



Développement de nouvelles méthodes pour dépasser les limitations rencontrées dans le suivi de biosenseur FRET par microscopie de fluorescence quantitative

Claire Déméautis

► To cite this version:

Claire Déméautis. Développement de nouvelles méthodes pour dépasser les limitations rencontrées dans le suivi de biosenseur FRET par microscopie de fluorescence quantitative. Biologie moléculaire. Université de Rennes, 2016. Français. ⟨NNT : 2016REN1B035⟩. ⟨tel-01691741⟩

HAL Id: tel-01691741

<https://theses.hal.science/tel-01691741v1>

Submitted on 24 Jan 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

École doctorale Vie Agro et Santé

présentée par

Claire Déméautis

Préparée à l'unité de recherche UMR6290 CNRS-UR1
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Composante universitaire Science de la vie et de l'Environnement

**Développement de
nouvelles méthodes
pour dépasser les
limitations
rencontrées dans le
suivi de biosenseur
FRET par
Microscopie de
Fluorescence
Quantitative**

**Thèse soutenue à Rennes
le 22 Septembre 2016**

devant le jury composé de :

Fabienne MÉROLA

Directeur de recherche- Laboratoire de Chimie et
Physique / *rapporteur*

Pierre VINCENT

Directeur de recherche- Institut de Biologie Paris
Seine / *rapporteur*

Marie-Dominique GALIBERT

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
UMR6290, IGDR / *examinateur*

Sergi PADILLA-PARRA

PI- University of Oxford / *examinateur*

Marc TRAMIER

Ingénieur de Recherche- UMR6290, IGDR /
directeur de thèse

À ma famille

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de l'équipe de Microscopie de Fluorescence Quantitative à l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes. Je tiens à remercier très particulièrement le Docteur Marc Tramier qui m'a accueilli dans son équipe en stage de master 2 et qui m'a permis de continuer en thèse. Je le remercie chaleureusement pour sa patience, son partage d'expérience et de ses connaissances et de l'aide apportée tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Sergi Padilla-Parra qui m'a donné envie de continuer en thèse et qui m'a permis de travailler avec lui à Oxford durant trois mois. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils, ta patience et toutes ces discussions fortes intéressantes.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury, Fabienne Mérola et Pierre Vincent qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le Professeur Marie-Dominique Galibert, le Docteur Antoine Delon et le Docteur Sergi Padilla-Parra pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Merci à mes collègues Julien, Giulia, Florian, Hafida, Théo, Benjamin, Catherine et Sébastien. Merci pour la bonne humeur toujours présente dans le labo. Merci pour les discussions, les conseils et l'aide fourni au cours de ma thèse. Je remercie aussi mes collaborateurs avec qui j'ai pu échanger et travailler au cours de ces années : Franck Riquet, François Sipieter avec qui j'ai partagé ma première expérience MiFoBio, je garde la photo de « l'équipe de choc » bien précieusement et le Docteur Gwenaël Rabut avec qui j'ai découvert les levures. Je tiens à remercier nos compagnons de labmeetig du mardi matin : Jacques, Benjamin, Yann, Laurent, Xavier, Hélène, Sylvain. Merci pour ces discussions intéressantes et constructives. Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Ludovic Galas, Sandrine Ruchaud, Gwenaël Rabut et Frédéric Moursin. Merci pour vos conseils et votre soutien au cours de nos différentes réunions.

Je tiens à remercier particulièrement Géraldine Le Provost, Nadine Gattet et Isabelle Agneray qui sont les supers woman de l'institut, sans qui nous serions sans doute perdus ! Merci pour votre aide pour la gestion des problèmes rencontrés au cours de ces années.

Au cours de ces années, j'ai rencontré de merveilleuses personnes qui ont fait de ma thèse une expérience unique avec beaucoup d'humour, de bonne humeur, de soutien et beaucoup d'anecdotes. Julien qui m'a fait sortir de ma chambre d'étudiante en me faisant découvrir les bars de Rennes. Hafida dite kinder, avec qui j'ai commencé la thèse en partageant une petite semaine de cohabitation, forcément ça rapproche. Tu vois kinder, on a commencé nos thèses ensemble et on les finis ensemble, tu vois on a réussi. Guillaume dit guigui, ma source de bonne humeur chaque jour, partenaire de nocturnes au labo et de soirées de folie! Merci kinder et guigui d'avoir supporté mon caractère durant ces trois ans. Sébastien qui m'a fait toutes ces blagues sur la Normandie et qui m'a caché jusqu'au dernier moment ses origines normandes ! J'espère que le dessin du cochon avec une jambe en bois restera sur ta porte après mon départ. Yann le fou des statistiques, tu as été un voisin de bureau parfait même si tu empiétais sur mon côté ☺ et que tu nous as fait manger des galettes de rois tous les jours pendant plus d'une semaine. Géraldine dite gégé (juste pour moi) tu as été présente durant ces trois années, tu es ma partenaire de couchette et de cinéma préférée. Stéphane qui a chaque jour un mot gentil et qui a sauvé ma voiture plusieurs fois, merci beaucoup. Je tiens à remercier tous les autres doctorants : Mélanie dite Princesse, Ghislain, Olivia, Ronan, ... pour les très bonnes soirées passées en leur compagnie. Je tiens à remercier les « anciens » doctorants : Manu dit Shakira, Jocelyn dit Dos argenté, Leslie, Nicolas. Merci de nous avoir intégrés dans votre groupe d'anciens et de nous avoir passé le flambeau. Je tiens particulièrement à remercier Jocelyn qui était mon deuxième partenaire de nocturne (avec guigui) et qui a mis en place l'expérience de reproduction de combattants avec Géraldine. Expérience qui a presque réussi (petite pensée pour Patrick II). Je souhaite bon courage et bonne chance aux petits « nouveaux » (Florian, Solenne, Marie, ...), profitez bien de cette expérience unique.

Je tiens à remercier ceux qui de loin ont aussi participé au bon déroulement de ces années de thèse, je parle de mes amis Normands qui m'ont toujours encouragé et soutenu : Claire, Cyril (pas vraiment normand^^), Aline, Émilie, Sébastien, Laëtitia, Mébarek et Pierre.

Pour terminer, je remercie ma famille de m'avoir toujours encouragé, soutenu dans les moments difficiles et ce malgré la distance. J'ai une chance extrême de vous avoir à mes côtés.

Résumé

Mots clés : FRET, FLIM, FCCS, biosenseurs, activité biochimique

La microscopie de fluorescence est devenue un outil incontournable en biologie. En particulier, il est possible de suivre dans le temps et dans l'espace en cellules vivantes l'activité de protéines en utilisant des biosenseurs FRET génétiquement encodés. Mon travail de thèse a consisté à développer de nouvelles méthodes de microscopie de fluorescence quantitative pour dépasser les limitations rencontrées dans le suivi de biosenseurs FRET.

En premier lieu, j'ai eu à développer une méthodologie pour le suivi de deux biosenseurs FRET génétiquement encodés par mesure de durée de vie (FLIM) en simultanément avec une seule longueur d'onde d'excitation. En effet, il n'est pas facile de suivre deux activités biochimiques par biosenseurs FRET dans un même échantillon vivant par microscopie de fluorescence à cause de l'existence de fuites spectrales dans les canaux de détection des différentes protéines fluorescentes et l'utilisation de deux longueurs d'onde d'excitation pour chacun des deux donneurs. En combinant les deux couples de protéines fluorescentes mTFP1/ShadowG et LSSmOrange/mKate2, les artefacts de fuite spectrale ont pu être négligés. Il a été possible de suivre les activités kinases des protéines ERK et PKA en simultanément par FLIM. À l'aide de cette méthodologie, nous avons pu mettre en évidence une activation de la voie PKA lors d'une stimulation à l'EGF.

En second lieu, j'ai développé une méthode pour le suivi de biosenseur FRET par la technique de spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS). Le suivi d'activité de certaines protéines peut s'avérer difficile du fait de leur faible expression au sein de l'échantillon vivant et de leur localisation. La méthode de FCCS nécessite une faible concentration de fluorophores et peut donc s'adapter à ces échantillons. Le FRET a un effet direct sur l'amplitude de corrélation croisée lorsque celle-ci est mesurée en suivant la co-diffusion de deux protéines fluorescentes attachées à un même biosenseur. Une diminution de ratio d'amplitude des courbes d'autocorrélation (verte ou rouge) sur l'amplitude de la courbe de corrélation croisée correspond à la présence de FRET. Nous avons pu mesurer cette diminution dans des cellules exprimant le biosenseur FRET Aurora A WT (FRET) en comparaison avec un mutant K162M (non FRET). Ces premiers résultats sont très prometteurs pour l'utilisation de cette approche au suivi d'un biosenseur faiblement exprimé en cellules vivantes.

L'amélioration du suivi de biosenseur FRET, par les méthodes de microscopie de fluorescence quantitative présentées dans ce travail, doit pouvoir permettre la réponse à des questions d'intérêt biologiques nécessitant le suivi multiplex de FRET ou la mesure de biosenseurs à faible niveau d'expression, là où les techniques conventionnelles se heurtaient à leur limitation.

Abstract

Key words : FRET, FLIM, FCCS, biosensors, biochemical activity

Fluorescence microscopy has become an invaluable tool in biology. In particular, it allows to follow in time and space the activity of proteins, using genetically encoded FRET biosensors, in live cell imaging. In my thesis work, I have developed new quantitative fluorescence microscopy methods to overcome the limitations encountered in monitoring FRET biosensors.

First, I developed a methodology to monitor simultaneously two genetically encoded FRET biosensors by lifetime measures (FLIM) with a single excitation wavelength. Previously, it was not easy to follow two biochemical activities by FRET biosensors in the same live sample by fluorescence microscopy. Two reasons for that: the existence of spectral bleed through in the detection channel of each fluorescent proteins and the use of two excitation wavelengths for the two donors. By combining two fluorescent proteins pairs: mTFP1 / ShadowG and LSSmOrange / mKate2, the “spectral bleed through” artifact became negligible. It became then possible to follow the kinase activity of PKA and ERK proteins simultaneously by FLIM. Using this methodology, we were able to show an activation of the PKA pathway upon stimulation with EGF.

Second, I developed a method to monitor FRET biosensor by fluorescence cross-correlation spectroscopy technique (FCCS). Monitoring the activity of certain proteins may be difficult due to their low expression in living sample and their sub-cellular localization. The FCCS methods requires a low concentration of fluorophores and can therefore be adapted to these samples. FRET has a direct effect on the cross-correlation amplitude when it is measured by following the co-diffusion of two fluorescent proteins attached to a same biosensor. An amplitude ratio decrease, of the autocorrelation curves (green or red) on the amplitude of the cross-correlation curve, corresponds to the presence of FRET. We were able to measure this ratio decreases in cells expressing the FRET biosensor Aurora A wild type (FRET) compared to the K162M mutant one (non-FRET). These first results are very promising to monitor the activity of a weakly expressed protein in living cells biosensor using this approach.

The improvement of FRET biosensor monitoring, by quantitative fluorescence microscopy methods presented in this work, will help to answer biological questions of interest requiring the measurement of multiplex FRET monitoring or biosensors at low level expression, where conventional techniques are facing these limitations.

Table des matières

Résumé	- 1 -
Abstract	- 2 -
Table des matières	- 3 -
Abréviations.....	- 6 -
Chapitre 1 Introduction	- 8 -
1. CONTEXTE BIOLOGIQUE GENERAL.....	- 8 -
1.1. LA COMPREHENSION DES MECANISMES MOLECULAIRES DANS LES ECHANTILLONS VIVANTS.....	- 8 -
1.2. TECHNIQUES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE BASE POUR L'ETUDE DU VIVANT	- 8 -
1.2.1. Outils moléculaires	- 8 -
1.2.2. Outils cellulaires.....	- 12 -
1.2.3. Organismes modèles.....	- 12 -
1.3. OUTILS DE MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE QUANTITATIVE	- 13 -
1.3.1. Méthodes de proximité moléculaire	- 18 -
1.3.1.1. Transfert d'énergie de type Förster (FRET).....	- 18 -
1.3.1.2. Anisotropie de fluorescence	- 20 -
1.3.2. Méthodes de diffusion.....	- 21 -
1.3.2.1. Réapparition de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)	- 21 -
1.3.2.2. Single Particle tracking (SPT).....	- 22 -
1.3.2.3. La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)	- 23 -
2. METHODOLOGIES DETAILLEES UTILISEES POUR CE TRAVAIL	- 24 -
2.1. LA SPECTROSCOPIE A CORRELATION DE FLUORESCENCE (FCS).....	- 25 -
2.2. LA SPECTROSCOPIE A CORRELATION CROISEE DE FLUORESCENCE (FCCS)	- 27 -
2.2.1. Principe	- 27 -
2.2.2. Analyse en FLCS.....	- 29 -
2.3. TRANSFERT D'ENERGIE DE TYPE FÖRSTER (FRET)	- 33 -
2.3.1. Principe général	- 33 -
2.3.2. FRET intermoléculaire.....	- 37 -
2.3.3. FRET intramoléculaire.....	- 38 -
2.4. MESURE DU FRET	- 39 -
2.4.1. Mesure du FRET par intensité de fluorescence (Méthode Ratiométrique)	- 39 -
2.4.2. Mesure du FRET par la mesure de durée de vie de fluorescence : FLIM	- 42 -
2.4.2.1. Principe et avantage.....	- 42 -
2.4.2.2. Domaine temporel	- 45 -

2.4.2.3. Domaine fréquentiel	- 49 -
------------------------------------	--------

Chapitre 2 Résultats - 52 -

1. SUIVI D'ACTIVITES BIOCHIMIQUES PAR FRET : MULTIPLEX FRET PAR FLIM.....	- 52 -
1.1. INTRODUCTION	- 52 -
1.1.1. Difficulté de suivre deux biosenseurs en simultané	- 52 -
1.1.2. Méthodologies déjà développées.....	- 53 -
1.1.3.1. Ratiométrie	- 53 -
1.1.3.2. Linear unmixing of 3D excitation/emission fingerprints.....	- 55 -
1.1.3.3. Couplage mesure ratiométrique et FLIM.....	- 55 -
1.2. METHODOLOGIE DE SUIVI D'ACTIVITE AVEC DEUX COULEURS FLIM ET UNE LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION	- 55 -
1.2.1. Suivi d'activité PKA et ERK	- 57 -
1.2.1.1. Introduction générale sur PKA	- 57 -
1.2.1.2. Introduction générale sur ERK	- 59 -
1.2.1.3. Biosenseurs utilisés pour suivre ces activités kinases	- 60 -
1.2.2. Méthodologie.....	- 62 -
1.2.2.1. Validation théorique de notre approche	- 62 -
1.2.2.2. Suivi des activités ERK et PKA par notre approche	- 69 -
1.3. ARTICLE	- 84 -
1.4. DISCUSSION	- 121 -
2. CHANGEMENT DE CONFORMATION PROTEIQUE : SUIVI DE FRET PAR FCCS.....	- 123 -
2.1. INTRODUCTION	- 123 -
2.2. RESULTATS	- 129 -
2.2.1. Suivi du biosenseur Aurora A in vitro par FCCS	- 129 -
2.2.2. Suivi du biosenseur Aurora A en cellule par FCCS	- 131 -
1.1. DISCUSSION	- 132 -

Chapitre 3 Projets annexes - 137 -

1. RAPID LIFETIME DETERMINATION	- 137 -
1.1. INTRODUCTION	- 137 -
1.2. MESURE DE DUREE DE VIE EN SOLUTION TEST.....	- 138 -
1.3. MESURE DE DUREE DE VIE DANS DES ECHANTILLONS VIVANTS	- 140 -
2. VISUALISATION D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE PAR FCCS CHEZ LA LEVURE	- 143 -
2.1. INTRODUCTION	- 143 -
2.2. INTERACTION UBC13 ET MMS2.....	- 144 -
2.3. TEST D'AUTRES TYPES D'INTERACTIONS	- 147 -

Chapitre 4 Conclusion et perspectives..... - 149 -

Chapitre 5 Matériels et méthodes..... - 154 -

1. MULTIPLEX DEUX COULEURS FLIM	- 154 -
1.1. <i>PLASMIDES</i>	- 154 -
1.2. <i>CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION</i>	- 155 -
1.3. AGENTS CHIMIQUES	- 155 -
1.4. <i>IMAGERIE DES CELLULES EXPRIMANT LES BIOSENSEURS</i>	- 155 -
1.5. <i>SYSTEME DE FLIM A DEUX COULEURS AVEC UNE LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION.....</i>	- 156 -
1.6. <i>ANALYSE DES DONNEES</i>	- 156 -
2. SUIVI DE FET PAR FCCS.....	- 157 -
2.1. <i>CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTIONS.....</i>	- 157 -
2.2. <i>SYNCHRONISATION DES CELLULES U2OS.....</i>	- 158 -
2.3. <i>ACQUISITION DES DONNEES.....</i>	- 158 -
2.4. <i>ANALYSE DES DONNEES</i>	- 159 -
2.5. <i>ANALYSES STATISTIQUES</i>	- 159 -
3. RAPID LIFETIME DETERMINATION	- 159 -
3.1. <i>CULTURE CELLULAIRE</i>	- 159 -
3.2. <i>SOLUTIONS</i>	- 160 -
3.3. <i>PLASMIDES ET TRANSFECTION</i>	- 160 -
3.4. <i>ACQUISITION DES DUREES DE VIE DE FLUORESCENCE</i>	- 160 -
3.5. <i>ANALYSE DES DONNEES</i>	- 160 -
4. MESURES FCCS DANS LA LEVURE	- 161 -

Chapitre 6 Références..... - 162 -

Abréviations

ACF: Autocorrelation function

AKAR4: A-Kinase Activity Reporter 4

APD: Avalanche Photodiode

CCD: Charge Coupled Device

GFP: Green Fluorescent Protein

EGF: Epidermal Growth Factor

eGFP: enhanced Green Fluorescent Protein

EKAR2G: Extracellular signal-regulated Kinase Activity Reporter second Generation

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

FCCS: Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

FLCS: Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

HRI: High Rate Imager

iRFP: near-infrared Fluorescent Protein

LSSmOrange: Large Stockes Shift monomeric Orange

MEK: MAPK/ERK kinase

NA: Numerical Aperture

mTFP1: monomeric Teal Fluorescent Protein

PA-GFP: PhotoActivable- Green Fluorescent Protein

PKA: Protein kinase A

RLD: Rapid Lifetime Determination

sfGFP: superfolder Green Fluorescent Protein

sREACH: super Resonance Energy Accepting Chromoprotein

SPT: Single Particle Tracking

TagRFP: Tag Red Fluorescent Protein

TCSPC: Time Correlated Single Photon Counting

Chapitre 1 Introduction

1. Contexte biologique général

1.1. La compréhension des mécanismes moléculaires dans les échantillons vivants

Dans un contexte général, la priorité scientifique est la nécessité de comprendre des mécanismes moléculaires fondamentaux dans des échantillons vivants pour comprendre les processus physiopathologiques cellulaires. Pour cela, quatre besoins sont essentiels : la localisation des molécules d'intérêt, l'étude de leur diffusion, l'étude de leurs interactions et l'étude de leurs activités.

Pour essayer de répondre à ces besoins fondamentaux, des outils ont été développés comme par exemple le développement de fluorophore pour marquer une protéine d'intérêt et la visualiser dans une cellule ou un organisme modèle. Pour visualiser ces phénomènes, la fluorescence est principalement utilisée. Dans les paragraphes suivant, les outils moléculaires pour le marquage de ces molécules, les supports d'étude (cellules et organismes modèle) et les outils de visualisation (dans notre cas la microscopie de fluorescence quantitative) vont être présentés.

1.2. Techniques moléculaires et cellulaires de base pour l'étude du vivant

1.2.1. Outils moléculaires

Beaucoup d'outils moléculaires ont été développés. Il existe différents marqueurs tels que des marqueurs organiques qui permettent de marquer spécifiquement des compartiments cellulaires comme par exemple le MitoTracker qui marque les mitochondries ou encore le DAPI qui permet de repérer le noyau des cellules. Il existe aussi des fluorophores organiques qui peuvent être couplés sur des peptides ou des anticorps permettant de cibler la protéine d'intérêt. La limitation majeure est qu'il n'est pas toujours facile d'internaliser ces sondes dans les cellules vivantes. Il est possible de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt sur des échantillons fixés. À l'aide des techniques de western blot ou d'immunofluorescence, on peut sur un échantillon fixé à un temps t savoir la localisation, l'état de phosphorylation d'une molécule. Pour ces techniques, des anticorps dirigés contre la protéine ou molécule d'intérêt ou contre un substrat d'une protéine sont

utilisés. Ces anticorps peuvent être directement utilisés pour une révélation en western blot ou peuvent être reconnus par un anticorps secondaire qui reconnaîtra l'immunoglobuline G de l'espèce où l'anticorps primaire a été produit. Cet anticorps secondaire sera associé à un fluorophore tel que les Alexa Fluor (du bleu au rouge lointain). L'inconvénient majeur de ces techniques est la complexité pour l'internalisation des anticorps dans l'échantillon qui doit subir de forts traitements chimiques.

Les quantum dots peuvent être utilisés pour marquer des molécules (Alivisatos 1996; Tokumasu & Dvorak 2003). Ces quantum dots sont des nanoparticules de semi-conducteurs, plus photostables et brillantes par rapport aux autres marqueurs fluorescents (Michalet et al. 2005) mais elles peuvent être plus toxiques pour les échantillons. La grande caractéristique de ces marqueurs est leur déplacement d'émission de fluorescence suivant leur taille. En effet, une nanoparticule de petite taille émettra une fluorescence bleue et celle d'un diamètre plus grand émettra dans le rouge. Là encore, l'internalisation est un problème.

Les protéines fluorescentes sont alors beaucoup plus utilisées pour marquer des molécules d'intérêt. L'avantage de ces protéines fluorescentes est qu'elles peuvent être produites par la cellule et permettent de marquer spécifiquement la protéine d'intérêt par encodage génétique. En effet, il est facile de visualiser et de suivre des protéines, qui ont été fusionnées à une protéine fluorescence, dans les cellules vivantes par des techniques non-invasives. La première protéine fluorescente découverte en 1962 a été la « Green Fluorescent Protein » GFP dérivée de la méduse *Aequorea Victoria*. Le prix Nobel de chimie pour la découverte et le développement de la GFP a été attribué en 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien (Ormö et al. 1996; Tsien 1998). À partir de la GFP, beaucoup de protéines fluorescentes ont été développées au cours du temps. De simples mutations sur le chromophore ont permis d'obtenir une version améliorée de la GFP, appelée eGFP pour « enhanced Green Fluorescent Protein » (Heim et al. 1995); mais aussi d'obtenir de nombreuses protéines fluorescentes qui diffèrent par leurs spectres d'absorption et d'émission, temps de maturation, photostabilité et brillance (Fig 1.1). Ce large spectre de protéines fluorescentes permet un marquage multi-couleurs des échantillons vivants (Shaner et al. 2007).

Des protéines fluorescentes dans le rouge et le rouge lointain ont été développées car du fait de leur longueur d'onde plus grande, l'énergie mise pour l'excitation est plus faible, la phototoxicité est donc plus faible et la pénétration dans l'échantillon est plus importante. Les premières protéines fluorescentes rouges ont été dérivées du corail (*Discosoma*) pour la protéine DsRed (Shaner et al. 2004; Matz et al. 1999) , ou de l'anémone (*Entecmaea quadricolor*) pour TagRFP (Merzlyak et al. 2007). Comme pour la GFP, de nombreuses mutations ont été faites pour obtenir de nombreuses formes de ces protéines fluorescentes (Fig 1.1) (Shaner et al. 2007; Shaner et al. 2008). Des mutations ont été réalisées sur la protéine fluorescente ECFP pour générer une nouvelle forme de protéine fluorescente bleue appelée Aquamarine (Erard et al. 2013). Cette protéine est monomérique, plus stable, brillante par rapport aux autres protéines fluorescentes bleues. Elle est adéquate pour des expériences d'imagerie en échantillon vivant. Bien sûr d'autres protéines fluorescentes bleues ont été développées au cours du temps comme par exemple la protéine Cerulean ou encore CyPet. Une protéine monomérique bleue appelée mTFP1 a été développée. Cette protéine est plus brillante que les autres protéines fluorescentes monomères dans la catégorie bleue ou verte. Elle est environ trois fois plus brillante que la protéine fluorescente ECFP, deux fois plus brillante que la protéine Cerulean (qui est une ECFP améliorée) et environ deux fois plus brillante que la protéine EGFP. Elle a la propriété d'être photostable, d'avoir un haut rendement quantique et un fort taux de maturation. Maintenant, les protéines fluorescentes couvrent le spectre du visible et au-delà (Rino et al. 2009; Shaner et al. 2007). Cet étalonnage de spectre permet d'avoir des protéines fluorescentes, qui sont spectralement séparées, et d'utiliser des techniques de microscopie de fluorescence quantitative (comme le FRET ou la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence).

Le développement de ces nombreuses protéines fluorescentes a permis de réaliser de multiples études de localisation, de dynamique, de fonction pour différents processus cellulaires. (Belmont 2001; Day & Schaufele 2005; Giepmans et al. 2006).

