [Paez-Segala et al., 2015] Paez-Segala, M. G., Sun, M. G., Shtengel, G., Viswanathan, S., Baird, M. A., Macklin, J. J., Patel, R., Allen, J. R., Howe, E. S., Piszczek, G., Hess, H. F., Davidson, M. W., Wang, Y., and Looger, L. L. (2015). Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for clem. *Nature Methods*, 12(3) :215–218.

- [Pakhomov et al., 2004] Pakhomov, A., Martynova, N. Y., Gurskaya, N., Balashova, T., and Martynov, V. (2004). Photoconversion of the chromophore of a fluorescent protein from dendronephthya sp. *Biochemistry (Moscow)*, 69(8) :901–908.
- [Pakhomov and Martynov, 2011] Pakhomov, A. A. and Martynov, V. I. (2011). Probing the structural determinants of yellow fluorescence of a protein from phialidium sp. *Biochemical and biophysical research communications*, 407(1) :230–235.
- [Palmer et al., 2009] Palmer, C. V., Modi, C. K., and Mydlarz, L. D. (2009). Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS One*, 4(10) :e7298.
- [Palmer and Freeman, 2004] Palmer, E. and Freeman, T. (2004). Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comparative and functional genomics*, 5(4) :342–353.
- [Paskaradevan and Scott, 2012] Paskaradevan, S. and Scott, I. C. (2012). The Aplnr GPCR regulates myocardial progenitor development via a novel cell-non-autonomous, Gαi/o protein-independent pathway. *Biology open*, page BIO2012380.
- [Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002] Patterson, G. H. and Lippincott-Schwartz, J. (2002). A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297(5588) :1873–1877.
- [Patterson and Piston, 2000] Patterson, G. H. and Piston, D. W. (2000). Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophysical Journal*, 78(4) :2159–2162.
- [Pawley, 2006] Pawley, J. B. (2006). Fundamental limits in confocal microscopy. In *Handbook of biological confocal microscopy*, pages 20–42. Springer.
- [Pearce et al., 2000] Pearce, L. L., Gandley, R. E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A. J., McLaughlin, M. K., Pitt, B. R., and Levitan, E. S. (2000). Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1) :477–482.
- [Pédélecq et al., 2006] Pédélecq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 24(1) :79–88.
- [Phair and Misteli, 2001] Phair, R. D. and Misteli, T. (2001). Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(12) :898–907.
- [Phillips, 1997] Phillips, G. N. (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current opinion in structural biology*, 7(6) :821–827.
- [Piatkevich et al., 2013a] Piatkevich, K. D., Malashkevich, V. N., Morozova, K. S., Nemkovich, N. A., Almo, S. C., and Verkhusha, V. V. (2013a). Extended stokes shift in fluorescent proteins : chromophore–protein interactions in a near-infrared tagrfp675 variant. *Scientific reports*, 3.
- [Piatkevich et al., 2013b] Piatkevich, K. D., Subach, F. V., and Verkhusha, V. V. (2013b). Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Nature Communications*, 4.
- [Pletnev et al., 2014] Pletnev, S., Shcherbakova, D. M., Subach, O. M., Pletneva, N. V., Malashkevich, V. N., Almo, S. C., Dauter, Z., and Verkhusha, V. V. (2014). Orange fluorescent proteins : structural studies of LSSmOrange, PSmOrange and PSmOrange2. *PloS one*, 9(6) :e99136.

- [Pletneva et al., 2016] Pletneva, N. V., Pletnev, S., Pakhomov, A. A., Chertkova, R. V., Martynov, V. I., Muslinkina, L., Dauter, Z., and Pletnev, V. (2016). Crystal structure of the fluorescent protein from *dendronephthya* sp. in both green and photoconverted red forms. *Acta Crystallographica Section D : Structural Biology*, 72(8).
- [Pletneva et al., 2010] Pletneva, N. V., Pletnev, V. Z., Lukyanov, K. A., Gurskaya, N. G., Goryacheva, E. A., Martynov, V. I., Wlodawer, A., Dauter, Z., and Pletnev, S. (2010). Structural evidence for a dehydrated intermediate in green fluorescent protein chromophore biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21) :15978–15984.
- [Prasher et al., 1992] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *æquorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2) :229–233.
- [Presley et al., 2002] Presley, J. F., Ward, T. H., Pfeifer, A. C., Siggia, E. D., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2002). Dissection of *cop1* and *arf1* dynamics in vivo and role in golgi membrane transport. *Nature*, 417(6885) :187–193.
- [Puchner et al., 2013] Puchner, E. M., Walter, J. M., Kasper, R., Huang, B., and Lim, W. A. (2013). Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40) :16015–20.
- [Qu et al., 2004] Qu, X., Wu, D., Mets, L., and Scherer, N. F. (2004). Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31) :11298–11303.
- [Rajulapati, 2009] Rajulapati, A. (2009). *High Resolution Single Molecule Optical Localization of Multiple Fluorophores on DNA Origami Constructs*. PhD thesis, Marshall University.
- [Ramakrishnan et al., 2016] Ramakrishnan, P., Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., and Grant, M. H. (2016). Cytotoxic responses to 405 nm light exposure in mammalian and bacterial cells : Involvement of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro*, 33 :54 – 62.
- [Raskin and de Boer, 1999] Raskin, D. M. and de Boer, P. A. J. (1999). Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9) :4971–4976.
- [Rasnik et al., 2006] Rasnik, I., McKinney, S. A., and Ha, T. (2006). Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nature Methods*, 3(11).
- [Regmi et al., 2013] Regmi, C. K., Bhandari, Y. R., Gerstman, B. S., and Chapagain, P. P. (2013). Exploring the diffusion of molecular oxygen in the red fluorescent protein mcherry using explicit oxygen molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry B*, 117(8) :2247–2253.
- [Rego et al., 2012] Rego, E. H., Shao, L., Macklin, J. J., Winoto, L., Johansson, G. A., Kamps-Hughes, N., Davidson, M. W., and Gustafsson, M. G. (2012). Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3) :135–143.
- [Remington et al., 2005] Remington, S. J., Wachter, R. M., Yarbrough, D. K., Branchaud, B., Anderson, D., Kallio, K., and Lukyanov, K. A. (2005). zfp538, a yellow-fluorescent protein from *zoanthus*, contains a novel three-ring chromophore. *Biochemistry*, 44(1) :202–212.

- [Ricci et al., 2015] Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M., and Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 160(6) :1145–1158.
- [Ridgway and Ashley, 1967] Ridgway, E. B. and Ashley, C. C. (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochemical and biophysical research communications*, 29(2) :229–234.
- [Rollins et al., 2015] Rollins, G. C., Shin, J. Y., Bustamante, C., and Pressé, S. (2015). Stochastic approach to the molecular counting problem in superresolution microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2) :E110–E118.
- [Rossi et al., 1997] Rossi, F., Charlton, C. A., and Blau, H. M. (1997). Monitoring protein–protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16) :8405–8410.
- [Roy et al., 2011] Roy, A., Field, M. J., Adam, V., and Bourgeois, D. (2011). The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 133(46) :18586–18589. PMID : 22039963.
- [Rudolph et al., 1999] Rudolph, C., Adam, G., and Simm, A. (1999). Determination of copy number of c-myc protein per cell by quantitative western blotting. *Analytical biochemistry*, 269(1) :66–71.
- [Sabatini et al., 1963] Sabatini, D. D., Bensch, K., and Barnett, R. J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *The Journal of cell biology*, 17(1) :19–58.
- [Sage et al., 2015] Sage, D., Kirshner, H., Pengo, T., Stuurman, N., Min, J., Manley, S., and Unser, M. (2015). Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nature Methods*, 12(8) :717–724.
- [Sako et al., 2000] Sako, Y., Minoghchi, S., and Yanagida, T. (2000). Single-molecule imaging of egfr signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biology*, 2(3) :168–172. 10.1038/35004044.
- [Salih et al., 2006] Salih, A., Cox, G., Szymczak, R., Coles, S. L., Baird, A. H., Dunstan, A., Cocco, G., Mills, J., and Larkum, A. (2006). The role of host-based color and fluorescent pigments in photoprotection and in reducing bleaching stress in corals. In *Proc 10th Int Coral Reef Symp*, pages 746–756.
- [Salih et al., 2000] Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., and Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408(6814) :850–853.
- [Sarkisyan et al., 2016] Sarkisyan, K. S., Bolotin, D. A., Meer, M. V., Usmanova, D. R., Mishin, A. S., Sharonov, G. V., Ivankov, D. N., Bozhanova, N. G., Baranov, M. S., Soylemez, O., et al. (2016). Local fitness landscape of the green fluorescent protein. *Nature*.
- [Sattarzadeh et al., 2015] Sattarzadeh, A., Saberianfar, R., Zipfel, W. R., Menassa, R., and Hanson, M. R. (2015). Green to red photoconversion of GFP for protein tracking in vivo. *Scientific reports*, 5 :11771.
- [Schäfer et al., 2006] Schäfer, S., Dittrich, P., Petrov, E., and Schwille, P. (2006). Single molecule fluorescence imaging of the photoinduced conversion and bleaching behavior of the fluorescent protein kaede. *Microscopy research and technique*, 69(3) :210–219.
- [Schenk et al., 2004] Schenk, A., Ivanchenko, S., Röcker, C., Wiedenmann, J., and Nienhaus, G. U. (2004). Photodynamics of red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 86(1) :384–394.