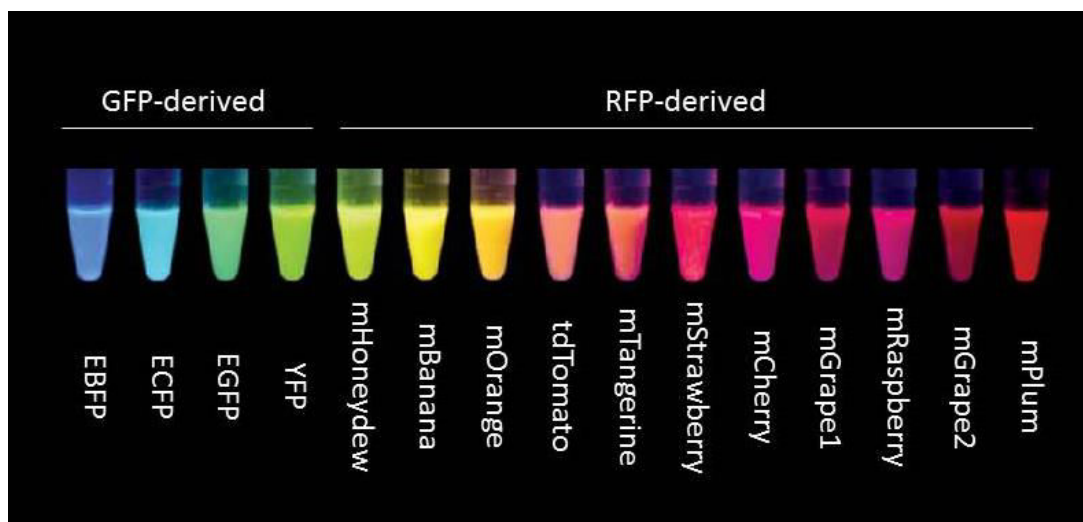


Fig 1.1 : Les protéines fluorescentes. Différentes protéines fluorescentes dans le spectre du visible (d'après Rino et al. 2009)

Après la mise en place de toutes ces molécules fluorescentes, les biosenseurs ont été développés sur la base de ces protéines fluorescentes avec toujours le même avantage d'être exprimé de manière endogène dans des échantillons vivants. Un biosenseur est un outil très précieux pour l'étude des activités biochimiques, de changement de conformation d'une protéine d'intérêt dans l'espace et dans le temps dans un échantillon vivant. Il est possible de suivre les ions Calcium avec un biosenseur Cameleon (Miyawaki et al. 1997). Ce biosenseur est un biosenseur historique en effet c'est le premier biosenseur développé. Ce biosenseur se compose de la protéine calmoduline qui s'associe aux ions calcium. Quand cette association se produit, il y a un changement de conformation du biosenseur, on peut donc suivre le mouvement calcique au cours du temps. De nombreux biosenseurs ont été réalisés comme les biosenseurs pour suivre l'activité kinase d'une protéine telle que ERK, PKA, Aurora A, etc (Castro et al. 2014; Morris 2013). Généralement ces biosenseurs sont constitués d'un substrat d'une kinase avec un site de reconnaissance du substrat phosphorylé. Il y a donc de nombreuses possibilités de trouver un biosenseur pour suivre un processus biologique. Le suivi des protéines GTPase comme RhoA, Ras, Rap1, Rac, Cdc42 est aussi possible à l'aide des biosenseurs (Pertz et al. 2006; Fujioka et al. 2015; MacNevin et al. 2016).

De nombreux biosenseurs ont été développés pour suivre l'activité des RhoGTPase pour étudier la dynamique du cytosquelette (Itoh et al. 2002; Hinde et al. 2013), étudier la tension au sein d'une protéine (Grashoff et al. 2010; Borghi et al. 2012), étudier la fusion

virale (Jones et al. 2015) ou encore l'activité kinase au sein de neurones (Gervasi et al. 2007). De manière générale, les biosenseurs FRET sont suivis par les deux techniques utilisées pour mesurer le transfert d'énergie entre deux fluorophores, c'est-à-dire : par mesure d'intensité de fluorescence du donneur et de l'accepteur ou par la mesure de durée de vie du donneur.

Lors de l'étude d'une protéine d'intérêt, il est encouragé de mettre sous silence son expression endogène. Ce silence se fait par des approches de siRNA, de CRISPR, de mutagenèse dirigée ou morpholino si le travail est fait sur un organisme modèle. Les mutations induites par ces techniques vont permettre l'arrêt de production des protéines ou facteurs d'intérêt.

Tous ces outils sont utilisés pour des études sur plusieurs échantillons : les cellules et les organismes modèles.

1.2.2. Outils cellulaires

Comme vu précédemment, il est facile de faire des études biologiques sur des cellules. De nombreuses variétés de cellules existent comme les U2OS (provenant d'un ostéosarcome humain), HeLa (cancer de l'utérus), HEK, 3T3, MEF (fibroblaste d'embryon de souris), etc. Les cellules sont faciles d'entretien, peuvent se congeler pour être stockées. Chaque lignée cellulaire a ses avantages pour les études biologiques. Dans ce modèle, il est assez facile d'effectuer et de visualiser des marquages de molécules d'intérêts à l'aide des outils moléculaires décrits précédemment.

1.2.3. Organismes modèles

Des critiques peuvent être entendues lorsque les études sont faites en cellules. En effet, la question principale est : visualisons-nous les mêmes phénomènes biologiques en cellules et en organismes modèles ? Il est donc primordial de prolonger les études effectuées en cellules sur des organismes modèles. Plusieurs organismes modèles existent tels que la souris, *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), *Drosophila melanogaster* (*Drosophile*), *Saccharomyces cerevisiae* (la levure de bière), *Xenopus laevis* (*Xénope*), *Danio rerio* (Zebrafish). Le réel avantage de travailler dans ces modèles est d'étudier un processus biologique dans un système fermé et de pouvoir suivre la physiologie entière du modèle.

Ces organismes sont faciles à utiliser, à entretenir. Beaucoup d'études sur la division cellulaire et les facteurs impliqués dans ce processus ont été réalisées sur les xénopes (Hatte et al. 2014) et la drosophile (Le Borgne et al. 2002), des études sur la dynamique des microtubules et des mouvements des centrosomes, sur les facteurs impliqués dans la fonction d'absorption dans l'intestin, le maintien de la polarité des cellules épithéliales ont été menées sur *C.elegans* (Lacroix et al. 2014; Gillard et al. 2015).

1.3. Outils de microscopie de fluorescence quantitative

C'est en utilisant les outils de biologie moléculaire et cellulaire présentés dans la partie précédente que la microscopie de fluorescence devient un outil indispensable pour l'étude du vivant. Dans cette partie, le principe de fluorescence, les marqueurs fluorescents ainsi que les outils microscopiques permettant de visualiser la fluorescence seront expliqués.

L'émission lumineuse par une molécule excitée (par absorption de photon) est appelée fluorescence. Généralement, une molécule fluorescente a la capacité d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation). Lorsque cette molécule absorbe l'énergie lumineuse, elle passe dans un état électronique excité (état singulet). Pour retourner dans son état fondamental, cette molécule excitée va émettre de l'énergie radiative que l'on appelle fluorescence.

Les choix des marqueurs fluorescents sont importants suivant l'utilité que l'on en a. Des fluorophores endogènes demeurent naturellement dans les organismes biologiques comme le NADH ou les flavines. Ces fluorophores endogènes sont responsables de l'autofluorescence cellulaire. Malgré cet inconvénient, ces fluorophores sont peu contrastés et non spécifiques. C'est pour cela qu'il est utile d'avoir des marqueurs spécifiques et adaptés selon l'étude que l'on mène. Le principal est d'obtenir un signal spécifique fluorescent plus important que le signal dû à l'autofluorescence.

Pour observer cette fluorescence, les modes de microscopie de fluorescence ont évolué au cours du temps. Un des premiers modes pour observer la fluorescence est l'utilisation d'un microscope à champ large ou épifluorescence (Fig 1.2). Ce mode présente de nombreux avantages : cette technique permet de détecter de faibles signaux de

fluorescence, les sources lumineuses utilisées sont de faibles énergies, les acquisitions sont rapides et moins invasives, ce qui permet de travailler sur des cellules vivantes. Le seul inconvénient est que la récupération de fluorescence à l'émission se fait sans sélectivité pour le plan imagé (c'est-à-dire avec la fluorescence diffuse des plans supérieurs et inférieurs) et non sur un plan focal uniquement.

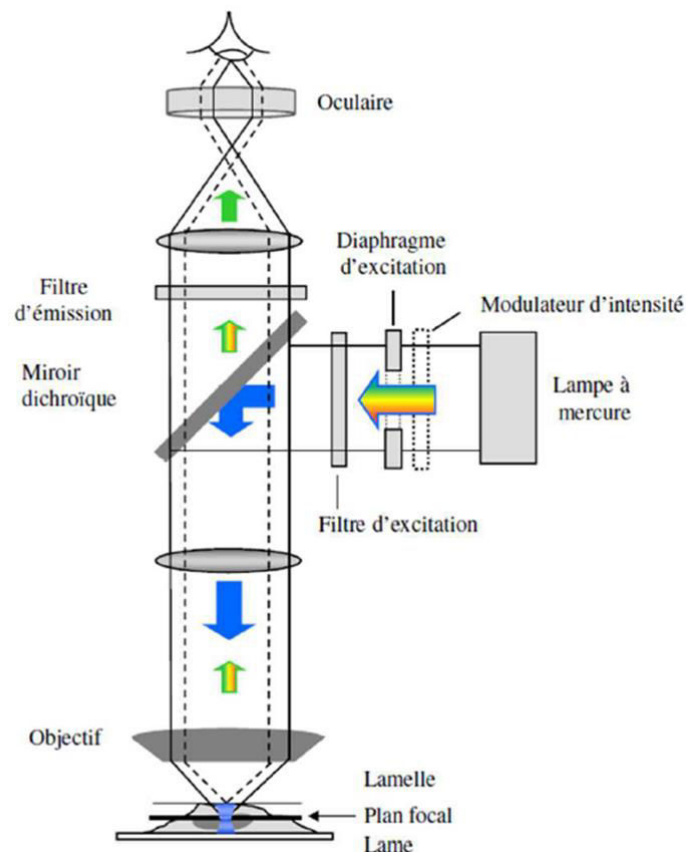


Fig 1.2 : Principe du microscope à champ large. L'échantillon va être excité par une source lumineuse (par exemple une lampe à mercure). Toute la fluorescence émise par l'échantillon sera récoltée au niveau d'un détecteur.

La microscopie confocale a été développée, un pinhole a été mis en place sur le trajet optique avant le détecteur (Fig 1.3). Ce pinhole va permettre de récupérer la fluorescence d'un plan focal. L'excitation de l'échantillon par le laser ne va pas être sur toute la surface mais sur un plan focal avec un système de balayage. Plus concrètement, le balayage laser va commencer sur la première ligne de gauche à droite, à la fin de cette ligne,

il y aura un décalage du scanner sur la deuxième ligne à gauche, pour effectuer un balayage sur cette ligne de gauche à droite et ainsi de suite.

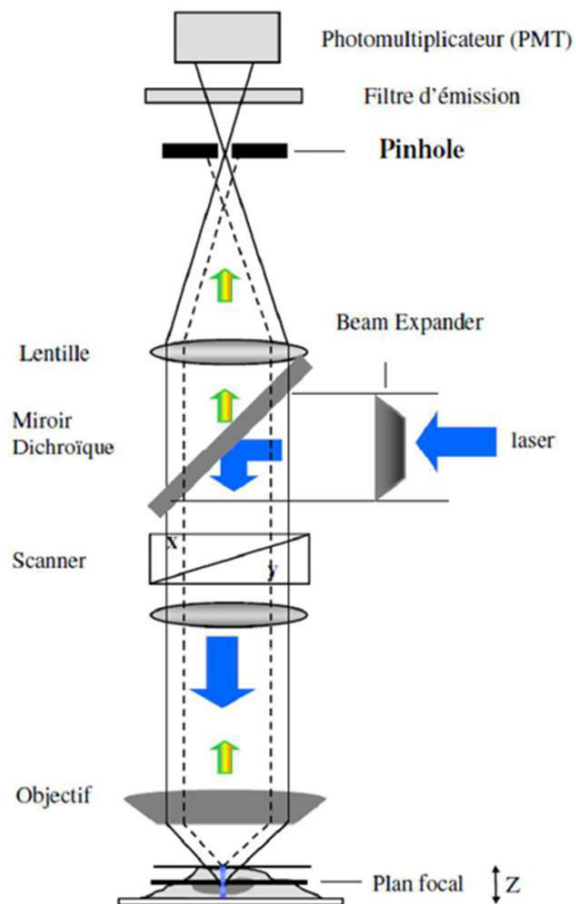


Fig 1.3 : Principe de la microscopie confocale. L'échantillon va être excité par un faisceau laser qui va être réfléchi par un miroir dichroïque et qui le balaie à l'aide d'un scanner. Après son excitation, il va émettre une fluorescence qui sera récupérée sur un plan focal grâce à la mise en place d'un pinhole devant le détecteur.

Un système de microscopie confocale a une meilleure résolution qu'un microscope à champ large. Les avantages de ce mode sont (i) la récupération de fluorescence à l'émission sur un plan focal donc fluorescence plus nette et moins de fluorescence de bruit, (ii) l'amélioration de la résolution, (iii) l'observation d'objet épais. Des inconvénients existent avec ce mode : premièrement, cette microscopie n'est pas très sensible car on enlève de la fluorescence produite avec le pinhole. Il y a donc un risque de photoblanchiment de l'échantillon car il y a excitation dans toute l'épaisseur de l'échantillon. Secondement La puissance laser peut induire des photo-dommages de

l'échantillon. Le laser permet une pénétration réduite dans l'épaisseur de l'échantillon. Le balayage laser est relativement lent donc ça peut être un inconvénient pour visualiser la dynamique cellulaire.

Pour améliorer ce dernier point, un mode de confocal rapide appelé spinning disk a été développé (Fig 1.4). La qualité de ce mode est un scan multi-points à l'aide d'une roue de pinhole donc beaucoup plus rapide que le confocal. Cette roue de pinhole est appelée disque Nipkow. Ce disque contient une série de trous arrangés en spirale pour scanner l'échantillon avec la lumière passant à travers les trous. De nombreux petits points de lumière vont scanner l'échantillon quand le disque tourne.

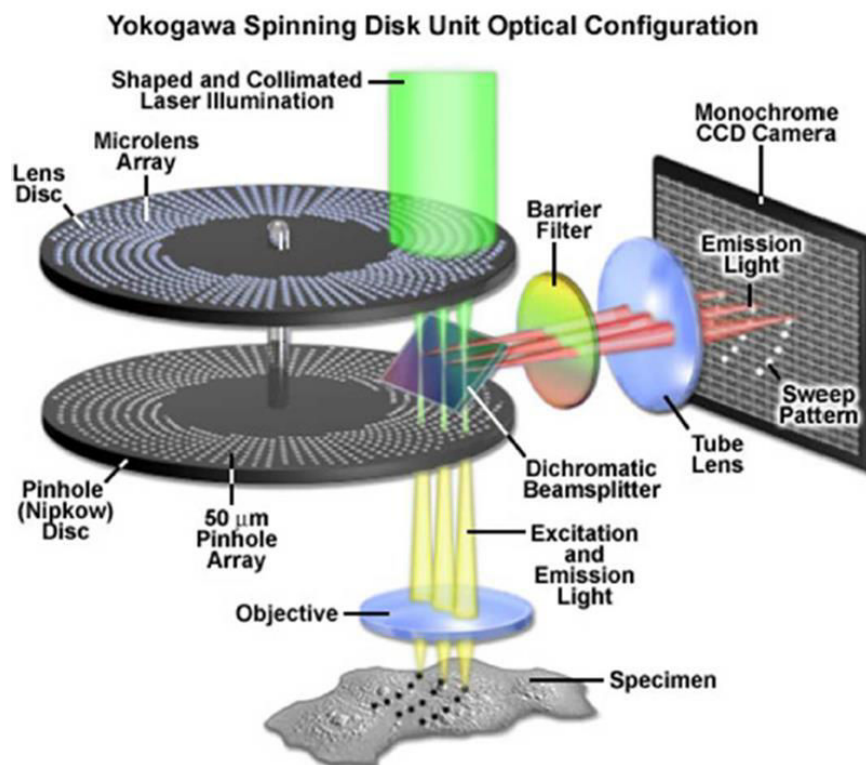


Fig 1.4 : Principe du spinning disk. Le faisceau d'excitation illumine le disque composé des microlentilles. Chaque microlentille focalise le faisceau du laser sur le pinhole correspondant. Chaque pinhole éclaire une partie de l'échantillon. La fluorescence émise par celui-ci repassent par les pinholes et est réfléchi par le miroir dichroïque pour arriver jusqu'à la caméra.

Les avantages de ce mode de confocal rapide sont un photoblanchiment et une phototoxicité plus faible que dans le mode confocal classique et permet une rapidité d'acquisition. Avec ce mode, la résolution est améliorée (mais moins qu'en microscopie confocale).

Un dernier mode de microscopie a été développé au cours de ces dernières années, c'est la fluorescence à 2-photons. Le principe de cette fluorescence est l'utilisation de l'absorption simultanée de deux photons ayant chacun la moitié de l'énergie (le double de la longueur d'onde) nécessaire pour l'excitation des molécules fluorescentes dans l'échantillon (Fig 1.5). Les molécules fluorescentes vont émettre une fluorescence identique à une excitation à un photon. De nombreux avantages sont liés à cette fluorescence comme (i) la localisation de l'excitation dans un petit volume confocal (car en dehors du volume, le flux de photons n'est pas suffisant pour que le phénomène non-linéaire de l'absorption de deux photons soit significatif), (ii) une imagerie plus en profondeur (par l'utilisation de lumière infra-rouge), (iii) moins de perte de lumière (pas de pinhole), (iv) pas de photoblanchiment hors du plan confocal. Les deux inconvénients majeurs de cette méthode sont la lenteur des acquisitions et l'utilisation de lasers pulsés avec de fortes puissances crêtes pouvant endommager les tissus (en particulier par des phénomènes d'échauffement).

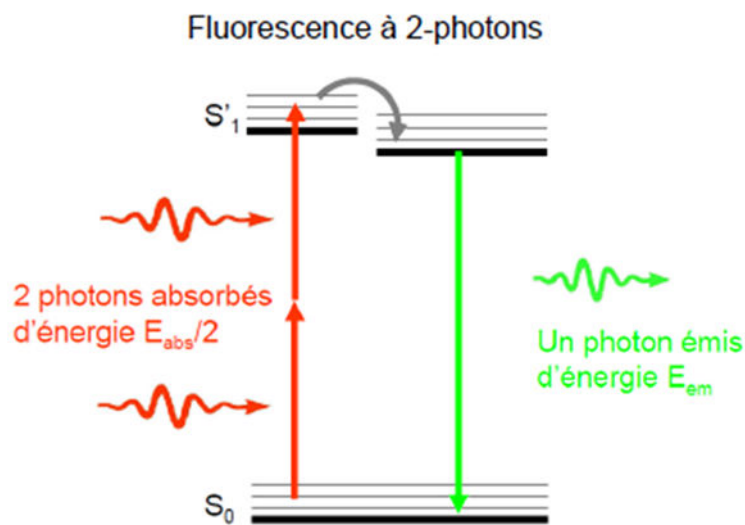


Fig 1.5 : Principe de la fluorescence à 2-photons. Dans un échantillon, les molécules fluorescentes vont absorber les deux photons ayant la moitié de l'énergie nécessaire à leur excitation.

Malgré les quelques limitations énoncées plus haut, la fluorescence reste une technique non invasive. Il est donc avantageux d'utiliser des méthodes à base de fluorescence pour imager le vivant. La fluorescence peut se mesurer en solution, en cellules vivantes ou dans un organisme vivant. En combinant le développement des fluorophores et

les propriétés physiques de la fluorescence, il a été possible de développer de nouvelles techniques de microscopie de fluorescence pour visualiser différents phénomènes dans des échantillons vivants. Ainsi, la diffusion de molécule est étudiée par la technique de spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) ou par réapparition de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ; l'interaction protéine-protéine est visualisée par la technique de transfert d'énergie de fluorescence de type Förster (FRET), la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS) ou l'anisotropie de fluorescence ; le changement de conformation d'une protéine par FRET. Nous verrons dans les paragraphes suivants le principe et l'intérêt de ces techniques.

1.3.1. Méthodes de proximité moléculaire

1.3.1.1. *Transfert d'énergie de type Förster (FRET)*

Le principe de transfert d'énergie de fluorescence de type Förster (FRET pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Tansfer) (Förster 1948) est détaillé dans la partie 2.3 *Transfert d'énergie de type Förster* de ce chapitre. Brièvement, le principe de transfert d'énergie de fluorescence permet de déterminer si deux protéines interagissent entre elles. Un fluorophore donneur à l'état excité transmet son énergie pour venir exciter un fluorophore accepteur. L'accepteur émet une énergie radiative pour revenir à son état fondamental. Ce transfert d'énergie entre ces deux fluorophores se produit si : (i) le spectre d'émission de fluorescence du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur se recouvrent en partie, (ii) les fluorophores sont à une distance inférieure à 10nm et (iii) leurs dipôles de transition électronique ont une orientation appropriée.

Les méthodes de techniques de transfert d'énergie entre deux fluorophores sont adaptées pour étudier les interactions macromoléculaires (dans le cas du FRET intermoléculaire) mais aussi les changements de conformation protéique due à une activité (dans le cas du FRET intramoléculaire). Cette partie sera développée ultérieurement dans la partie 2. *Méthodologies détaillées utilisées pour ce travail* dans ce chapitre. Plusieurs études ont été menées à l'aide de cette technique de transfert d'énergie pour suivre une activité biochimique dans un échantillon vivant à l'aide de biosenseur. Comme par exemple l'étude de la tension au sein de la vinculine aux points d'adhésions focaux a été menée par Grashoff (Grashoff et al. 2010). Cette étude a calibré l'efficacité de FRET pour en déterminer la

tension au sein de la protéine vinculine située aux points d'adhésions focaux. D'autres études effectuées par Lam ou Schultz, ont suivi l'activité calcique à l'aide de biosenseurs constitués de la protéine kinase Ca^{2+} calmoduline dépendante (Lam et al. 2012; Piljic & Schultz 2008). À l'état d'origine le biosenseur est sous forme inactive, lorsque le calcium est présent un changement de conformation du biosenseur s'opère, il est dans une configuration active qui se traduit par une diminution de FRET. Shcherbakova a étudié lui aussi l'activité calcique avec un biosenseur composé de la protéine cameleon qui permet de fixer le calcium (Shcherbakova et al. 2012). On suit donc ici aussi le changement de conformation d'un biosenseur. Il y a aussi eu le suivi d'activité GTPase effectué par Lin (Lam et al. 2012). Dans cette étude, le biosenseur est composé d'une protéine fluorescente Clover, d'une partie RhoA-GDP, d'une partie PKN RhoA binding domain et d'un accepteur mRuby2. Lorsqu'un activateur de la voie RhoA est ajouté, comme par exemple l'acide lysophosphatidique (LPA), un échange GDP en GTP s'effectue, le RhoA-GTP est reconnu par le RhoA binding domain, il y a donc changement de conformation du biosenseur. On peut donc suivre au cours du temps l'activité de RhoA GTPase. D'autres études ont montré une interaction protéine-protéine à l'aide de cette méthode de transfert d'énergie entre deux fluorophores. En effet, il a été montré que les protéines du prion ancrées à la membrane cellulaire interagissent avec leurs protéines voisines (Tavares et al. 2014). Une autre étude a suivi l'interaction du bromodomaine du facteur de transcription TAFII250 avec l'histone H4 (Padilla-Parra et al. 2008). Chaque partie est marquée par une protéine fluorescente comme la GFP pour le bromodomaine et mCherry pour l'histone H4. L'interaction entre ces deux parties s'est démontrée par une diminution de durée de vie de la GFP, signifiant un transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur. Une nouvelle interaction entre le récepteur membranaire CXCR4 qui et la protéine kinase C (PKC) a été découverte par Peter et al en 2005. Le récepteur CXCR4 est le récepteur membranaire de la molécule SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) mais aussi le co-récepteur avec CD4 du virus du SIDA. Le récepteur CXCR4 et la PKC étaient marqués respectivement avec la GFP et mRFP1 (Peter et al. 2005). Une diminution de durée de vie de la GFP a été mesurée, correspondant au phénomène de transfert d'énergie entre GFP et mRFP1. Les auteurs ont pu conclure sur ce résultat qu'il y avait une interaction entre CXCR4 et PKC.

1.3.1.2. *Anisotropie de fluorescence*

Cette technique repose sur l'analyse de la dépolarisation de la lumière. Un échantillon est excité par une lumière polarisée, le fluorophore excité va émettre lui-même une lumière avec des propriétés de polarisation. Si un événement vient perturber l'orientation de ce fluorophore, il y aura une incidence sur les propriétés de polarisation de la lumière émise.