- [Schermelleh et al., 2010] Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 190(2) :165–175.
- [Schnell et al., 2012] Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A., and Giepmans, B. N. G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods*, 9(2) :152–158. 10.1038/nmeth.1855.
- [Schnorrenberg et al., 2016] Schnorrenberg, S., Grotjohann, T., Vorbrüggen, G., Herzig, A., Hell, S. W., and Jakobs, S. (2016). In vivo super-resolution RESOLFT microscopy of *Drosophila melanogaster*. *eLife*, 5 :e15567.
- [Schwentker et al., 2007] Schwentker, M., Bock, H., Hofmann, M., Jakobs, S., Bewersdorf, J., Egeling, C., and Hell, S. W. (2007). Wide-field subdiffraction resolt microscopy using fluorescent protein photoswitching. *Microscopy Research and Technique*, 70(3) :269–280.
- [Selvin et al., 2007] Selvin, P. R., Loughheed, T., Hoffman, M. T., Park, H., Balci, H., Blehm, B. H., and Toprak, E. (2007). Fluorescence imaging with one-nanometer accuracy (FIONA). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(10).
- [Sengupta et al., 2011] Sengupta, P., Jovanovic-Taliman, T., Skoko, D., Renz, M., Veatch, S. L., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nature Methods*, 8(11) :969–975. 10.1038/nmeth.1704.
- [Sengupta and Lippincott-Schwartz, 2012] Sengupta, P. and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Quantitative analysis of photoactivated localization microscopy (PALM) datasets using pair-correlation analysis. *BioEssays*, 34(5) :396–405.
- [Shaner et al., 2004] Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12) :1567–1572.
- [Shaner et al., 2008] 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. *Nature Methods*, 5(6) :545–51.
- [Shcherbo et al., 2007] Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S., et al. (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature Methods*, 4(9) :741–746.
- [Shimomura, 1995] Shimomura, O. (1995). Luminescence of *aequorin* is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochemical and biophysical research communications*, 211(2) :359–363.
- [Shimomura and Johnson, 1969] Shimomura, O. and Johnson, F. H. (1969). Properties of the bioluminescent protein *aequorin*. *Biochemistry*, 8(10) :3991–3997.
- [Shimomura and Johnson, 1970] Shimomura, O. and Johnson, F. H. (1970). Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in *aequorin* bioluminescence.
- [Shimomura et al., 1962] Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of *aequorin*, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3) :223–239.
- [Shivanandan et al., 2015] Shivanandan, A., Unnikrishnan, J., and Radenovic, A. (2015). Accounting for limited detection efficiency and localization precision in cluster analysis in single molecule localization microscopy. *PLoS ONE*, 10(3) :1–15.