Cette technique permet d'étudier la taille, la forme des molécules ou la rigidité de différents environnements moléculaires. L'anisotropie de fluorescence est influencée par les mouvements rotationnels du fluorophore. Les mouvements locaux et/ou globaux de la molécule marquée peuvent modifier l'orientation du fluorophore et donc modifier les propriétés de polarisation de la lumière émise. L'anisotropie de fluorescence est donc reliée à la dynamique des molécules. Mais dans le cas où ces mouvements sont moins rapides que l'état excité du fluorophore, l'anisotropie de fluorescence devient insensible à ces mouvements. C'est le cas de protéines étiquetées par des GFP, la durée de vie des GFP est de l'ordre de quelques nanosecondes (ns) quand les temps caractéristiques de rotation des protéines sont de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes. C'est dans ce contexte qu'il est possible d'étudier des interactions protéines-protéines par polarisation de fluorescence. Le transfert d'énergie (FRET) peut aussi avoir un effet sur l'anisotropie. Le FRET peut avoir lieu entre deux fluorophores identique (homo-FRET). Le premier fluorophore va être excité par une lumière polarisée, il va transmettre son énergie non radiative au second fluorophore qui va passer dans son état excité et va émettre une lumière. Dans ce cas, seule la dépolarisation de la lumière émise par ce second fluorophore va permettre de caractériser le phénomène de FRET (Weber 1954). En effet, si les dipôles du donneur et de l'accepteur ne sont pas parallèles, la fluorescence émise de l'accepteur due au transfert d'énergie du donneur qui a été photo-sélectionné, est dépolarisée par rapport à la lumière d'excitation (Fig 1.6). Le taux de transfert d'énergie est rapide en comparaison avec le temps de rotation d'une protéine, il est donc possible de détecter des temps de dépolarisation très rapide sur les déclin d'anisotropie de fluorescence. Généralement, l'homo-FRET s'effectue entre deux GFP. Souvent l'anisotropie de fluorescence est employée pour suivre l'oligomérisation de protéines et l'interaction protéine-protéine.

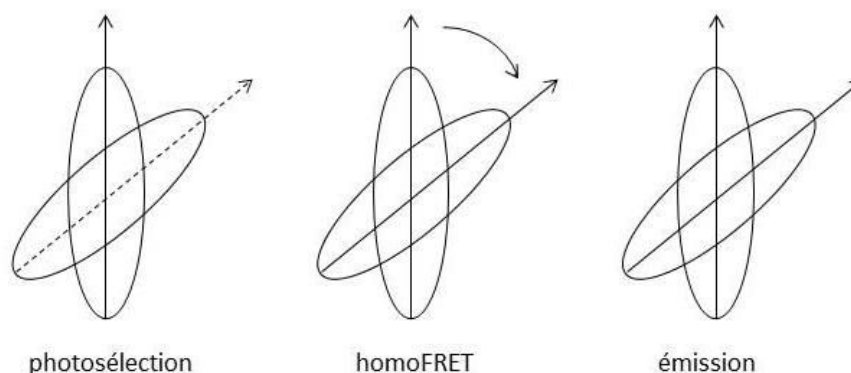


Fig 1.6 : Principe de dépolarisation de la fluorescence par transfert d'énergie. La fluorescence émise par un dipôle, qui a une orientation différente du dipôle lui transférant son énergie, sera désorientée par rapport à l'excitation.

Par exemple, la formation de dimères de la thymidine kinase du virus de l'Herpes HSV-1 (Herpes simplex virus) a été étudiée par anisotropie de fluorescence (Gautier et al. 2001). Le suivi de l'homodimérisation de protéines en présence ou en absence de ligands peut-être étudié à l'aide de cette technique (Bader et al. 2011; Thaler et al. 2009).

1.3.2. Méthodes de diffusion

1.3.2.1. Réapparition de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

La technique de réapparition de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) est une méthode adaptée pour étudier la vitesse de diffusion de molécules au sein d'un échantillon (Axelrod et al. 1976) (Fig 1.7). Brièvement, après photoblanchiment (c'est-à-dire détruire la fluorescence d'un fluorophore de manière irréversible) d'une zone restreinte sur l'échantillon par un laser à pleine puissance, on observe deux zones distinctes : une zone non fluorescente dite « noire » et une zone fluorescente. Si les molécules sont capables de diffuser dans le milieu, on observe une réapparition de la fluorescence dans la zone « noire ». On suit au cours du temps cette réapparition de fluorescence, ce qui nous renseigne sur la vitesse de diffusion des molécules dans le milieu.

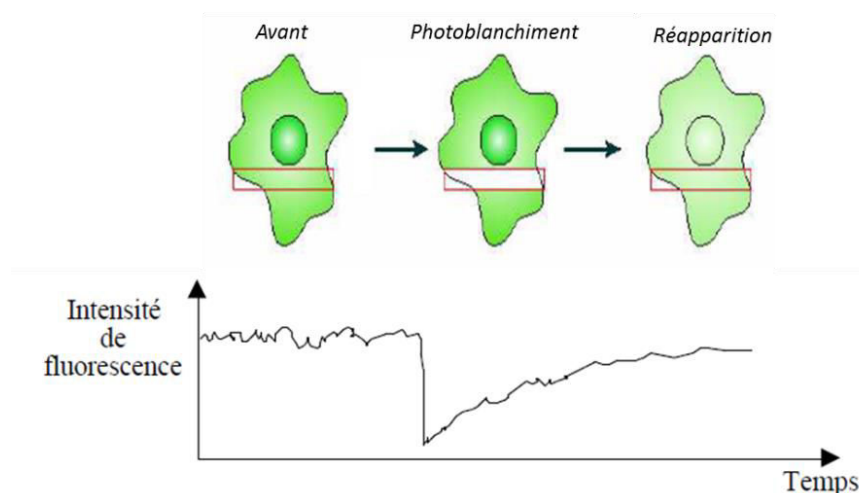


Fig 1.7 : Le FRAP. Cette technique permet de suivre la réapparition de fluorescence dans un volume où les fluorophores ont été détruits par photoblanchiment.

Cette technique permet de suivre la mobilité d'une molécule dans les membranes ou dans la cellule vivante, la proportion de molécules liées ou immobiles dans un compartiment cellulaire par exemple mais aussi de visualiser les échanges entre compartiments comme par exemple entre le noyau et le cytoplasme ou entre les cellules. Beaudouin en 2006 étudie la diffusion des protéines se liant à la chromatine (Beaudouin et al. 2006). Des études sur la dynamique des protéines composant le complexe du pore nucléaire ont été menées à l'aide de FRAP (Rabut et al. 2004). Mais aussi l'étude du transport vésiculaire aux synapses neuronales en marquant avec la GFP les synaptophysines (vésicule synaptique) et la diffusion de synapsine (protéines impliquées dans la régulation de neurotransmetteurs libérés par les synapses) marquée par la GFP dans des synapses de neurones hippocampaux (Orenbuch et al. 2012).

1.3.2.2. *Single Particle tracking (SPT)*

La technique de suivi de particules isolées (SPT pour Single Particle Tracking) a pour intérêt de suivre la dynamique moléculaire au sein d'un échantillon. Chaque molécule est marquée par un fluorochrome de petite taille, pas toxique pour la cellule. Il existe différents outils pour le marquage des molécules comme l'utilisation de quantum dots qui sont de petite taille, ils sont tous excitables à une longueur d'onde mais émettent de la fluorescence à différentes longueurs d'onde suivant leur grosseur (les petits quantum dots vont émettre

dans le bleu alors que les gros vont émettre de la fluorescence dans le rouge), l'utilisation de microsphère de latex ou de l'or colloïdal est aussi possible.

Cette technique a permis d'étudier la dynamique et l'organisation de la membrane cellulaire. Des études ont permis de montrer que la membrane cellulaire était très dynamique et qu'il y a des « compartiments » au sein de la membrane. En effet, des protéines et des lipides sont organisés en régions spécifiques de taille et de composition variées (Maxfield 2002; Kusumi et al. 2011; Nicolson 2013), les protéines et lipides qui ne sont pas structurés sont capables de former des agrégats (Singer & Nicolson 1972). Des radeaux lipidiques ont été étudiés avec la technique de SPT. Il a été montré que ces radeaux lipidiques sont très dynamiques et de courte durée. Les molécules les constituant peuvent-être recrutées transitoirement (de quelques ou plusieurs centaines de millisecondes) (Garcia-Parajo et al. 2014; Klotzsch & Schütz 2013). La technique de SPT à deux couleurs a été étendue pour l'étude de la diffusion corrélée entre deux espèces similaires ou différentes dans le but d'étudier la dynamique des interactions protéine-protéine à un niveau molécule unique. En effet la co-diffusion de molécules uniques permet la distinction de la co-localisation et l'interaction moléculaire. En effet le co-mouvement est une signature d'un lien (direct ou indirect) entre deux molécules. La durée de vie de ces interactions ou de ces complexes formés peut-être obtenu par la mesure des longueurs où les trajectoires des molécules uniques présentent une corrélation. En utilisant cette approche, l'interaction dynamique des récepteurs de la même espèce a pu être visualisée (Andrews et al. 2009; Low-Nam et al. 2011). Des études de processus intracellulaire ont été menées à l'aide de cette technique comme l'internalisation virale (Lakadamyali et al. 2003), les transports moléculaires, la dynamique de la chromatine et la régulation des gènes.

1.3.2.3. La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy) a été décrite par Elson et Magde (Elson & Magde 1974). Brièvement, cette technique permet d'observer l'amplitude et la fréquence des fluctuations d'intensité de fluorescence dans un petit volume (Fig 1.8). Ces fluctuations sont corrélées avec les mouvements des molécules dans ce volume (mouvements entrant et sortant) ce qui permet de mesurer la diffusion des molécules dans ce volume. De nouveaux développements ont

été récemment faits pour cette technique, pour avoir la capacité de mesurer les fluctuations d'intensité de fluorescence de deux fluorophores (Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy) (Schwille et al. 1997). Cette nouvelle technique donne la possibilité de mesurer la diffusion de deux couleurs mais aussi de mesurer les interactions entre deux molécules marquées par chaque couleur.

Plusieurs études ont suivi le rôle de différents lipides et des structures stéroïdes dans les vésicules géantes unilamellaires (Kahya & Schwille 2006). Toutes ces études sur la dynamique et la structure des membranes biologiques par FCS sont expliquées par Groves (Groves et al. 2008).

Le travail de Briddon (Briddon 2004) s'est concentré sur la liaison et la formation du complexe d'un agoniste fluorescent et synthétique du récepteur A(1)-adénosine. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

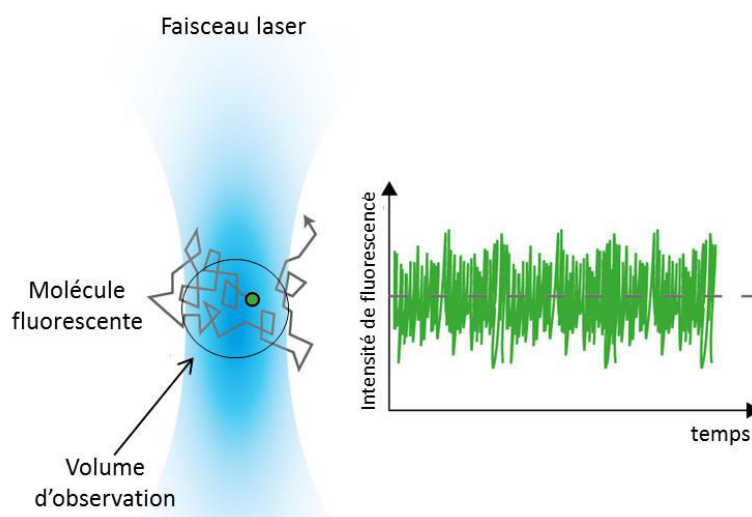


Fig 1.8 : La FCS. Cette technique consiste à observer l'amplitude et la fréquence des fluctuations des intensités de fluorescence au sein d'un volume confocal. Ces fluctuations renseignent sur le modèle de diffusion des molécules entrantes et sortantes au sein du volume

2. Méthodologies détaillées utilisées pour ce travail

Les techniques de microscopie de fluorescence quantitative utilisées pour mener à bien mon projet de thèse vont être décrites dans cette partie. Nous verrons en détail la FCS et ses dérivés, le transfert d'énergie de type Förster et les moyens de mesure de ce phénomène.

2.1. La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

La spectroscopie corrélée de fluorescence est une méthode basée sur l'observation d'évènements uniques de fluctuations d'intensité en mesurant l'intensité de plusieurs molécules. Cette technique a été développée au début des années 70. Des mesures des FCS peuvent être réalisées sur des molécules en solution. Le principe de la FCS est de corréler les fluctuations de fluorescence au cours du temps. Les fluctuations de fluorescence proviennent des mouvements des molécules fluorescentes, d'une couleur, c'est-à-dire leurs entrées et sorties dans un petit volume confocal (de l'ordre de 0,3 femtolitre). Ces fluctuations peuvent être quantifiées en faisant une autocorrélation temporelle de l'intensité de fluorescence mesurée (Fig 1.9). La courbe d'autocorrélation (ACF) obtenue est définie par :

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1$$

Avec $(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ et $\langle F(t) \rangle = \overline{F(t)}$, la moyenne de fluorescence et $\delta F(t)$ les fluctuations de fluorescence du signal $F(t)$.

La courbe d'autocorrélation permet de quantifier l'auto-similarité d'un signal après un décalage donné τ et reflète la probabilité qu'une molécule passant à travers le volume confocal en t y soit encore aux temps t et $t+\tau$. La probabilité qu'une même protéine fluorescente se trouve à l'instant t et $t+\tau$, dans le volume confocal est forte quand τ est petit et diminue quand τ augmente, en fonction de la mobilité de la protéine étudiée. (Ferrand et al. 2011; Haustein & Schwille 2007)

Les fluctuations de fluorescence deviennent petites lorsque le nombre de molécules augmente, il est donc important de minimiser le nombre de molécules dans le volume confocal. Le nombre de molécules dans le volume confocal doit être compris entre 0,1 et 500 ce qui correspond à des concentrations de l'ordre du nano- au micromolaire (Haustein & Schwille 2007). Pour analyser les données de FCS, j'utilise un modèle de diffusion libre 3D sur le logiciel SymPhoTime (PicoQuant). Dans le cas d'une espèce diffusant librement en 3D, l'ACF peut s'écrire :

$$G(\tau) = 1 + G_0 \times \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \times \left(1 + S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2}$$

Avec G_0 représentant l'amplitude de la courbe, τ_D est le temps de résidence des protéines dans le volume focal et S est un paramètre tenant en compte de la structure du volume focal, défini par $S = \omega_{xy}/\omega_z$ où ω_{xy} est le rayon transversal et ω_z est la mi-hauteur axiale du volume focal.

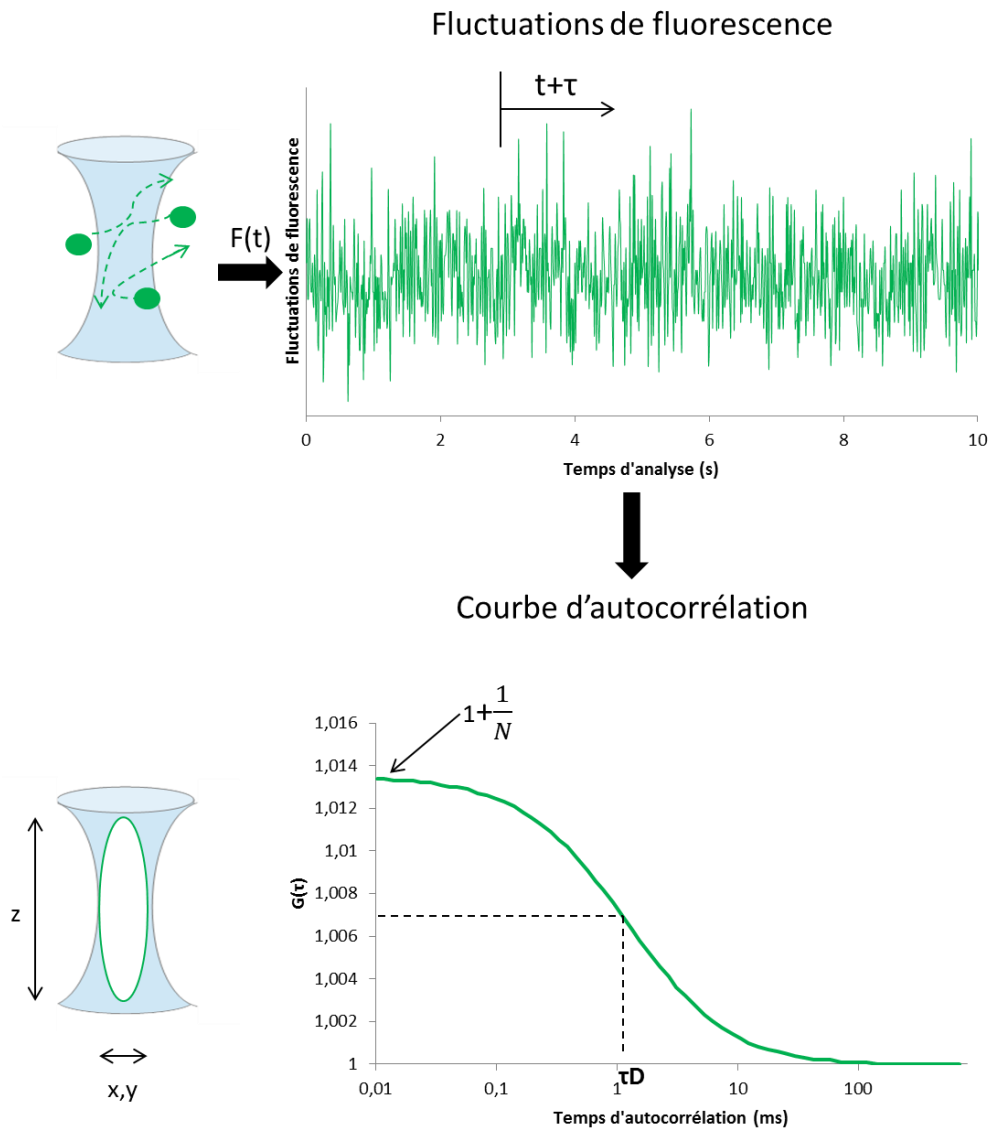


Fig 1.9 : Principe de la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS). Cette technique consiste à mesurer les fluctuations de fluorescences à l'intérieur d'un volume focal défini par les dimensions x , y et z . Les intensités de fluorescence $F(t)$ sont corrélées au temps $t+\tau$, ce qui permet d'obtenir une courbe d'autocorrélation $G(\tau)$. Le nombre de molécules passant dans le volume focal (N) et le temps de diffusion τ_D (correspondant au temps à la mi-hauteur de la courbe) peuvent être déterminés à l'aide de cette courbe d'autocorrélation lorsque la molécule diffuse librement.

L'avantage avec la mesure de FCS est la détermination de la concentration des molécules d'intérêt. L'amplitude de l'ACF est inversement proportionnelle au nombre moyen de molécules à l'intérieur du volume focal d'observation. Le nombre de molécules correspond à l'ordonnée à l'origine, ce qui représente la valeur de $G(\tau)$ lorsque τ tend vers 0 :

$$G(0) = 1 + \frac{1}{N} = 1 + \frac{1}{V_{eff} \cdot C}$$

Où C est la concentration des molécules ; V_{eff} représente le volume de détection ; N est le nombre de molécules.

La constante de diffusion ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) d'une molécule est obtenue à partir du temps de diffusion et est décrite par la relation suivante :

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D}$$

La taille et la forme du volume de détection, données par les valeurs ω_{xy} et ω_z sont liées à l'instrumentation et sont déterminées par calibration à l'aide de la Rhodamine-6G qui a une constante de diffusion connue. Dans le cas où le volume focal est approximé par une gaussienne à trois dimensions, le volume de détection est décrit par $V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$.

Je ne décris pas tous les modèles de diffusion que l'on peut appliquer lors des mesures de FCS car dans mon travail je ne les utiliserai pas. En effet, ce n'est pas le modèle de diffusion qui m'a intéressé pour notre travail mais l'amplitude des courbes de corrélation correspondant aux concentrations de molécules qui diffusent.

2.2. La spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS)

2.2.1. Principe

Une variante de la FCS est la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS). Cette technique consiste à utiliser des protéines fluorescentes séparées spectralement (deux couleurs) pour visualiser des interactions entre ces protéines. Si les protéines sont liées, elles co-diffusent dans le volume focal, on mesure alors les mêmes

fluctuations du signal fluorescent dans les deux canaux de détection. On obtient alors trois courbes : une courbe d'autocorrélation du premier canal (vert), une courbe d'autocorrélation du deuxième canal (rouge) et la courbe de corrélation croisée d'un canal vers l'autre (Fig 1.10). L'amplitude de la courbe de corrélation croisée augmente lorsque les fluctuations dans les deux canaux sont identiques (Bacia et al. 2006).

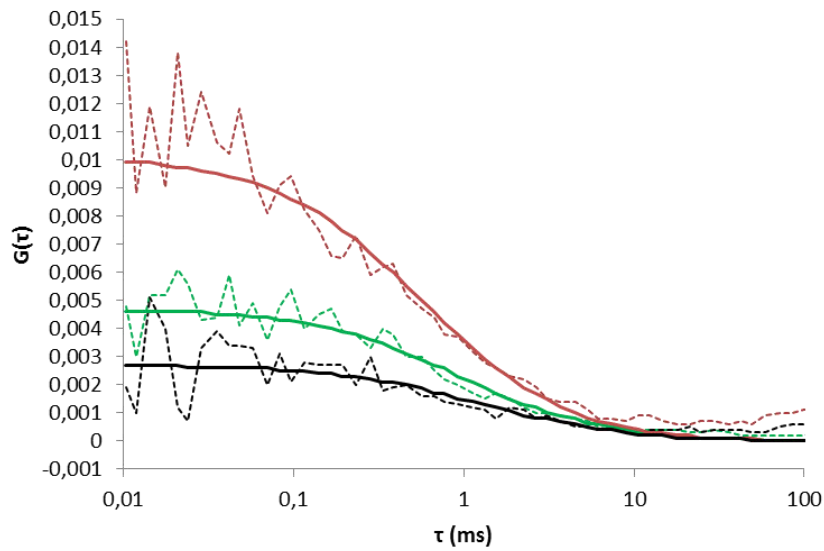


Fig 1.10 : Courbe d'autocorrélation et de corrélation croisée de fluorescence. Mesure de FCS deux couleurs sur des cellules exprimant la GFP et mCherry en tandem. En rouge et en vert, les courbes d'autocorrélation des protéines fluorescentes vertes et rouges. En noire, courbe de corrélation croisée des molécules vertes et rouges. Les protéines fluorescentes co-diffusent, un signal de corrélation croisée est mesuré.

L'amplitude relative du signal de corrélation croisée par rapport au signal d'une des autocorrélations est en lien avec les équations suivantes :

$$\frac{C_{RG}}{C_{G,t}} = \frac{G_{0,x}}{G_{0,r}} \quad et \quad \frac{C_{RG}}{C_{R,t}} = \frac{G_{0,x}}{G_{0,g}}$$

Où C_{RG} est la concentration de l'espèce doublement marquée ; $C_{G,t}$ et $C_{R,t}$ la concentration de la totalité des espèces « verte » et « rouge » ; $G_{0,x}$, $G_{0,g}$ et $G_{0,r}$ représentent l'amplitude respectivement de la corrélation croisée, de l'autocorrélation du canal vert et de l'autocorrélation du canal rouge. Ces relations sont vraies si les molécules sont marquées de manière uniforme, si la stoechiométrie de liaison est de l'ordre 1:1 et si les volumes de détection des deux canaux se superposent parfaitement (Bacia & Schwille 2007). La

technique de FCCS est très sensible, il faut donc utiliser des protéines fluorescentes spectralement distinctes pour éviter la récupération du signal d'un fluorophore dans le canal de détection du second et donc avoir un signal de corrélation croisée.

On sait qu'il y a très souvent détection d'un fluorophore (vert) dans le canal de détection du second fluorophore (rouge). Pour supprimer cet inconvénient, j'analyserai les courbes de corrélation croisée par la technique de spectroscopie à corrélation de temps de vie de fluorescence.

2.2.2. Analyse en FLCS

Cette analyse nécessite des paramètres d'acquisition de FCS deux couleurs spécifiques. Pour mes acquisitions j'utiliserai les protéines fluorescentes vertes (GFP) et rouges (mCherry). Un laser pulsé 470nm et un laser continu à 561nm seront utilisés pour exciter respectivement les protéines fluorescentes vertes et rouges. La combinaison du laser pulsé et continu permet de discriminer les photons venant de l'excitation des protéines fluorescentes vertes et détectées dans le canal rouge. L'utilisation d'un laser pulsé pour faire des acquisitions en FCS prend les avantages de la technique de comptage de photon unique corrélé dans le temps, pour différencier les temps de vie de fluorescence des protéines fluorescentes (Böhmer & Enderlein 2003). En effet, chaque photon est enregistré avec son temps global d'arrivée et le temps de retard par rapport à l'impulsion du laser. La méthode de FLCS s'appuie sur le calcul de filtres de durée de vie pour chaque espèce fluorescente ayant des signatures différentes de déclin de fluorescence dans les histogrammes de TCSPC. Chaque espèce fluorescente, ayant des propriétés différentes de temps de vie peut être séparée sur la base de sa signature de déclin de fluorescence. La technique de FLCS est déjà utilisée en spectroscopie pour supprimer la dispersion de la lumière et l'après pulse du détecteur (Kapusta et al. 2007), pour étudier la dynamique de transition entre deux états de durée de vie (Gregor & Enderlein 2007), pour aussi séparer les différentes durées de vie des espèces (Ray et al. 2008).