- [Shkrob et al., 2005] Shkrob, M. A., Yanushevich, Y. G., Chudakov, D. M., Gurskaya, N. G., Labas, Y. A., Poponov, S. Y., Mudrik, N. N., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2005). Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from actinia equina. *Biochemical Journal*, 392(3) :649–654.
- [Shroff et al., 2007] Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A., White, H., Gillette, J., Olenych, S., Davidson, M. W., and Betzig, E. (2007). Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51) :20308–20313.
- [Siemering et al., 1996] Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, 6(12) :1653 – 1663.
- [Smyrnova et al., 2015] Smyrnova, D., Moeyaert, B., Michielsens, S., Hofkens, J., Dedecker, P., and Ceulemans, A. (2015). Molecular dynamic indicators of the photoswitching properties of green fluorescent proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(36) :12007–12016.
- [Snapp, 2009] Snapp, E. L. (2009). Fluorescent proteins : A cell biologist's user guide. *Trends in cell biology*, 19(11) :649–655. 19819147[pmid] Trends Cell Biol.
- [Snapp et al., 2003] Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked er cisternae by low affinity protein interactions. *The Journal of Cell Biology*, 163(2) :257–269. 200306020[PII] 14581454[pmid] J Cell Biol.
- [Sniegowski et al., 2005] Sniegowski, J. A., Lappe, J. W., Patel, H. N., Huffman, H. A., and Wachter, R. M. (2005). Base catalysis of chromophore formation in arg96 and glu222 variants of green fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28) :26248–26255.
- [Stanley, 2014] Stanley, P. E. (2014). Bioluminescence : living lights, lights for living. the wilson and j woodland hastings. harvard university press, cambridge, ma (2013) (176 pp., hbk ; also available as a kindle version). isbn-10 : 0674067169, isbn-13 : 978-0674067165. *Luminescence*, 29(3) :201–201.
- [Stiel et al., 2008] Stiel, A. C., Andresen, M., Bock, H., Hilbert, M., Schilde, J., and Sch A. (2008). Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy. *Biophysical Journal*, 95(6) :2989 – 2997.
- [Stiel et al., 2007] Stiel, A. C., Trowitzsch, S., Weber, G., Andresen, M., Eggeling, C., Hell, S. W., Jakobs, S., and Wahl, M. C. (2007). 1.8 bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein dronpa guides the generation of fast switching variants. *Biochemical Journal*, 402(1) :35–42.
- [Strack, 2015] Strack, R. (2015). Imaging : Death by super-resolution imaging. *Nature Methods*, 12(12) :1111–1111.
- [Subach et al., 2009a] Subach, F. V., Malashkevich, V. N., Zencheck, W. D., Xiao, H., Filonov, G. S., Almo, S. C., and Verkhusha, V. V. (2009a). Photoactivation mechanism of pamcherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50) :21097–21102.
- [Subach et al., 2009b] Subach, F. V., Patterson, G. H., Manley, S., Gillette, J. M., Lippincott-Schwartz, J., and Verkhusha, V. V. (2009b). Photoactivatable mcherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 6(2) :153–159. 10.1038/nmeth.1298.

- [Subach et al., 2010a] Subach, F. V., Patterson, G. H., Renz, M., Lippincott-Schwartz, J., and Verkhusha, V. V. (2010a). Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells. *Journal of the American Chemical Society*, 132(18) :6481–6491. PMID : 20394363.
- [Subach et al., 2010b] Subach, F. V., Zhang, L., Gadella, T. W., Gurskaya, N. G., Lukyanov, K. A., and Verkhusha, V. V. (2010b). Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET. *Chemistry & biology*, 17(7) :745–755.
- [Subach et al., 2012] Subach, O. M., Entenberg, D., Condeelis, J. S., and Verkhusha, V. V. (2012). A FRET-facilitated photoswitching using an orange fluorescent protein with the fast photoconversion kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, 134(36) :14789–14799.
- [Subach et al., 2010c] Subach, O. M., Malashkevich, V. N., Zencheck, W. D., Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Almo, S. C., and Verkhusha, V. V. (2010c). Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mtagbfp and tagrpf fluorescent proteins. *Chemistry and Biology*, 17(4) :333 – 341.
- [Subach et al., 2011] Subach, O. M., Patterson, G. H., Ting, L.-M., Wang, Y., Condeelis, J. S., and Verkhusha, V. V. (2011). A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange. *Nature Methods*, 8(9) :771–777. 10.1038/nmeth.1664.
- [Sugunan et al., 2011] Sugunan, S. K., Paige, M. F., and Steer, R. P. (2011). Determination of oxygen permeabilities in thin polymer films using quenching of upconverted fluorescence in porphyrins. *Canadian Journal of Chemistry*, 89(2) :195–202.
- [Sun et al., 2004] Sun, Y., Castner, E. W., Lawson, C. L., and Falkowski, P. G. (2004). Biophysical characterization of natural and mutant fluorescent proteins cloned from zooxanthellate corals. *FEBS letters*, 570(1-3) :175–183.
- [Suzuki et al., 2012] Suzuki, K. G., Kasai, R. S., Hirosawa, K. M., Nemoto, Y. L., Ishibashi, M., Miwa, Y., Fujiwara, T. K., and Kusumi, A. (2012). Transient gpi-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nature chemical biology*, 8(9) :774–783.
- [Svoboda et al., 1993] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J., Block, S. M., et al. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448) :721–727.
- [Swulius and Jensen, 2012] Swulius, M. T. and Jensen, G. J. (2012). The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag. *Journal of Bacteriology*, 194(23) :6382–6386.
- [Synge, 1928] Synge, E. (1928). Xxxviii. a suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6(35) :356–362.
- [Taniguchi et al., 2010] Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G.-W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., and Xie, X. S. (2010). Quantifying *e. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, 329(5991) :533–538.
- [Tatavarty et al., 2009] Tatavarty, V., Kim, E.-J., Rodionov, V., and Yu, J. (2009). Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS ONE*, 4(11) :1–9.

- [Teramura et al., 2006] Teramura, Y., Ichinose, J., Takagi, H., Nishida, K., Yanagida, T., and Sako, Y. (2006). Single-molecule analysis of epidermal growth factor binding on the surface of living cells. *The EMBO Journal*, 25(18) :4215–4222.
- [Testa et al., 2010] Testa, I., Wurm, C. A., Medda, R., Rothermel, E., von Middendorf, C., Fölling, J., Jakobs, S., Schönle, A., Hell, S. W., and Eggeling, C. (2010). Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength. *Biophysical Journal*, 99(8) :2686–2694. BPJ2042[PII] 20959110[pmid] Biophys J.
- [Tomosugi et al., 2009] Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., and Nagai, T. (2009). An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods*, 6(5) :351–353.
- [Toprak et al., 2006] Toprak, E., Enderlein, J., Syed, S., McKinney, S. A., Petschek, R. G., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2006). Defocused orientation and position imaging (dopi) of myosin v. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17) :6495–6499.
- [Truneh and Machy, 1987] Truneh, A. and Machy, P. (1987). Detection of very low receptor numbers on cells by flow cytometry using a sensitive staining method. *Cytometry*, 8(6) :562–567.
- [Tsutsui et al., 2005] Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N., and Miyawaki, A. (2005). Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO reports*, 6(3) :233–238.
- [Ulbrich and Isacoff, 2007] Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature Methods*, 4(4) :319–321. 10.1038/nmeth1024.
- [Uno et al., 2014] Uno, S.-n., Kamiya, M., Yoshihara, T., Sugawara, K., Okabe, K., Tarhan, M. C., Fujita, H., Funatsu, T., Okada, Y., Tobita, S., and Urano, Y. (2014). A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nature Chemistry*, 6(8) :681–689.
- [van de Linde et al., 2011a] van de Linde, S., Krstić, I., Prisner, T., Dose, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011a). Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(4) :499–506.
- [van de Linde et al., 2011b] van de Linde, S., Loschberger, A., Klein, T., Heidebreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011b). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols*, 6(7) :991–1009. 10.1038/nprot.2011.336.
- [van de Linde et al., 2011c] van de Linde, S., Löscherberger, A., Klein, T., Heidebreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011c). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols*, 6(7) :991–1009.
- [van de Linde and Sauer, 2014] van de Linde, S. and Sauer, M. (2014). How to switch a fluorophore : from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chemical Society Reviews*, 43 :1076–1087.
- [van Thor et al., 2002] van Thor, J. J., Gensch, T., Hellingwerf, K. J., and Johnson, L. N. (2002). Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(1) :37–41.
- [Vaughan et al., 2013] Vaughan, J. C., Dempsey, G. T., Sun, E., and Zhuang, X. (2013). Phosphine quenching of cyanine dyes as a versatile tool for fluorescence microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 135(4) :1197–1200.