En utilisant deux lasers pour exciter les deux espèces fluorescentes spectralement différentes : un laser pulsé (470nm pour exciter les espèces vertes, GFP) et un laser continu (561nm pour exciter les espèces rouges, mCherry), l'analyse en FLCS des acquisitions en FCS deux couleurs permet d'enlever la fuite spectrale des espèces vertes dans le canal de

détection des espèces rouges. Les photons provenant des espèces vertes dans le canal rouge sont corrélés dans le temps avec le laser pulsé (Fig 1.11, haut) comparé aux photons provenant des espèces rouges qui n'ont pas la même signature de déclin de fluorescence (Fig 1.11, milieu). Quand les deux espèces sont excitées en simultanément, on retrouve dans le canal rouge les deux signaux de fluorescence c'est-à-dire le déclin de fluorescence de la fuite spectrale des espèces vertes dans le canal rouge et le signal de fluorescence continu venant des espèces rouges (Fig 1.11, bas).

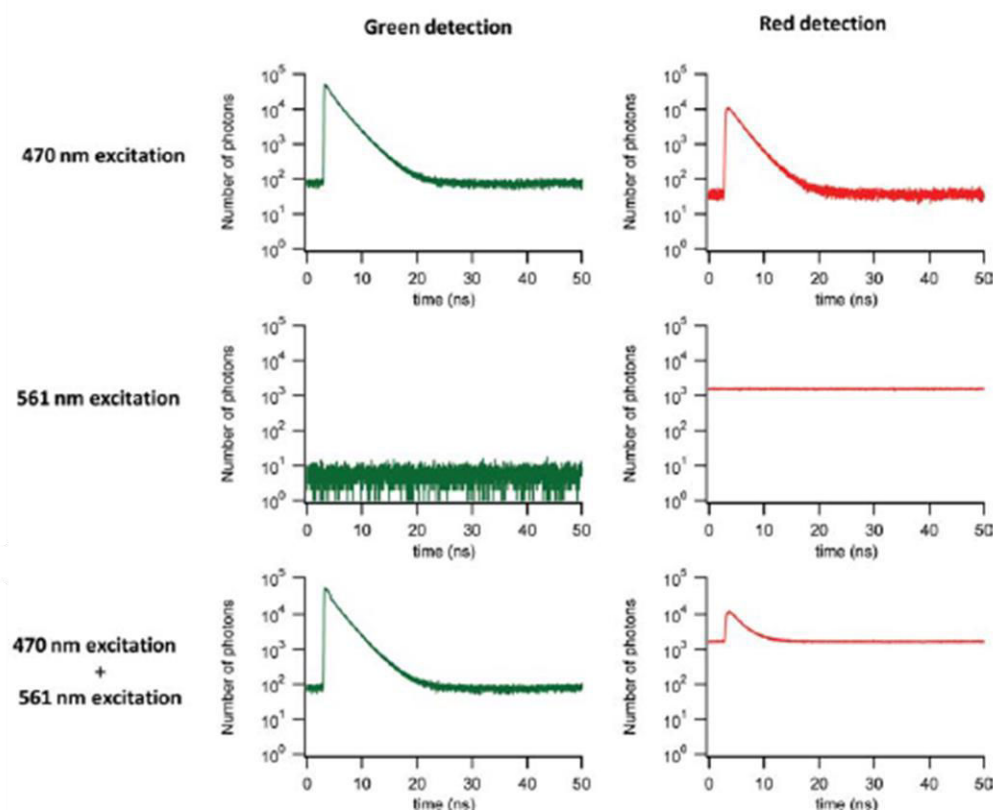


Fig 1.11 : Histogramme de fluorescence de la GFP et de la mCherry détecté dans le canal de détection vert (gauche) et rouge (droite) en utilisant le laser pulsé 470nm (haut), le laser continu 561nm (milieu) et les deux en même temps (bas). Récupération de photon venant de l'espèce verte dans le canal de détection rouge. (Adapté de Padilla-Parra, 2011)

La fonction des filtres de durée de vie est calculée pour séparer les deux composants qui forment le déclin de fluorescence dans le canal rouge. Pour chaque canal de temps, la valeur du filtre de durée de vie donne le poids statistique des photons comptés pour chaque espèce. La Figure 1.12 représente un filtre correspondant au déclin de fluorescence des espèces (en bleu) et celui correspondant au bruit de fond de la fluorescence (rose). Ces

différents filtres peuvent être sélectionnés pendant l'analyse de l'autocorrélation et la corrélation croisée. En utilisant le filtre de durée de vie du déclin de fluorescence pour le canal vert et le filtre de bruit de fond de fluorescence pour le canal rouge pendant l'analyse de la corrélation croisée, la fuite spectrale des espèces vertes dans le canal rouge sera éliminée. Cette technique pourra être utilisée pour quantifier l'interaction entre deux protéines taguées GFP et mCherry respectivement (Padilla-Parra et al. 2011).

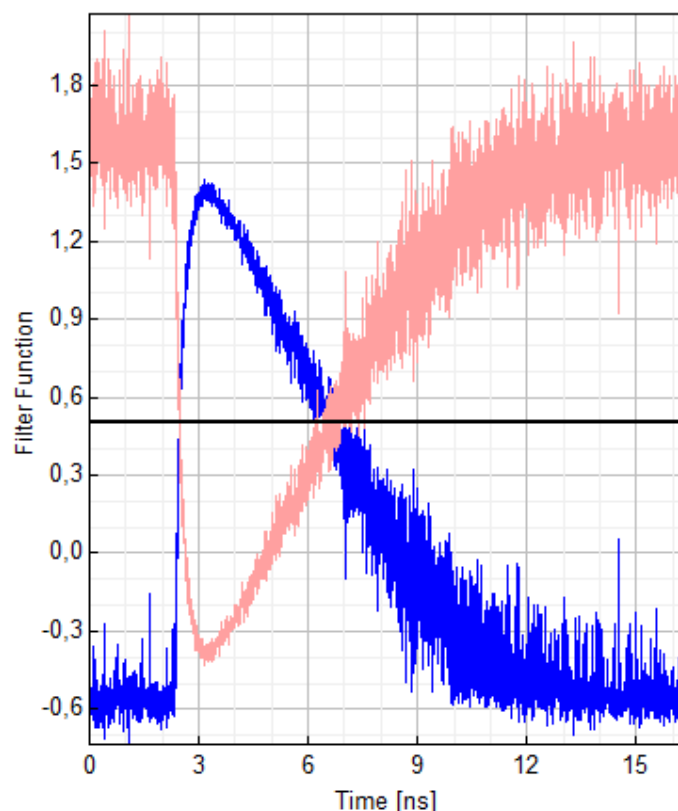


Fig 1.12 : Filtres de durée de vie du déclin de fluorescence (en bleu) et du bruit de fond de fluorescence (rose) calculés par le logiciel SymPhoTime (PicoQuant) obtenus pour le canal de détection rouge en utilisant le laser pulsé 470nm et le laser continu 561nm.

Pour valider cette approche, on compare des acquisitions en FCS deux couleurs sur des cellules exprimant GFP et mCherry librement et des cellules exprimant les deux protéines en tandem (c'est-à-dire que les deux protéines fluorescentes sont liées par un petit peptide) entraînant donc leur co-diffusion. Pour des cellules exprimant les deux protéines fluorescentes libres (Fig 1.13A), lorsque le calcul de la corrélation croisée est fait sans l'utilisation des filtres de durée de vie, on récupère une courbe de corrélation croisée avec une amplitude non nulle (courbe noire). Lorsque ce calcul se fait avec les filtres de

durée de vie, on retrouve alors une courbe de corrélation croisée avec une amplitude nulle correspondant à la situation de deux protéines fluorescentes diffusant librement l'une de l'autre (courbe bleue).

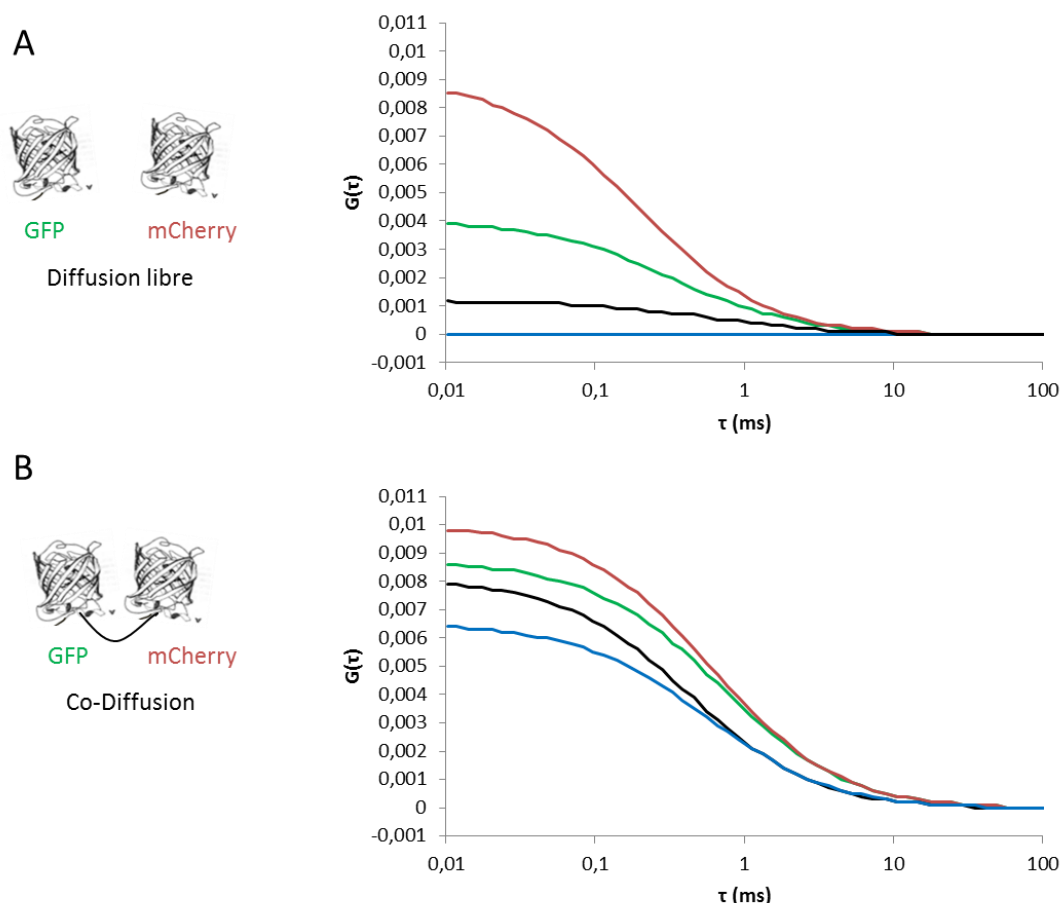


Fig 1.13 : FLCS deux couleurs dans les cellules exprimant GFP et mCherry libre ou en tandem. Courbes d'autocorrélation et de corrélation croisée analysées avec le modèle de diffusion pure. Autocorrélation verte (vert), autocorrélation rouge (rouge), corrélation croisée conventionnelle (noire) et corrélation croisée avec analyse à l'aide des filtres de durée de vie (bleue) pour les cellules exprimant GFP et mCherry libre (A) et en tandem (B). Les constructions ont été exprimées dans des cellules HeLa. Les mesures de FCCS ont été effectuées sur un microscope SP8 (Leica). Les résultats obtenus ont été utilisés dans le *Chapitre 2* partie 2.2 *Résultats*.

Pour les cellules exprimant les deux protéines fluorescentes sous forme d'un tandem (Fig 1.13B), lorsque le calcul de la corrélation croisée est fait sans l'utilisation des filtres de durée de vie on obtient une courbe avec une amplitude plus importante (courbe noire) que lorsque ce calcul est fait avec les filtres de durée de vie (courbe bleue). Cette différence

d'amplitude est due à l'élimination de la fuite spectrale des espèces vertes dans le canal de détection rouge.

Pour chaque analyse de FCS deux couleurs au cours de ma thèse, j'utiliserai cette technique de FLCS pour analyser la courbe de corrélation croisée.

2.3. Transfert d'énergie de type Förster (FRET)

Le FRET est un phénomène physique où l'énergie non radiative d'un fluorophore (donneur) dans un état excité est transmise au fluorophore voisin (accepteur) qui est dans un état fondamental. La mesure du FRET permet de suivre la formation de complexes protéiques et le changement de conformation protéique dans les tissus et cellules vivantes.

2.3.1. Principe général

Comme précédemment décrit, le processus de transfert d'énergie se passe sous trois conditions (Fig 1.14) : (i) le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'absorption de l'accepteur (A). (ii) Les dipôles de transition électronique du donneur et de l'accepteur doivent avoir une orientation appropriée (B). (iii) le donneur et l'accepteur doivent être à une distance de 10nm (C).

Le recouvrement spectral est décrit en termes de distance de Förster (R_0). La distance de Förster est la distance pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. Cette distance est généralement entre 20 et 60 Å. Le taux de transfert d'énergie $k_T(R)$ est donné par

$$k_T(R) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (1)$$

Où R correspond à la distance entre le donneur et l'accepteur et τ_D est la durée de vie du donneur en l'absence de transfert d'énergie. Le taux de transfert est égal à $1/\tau_D$ quand la distance entre le donneur et l'accepteur est égal à la distance de Förster et l'efficacité de transfert est de 50%.

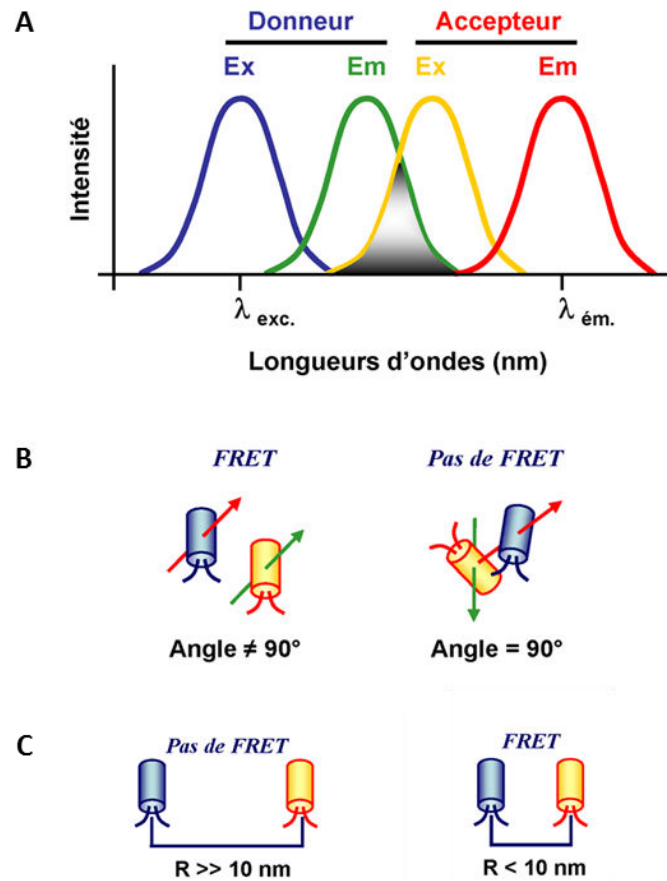


Fig 1.14 : Les conditions nécessaires pour le FRET : chevauchement du spectre d'absorption du donneur avec le spectre d'émission de l'accepteur (A) ; orientation appropriée des dipôles de transition électronique du donneur et de l'accepteur (B) ; une distance inférieure à 10nm doit séparer le donneur et l'accepteur pour qu'il y ait transfert d'énergie entre ces deux fluorophores (C).

Les distances de Förster sont comparables en taille par rapport aux macromolécules biologiques (30 à 60 Å), le FRET est un moyen de mesurer la distance entre le donneur et l'accepteur (Tramier et al. 2002). On note alors que plus le R_0 est grand plus la probabilité d'avoir du FRET entre les fluorophores est importante. R_0 dépend de plusieurs paramètres qui peuvent être reliés par l'équation suivante

$$R_0 = 0,211 \times [K^2 n^{-4} Q_D J]^{1/6}$$

Où K^2 est le facteur d'orientation du dipôle, fonction du moment de transition de l'émission du donneur et du moment de transition de l'absorption de l'accepteur et peut-être décrit par l'équation suivante $K = \cos \theta_T - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D$ où θ_T est l'angle entre les dipôles électroniques d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, θ_D et θ_A sont

respectivement les angles entre le vecteur normalisé reliant le donneur à l'accepteur et les dipôles électroniques d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. K^2 doit être compris entre 0 et 4.

Q_D est le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence de l'accepteur

n est l'indice de réfraction

J est l'intégrale de recouvrement spectral, ce qui représente le pourcentage de recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

J peut s'écrire $J = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$ où λ représente la longueur d'onde,

$F_D(\lambda)$ est le spectre d'émission du donneur et $\varepsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur à la longueur d'onde λ .

L'efficacité de transfert se définit comme le rendement quantique du transfert d'énergie. Le rendement quantique de transfert d'énergie est le nombre de molécules qui se désexcitent par transfert sur le nombre total de molécules excitées. On peut le noter

$$Q_T = \frac{k_T}{(k_r + k_{nr} + k_T)} \equiv E \quad (2)$$

Où Q_T est le rendement quantique de FRET et E est l'efficacité de FRET.

En combinant les équations 1 et 2, on peut écrire l'équation suivante pour décrire l'efficacité de transfert

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

On peut donc dire que l'efficacité du transfert d'énergie est déterminée par la distance entre le donneur et l'accepteur et le pourcentage de recouvrement spectral (Fig 1.15).

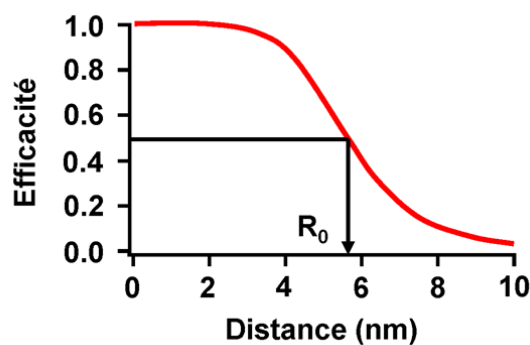


Fig 1.15 : L'efficacité de transfert est en relation par la distance entre le donneur et l'accepteur

Généralement, l'efficacité de transfert est mesurée en utilisant l'intensité relative de fluorescence du donneur en absence (F_D) et en présence (F_{DA}) de l'accepteur :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (4)$$

Elle peut aussi être calculée à l'aide des durées de vie du donneur en absence (τ_D) et en présence (τ_{DA}) de l'accepteur :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (5)$$

Les équations 4 et 5 ne sont applicables que pour un donneur et un accepteur séparés par une distance fixe.

Ce processus de transfert d'énergie peut se faire entre un donneur et un accepteur chimiquement différents, on parle d'hétéro-FRET. Ce transfert d'énergie peut aussi se faire entre deux espèces chimiquement identiques, on parle d'homo-FRET (Fig 1.16). On peut noter pour l'homo-FRET qu'il y a un plus léger recouvrement spectral entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission de l'espèce par rapport au recouvrement spectral pour l'hétéro-FRET. Par exemple, il peut y avoir transfert d'énergie entre deux EGFP. On utilise généralement ce principe d'homo-FRET pour des acquisitions d'anisotropie de fluorescence.

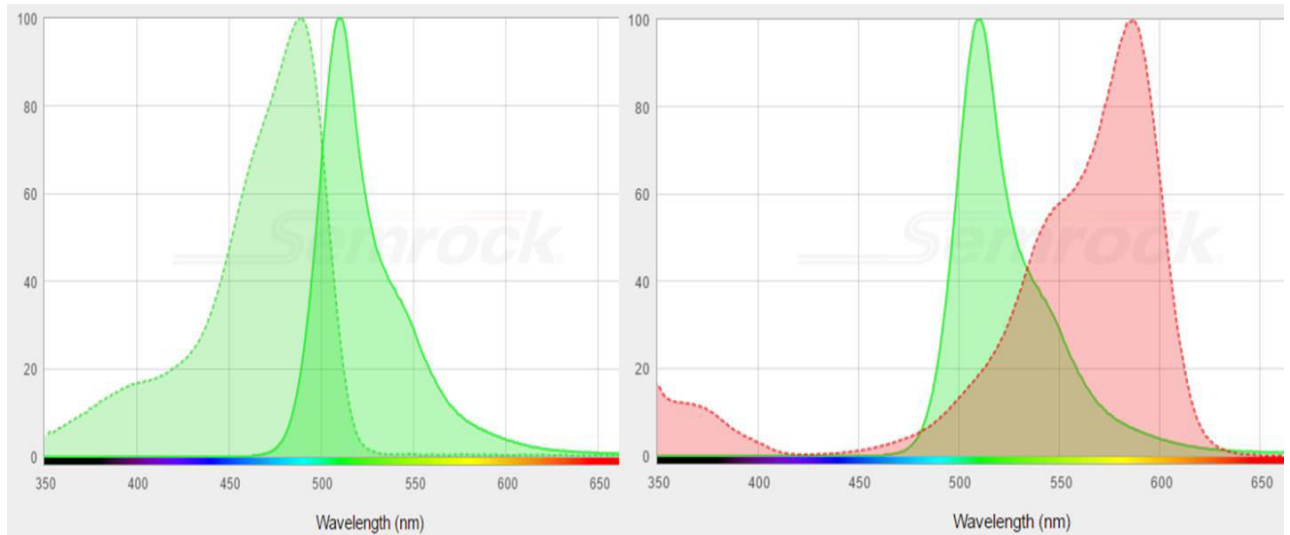


Fig 1.16 : homo et hétéro-FRET: A gauche, spectre d'absorption (pointillés) et d'émission (ligne pleine) d'EGFP, léger recouvrement spectral pour l'homo-FRET. À droite, recouvrement du spectre d'émission du donneur (EGFP, ligne verte) et du spectre d'excitation de l'accepteur (mCherry, pointillés rouges) plus important pour l'hétéro-FRET

Suivant la question biologique, il peut y avoir deux types de transfert d'énergie : le FRET intermoléculaire et le FRET intramoléculaire.

2.3.2. FRET intermoléculaire

Le FRET intermoléculaire permet de suivre généralement l'interaction protéine-protéine. Une protéine 1 va être marquée par un donneur et une protéine 2 va être marquée par un accepteur. Si les deux protéines interagissent entre elles, le donneur et l'accepteur seront à proximité, il pourra y avoir transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur (Fig 1.17).

À l'aide de cette technique, l'interaction entre deux mêmes protéines a été démontrée (Tavares et al. 2014), l'interaction entre un domaine de facteur de transcription et un histone (Padilla-Parra et al. 2008). L'interaction des protéines nucléaires dans les cellules a été mis en évidence suivant le FRET intermoléculaire (Louvet et al. 2008)

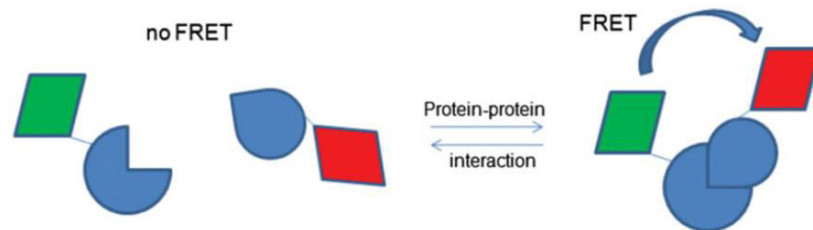


Fig 1.17 : FRET intermoléculaire : représentation de deux protéines diffusant indépendamment, une est marquée avec une protéine fluorescente verte (donneur) et l'autre est marquée avec une protéine fluorescente rouge (accepteur). Quand il y a interaction entre les deux protéines, la distance et l'orientation des protéines permettent le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur.

2.3.3. FRET intramoléculaire

Le FRET intramoléculaire permet de suivre le changement de conformation d'une protéine ou de suivre des activités biochimiques. Une protéine avec deux sous-unités va être marquée par un donneur et un accepteur. Lorsqu'il y a changement de conformation de la protéine ou une activité biochimique, le donneur et l'accepteur seront assez proches pour qu'il y ait transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur (Fig 1.18).

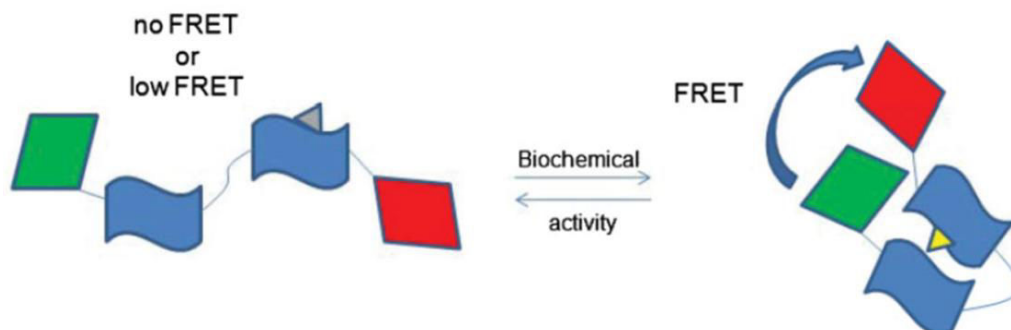


Fig 1.18 : FRET intramoléculaire : représentation d'une protéine avec deux sous-unités marquées par une protéine fluorescente verte (donneur) et une protéine fluorescente rouge (accepteur). Quand il y a changement de conformation, le donneur et l'accepteur sont proches et le transfert d'énergie entre eux peut s'effectuer.

Le FRET intramoléculaire permet le suivi de changement de conformation et de l'activité d'une protéine. Comme par exemple, le suivi de l'activité d'une kinase telle que ERK, PKA, etc, le suivi de la fusion du virus HIV au cours du temps (Jones et al. 2015) ou encore la tension au sein d'une protéine comme la vinculine (Grashoff et al. 2010).

2.4. Mesure du FRET

Le FRET induit des modifications de fluorescence émise. Il existe différentes techniques pour mesurer ces changements de fluorescence émise telles que le suivi du spectre d'émission de la fluorescence, la mesure de durée de vie du donneur, l'anisotropie de fluorescence, etc.

2.4.1. Mesure du FRET par intensité de fluorescence (Méthode Ratiométrique)

La mesure d'intensité de fluorescence est la technique la plus populaire pour la mesure du FRET. Cette technique consiste à mesurer la fluorescence émise par le donneur et l'accepteur après excitation du donneur. Il s'agit d'imager la fraction d'émission de fluorescence de l'accepteur induit par le transfert d'énergie non radiative du donneur, et de calculer le ratio d'intensité de fluorescence de l'accepteur sur l'intensité de fluorescence du donneur.

Après l'acquisition d'émission de la fluorescence du donneur et de l'accepteur, les données sont représentées par un ratio d'intensité de l'accepteur sur l'intensité du donneur. Lorsque FRET augmente, on a une diminution de fluorescence du donneur et une augmentation de fluorescence de l'accepteur (Fig 1.19).

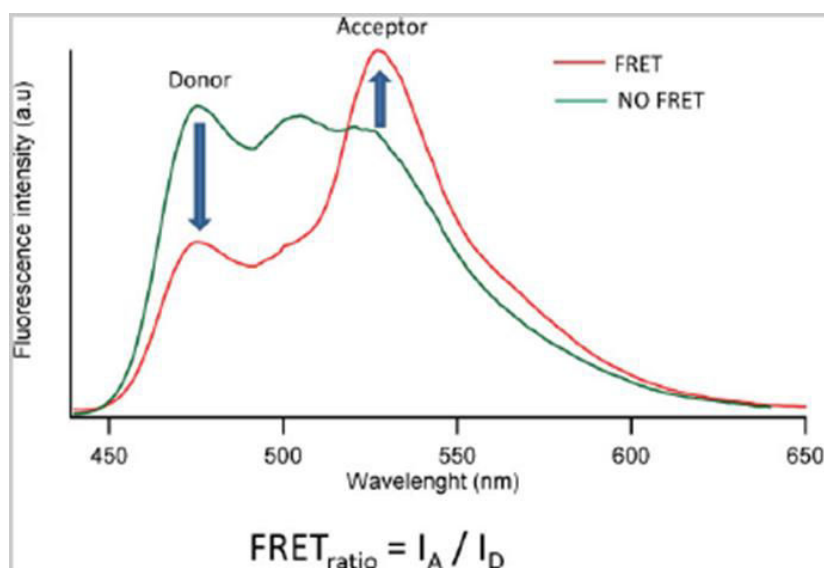


Fig 1.19 : Principe de mesure du FRET par intensité. Mise en évidence en absence de FRET (ligne verte), en présence de FRET (ligne rouge) (Padilla-Parra & Tramier 2012)

Cette technique rencontre deux artefacts : la fuite spectrale du donneur dans le canal de l'accepteur et l'excitation directe de l'accepteur en excitant le donneur (Fig 1.20).

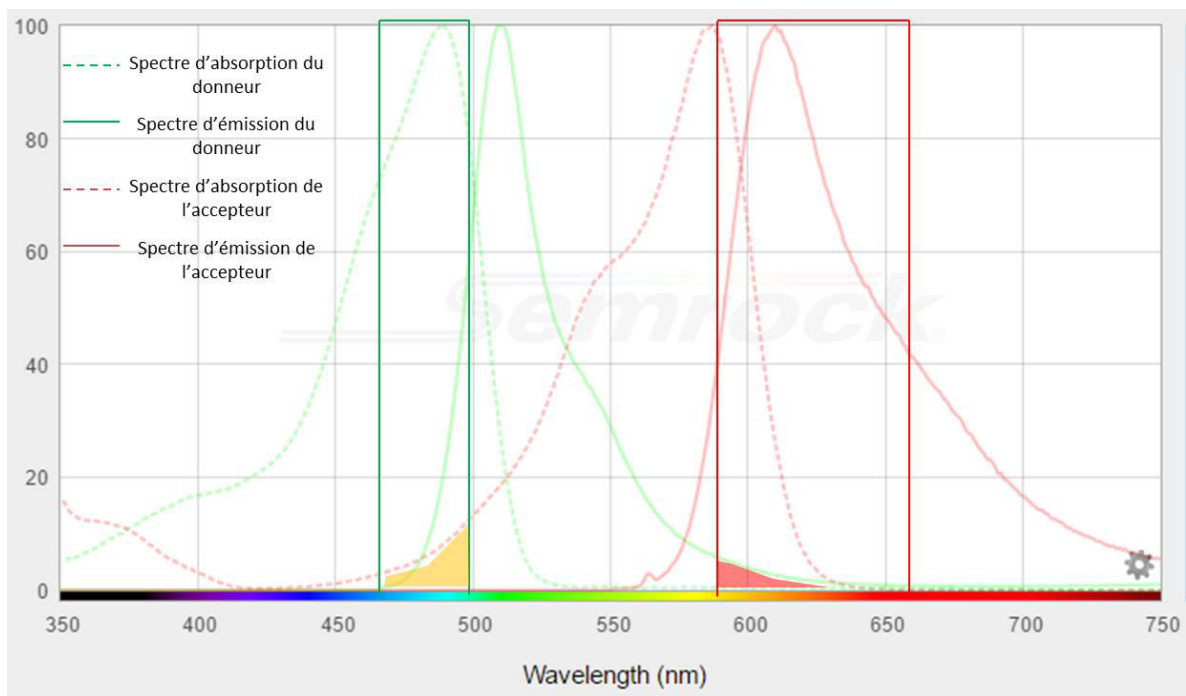


Fig 1.20 : Observation des artefacts liés à l'excitation directe de l'accepteur (zone orange) et la détection de l'émission de fluorescence du donneur (zone rouge) dans la mesure de FRET en intensité

Les problématiques citées au-dessus sont importantes quand on ne connaît pas les concentrations du donneur et de l'accepteur. Or lors du suivi de biosenseur FRET, les concentrations sont stœchiométriques. La mesure de FRET par mesure du ratio d'intensité de fluorescence est donc commune et très utilisée pour le suivi de biosenseur FRET (Fig 1.21). Il est possible avec cette technique de suivre l'activité PKA dans le noyau et le cytoplasme des neurones dans le cerveau de souris (Gervasi et al. 2007). Lors d'une stimulation à la forskoline, une augmentation du ratio d'intensité accepteur sur donneur est mesurée correspondant à une augmentation de l'activité de la protéine kinase PKA.

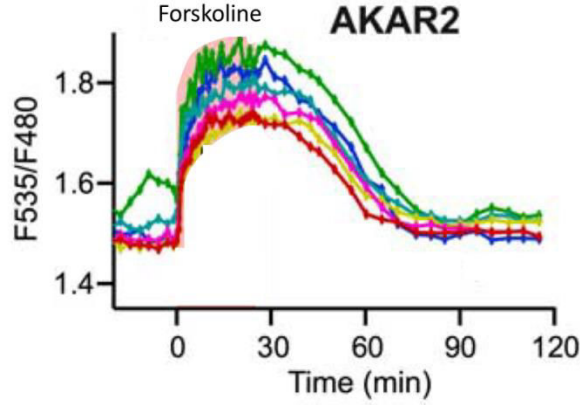


Fig 1.21 : Exemple de suivi de biosenseur FRET par ratiométrie. Suivi du biosenseur d'activité kinase PKA (AKAR2) par ratio d'intensité (jaune/bleu) dans les neurones. Chaque courbe représente le ratio d'intensité mesuré pour un neurone au cours du temps. Après stimulation à la forskoline, une augmentation du ratio (jaune/bleu) est mesurée correspondant à une augmentation du FRET (Adaptée de Gervasi et al. 2007)

Pour éliminer ces problèmes, il existe la méthode du 3-cube FRET (Padilla-Parra & Tramier 2012). Le principe consiste à acquérir des images de fluorescence suivant trois configurations spectrales (Fig 1.22) : l'émission du donneur seul après son excitation (cube donneur, D), l'émission de l'accepteur seul après son excitation directe (cube accepteur, A) et l'émission de l'accepteur après l'excitation du donneur (cube FRET, FRET). Les mesures concernant les 3-cube sont réalisées pour les expériences de FRET (F) et pour deux contrôles : le donneur seul (D) et l'accepteur seul (A). La fuite spectrale du donneur dans le canal de l'accepteur pendant les expériences de FRET (F^D_{FRET}) est calculée par

$$F^D_{FRET} = F_D \times \frac{D_{FRET}}{D_D}$$

Où F_D représente l'intensité des expériences de FRET dans le cube donneur, D_{FRET} et D_D représentent la correction de l'intensité de la même image du donneur dans le cube FRET et dans le cube donneur.

L'excitation directe de l'accepteur utilisant le cube FRET pendant les expériences de FRET (F^A_{FRET}) est calculée par

$$F^A_{FRET} = F_A \times \frac{A_{FRET}}{A_A}$$

Où F_A représente l'intensité des expériences de FRET dans le cube accepteur, A_{FRET} et A_A représentent la correction de l'intensité de la même image de l'accepteur dans le cube FRET et dans le cube accepteur.

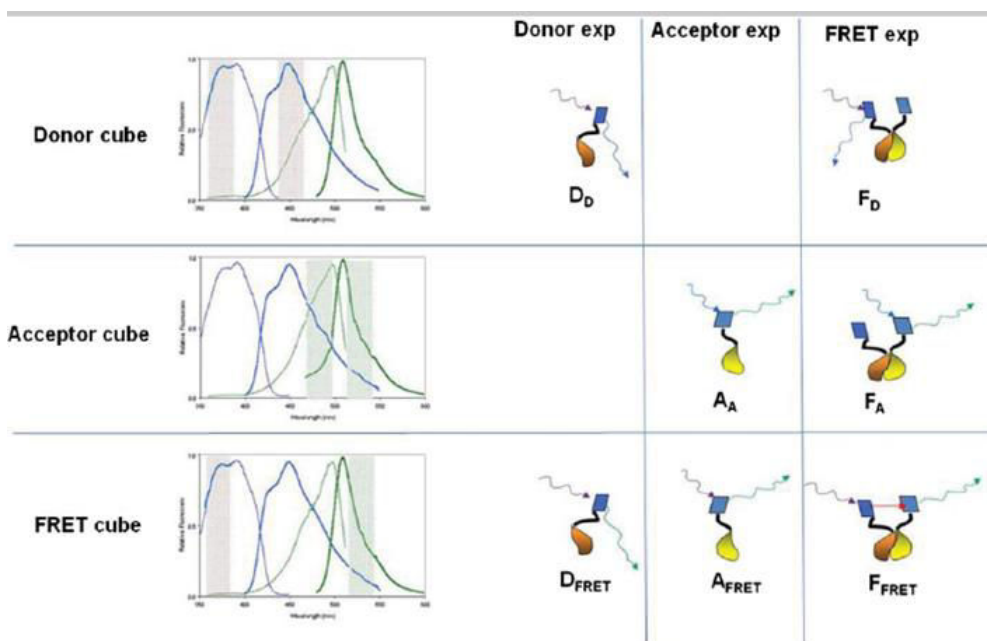


Fig 1.22 : Principe de la méthode 3-cube FRET : acquisition de l'émission du donneur seul après son excitation (cube donneur, D), l'émission de l'accepteur seul après son excitation directe (cube accepteur, A) et l'émission de l'accepteur après l'excitation du donneur (cube FRET, FRET)

Ces corrections sont soustraites de l'intensité mesurée dans le cube FRET pendant les expériences FRET (F_{FRET}) pour récupérer la réelle intensité de FRET (F_{FRET}^N)

$$F_{FRET}^N = F_{FRET} - F_{FRET}^D - F_{FRET}^A$$

La valeur de F_{FRET}^N correspond au signal corrigé venant du processus de FRET reçu dans le canal de l'accepteur après l'excitation direct du donneur.

La mesure du FRET par la méthode d'intensité est dépendante de la concentration du donneur et de l'accepteur dans l'échantillon. Cette technique est généralement semi-quantitative.

2.4.2. Mesure du FRET par la mesure de durée de vie de fluorescence : FLIM

2.4.2.1. Principe et avantage

La mesure de durée de vie du donneur est une autre technique pour mesurer le transfert d'énergie entre deux fluorophores. Cette technique est indépendante des concentrations du donneur et de l'accepteur et permet d'être quantitatif.

La durée de vie correspond au temps qu'une molécule reste excitée avant de retourner à son état fondamental. Pour un fluorophore plusieurs voies de désexcitation

existent comme le transfert d'énergie. On peut écrire la durée de vie d'un donneur seul telle que

$$\tau_{donneur} = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

En présence d'un accepteur, on pourra écrire la durée de vie de fluorescence du donneur

$$\tau_{donneur/accepteur} = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{FRET}}$$

Le transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur induit une diminution de la durée de vie de fluorescence du donneur. Si on prend un couple de fluorophore dont le donneur possède un déclin de fluorescence mono-exponentiel. Si en présence de l'accepteur, on mesure un déclin de fluorescence du donneur mono-exponentiel cela signifie qu'il n'y a pas de FRET entre les deux fluorophores. Le déclin d'intensité est donc donné par :

$$I(t) = \alpha e^{-t/\tau_D}$$

Où α est un facteur pré-exponentiel mais qui représente aussi la quantité de donneur et τ_D est la durée de vie de fluorescence du donneur seul.

À contrario, si l'on mesure un déclin de fluorescence du donneur bi-exponentiel cela signifie qu'il y a FRET entre les deux fluorophores. Le déclin de fluorescence bi-exponentiel représente le mélange des populations qui ont des durées de vie différentes (donneur seul (durée de vie longue) et au donneur en présence de l'accepteur (durée de vie courte)), et on pourra obtenir les proportions associées à chaque population (Fig 1.23).

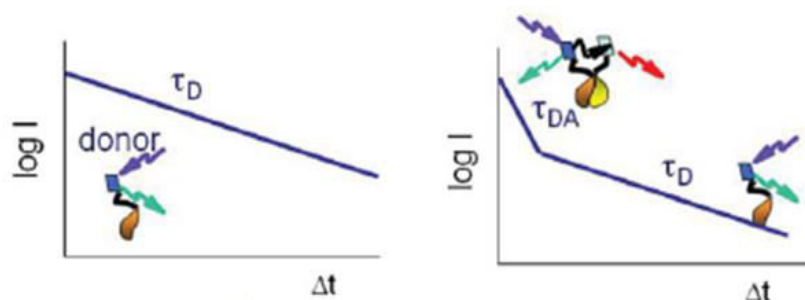


Fig 1.23: Représentation du déclin de fluorescence du donneur seul (à gauche) et du donneur en présence de l'accepteur (à droite). En présence de l'accepteur, le déclin de fluorescence du donneur est bi-exponentiel, représentant le mélange de durée de vie longue (donneur seul) et courte (donneur en présence de l'accepteur)

Le déclin d'intensité est décrit par la relation suivant :

$$I(t) = \alpha_D e^{-t/\tau_D} + \alpha_{DA} e^{-t/\tau_{DA}}$$

Où α_D est un facteur pré-exponentiel mais qui représente aussi la quantité de donneur, τ_D est la durée de vie de fluorescence du donneur seul, α_{DA} représente la quantité de donneur transférant leur énergie à l'accepteur et τ_{DA} est la durée de vie du donneur en présence de l'accepteur.

Dans ce cas, l'efficacité de transfert est donnée par :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Où τ_{DA} représente la durée de vie du donneur en présence de l'accepteur et τ_D celle du donneur seul.

On pourra calculer la proportion de donneur lié à l'accepteur par :

$$P_{DA} = \frac{\alpha_{DA}}{\alpha_{DA} + \alpha_D}$$

La mesure de durée de vie nécessite des instruments coûteux par rapport aux techniques de mesure de FRET par intensité. Suivant son environnement et les molécules l'entourant, le transfert ou non d'énergie, la durée de vie d'une molécule fluorescente pourra se modifier. Deux approches existent : la technique du déclin de fluorescence appelée aussi la mesure de durée de vie de fluorescence dans le domaine temporel et la technique de phase et modulation dans le domaine fréquentiel (Fig 1.24).

Pour le déclin de fluorescence, l'échantillon est excité par une impulsion lumineuse. Le déclin de fluorescence de l'échantillon correspond à la mesure du déclin des molécules excitées par l'impulsion lumineuse. On peut mesurer les différentes durées de vie de fluorescence de l'échantillon en modélisant ce déclin par des modèles exponentiels.

Pour la technique de phase et modulation, l'échantillon fluorescent est excité par une lumière d'intensité modulée. La fluorescence émise est modulée à la même fréquence mais avec un déphasage et une démodulation. Ce déphasage et cette démodulation sont caractéristiques de la durée de vie des molécules fluorescentes excitées. L'étude de ces paramètres permet de modéliser l'échantillon fluorescent par différentes durées de vie. Pour une fréquence excitatrice plus rapide que la durée de vie des molécules excitées, la

démodulation est maximum et le déphasage est presque nul. Pour une fréquence d'excitation plus lente que la durée de vie des molécules excitées, la démodulation est presque nulle et le déphasage est, par contre, typique du temps de résidence des molécules à l'état excité.

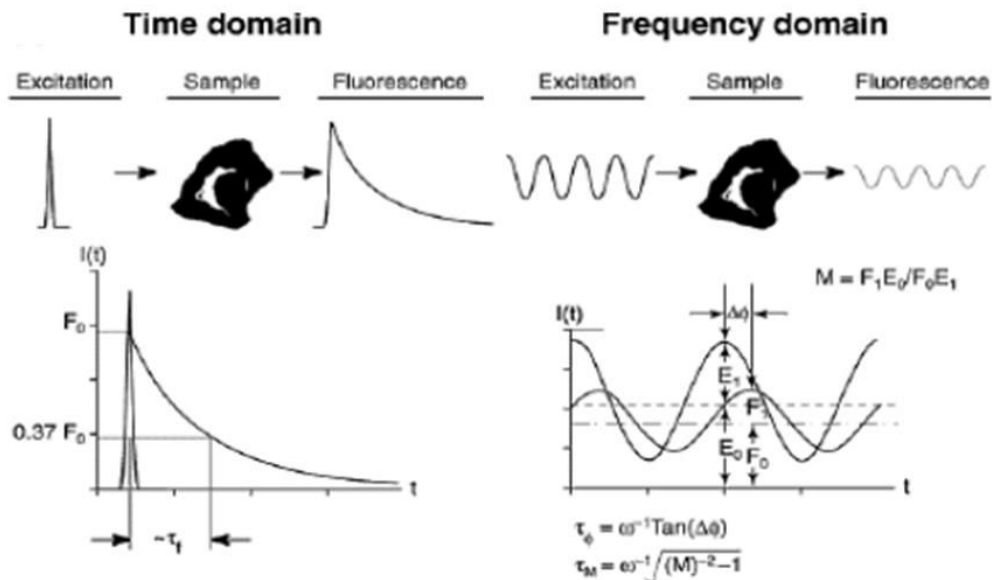


Fig 1.24 : Présentation des deux techniques de mesure de durée de vie de fluorescence : domaine temporel et domaine fréquentiel (d'après Bastiaens & Squire 1999)

2.4.2.2. Domaine temporel

Comme décrit précédemment, en domaine temporel, l'échantillon est excité avec un pulse laser. La largeur du pulse laser doit être la plus petite possible et avec un temps de décroissance τ plus court que celui de l'échantillon. L'intensité dépendant du temps est mesurée à la suite du pulse d'excitation. Le temps de décroissance τ est calculé à partir de la pente de la courbe de $\log I(t)$ versus t . L'espèce excitée aura un déclin de fluorescence suivant un modèle exponentiel. Dans le cas général, si l'échantillon est un mélange de fluorophore, l'intensité totale de fluorescence sera la somme des déclins exponentiels de chaque fluorophore.

$$I(t) = \sum_i a_i e^{(-\frac{t}{\tau_i})}$$

Où τ_i est le temps de vie de chaque espèce et a_i correspond au facteur pré-exponentiel qui représente aussi la quantité de fluorophore.

Deux principales techniques sont utilisées dans ce domaine : le comptage de photon unique corrélé dans le temps (Time Correlation Single Photon Counting : TCSPC) qui est le plus utilisé par la communauté scientifique et la mesure de durée de vie de fluorescence avec un intensificateur à déclenchement périodique (time gated flim) qui sera utilisée pour tous les travaux FRET by FLIM effectués au cours de cette thèse.

2.4.2.2.1. Déclin de fluorescence

Cette technique est basée sur la mesure du temps entre l'excitation avec le pulse laser et le premier photon détecté au niveau des détecteurs. En répétant cette mesure, il est possible de construire un histogramme du nombre de photons détectés en fonction du temps (Fig 1.25). Cet histogramme obtenu représente le déclin de fluorescence des molécules excitées au sein de l'échantillon. En analysant ce déclin de fluorescence avec un modèle exponentiel, il est possible de calculer la durée de vie des fluorophores dans l'échantillon.

Cette technique a plusieurs avantages comme (i) une bonne résolution temporelle de l'ordre de la picoseconde (qui dépend de la fonction de réponse instrumentale du détecteur) ; (ii) une mesure de durée de vie de fluorescence précise ; (iii) un bon rapport signal sur bruit ; (iv) les mesures de durée de vie de fluorescence sont reproductibles.

Le temps d'acquisition est une limitation de cette technique. En effet, pour avoir un signal suffisant et un ajustement fiable, il faut une acquisition de plusieurs minutes. Malgré cette limitation, cette technique reste fortement utilisée pour effectuer des mesures de durée de vie de fluorescence avec un microscope confocal (Becker 2005) ou multiphoton (Bugiel et al. 1989).

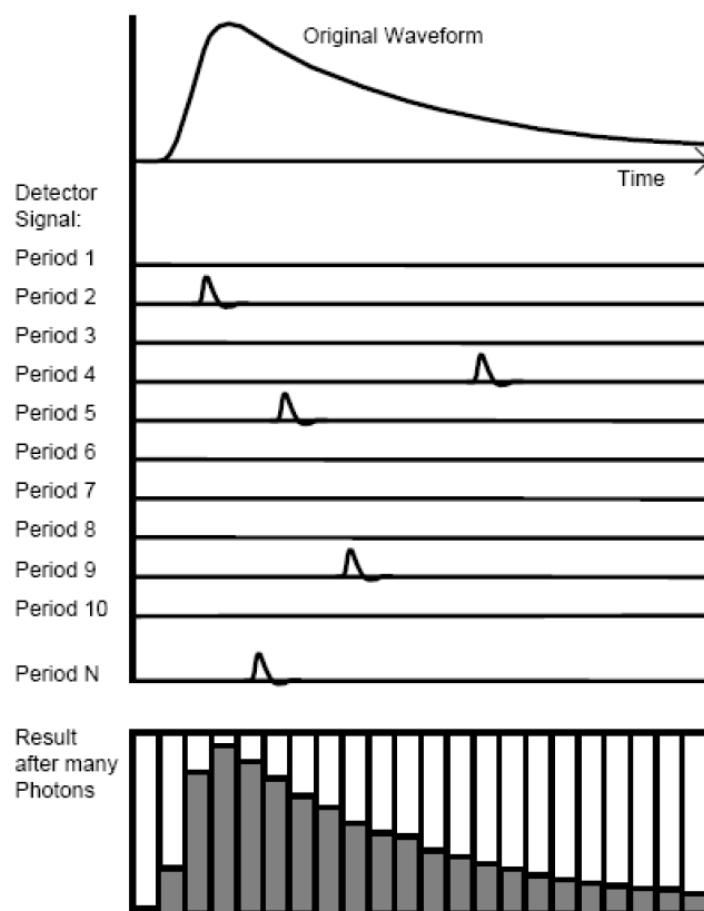


Fig 1.25 : principe de la méthode de comptage de photon unique corrélé dans le temps. En haut sont représentés le déclin de fluorescence obtenu au cours du temps, puis les dix premières impulsions et les photons détectés. En bas est représenté l'histogramme de la distribution des photons au cours du temps

2.4.2.2.2. Mesure de durée de vie de fluorescence avec un intensificateur à déclenchement périodique

La mesure de durée de vie de fluorescence par déclenchement périodique est une alternative dans le domaine temporel en utilisant un intensificateur. L'échantillon est excité avec un laser pulsé à très courte impulsion. Le déclin de fluorescence va être échantillonné en acquérant des images à différents instants après l'impulsion laser (Fig 1.26).