- [Veatch et al., 2012a] Veatch, S. L., Machta, B. B., Shelby, S. A., Chiang, E. N., Holowka, D. A., and Baird, B. A. (2012a). Correlation functions quantify super-resolution images and estimate apparent clustering due to over-counting. *PloS one*, 7(2) :e31457.
- [Veatch et al., 2012b] Veatch, S. L., Machta, B. B., Shelby, S. A., Chiang, E. N., Holowka, D. A., and Baird, B. A. (2012b). Correlation functions quantify super-resolution images and estimate apparent clustering due to over-counting. *PloS one*, 7(2) :e31457.
- [Venkataramani et al., 2016] Venkataramani, V., Herrmannsdorfer, F., Heilemann, M., and Kuner, T. (2016). Suresim : simulating localization microscopy experiments from ground truth models. *Nature Methods*, 13(4) :319–321.
- [Verkhusha and Lukyanov, 2004] Verkhusha, V. V. and Lukyanov, K. A. (2004). The molecular properties and applications of anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature biotechnology*, 22(3) :289–296.
- [Verkhusha and Sorkin, 2005] Verkhusha, V. V. and Sorkin, A. (2005). Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe. *Chemistry & biology*, 12(3) :279–285.
- [von Gerlach, 1858] von Gerlach, J. (1858). *Mikroskopische Studien aus dem Gebiete der menschlichen Morphologie*. Enke.
- [Von Prowazek, 1914] Von Prowazek, S. (1914). Zur kenntnis der giemsafärbung von standpunkt der zytologie. *Z Mikrosk*, 31 :1–16.
- [Vreja et al., 2015] Vreja, I. C., Nikic, I., Göttfert, F., Bates, M., Kröhnert, K., Outeiro, T. F., Hell, S. W., Lemke, E. A., and Rizzoli, S. O. (2015). Super-resolution microscopy of clickable amino acids reveals the effects of fluorescent protein tagging on protein assemblies. *ACS Nano*, 9(11) :11034–11041. PMID : 26498474.
- [Wachter et al., 1998] Wachter, R. M., Elsiger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G. T., and Remington, S. J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, 6(10) :1267–1277.
- [Wäldchen et al., 2015] Wäldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., van de Linde, S., and Sauer, M. (2015). Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Scientific reports*, 5.
- [Wang et al., 2004] Wang, L., Jackson, W. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2004). Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(48) :16745–16749.
- [Wang et al., 2014a] Wang, S., Moffitt, J. R., Dempsey, G. T., Xie, X. S., and Zhuang, X. (2014a). Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23) :8452–7. Wang, Siyuan Moffitt, Jeffrey R Dempsey, Graham T Xie, X Sunney Zhuang, Xiaowei United States Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 10 ;111(23) :8452-7. doi : 10.1073/pnas.1406593111. Epub 2014 May 27.
- [Wang et al., 2014b] Wang, S., Moffitt, J. R., Dempsey, G. T., Xie, X. S., and Zhuang, X. (2014b). Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-moleculebased superresolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23) :8452–8457.
- [Wang and Hsieh, 2008] Wang, Y. and Hsieh, Y.-L. (2008). Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (pva) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science*, 309(1) :73–81.

- [Ward, 1979] Ward, W. W. (1979). Energy transfer processes in bioluminescence. In *Photochemical and photobiological reviews*, pages 1–57. Springer.
- [Webber et al., 2001] Webber, N. M., Litvinenko, K. L., and Meech, S. R. (2001). Radiationless relaxation in a synthetic analogue of the green fluorescent protein chromophore. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(33) :8036–8039.
- [Weber et al., 1978] Weber, K., Rathke, P. C., and Osborn, M. (1978). Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(4) :1820–1824. 417343[pmid] Proc Natl Acad Sci U S A.
- [Wiedenmann, 1997] Wiedenmann, J. (1997). Die anwendung eines orange fluoreszierenden proteins und weiterer farbiger proteine und der zugehörigen gene aus der artengruppe anemonia sp.(sulcata) pennant,(cnidaria, anthozoa, actinaria) in gentechnologie und molekularbiologie. *Patent DE*, 197(18) :640.
- [Wiedenmann et al., 2004a] Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., and Nienhaus, G. U. (2004a). Identification of GFP-like proteins in nonbioluminescent, azooxanthellate Anthozoa opens new perspectives for bioprospecting. *Marine Biotechnology*, 6(3) :270–277.
- [Wiedenmann et al., 2004b] Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Rocker, C., Salih, A., Spindler, K.-D., and Nienhaus, G. U. (2004b). Eosfp, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45) :15905–15910.
- [Wiedenmann et al., 1999] Wiedenmann, J., Röcker, C., and Funke, W. (1999). The morphs of anemonia aff. sulcata (cnidaria, anthozoa) in particular consideration of the ectodermal pigments.
- [Wiedenmann et al., 2002] Wiedenmann, J., Schenk, A., Röcker, C., Girod, A., Spindler, K.-D., and Nienhaus, G. U. (2002). A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from entacmaea quadricolor (anthozoa, actinaria). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18) :11646–11651.
- [Wieneke et al., 2014] Wieneke, R., Lab, N., Rajan, M., Kollmannsperger, A., Natale, F., Cardoso, M. C., and Tamp. (2014). Live-cell targeting of his-tagged proteins by multivalent n-nitrilotriacetic acid carrier complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 136(40) :13975–13978. PMID : 25238106.
- [Wilson and Richards, 2009] Wilson, L. R. and Richards, B. S. (2009). Measurement method for photoluminescent quantum yields of fluorescent organic dyes in polymethyl methacrylate for luminescent solar concentrators. *Applied Optics*, 48(2) :212–220.
- [Wombacher et al., 2010] Wombacher, R., Heidbreder, M., van de Linde, S., Sheetz, M. P., Heilemann, M., Cornish, V. W., and Sauer, M. (2010). Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nature Methods*, 7(9) :717–719. 10.1038/nmeth.1489.
- [Wong et al., 2007] Wong, F. H., Banks, D. S., Abu-Arish, A., and Fradin, C. (2007). A molecular thermometer based on fluorescent protein blinking. *Journal of the American Chemical Society*, 129(34) :10302–10303.
- [Woods et al., 2014] Woods, E., Courtney, J., Scholz, D., Hall, W. W., and Gautier, V. W. (2014). Tracking protein dynamics with photoconvertible Dendra2 on spinning disk confocal systems. *Journal of Microscopy*, 256(3) :197–207.