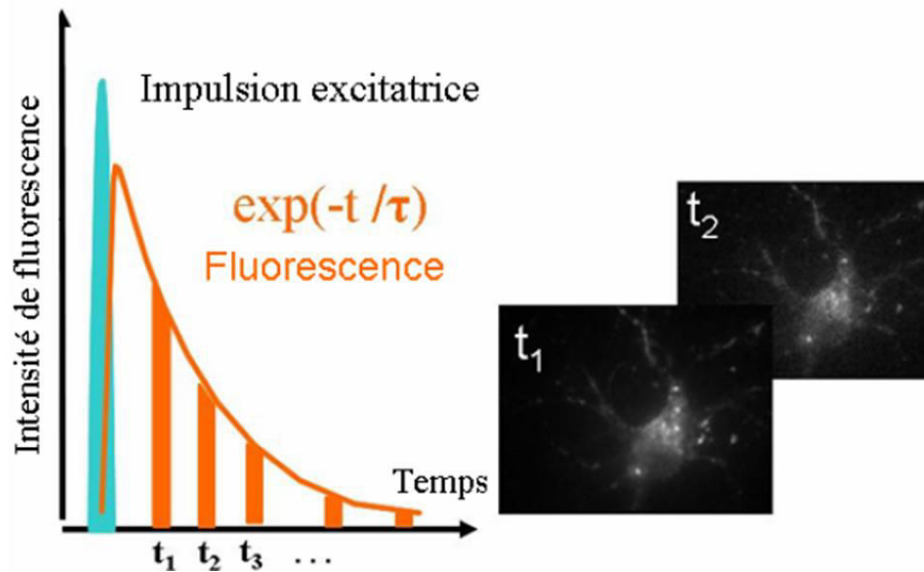


Fig 1.26 : Principe du FLIM dans le domaine temporel avec un déclenchement contrôlé. Pour une première impulsion, un délai t_1 est appliqué entre le pulse laser et l'acquisition ; puis pour un second pulse un délai t_2 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition (Webb et al. 2002)

L'intensificateur à déclenchement périodique ou HRI (High Rate Imager) permet l'amplification d'un signal fluorescent émis à un instant t après une référence temporelle avec un temps d'intégration très court. L'intensificateur est composé d'une photocathode qui convertit les photons en électrons à l'entrée puis d'un espace sous vide avec deux galettes à canaux qui vont amplifier le signal et en sortie un écran phosphore où l'image amplifiée est formée (Fig 1.27).

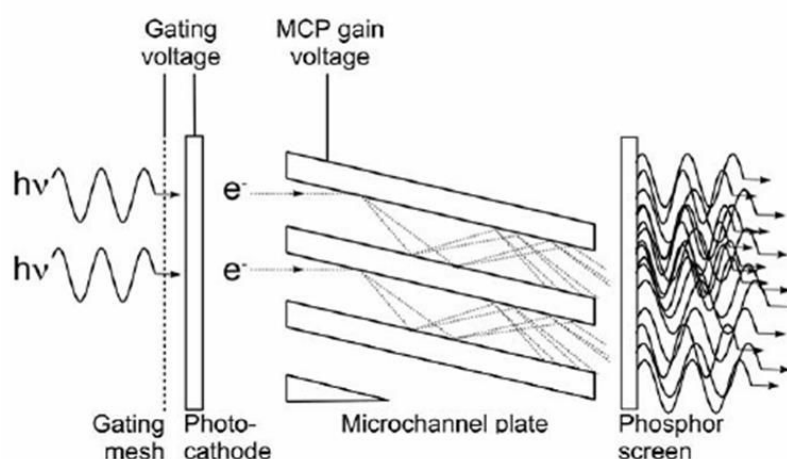


Fig 1.27 : Principe de fonctionnement d'un intensificateur à déclenchement périodique. Les photons sont convertis en électrons par la photocathode, le signal sera amplifié à l'aide de deux galettes à canaux et enfin l'image sera formée sur un écran phosphore.

L'application d'une tension sur un temps très court sur la photocathode permet la formation des portes temporelles ultra-rapides (deux cents picosecondes à quelques nanosecondes). L'utilisation d'un intensificateur diminue la résolution spatiale. Généralement, l'acquisition d'une image de l'écran phosphore et l'enregistrement de l'image amplifiée se fait à l'aide d'une caméra CCD.

Le détecteur opère uniquement aux temps choisis et pendant la durée de la largeur des portes temporelles. On peut donc choisir le nombre de portes temporelles, leur largeur en fonction du signal de fluorescence. La vitesse d'acquisition avec cette technique est rapide car les acquisitions sont faites en parallèle sur tous les pixels. Cette technique nécessite un signal de fluorescence très intense. Le suivi du flux calcique dans les myocytes de rat a été effectué avec cette technique de FLIM à déclenchement périodique avec une cadence de 100Hz (Agronskaia et al. 2003).

Pour mon travail, j'utiliserai le prototype fastFLIM développé au sein de l'équipe. Ce système mesure la durée de vie de fluorescence avec un intensificateur à déclenchement périodique (Leray et al. 2013).

Nous allons maintenant voir en détail la mesure de durée de vie avec la technique de phase et modulation.

2.4.2.3. Domaine fréquentiel

La technique de mesure de durée de vie en phase et modulation requiert une source lumineuse modulée et un détecteur modulé. La lumière d'excitation est modulée ou pulsée à une certaine fréquence. L'émission de fluorescence, induite par cette source d'excitation, aura un retard dans le temps sous la forme d'un déphasage ϕ par rapport à l'excitation (Fig 1.28). Ce retard dans le temps est dû à la décroissance de fluorescence.

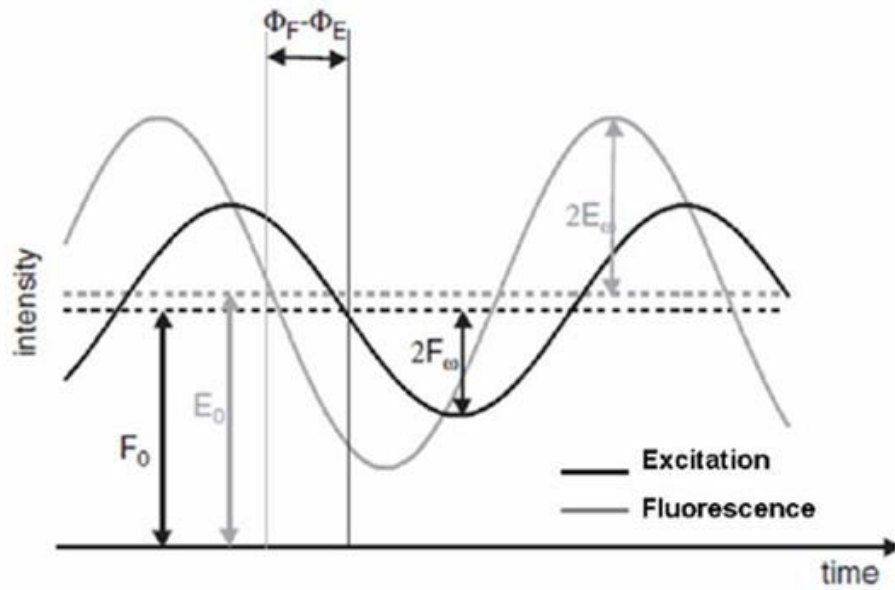


Fig 1.28 : Profils de l'excitation (ligne noire) et de l'émission (ligne grise) de fluorescence au cours du temps obtenus dans le domaine fréquentiel. E_0 et F_0 sont les amplitudes de l'offset d'excitation et du signal de fluorescence. E_ω et F_ω sont la moitié des amplitudes de modulation. Le déphasage entre les deux signaux est obtenu par $(\phi_F - \phi_E)$ (Cubeddu et al. 2002)

Une autre caractéristique de la mesure de durée de vie par phase et modulation est la diminution de la profondeur de modulation par rapport à la lumière d'excitation. Cette différence de modulation est aussi appelée degré de modulation M . Le déphasage et la profondeur de modulation dépendent directement de la durée de vie de fluorescence. Ce degré de modulation pour l'émission est donné par la relation F_ω/F_0 alors que le degré de modulation pour l'excitation est donné par la relation E_ω/E_0 (Fig 1.28). Pour extraire les constantes de temps du système, on mesure la variation du degré de modulation et le retard de phase entre l'excitation et l'émission.

On peut écrire la lumière excitatrice sous la forme :

$$E(t) = E_0 + 2E_\omega \cos(\omega t + \phi^E)$$

Où E_0 est l'offset du signal, E_ω correspond à la moitié de l'amplitude de la modulation et ϕ^E représente une constante de phase. En considérant un signal de fluorescence avec un déclin mono-exponentiel, la réponse du système à une excitation de type $E(t)$, oscillant à une pulsation $\omega = 2\pi f$ sera donnée par l'expression :

$$F(t, r) = F_0 + 2F_\omega(r) \cos(\omega t + \phi^F(r))$$

Où r est la position du pixel choisi, $F_{\omega}(r)$ correspond à la moitié de l'amplitude de la modulation et $\phi^F(r)$ représente une constante de phase.

Il a été montré que pour un cas où le déclin de fluorescence est mono-exponentiel avec une durée de vie de fluorescence $\tau(r)$, le déphasage entre l'excitation et l'émission de fluorescence est relié par la durée de vie de fluorescence et peut-être décrit par la relation suivante (Schneider & Clegg 1997) :

$$\phi(r) = \tan^{-1}(\omega\tau(r))$$

On peut décrire le degré de modulation de l'émission de fluorescence par :

$$m(r) = \frac{F_{\omega}(r)/F_0(r)}{E_{\omega}/E_0}$$

Ce facteur peut-être aussi relié à la durée de vie de fluorescence par la relation suivante :

$$m(r) = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau(r))^2}}$$

Dans le cas d'un déclin de fluorescence mono-exponentiel, la durée de vie de fluorescence associée à chaque pixel de l'image peut être déduite par la mesure du déphasage $\phi(r)$ ou du degré de modulation $m(r)$.

Pour tout le travail de suivi de biosenseur FRET par FLIM effectué au cours de ma thèse, j'ai utilisé les techniques de mesure de durée de vie de fluorescence dans le domaine temporel.

Chapitre 2 Résultats

1. Suivi d'activités biochimiques par FRET : Multiplex FRET par FLIM

1.1. Introduction

1.1.1. Difficulté de suivre deux biosenseurs en simultané

Quel que soit la méthode utilisée pour le suivi d'activité à l'aide de biosenseur, il est difficile d'observer deux activités biochimiques dans un échantillon vivant. Deux limitations majeures se présentent : (i) du fait que les protéines fluorescentes ont des propriétés physiques propres à chacune et qu'il faut 2 paires de protéines fluorescentes pour suivre deux biosenseurs FRET, il faut donc au moins deux longueurs d'onde d'excitation et (ii) les protéines fluorescentes ont des spectres d'excitation et d'émission très proches, des fuites spectrales dans les canaux d'acquisition sont donc observées

En effet, quel que soit la technique de mesure du FRET (mesure de durée de vie du donneur ou mesure d'intensité de fluorescence) et des protéines fluorescentes utilisées pour suivre les activités biochimiques, le problème général rencontré est la fuite spectrale d'émission de fluorescence (Shaner et al. 2005). Par exemple, si l'on décide de suivre deux paires de protéines fluorescentes : mTFP1/YFP et EGFP/mCherry (Fig 2.1) et que le FRET est mesuré par ratio d'intensité, on récupérera l'émission de fluorescence du bleu dans le canal jaune mais aussi dans le vert et un peu dans le rouge. Cette remarque est vraie pour chaque protéine fluorescente, c'est-à-dire que l'émission de fluorescence de la molécule jaune sera détectée dans le canal bleu, vert et rouge, etc. Si on mesure le FRET par mesure de durée de vie de fluorescence des donneurs (ici mTFP1 et EGFP), les photons provenant de l'émission de fluorescence des molécules bleues seront détectés dans le canal vert, la durée de vie mesurée dans ce dernier sera donc erronée.

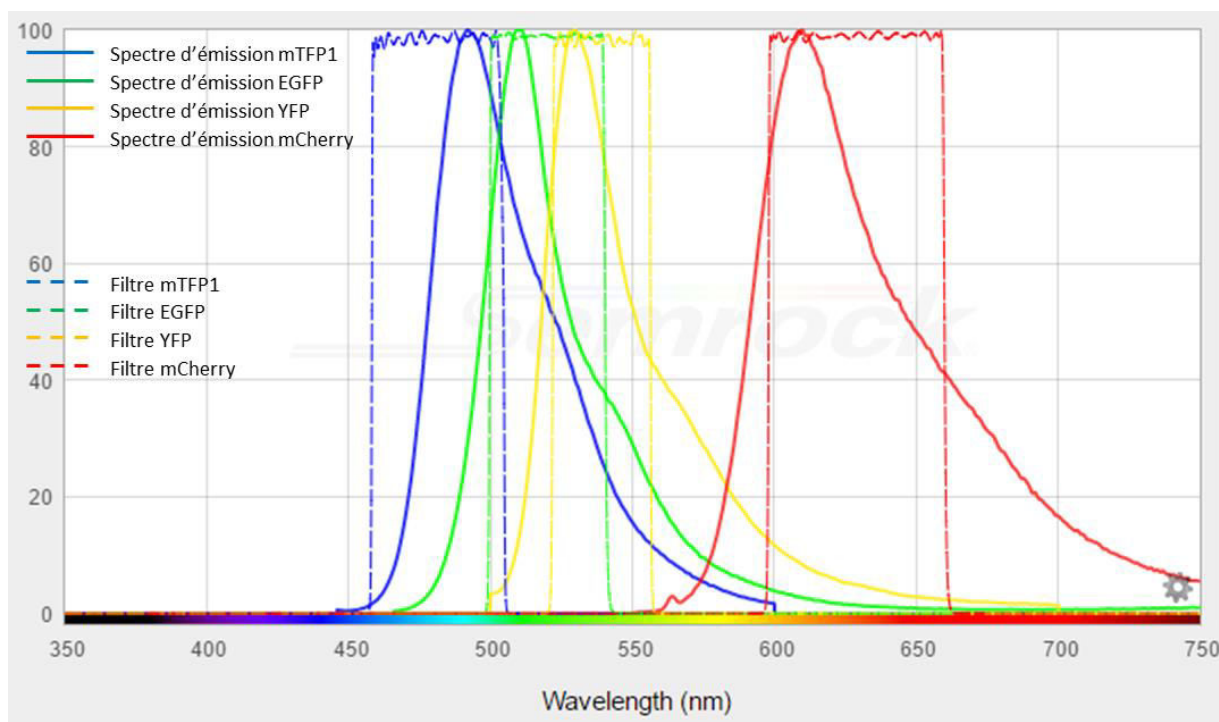


Fig 2.1 : Spectres d'émissions de fluorescence des deux paires FRET de protéines fluorescentes mTFP1/YFP, EGFP/mCherry. Fuite spectrale de chaque molécule fluorescente dans chaque canal de détection lorsque deux paires de protéines fluorescentes sont utilisées.

Malgré ces deux limitations majeures, des méthodologies ont été développées pour le suivi de deux activités biochimiques. Elles ont toutes développées des moyens de corrections des artefacts provoqués par ces limitations.

1.1.2. Méthodologies déjà développées

1.1.3.1. *Ratiométrie*

La plupart des méthodologies développées pour le suivi d'activités biochimiques en simultanée choisissent de mesurer le FRET par mesures d'intensité d'émission de fluorescence. En 2008, Piljic et Schultz choisissent de suivre l'activité des ions calcium à l'aide d'un biosenseur de la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante (CaMKII) et de la protéine Annexine A4 calcium-dépendante. Les biosenseurs CaMKII et Annexine4 sont marqués par les protéines fluorescentes CFP/YFP et mOrange/mCherry respectivement (Piljic & Schultz 2008). Les deux biosenseurs sont excités par deux longueurs d'onde différentes 405nm et 561nm. Une autre étude a suivi l'activité AMPc et des ions calcium simultanément dans les myocytes cardiaques (Niino et al. 2009). Les deux biosenseurs

utilisés sont marqués par les protéines fluorescentes CFP/YFP et Sapphire/RFP respectivement. L'émission de fluorescence des protéines fluorescentes est récupérée sur 4 détecteurs. Pour ces deux études, le problème de fuite spectrale est rencontré, et une correction doit être appliquée.

Certaines méthodologies ne rencontrent pas ce problème car l'expression des biosenseurs se fait dans deux compartiments différents. L'activité caspase a été suivie dans le cytoplasme et dans le noyau à l'aide de deux biosenseurs de l'activité caspase-3. Ces biosenseurs sont marqués avec deux paires de protéines fluorescentes différentes mAmetrine/tdTomato (orange/rouge) et mCitrine/mTFP1 (jaune/bleu) (Ai et al. 2008). Ces biosenseurs sont composés d'un substrat, d'un effecteur caspase entouré de deux protéines fluorescentes soit mAmetrine/tdTomato soit mCitrine/mTFP1. Un des biosenseurs est localisé au noyau, l'autre y est exclu. À l'aide des deux paires de protéines fluorescentes utilisées pour l'étude précédente, l'activité calcique a été suivie au cours du temps. Les deux biosenseurs calciques ont été localisés dans deux compartiments différents : l'un est localisé dans le noyau et l'autre est exclu du noyau (Ding et al. 2011). La combinaison de deux couples de protéines fluorescentes mTagBFP/sfGFP et mVenus/mKok permet de négliger la fuite spectrale, une correction après acquisition n'est donc pas nécessaire. Pour suivre ces deux couples de protéines fluorescentes, deux longueurs d'excitation sont utilisées de 405nm pour mTagBFP et 514nm pour mVenus. La protéine fluorescente sfGFP est une super-folder GFP est plus photo-stable et brillante que la GFP et la protéine fluorescente mKok émet une fluorescence dans le orange et a une maturation rapide (Su et al. 2013).

En 2012, une approche intéressante a été développée pour le suivi en simultané de biosenseurs (Shcherbakova et al. 2012). Cette méthodologie se base sur l'utilisation d'une protéine fluorescente orange qui a la propriété d'absorber la lumière dans le bleu et d'émettre une fluorescence dans le orange. Cette protéine fluorescente est nommée LSSmOrange. Les auteurs ont utilisé les couples CFP/YFP et LSSmOrange/mKate2 sur des biosenseurs permettant de suivre l'activité apoptotique et les fluctuations de calcium simultanément par mesure de FRET par ratio d'intensité.

1.1.3.2. Linear unmixing of 3D excitation/emission fingerprints

Une méthode élégante basée sur une séparation linéaire des empreintes spectrales d'excitation/émission 3D a été développée par Woehler (Woehler 2013). Cette méthodologie permet de suivre en simultanée trois biosenseurs. Cette approche basée sur le calcul d'image est souvent limitée par le niveau d'expression des différents biosenseurs et le faible ratio signal sur bruit après l'application des corrections d'images.

1.1.3.3. Couplage mesure ratiométrique et FLIM

Une troisième méthode pour le suivi de deux biosenseurs FRET consiste à utiliser les deux techniques permettant de mesurer le FRET c'est-à-dire en mesurant le FRET par mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM) et par mesure de ratio d'intensité. Pour rappel, quand le FRET se produit, la durée de vie du donneur diminue et la mesure est indépendante de l'émission de l'accepteur. La combinaison de la mesure de durée de vie de fluorescence du donneur du couple TagRFP/mPlum et la mesure du ratio d'intensité du couple CFP/YFP permet d'optimiser la séparation spectrale mais aussi de surmonter le faible rendement quantique de la protéine fluorescente rouge lointaine mPlum (Grant et al. 2008).

Avec la méthode de mesure de durée de vie de fluorescence seule, il est possible de suivre deux activités biochimiques en simultanée. En utilisant les protéines fluorescentes CFP et YFP en tant que donneurs et un accepteur rouge identique (tHcRed), la mesure de durée de vie de fluorescence des donneurs (CFP et YFP) permet de distinguer les deux signaux FRET (Peyker et al. 2005).

1.2. Méthodologie de suivi d'activité avec deux couleurs FLIM et une longueur d'onde d'excitation

Malgré toutes les méthodologies développées au cours des années, aucune n'a permis de supprimer les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de plusieurs protéines fluorescentes. Au cours de ma thèse j'ai pu développer une nouvelle méthodologie pour le suivi de deux activités biochimiques en simultanée par mesure de FRET par FLIM en utilisant une longueur d'onde d'excitation et en minimisant la fuite spectrale. Pour ça, nous avons utilisé les deux couples de protéines fluorescentes mTFP1/sREACH et LSSmOrange/mKate2. Nous avons pris avantage du décalage de spectre de la protéine fluorescente LSSmOrange pour n'utiliser qu'une seule longueur d'onde d'excitation à 440nm. En effet, le pic du

spectre d'absorption de LSSmOrange est à 437nm avec un maximum d'émission à 572nm. Cette protéine fluorescente a un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique respectivement de 52000 M⁻¹.cm⁻¹ et de 0.45 (tableau 1). Elle a une brillance de 23.4. Pour accepteur, nous avons pris la protéine fluorescente mKate2 qui a un pic d'absorption à 588nm avec un pic d'émission de fluorescence à 633nm. mKate2 a un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique respectivement de 62500 M⁻¹.cm⁻¹ et de 0.40 (tableau 1). Elle a une brillance de 25. mTFP1 a un pic d'absorption à 462nm avec un pic d'émission de fluorescence à 492nm. Le deuxième couple de protéines fluorescentes utilisées pour cette méthodologie est mTFP1/sREACH. mTFP1 a un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique respectivement de 64000 M⁻¹.cm⁻¹ et de 0.85 (tableau 1). Elle a une brillance de 54.4. sREACH a un pic d'absorption à 517nm avec un pic d'émission de fluorescence à 531nm. sREACH a un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique respectivement de 115000 M⁻¹.cm⁻¹ et de 0.07 (tableau 1). Elle a une brillance de 19.

Protéines fluorescentes	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Coefficient d'extinction molaire (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Rendement quantique ϕ	Brillance
LSSmOrange	437	572	52000	0.45	23.4
mKate2	588	633	62500	0.40	25
mTFP1	462	492	64000	0.85	54.4
sREACH	517	531	115000	0.07	19

Tableau 1 : tableau décrivant le pic d'absorption, d'émission, le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique et la brillance des protéines fluorescentes LSSmOrange, mKate2, mTFP1 et sREACH.

En observant les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence pour chaque couple de protéines fluorescentes (Fig 2.2), il est montré que le spectre d'émission du donneur (soit LSSmOrange (A) soit mTFP1 (B)) recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur (soit mKate2 (A) soit sREACH (B)). Ces couples de protéines fluorescentes répondent à une des conditions permettant le transfert d'énergie entre deux protéines fluorescentes, on pourra donc mesurer un transfert d'énergie entre LSSmOrange et mKate2 et mTFP1 et sREACH.

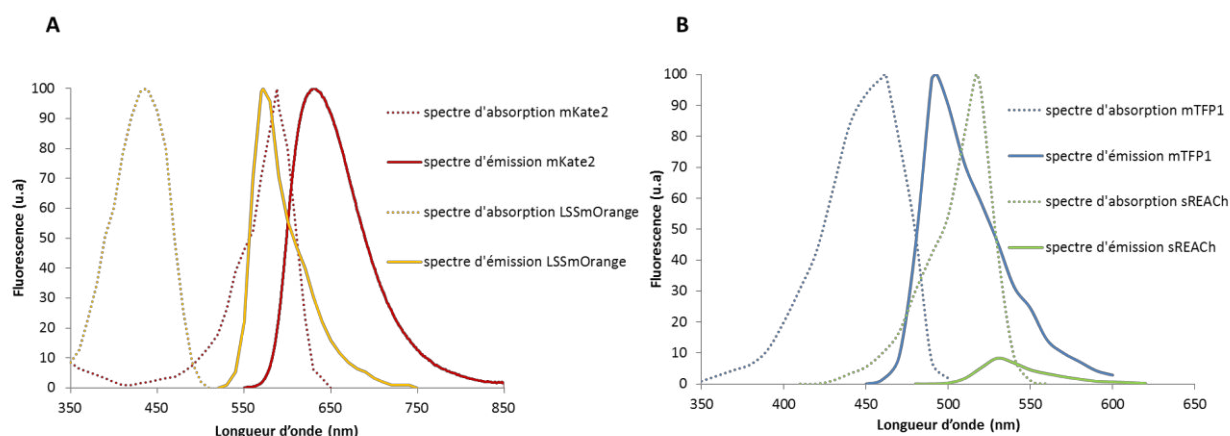


Fig 2.2 : recouvrement spectral des protéines fluorescentes LSSmOrange/mKate2 et mTFP1/sREACH.

(A) Recouvrement entre le spectre d'émission de LSSmOrange (trait plein orange) et le spectre d'absorption de mKate2 (pointillés rouge). (B) Recouvrement entre le spectre d'émission de mTFP1 (trait plein bleu) et le spectre d'absorption de sREACH (pointillés vert)

L'avantage principal de notre méthodologie est de mesurer en simultanément la durée de vie de fluorescence des deux donneurs mTFP1 et LSSmOrange. sREACH est un accepteur « noir » (Ganesan et al. 2006) c'est-à-dire qu'elle est cent fois moins fluorescente que la protéine fluorescente YFP.

Pour valider notre approche, nous avons choisi de suivre en simultanément l'activité enzymatique de la kinase ERK et PKA. Ces activités ont été suivies à l'aide des biosenseurs EKAR2G (Fritz et al. 2013) et AKAR4 (Depry et al. 2011) modifiés avec nos couples mTFP1/sREACH et LSSmOrange/mKate2.

1.2.1. Suivi d'activité PKA et ERK

À l'aide de la combinaison des deux couples de protéines fluorescentes mTFP1/sREACH et LSSmOrange/Kate2, nous allons pouvoir suivre en simultanément les voies ERK et PKA. L'interaction entre les voies de signalisation ERK 1/2 (Extracellular Regulated Kinase 1/2) et des Protéines Kinases A (PKA) est bien établie et décrite (Gerits et al. 2008).