- [Wu and Burgess, 2008] Wu, L. and Burgess, K. (2008). Syntheses of highly fluorescent gfp-chromophore analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 130(12) :4089–4096. PMID : 18321105.
- [Yang et al., 1996] Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14(10) :1246–1251. 10.1038/nbt1096-1246.
- [Yang et al., 1998] Yang, T.-T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P. A., Chen, Y.-T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G. H., Piston, D. W., and Kain, S. R. (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14) :8212–8216.
- [Yeow et al., 2006] Yeow, E. K., Melnikov, S. M., Bell, T. D., De Schryver, F. C., and Hofkens, J. (2006). Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(5) :1726–1734.
- [Yildiz and Selvin, 2005] Yildiz, A. and Selvin, P. R. (2005). Fluorescence imaging with one nanometer accuracy : application to molecular motors. *Accounts of chemical research*, 38(7) :574–582.
- [Yu et al., 2014] Yu, D., Gustafson, W. C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoye, M., Ge, W.-P., Thayer, D. A., Huang, H., Kornberg, T. B., Royant, A., et al. (2014). An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nature communications*, 5.
- [Yu et al., 2009] Yu, Y., Ulbrich, M. H., Li, M.-H., Buraei, Z., Chen, X.-Z., Ong, A. C. M., Tong, L., Isacoff, E. Y., and Yang, J. (2009). Structural and molecular basis of the assembly of the trpp2/pkd1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28) :11558–11563.
- [Yuan et al., 2014] Yuan, J., He, K., Cheng, M., Yu, J., and Fang, X. (2014). Analysis of the steps in single-molecule photobleaching traces by using the hidden markov model and maximum-likelihood clustering. *Chemistry—An Asian Journal*, 9(8) :2303–2308.
- [Zaccolo et al., 2000] Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., and Pozzan, T. (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature Cell Biology*, 2(1) :25–29.
- [Zanella et al., 2013] Zanella, R., Zanghirati, G., Cavicchioli, R., Zanni, L., Boccacci, P., Bertero, M., and Vicidomini, G. (2013). Towards real-time image deconvolution : application to confocal and STED microscopy. *Scientific reports*, 3.
- [Zernike, 1938] Zernike, F. (1938). The concept of degree of coherence and its application to optical problems. *Physica*, 5(8) :785–795.
- [Zhang et al., 2006] Zhang, L., Patel, H. N., Lappe, J. W., and Wachter, R. M. (2006). Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society*, 128(14) :4766–4772.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, M., Chang, H., Zhang, Y., Yu, J., Wu, L., Ji, W., Chen, J., Liu, B., Lu, J., Liu, Y., Zhang, J., Xu, P., and Xu, T. (2012). Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Methods*, 9(7) :727–729. 10.1038/nmeth.2021.
- [Zhang et al., 2015] Zhang, X., Chen, X., Zeng, Z., Zhang, M., Sun, Y., Xi, P., Peng, J., and Xu, P. (2015). Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *ACS nano*, 9(3) :2659–2667.

- [Zhong et al., 2014] Zhong, S., Navaratnam, D., and Santos-Sacchi, J. (2014). A genetically-encoded YFP sensor with enhanced chloride sensitivity, photostability and reduced pH interference demonstrates augmented transmembrane chloride movement by gerbil prestin (slc26a5). *PloS one*, 9(6) :e99095.
- [Zhou et al., 2012] Zhou, X. X., Chung, H. K., Lam, A. J., and Lin, M. Z. (2012). Optical control of protein activity by fluorescent protein domains. *Science*, 338(6108) :810–814.
- [Zhu et al., 2015] Zhu, X., Zhang, L., Kao, Y.-T., Xu, F., and Min, W. (2015). A tunable fluorescent timer method for imaging spatial-temporal protein dynamics using light-driven photoconvertible protein. *Journal of biophotonics*, 8(3) :226–232.
- [Zondervan et al., 2003] Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S. B., and Orrit, M. (2003). Photoblinking of rhodamine 6g in poly (vinyl alcohol) : Radical dark state formed through the triplet. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(35) :6770–6776.