1.2.1.1. Introduction générale sur PKA

La protéine kinase A est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, le métabolisme, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. La modulation de l'activité PKA se fait à l'aide de modulateurs connus comprenant des facteurs activant ou inhibant l'adénylate cyclase. Cette modulation provoque une augmentation ou diminution

du niveau d'AMPc (Adenosine 3',5'-monophosphate Cyclique) et donc une modulation de l'activité PKA. L'AMPc est un activateur majeur de PKA (Fig 2.3). PKA est constituée de quatre sous-unités : deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. Cette enzyme est classée en deux types en fonction des sous-unités régulatrices associées (RI ou RII). PKA de type I est prédominante dans le cytoplasme alors que le type II est associé aux structures cellulaires et organelles. Le type II est ancré à des emplacements spécifiques dans la cellule par des protéines spécifiques appelées AKAPs (A Kinase-Anchoring Proteins). Ces protéines gardent les enzymes PKA localisées et limitent les cibles qui peuvent être phosphorylées (Trewheella 2006). Les enzymes PKA ancrées permettent de moduler de diverses protéines cellulaires, en effet une fois PKA activée celle-ci va pouvoir venir phosphoryler ses cibles.

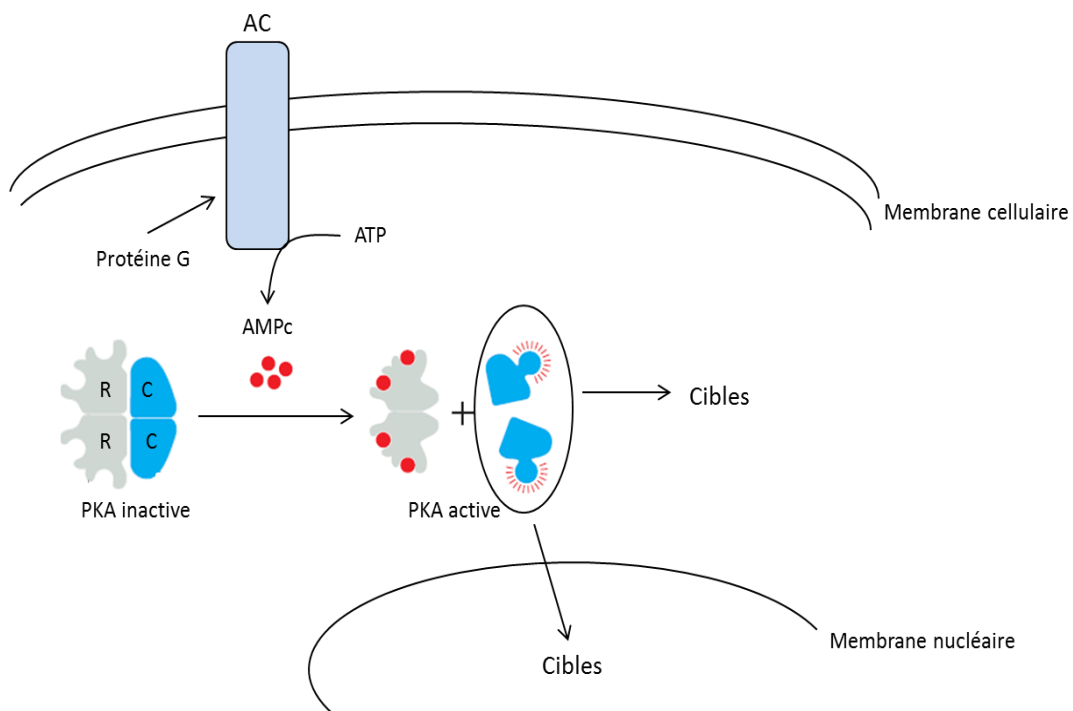


Fig 2.3 : Schéma simplifié de la voie de signalisation PKA. L'adényle cyclase (AC) va être activée par une protéine G. Une fois son activation produite, elle va transformer l'ATP en AMPcyclique. Cette dernière va se fixer sur les sous-unités régulatrices R de PKA. Cette fixation va induire l'activation de PKA et donc un détachement des sous-unités catalytiques qui vont pouvoir phosphoryler leurs cibles.

1.2.1.2. Introduction générale sur ERK

La voie de signalisation ERK est une composante de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Ces MAPK sont un ensemble de protéines nécessaire à l'induction de la mitose. Mais ces MAPK régulent aussi des processus cellulaires tels que la prolifération, la survie/l'apoptose, la différenciation cellulaire, le développement, l'adhérence, la mobilité, le métabolisme et la régulation des gènes. La cascade des MAPK se compose de trois types de kinase : MAPK kinase kinase (MKKK), MAPK kinase (MKK) et MAPK. ERK fait partie de la dernière catégorie.

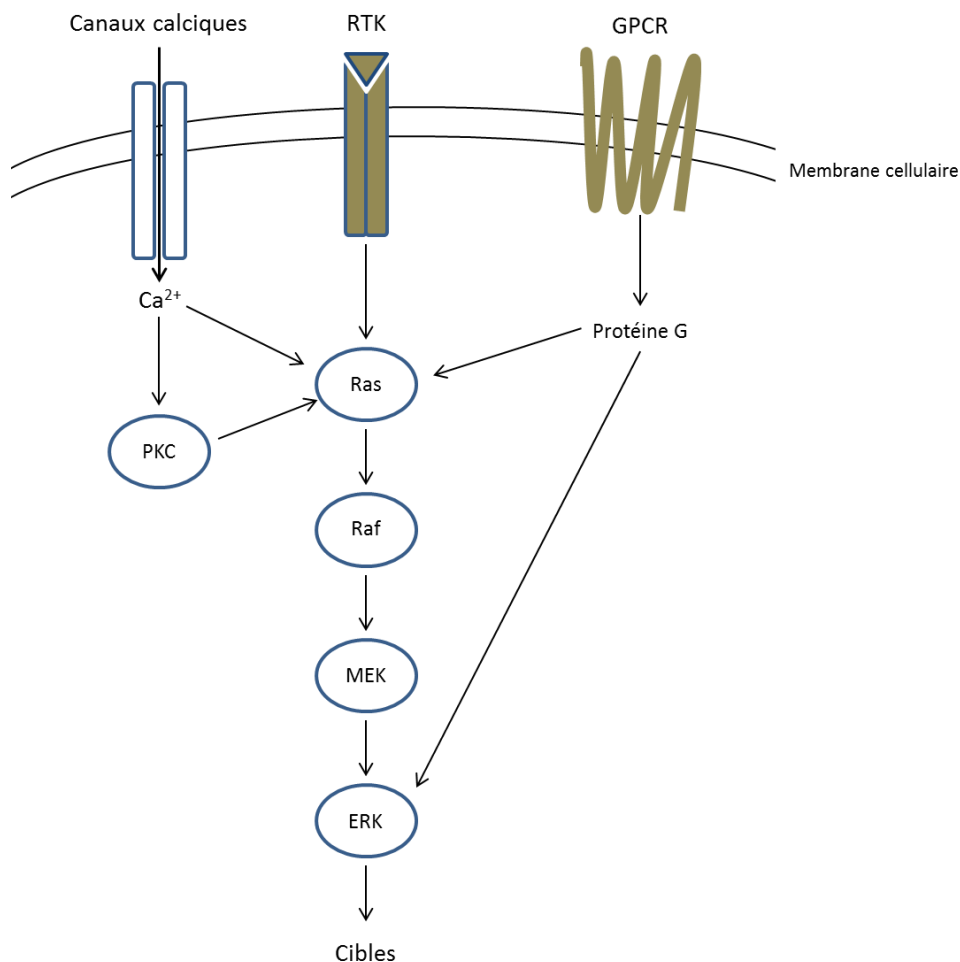


Fig 2.4 : Schéma simplifié de la voie ERK. La voie ERK peut être activée par différents moyens comme : l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui permet l'activation de ERK par l'intermédiaire ou non des Ras ; les récepteurs tyrosine kinase qui activent Ras déclenchant une cascade jusqu'à l'activation de ERK ; les ions calcium peuvent par différents moyens activer ERK par l'intermédiaire des Ras et enfin PKC régule la voie ERK par différents mécanismes.

L'activation de ERK peut se faire suivant quatre voies (Fig 2.4): 1) par la stimulation des récepteurs tyrosine kinase qui va provoquer l'activation des Ras (Eisinger & Ammer 2008). 2) les ions calcium stimulent l'activation des Ras par de nombreux mécanismes (Cullen & Lockyer 2002). 3) La protéine kinase C (PKC) régule l'activité des isozymes ERK par différents mécanismes, cette régulation est spécifique à chaque type cellulaire (Gao et al. 2010). 4) L'activation des récepteurs couplés aux protéines G permet l'activation de la voie ERK. Cette activation peut être dépendante et indépendante de la voie Ras (English & Sweatt 1997).

1.2.1.3. Biosenseurs utilisés pour suivre ces activités kinases

Les biosenseurs permettant de suivre l'activité PKA et ERK ont été développés et optimisés au cours des années.

La première génération du biosenseur reportant l'activité PKA s'appelle AKAR1 (A-Kinase Activity Reporter). AKAR1 est constitué de quatre protéines chimériques : la protéine fluorescente bleue CFP, un site de reconnaissance d'un substrat phosphorylé, une séquence peptidique phosphorylable spécifiquement par PKA et enfin de la protéine fluorescente jaune YFP (Zhang et al. 2001). La première génération de biosenseur AKAR1 a été améliorée avec le changement des protéines fluorescentes, du peptide substrat et du module de reconnaissance au sein du biosenseur (Zhang et al. 2005). Cette nouvelle génération appelée AKAR2, a été marquée par les protéines fluorescentes ECFP et Citrine, le module de reconnaissance présent dans sur AKAR1 (la protéine 14-3-3) a été remplacé par la protéine FHA (Forkhead associated domain) qui est un domaine de liaison de thréonine phosphorylée avec une affinité de liaison submicromolaire (Zhang et al. 2005). La troisième génération de biosenseur appelé AKAR3 a été modifié à partir du biosenseur AKAR2 en remplaçant la citrine par Venus (Allen & Zhang 2006). La dernière version du biosenseur reportant l'activité PKA comprend le remplacement des protéines fluorescentes ECFP et Venus par Cerulean (protéine fluorescente bleue) et cpVenus (AKAR4) (Depry et al. 2011). Malgré l'amélioration de ces biosenseurs, ces derniers fonctionnent de la même façon : la protéine kinase PKA phosphoryle son substrat, une fois la phosphorylation effectuée, le site de reconnaissance va reconnaître le phosphate ajouté sur le substrat, il y aura donc un changement de conformation du biosenseur. Ce changement de conformation va induire un

rapprochement des protéines fluorescentes qui seront assez proches pour pouvoir observer le phénomène de transfert d'énergie du donneur à l'accepteur (Cerulean/cpVenus pour AKAR4). Si le phosphate est enlevé du substrat, le biosenseur passera en conformation ouverte ce qui entraînera un éloignement des protéines fluorescentes, empêchant le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur.

Sur le même principe, les biosenseurs utilisés pour suivre l'activité kinase ERK ont été optimisés. Ces biosenseurs s'appellent EKAR (ERK Kinase Activity Reporter), ils sont construits sur le même principe que les biosenseurs AKAR c'est-à-dire une protéine fluorescente rouge mRFP, un site de reconnaissance du substrat phosphorylé par ERK, un peptide substrat de la kinase ERK accolé à un domaine permettant à la kinase de s'accrocher pour phosphoryler son substrat (C D Harvey et al. 2008). Après optimisation de cette première version, l'équipe d'Oliver Pertz a développé le biosenseur EKAR1G (ERK kinase activity reporter first generation). Ce biosenseur est constitué des protéines fluorescentes Cerulean et mVenus. La deuxième génération de ce biosenseur est due au remplacement de la protéine fluorescente Cerulean par mTFP1 (Fritz, Letzelter, Reimann, Martin, Fusco, et al. 2013). Sur le même principe que les biosenseurs PKA, lors de son activation la MAPK ERK viendra se fixer sur son domaine de fixation (ERK Docking Domain) et phosphoryler son substrat (ajout de phosphate). Le substrat phosphorylé sera reconnu par le site de reconnaissance. Il y aura un repliement du biosenseur permettant un rapprochement des protéines fluorescentes et donc un transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur (Cerulean/mVenus pour EKAR2G). Une inhibition de la voie ERK provoque une déphosphorylation du substrat entraînant l'éloignement des protéines fluorescentes et donc un arrêt de transfert d'énergie entre les deux protéines fluorescentes.

Pour notre étude, nous avons généré de nouvelles versions des biosenseurs AKAR4 et EKAR2G en changeant les protéines fluorescentes Cerulean/cpVenus et mTFP1/mVenus par LSSmOrange/mKate2 et mTFP1/sREACH (Fig 2.5). Ces nouvelles versions de biosenseurs ont été renommées AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH}.

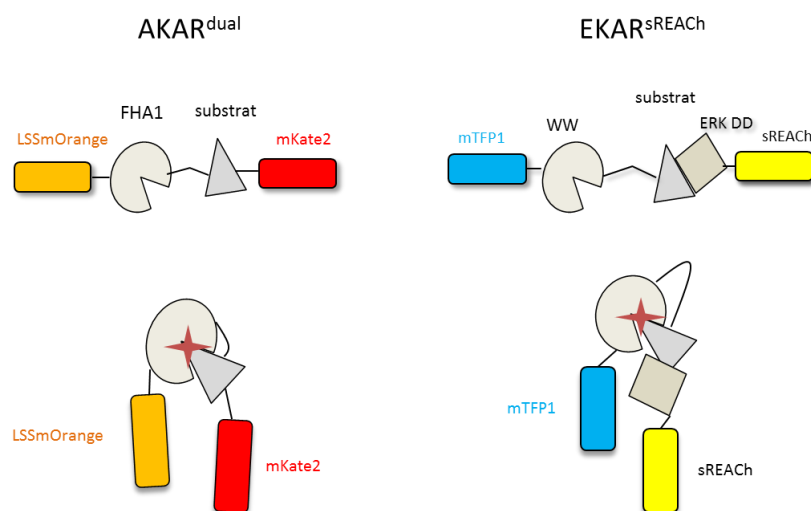


Fig 2.5 : schéma des biosenseurs AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH}. Chaque biosenseur est constitué d'un couple de protéines fluorescentes LSSmOrange/mKate2 et mTFP1/sREACH pour respectivement AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH} ; d'un site de reconnaissance du substrat phosphorylé par la kinase (FHA1 pour AKAR^{dual} et WW pour EKAR^{sREACH}), un substrat de la kinase et un peptide a été rajouté à côté du substrat de la kinase ERK permettant de s'accrocher et de phosphoryler son substrat. Pour les deux biosenseurs, la kinase vient phosphoryler son substrat, entraînant un repli du biosenseur, le phénomène de FRET est observable. Lors de l'inactivation de ces kinases, le substrat ne sera plus phosphorylé entraînant le dépliement du biosenseur (FRET non observable).

1.2.2. Méthodologie

1.2.2.1. Validation théorique de notre approche

1.2.2.1.1. Choix des donneurs

La première étape pour le développement de la méthodologie de suivi d'activité en deux couleurs FLIM avec une seule longueur d'onde d'excitation a été de combiner deux protéines fluorescentes donneuses, spectralement séparées et excitables à la même longueur d'onde. Pour effectuer cette approche, nous avons cherché un second donneur ayant la capacité d'être excité à la même longueur d'onde que le donneur FRET bleu à 440nm et avec une émission de fluorescence décalée dans le rouge. LSSmOrange a la propriété d'être excité à 440nm et d'émettre sa fluorescence dans le rouge à 572nm (Fig 2.6) (Shcherbakova et al. 2012).

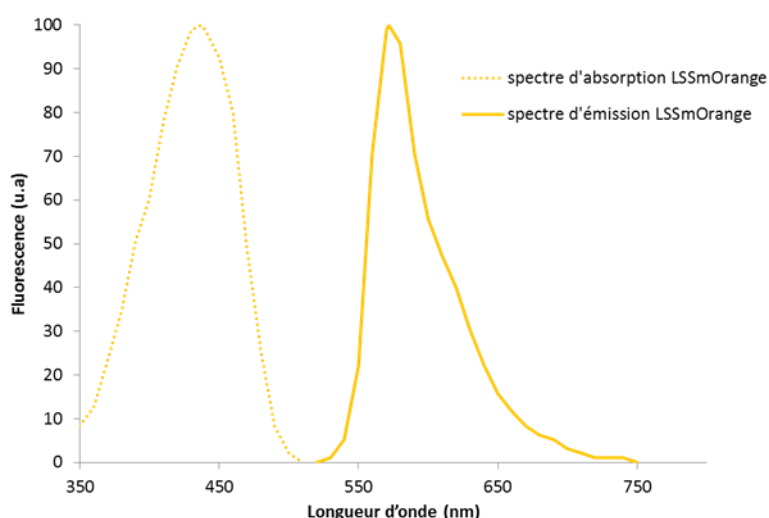


Fig 2.6 : Spectres d'absorption et d'émission de LSSmOrange.

Nous avons vérifié si cette protéine fluorescente comportait les propriétés fluorescentes appropriées pour des mesures de FRET par FLIM. En acquérant son déclin de fluorescence par la méthode TCSPC, nous avons montré que LSSmOrange avait un déclin de fluorescence mono-exponentiel, avec une durée de vie de 2.75 ± 0.07 ns ($n=11$) (Fig 2.7A). Nous ne mesurons pas un déclin de fluorescence multi-exponentiel de LSSmOrange, comme mesuré dans une étude de Fron en 2015 (Fron et al. 2015). Cette différence de mesure peut être expliquée par une analyse moins précise de nos déclins de fluorescence. En effet, dans cette étude deux durées de vie de 1.76 ns et 3.50 ns sont mesurées, dans notre cas nous mesurons avec un déclin mono-exponentiel une durée de vie de 2.75 ns qui se trouve entre les deux durées de vie mesurées avec un déclin de fluorescence multi-exponentiel. Dans l'étude de Fron, il est montré que LSSmOrange a des propriétés de photo-conversion et une émission de fluorescence bleue. Cette émission de fluorescence bleue n'est pas récupérée lors de nos acquisitions. On peut dire que les espèces de LSSmOrange photo-converties sont négligeables dans notre cas, en effet, il a été démontré que LSSmOrange était photo-convertible lorsqu'elle était excitée à une longueur d'onde de 400 nm avec des pulses laser de l'ordre de femtosecondes engendrant un décalage de son spectre d'absorption avec un pic à 553 nm or nous éclairons notre LSSmOrange avec un pulse laser de l'ordre de la picoseconde à 440 nm. Cette LSSmOrange photo-convertie ne sera donc pas excitée avec notre cas. Ensuite, nous avons vérifié que mKate2 est un bon accepteur pour LSSmOrange. Le tandem LSSmOrange-mKate2 a été construit (tandem= donneur et accepteur relié par un petit linker peptidique). LSSmOrange seule et le tandem LSSmOrange-mKate2 ont été

exprimés dans les cellules U2OS. Les durées de vie de ces deux constructions ont été mesurées par TCSPC et à l'aide du microscope fastFLIM (Leray et al. 2013). En comparant le déclin de fluorescence mesuré en TCSPC de LSSmOrange et LSSmOrange-mKate2, on remarque que le déclin de fluorescence du tandem est un déclin plus rapide que celui du donneur seul. Cette différence de déclin signifie un phénomène de transfert d'énergie entre LSSmOrange et mKate2. Donc mKate2 est un bon accepteur pour LSSmOrange (Fig 2.7A). Dans un deuxième temps, la durée de vie de ces deux constructions a été mesurée avec le système fastFLIM (Fig 2.7B).

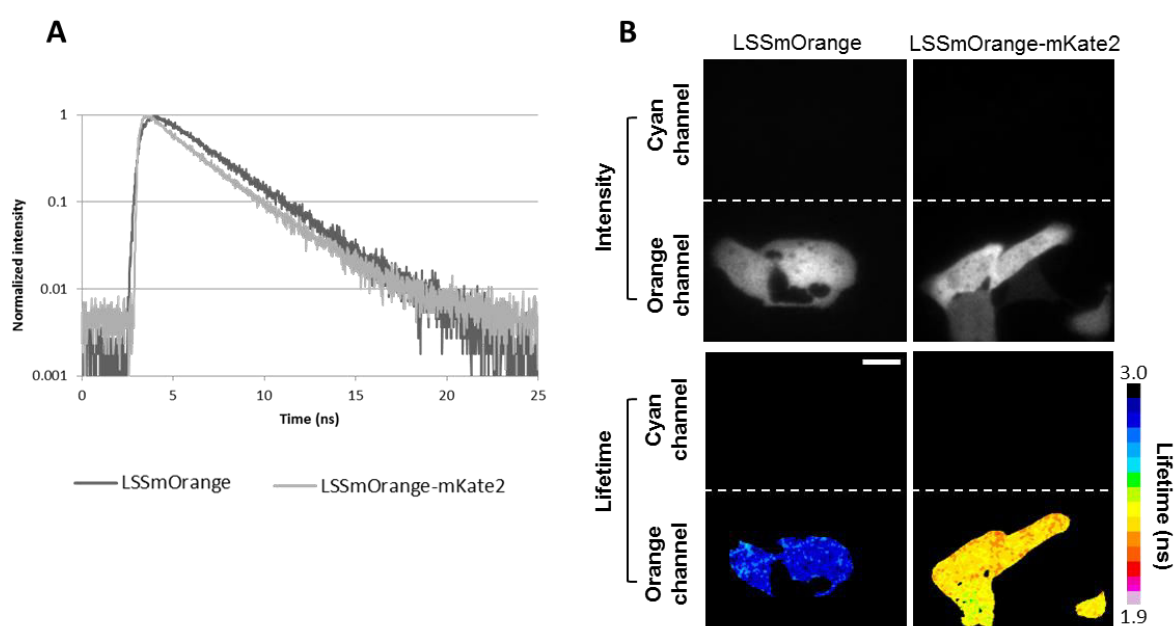


Fig 2.7 : (A) Représentation des déclins de fluorescence de LSSmOrange et du tandem LSSmOrange-mKate2. LSSmOrange présente un déclin mono-exponentiel tandis que LSSmOrange-mKate2 présente un déclin bi-exponentiel avec une pente plus courte que LSSmOrange correspondant à une durée de vie plus courte. (B) Images en intensité et durée de vie de LSSmOrange et du tandem LSSmOrange-mKate2 exprimés dans des cellules U2OS prisent avec le microscope fastFLIM.

Avec le fastFLIM, LSSmOrange et le tandem LSSmOrange-mKate2 ont une durée de vie respective de 2.76 ± 0.03 ns ($n=34$) et de 2.32 ± 0.08 ns ($n=56$) correspondant à une efficacité de FRET ($\text{pseudo}E = 1 - \langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_D$ où $\langle \tau \rangle_D$ correspond à la durée de vie du donneur seul) de 0.16 (Fig 2.7B).

mTFP1 est une protéine fluorescente bleue monomérique (Ai et al. 2006), excitée à 440nm. L'émission de fluorescence des deux donneurs peut être visualisée en même temps sur le

système fastFLIM à l'aide d'un Dual View. Grâce à cet instrument, le champ de la caméra est divisé en deux et on récupère donc l'émission de fluorescence bleu (480/30nm) et orange (579/34nm) en simultanément. Pour vérifier si mTFP1 et LSSmOrange sont compatibles pour notre approche de FLIM à deux couleurs avec une seule longueur d'onde d'excitation, ces protéines ont été exprimées seules ou co-exprimées dans des cellules U2OS. Le résultat démontre que l'on mesure la même durée de vie lorsque les deux donneurs sont exprimés seuls et lorsqu'ils sont co-exprimés et excités à la même longueur d'onde (Fig 2.8). Quand mTFP1 et LSSmOrange sont exprimés seuls, la durée de vie mesurée dans le canal bleu est de 2.63 ± 0.03 ns ($n=28$) (Fig 2.8, gauche) et dans le canal orange de 2.76 ± 0.03 ns ($n=34$) (Fig 2.8, au milieu), on remarque une fuite spectrale de mTFP1 dans le canal orange due au spectre d'émission de mTFP1. Lorsque ces deux donneurs sont co-exprimés dans les cellules U2OS, les durées de vie mesurées dans les deux canaux sont identiques aux durées de vie mesurées lorsque les donneurs sont exprimés seuls, c'est-à-dire 2.62 ± 0.03 ns ($n=23$) pour mTFP1 et 2.76 ± 0.04 ns ($n=23$) pour LSSmOrange (Fig 2.8, droite).