Remerciements

Ces trois années de thèse (et quatre dans la “maison Pixel” !) auront été pour moi une heureuse expérience à la fois enrichissante et intense. J’y aurais appris le sens profond de deux jolis mots trop souvent maltraités : “je ne sais pas” et “j’imagine”. Ces années n’auraient pas été ce qu’elles ont été sans les nombreuses personnes qui ont donné - de près ou de loin- vie à ce projet. Je tiens dans ces pages à leur exprimer ma gratitude par un franc merci.

Tout d’abord, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse Dominique Bourgeois pour m’avoir donné l’opportunité de rejoindre l’équipe Pixel pour mon stage de Master, préambule d’une longue histoire scientifique. Merci pour ta bienveillance, ton aide précieuse et ta rigueur que je ne manquerai pas de prendre pour exemple dans les années qui viennent. J’ai beaucoup apprécié nos discussions à faire chauffer la pie-mère sur la photophysique des protéines fluorescentes : tu as su me transmettre ta passion et élargir mon champ de connaissance, merci. Ta précision, ton calme et ta rigueur sont à mes yeux des qualités indispensables dans le monde de l’enseignement et de la recherche : merci de m’avoir montré la voie !

Je te tiens également à remercier mon co-directeur de thèse Virgile Adam pour ses conseils techniques et ses remarquables idées sans lesquels mes travaux n’auraient pas été ce qu’ils ont été. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton enthousiasme communicatif et pour ta patience : tu m’auras donné une bien belle image de la recherche scientifique, celle d’une science bouillonnante et lumineuse que je ne manquerai pas de transmettre à mes élèves. Si je quitte l’IBS avec en tête de beaux moments de science, de partage et rigolade c’est grâce à vous !

Merci à Martin Byrdin et Chenxi Duan pour leurs conseils techniques et expertise précieuse en spectrophotométrie et cristallographie des protéines. Merci aux camarades de bureau et de paillasse : Mariam El Khatib, Joyce Woodhouse, Virginia Guillon, Céline Lafaye, Joël Beaudouin, Maxime Jacq, Kevin Floch, Eugenio de La Mora Lugo, Sylvain Engilberge, Giorgio Schiro, Jacques-Philippe Colletier et Martin Weik. J’en oublie sans doute certains dans ces lignes mais je n’oublie pas les moments partagés avec eux.

Merci à nos collaborateurs de m’avoir accueilli au sein de leur laboratoire et pour leur aide précieuse qui a contribué au succès de cette thèse. Merci à Michel Sliwa du Laboratoire de Spectroscopie Infra Rouge de Lille, à Marcelo Nolmann et Alessandro Valeri du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier, à Aline Le Roy, Christine Ebel et Jean-Phillippe Kleman de l’Institut de Biologie Structurale.

Merci à Estelle Lemaître et Mujda Hakime de s’être, toujours avec enthousiasme et sourire, creusées la tête sur le scintillement des protéines fluorescentes. Un sujet pas évident que vous avez su affronter avec aplomb au cours de stages (trop !) courts : merci pour votre aide et le souffle d’air nouveau que vous avez apporté au laboratoire. Bon vent pour la suite !

Grazie a Liliana Barbieri per la sua gentilezza e la sua buon umore. Sei stata un raggio di sole nella

team Pixel. In bocca al lupo per il futuro !

Une thèse c'est également une bonne tranche d'enseignement. Dominique, Virgile, vous m'avez laissé libre de m'impliquer très largement dans l'enseignement, ouvrant à cette occasion de belles opportunités de carrière, merci.

Merci à Alexandra Goudard et Chantal Kleman du lycée Champollion de m'avoir donné l'opportunité de "coller" auprès de leurs élèves. Alexandra, pour cette belle expérience offerte d'encadrement d'école de terrain, un franc merci !

Merci aux collègues enseignants de l'Université de Grenoble pour leurs conseils et leur confiance : Annie Ray, Hervé Albertin, Françoise Cornillon, Stéphane Tanzarella, Nicolas Caudron et Sabrina Boulet.

Merci aux étudiants qui naïvement ne se doutait pas qu'ils m'ont fait progresser et m'améliorer. Vous m'avez offert de beaux moments d'enseignements !

Merci à mes parents pour m'avoir donné l'envie (et les moyens) d'aller toujours plus loin dans ce qui me plaît. Et enfin, merci à ma douce et chère Juliette pour son soutien infaillible depuis toutes ces années.