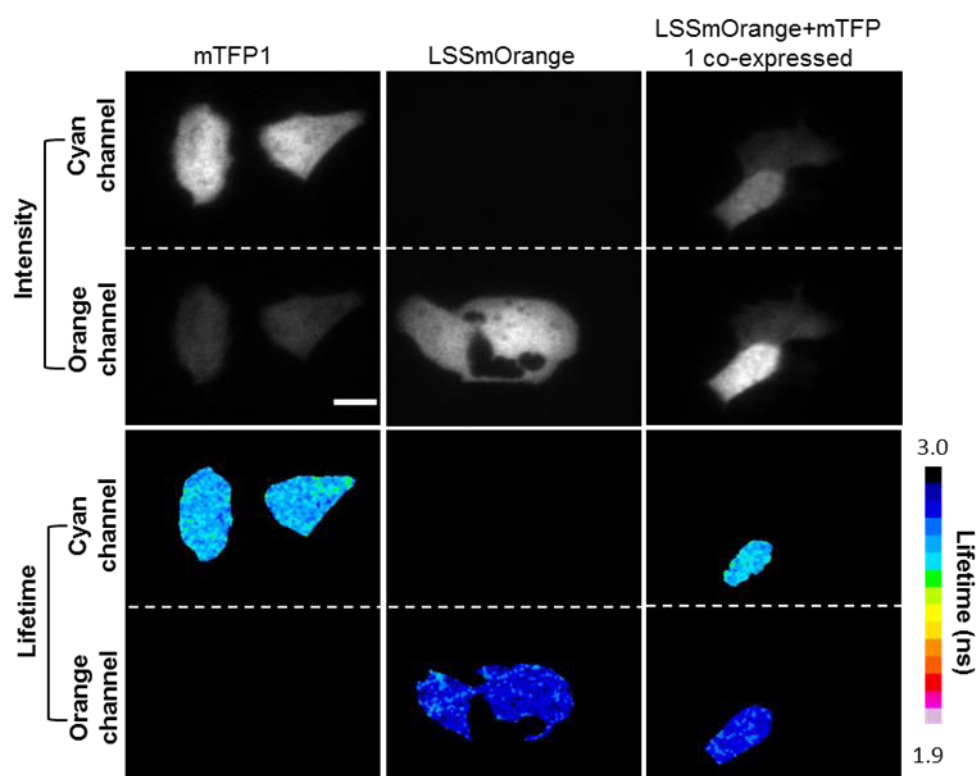


Fig 2.8 : Images en durée de vie de mTFP1, LSSmOrange et des deux co-exprimés dans les cellules U2OS acquises avec le fastFLIM. La durée de vie mesurée est identique lorsque les protéines mTFP1 et LSSmOrange sont exprimées seules et lorsqu'elles sont co-exprimées.

1.2.2.1.2. Choix des couples FRET

Ayant confirmé la faisabilité d'exciter mTFP1 et LSSmOrange avec la même longueur d'onde à 440nm, la seconde étape a été de confirmer si nos deux couples donneur/accepteur étaient compatibles avec notre approche. Nous savons que YFP est un bon accepteur pour mTFP1 (Padilla-Parra et al. 2009), nous avons donc décidé de co-exprimer les tandems mTFP1-EYFP et LSSmOrange-mKate2 dans des cellules U2OS. Lorsque les deux tandems sont co-exprimés, nous remarquons une hétérogénéité dans la mesure de durée de vie dans le canal orange (Fig 2.9). Cette hétérogénéité de durée de vie est due à la fuite spectrale de l'accepteur EYFP dans le canal orange.

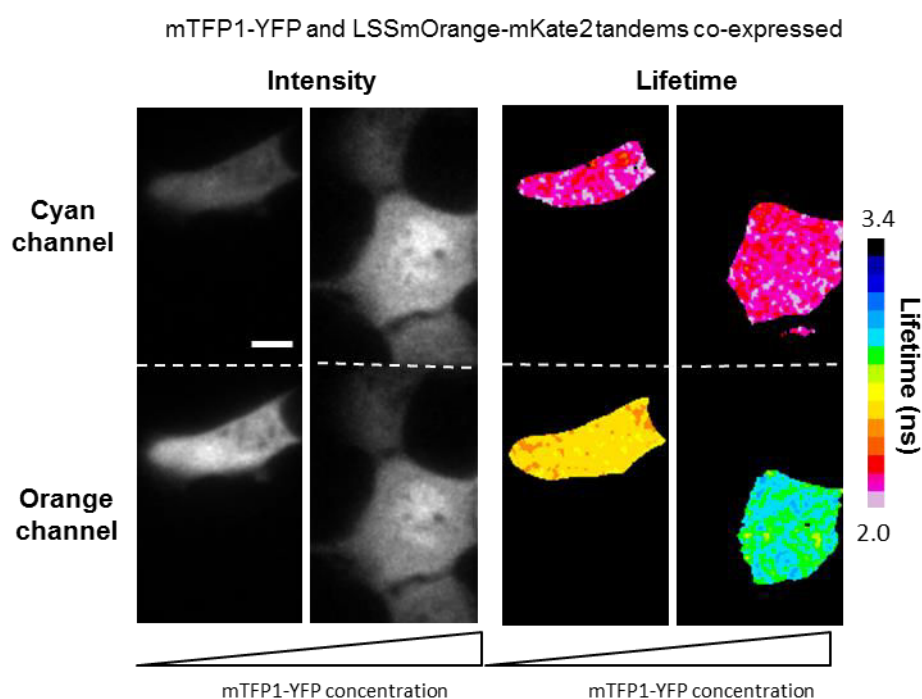


Fig 2.9 : Images en intensité et en durée de vie des cellules U2OS co-exprimant les tandems mTFP1-EYFP et LSSmOrange-mKate2. Les images sont acquises avec le fastFLIM. On note une hétérogénéité de mesure de durée de vie dans le canal orange lorsque mTFP1-EYFP est exprimé plus fort que LSSmOrange-mKate2.

Pour diminuer cette fuite spectrale, nous avons remplacé EYFP par sREACH (super Resonance Energy Accepting Chromoprotein). Cette protéine est un variant de YFP avec le même spectre d'excitation (pic d'absorption à 517nm) mais elle est cent fois moins fluorescente que YFP (pic d'émission à 531nm) (Ganesan et al. 2006) (Fig 2.10).

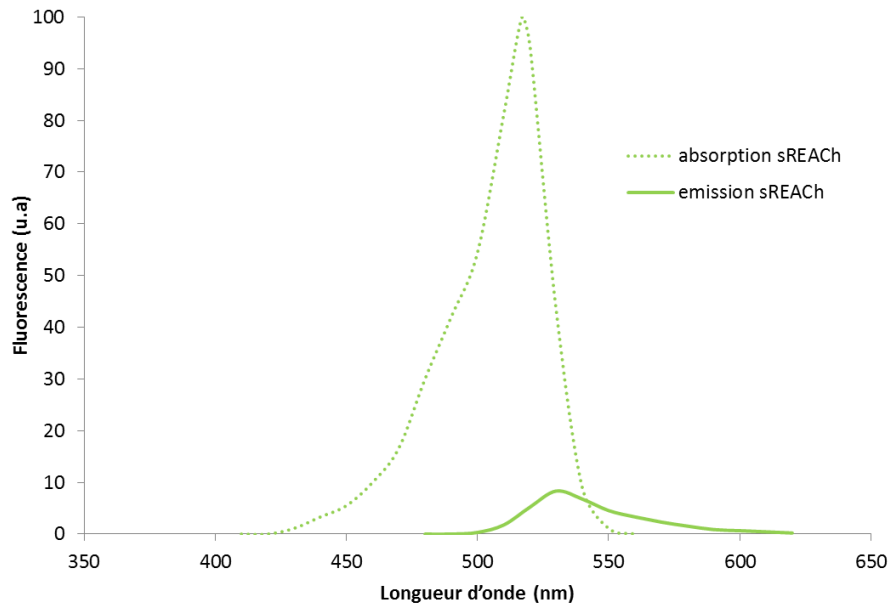


Fig 2.10 : Spectres d'absorption et d'émission de sREACH

Pour savoir si sREACH ferait un bon accepteur pour mTFP1, nous avons construit le tandem mTFP1-sREACH. Nous avons mesuré les durées de vie du tandem mTFP1-EYFP et mTFP1-sREACH qui sont respectivement de 2.02 ± 0.04 ns ($n=30$) et 2.05 ± 0.07 ns ($n=30$) (Fig 2.11). Les durées de vies sont très proches, on peut donc considérer sREACH comme un bon accepteur pour mTFP1. Pour vérifier si le remplacement de EYFP par sREACH permettait de réduire la fuite spectrale, LSSmOrange-mKate2 a été co-exprimé avec mTFP1, mTFP1-YFP ou mTFP1-sREACH. Ces trois dernières constructions ont été exprimées avec un gradient de concentration de 0.25 à $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.25, 0.5, 0.75 et $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), le tandem LSSmOrange-mKate2 quant à lui a été exprimé à une concentration de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. L'impact de cette augmentation de concentration intracellulaire relative sur la durée de vie mesurée dans le canal orange a été représenté sous forme de graphique (Fig 2.12). Ce graphique représente en ordonnée la durée de vie mesurée dans le canal orange et en abscisse le ratio d'intensité mesurée dans le canal bleu sur l'intensité mesurée dans le canal orange. Ces intensités ont été récupérées sur la première image de notre déclin de fluorescence, ce qui représente l'amplitude de notre déclin et donc qui est en rapport avec la concentration des plasmides exprimés. On peut donc dire qu'un petit ratio d'intensité bleu/orange correspond à une condition où le tandem LSSmOrange-mKate2 est plus exprimé que mTFP1, mTFP1-YFP ou mTFP1-sREACH. Ainsi plus le ratio d'intensité bleu/orange est grand plus l'espèce bleue est exprimée. En présence de mTFP1, la durée de vie dans le canal orange augmente légèrement de 2.42 à

2.6ns entre un ratio de 0.71 à 2.66. Cette augmentation est due à la fuite spectrale de mTFP1 (qui a une durée de vie de 2.62) dans le canal orange. En présence de mTFP1-EYFP, la durée de vie mesurée dans le canal orange augmente très rapidement de 2.49 à 2.83ns. Cette augmentation se fait sur des ratios de 0.29 à 1.20. Cette augmentation de durée de vie mesurée dans le canal orange est cohérente avec la fuite spectrale de la protéine EYFP dans ce canal. En présence de mTFP1-sREACH, la durée de vie mesurée dans le canal orange diminue de 2.29 à 2.15ns. Cette diminution s'effectue entre un ratio de 0.78 à 2.28 et correspond à la fuite spectrale de sREACH (qui a une durée de vie très courte de l'ordre de 0.32ns) dans le canal orange. Malgré cette diminution de durée de vie dans le canal orange lorsque la concentration de mTFP1-sREACH augmente en présence de LSSmOrange-mKate2, on peut conclure que sREACH diminue la fuite spectrale.

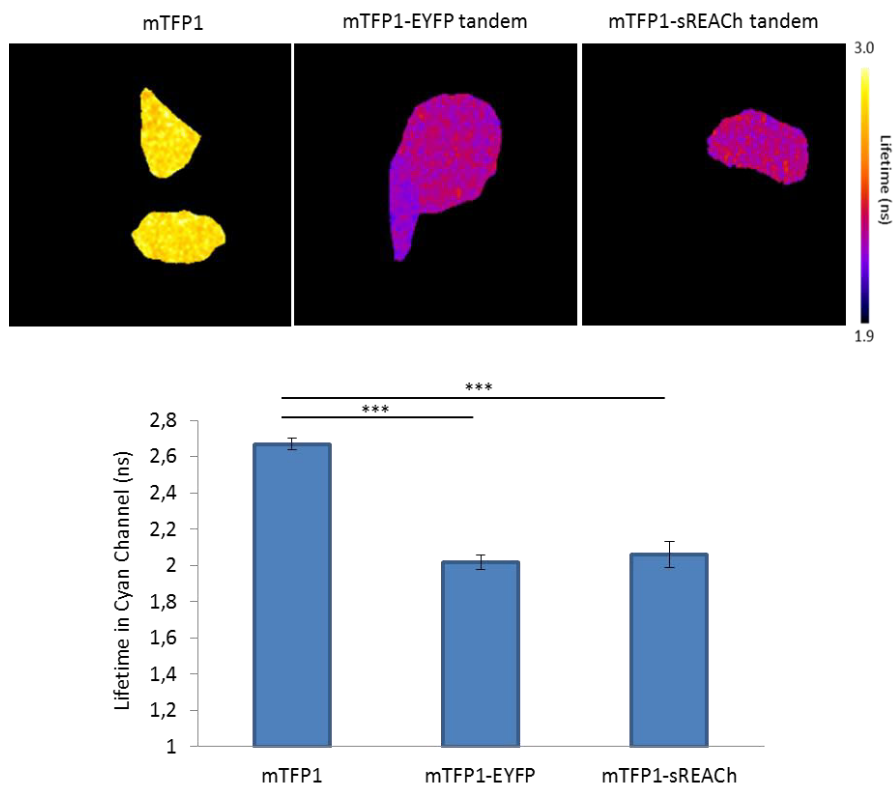


Fig 2.11 : Images en durée de vie de cellules U2OS exprimant mTFP1 (n=28 cellules), mTFP1-EYFP (n=30 cellules) et mTFP1-sREACH (n=30 cellules). Histogramme représentant les durées de vie obtenues avec le fastFLIM pour ces constructions. mTFP1-EYFP et mTFP1-sREACH ont des durées de vie courtes très a proches. sREACH est un bon accepteur pour mTFP1. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard entre les mesures.

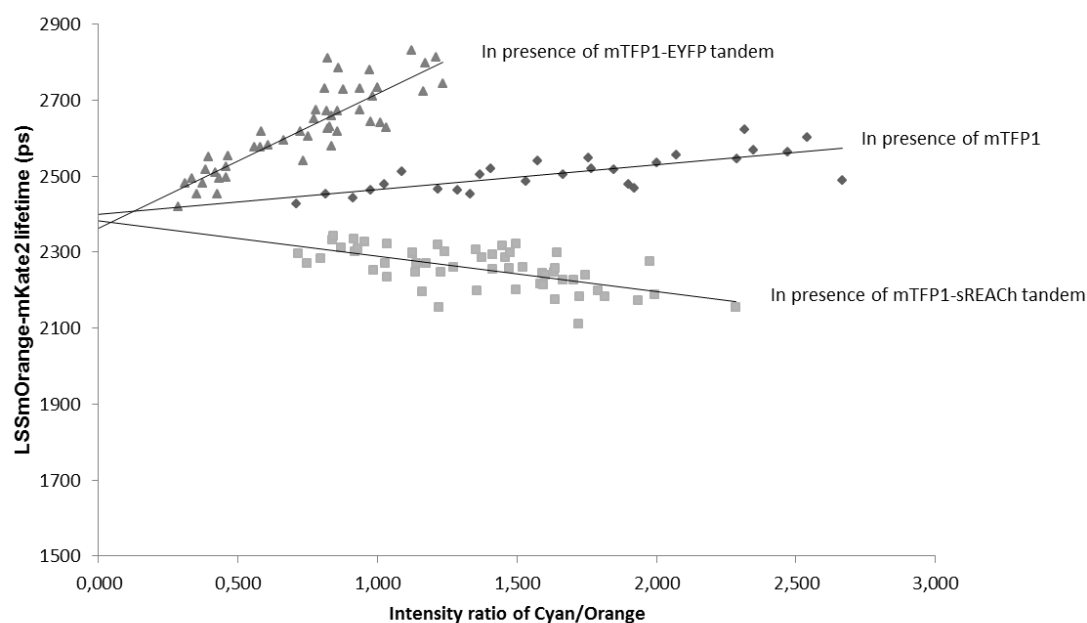


Fig 2.12 : Graphique représentant la durée de vie mesurée dans le canal orange en présence de mTFP1, mTFP1-EYFP et mTFP1-sREACH en fonction du ratio d'intensité du canal bleu sur le canal orange. En présence de mTFP1, la durée de vie dans le canal orange augmente légèrement due à la fuite spectrale de mTFP1. En présence de mTFP-YFP, la durée de vie de LSSmOrange-mKate2 augmente fortement jusqu'à mesurer la durée de vie de YFP dans le canal orange et en présence de sREACH, la durée de vie dans le canal orange diminue due à la fuite spectrale de sREACH (qui a une durée de vie de 0.32ns). Chaque courbe est ajustée par une régression linéaire.

Les couples mTFP1/sREACH et LSSmOrange/mKate2 peuvent être utilisés pour notre approche.

1.2.2.2. *Suivi des activités ERK et PKA par notre approche*

1.2.2.2.1. Caractérisation des biosenseurs ERK et PKA

Comme expliqué précédemment, les biosenseurs AKAR4 et EKAR2G ont été modifiés avec les couples LSSmOrange/mKate2 et mTFP1/sREACH respectivement pour un suivi des voies PKA et ERK en simultané. Ces nouvelles versions sont renommées AKAR^{dual} (biosenseur PKA) et EKAR^{sREACH} (biosenseur ERK). Il est possible de moduler l'activité de ces biosenseurs à l'aide de substances chimiques. En effet, la voie de signalisation PKA est stimulée par ajout Forskoline et IBMX. L'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) est une substance permettant d'optimiser l'activation de la voie PKA en inhibant les phosphodiesterases. La forskoline et l'IBMX seront utilisées à des concentrations de 12,5µM et 75µM respectivement. La voie PKA est inhibée par l'H89 à une concentration de 20µM. Cette drogue n'est malheureusement pas un inhibiteur spécifique de la voie PKA, il peut donc agir sur d'autres

kinases. La voie ERK, quant à elle, est stimulée par l'EGF (Epidermal Growth Factor) à une concentration de 100ng/ml et inhibée par l'U0126 à une concentration de 20μM. Cette drogue est un inhibiteur des kinases MEK1/2 qui se trouvent juste avant les kinases ERK1/2 dans la cascade de signalisation. Quel que soit l'expérience proposée, la préparation et l'acquisition des échantillons sont les mêmes, c'est à dire que les biosenseurs sont intégrés dans les cellules par transfection. Quatre heures après cette transfection, les cellules sont sevrées dans un milieu contenant 0.1% de sérum. Ce sevrage permet d'inactiver les voies de signalisation endogène. Une fois sous le microscope, les cellules sont imagées toutes les deux minutes pendant une heure. Cette heure est partagée en trois parties : la **baseline** : pendant dix minutes aucun traitement n'est mis sur les cellules, cette phase nous permet de visualiser notre niveau basal d'activation des biosenseurs ; l'**activation** : cette phase dure trente minutes, ce qui nous permet de visualiser la réponse du biosenseur après l'ajout des activateurs des voies kinases ; et enfin, l'**inhibition** : cette phase dure vingt minutes ce qui permet de visualiser la réponse du biosenseur après l'addition des inhibiteurs des voies de signalisation.

Dans un premier temps, les deux nouveaux biosenseurs ont été caractérisés pour vérifier si le changement des protéines fluorescentes ne perturbait pas le changement de conformation des biosenseurs induit par l'addition des activateurs et inhibiteurs. Pour cela, les biosenseurs ont été exprimés seuls dans des cellules HeLa (Fig 2.13).

Le biosenseur AKAR^{dual} est exprimé dans les cellules HeLa (Fig 2.13A). Après addition de forskoline+IBMX, la durée de vie mesurée diminue d'environ 60ps et reste stable tout au long de la phase d'activation correspondant à une activation continue de la voie PKA. Un traitement des cellules par H89 provoque une augmentation de la durée de vie mesurée d'environ 80ps concordant à une inhibition de voie PKA (Fig 2.13A, courbe orange). Le biosenseur EKAR^{SREACH} a été lui aussi exprimé dans les cellules HeLa (Fig 2.13B). Après traitement à l'EGF, la durée de vie mesurée diminue d'environ 60ps signifiant une activation de la voie ERK. On remarque que cette activation est transitoire. Le traitement à l'U0126 provoque une augmentation de durée de vie mesurée d'environ 80ps ce qui est en accord avec une inhibition de la voie ERK (Fig 2.13B, courbe bleue). Dans les deux cas, des expériences contrôles en présence de DMSO ont été effectuées (Fig 2.13A et B, courbes grises). Ces expériences démontrent que les réponses mesurées des biosenseurs sont

spécifiques des voies de signalisation étudiées. En effet, dans les deux cas, lorsque le DMSO est ajouté il n'y a pas de diminution ou augmentation significative des durées de vie mesurées. Une fois ces contrôles effectués, il est donc possible, d'exprimer nos deux biosenseurs pour un suivi d'activité en simultané.

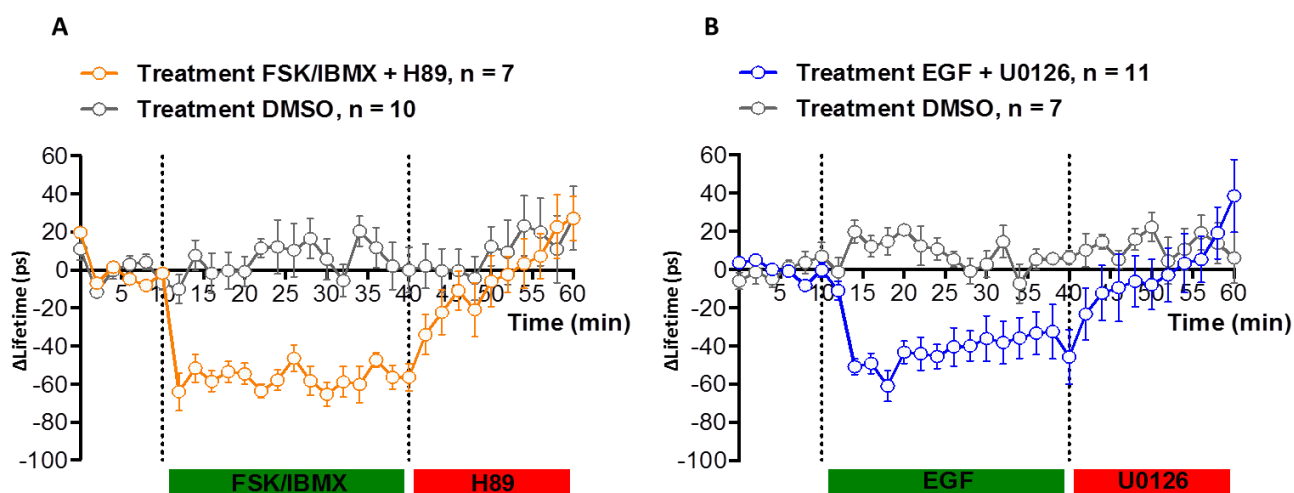


Fig 2.13 : Caractérisation des biosenseurs AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH}. (A) Caractérisation du biosenseur AKAR^{dual} avec traitement au DMSO (n=10 cellules, courbe grise), traitement à la forskoline+IBMX où la durée de vie mesurée diminue correspondant à l'activation du biosenseur puis à l'H89 où la durée de vie augmente correspondant à l'inactivation du biosenseur (n=7 cellules, courbe orange). (B) Caractérisation du biosenseur EKAR^{sREACH} avec traitement au DMSO (n=7 cellules, courbe grise) ; le traitement à l'EGF provoque une diminution de la durée de vie du biosenseur EKAR^{sREACH} c'est-à-dire son activation puis à l'U0126 ce qui cause l'augmentation de durée de vie de EKAR^{sREACH} correspondant à son inhibition (n=11 cellules, courbe bleue). Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5μM, [IBMX]=75μM, [u0126]=20μM et [H89]=20μM.

1.2.2.2.2. Suivi des activités ERK et PKA en simultané

L'idée générale est de voir s'il est possible de mesurer les mêmes réponses lorsque les biosenseurs sont exprimés seuls et lorsqu'ils sont co-exprimés. Pour répondre à cette question les deux biosenseurs ont été co-exprimés (Fig 2.14).

Durant la phase de baseline, les durées de vie des deux biosenseurs restent stables, lors du traitement aux activateurs (Forskoline+IBMX et EGF), une diminution de durée de vie de 57ps pour AKAR^{dual} et de 40ps pour EKAR^{sREACH} (au temps t=14min) est mesurée. Cette diminution correspond à la phosphorylation des substrats par PKA pour AKAR^{dual} et par ERK

pour EKAR^{sREACH}. On note que l'on retrouve une activation stable pour la voie PKA et une activation transitoire pour la voie ERK, réponses caractéristiques de ces biosenseurs. Lors de l'ajout des inhibiteurs U0126 et H86, on note une augmentation des durées de vie (avec un $\Delta\tau$ de -29ps au lieu de -57ps pour AKAR^{dual} et un $\Delta\tau$ de 14ps au lieu de -40ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=44min). Cette augmentation de durée de vie correspond à l'inhibition des voies de signalisation. Cette inhibition est due à un équilibre de la balance kinase/phosphatase.

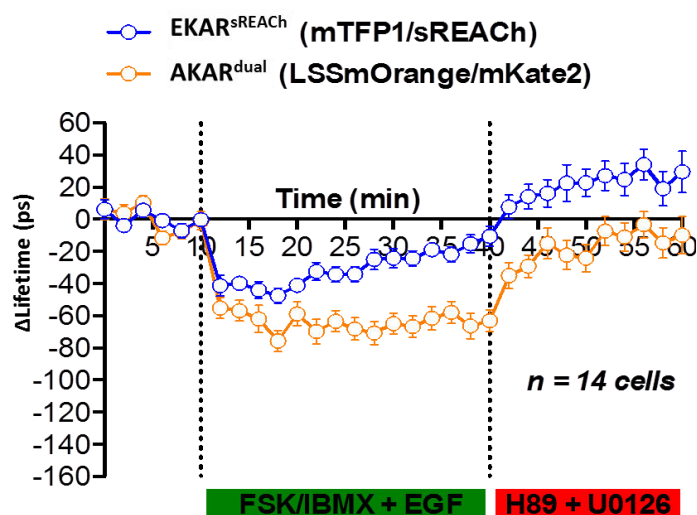


Fig 2.14 : Suivi spatio-temporel des activités kinases ERK et PKA en simultané sur le fastFLIM. Le graphique représente les mesures de durée de vie d'AKAR^{dual} (orange) et EKAR^{sREACH} (bleu) pendant les phases de baseline, activation et inhibition (n=14 cellules). L'addition de forskoline et EGF provoque une diminution de durée de vie des deux biosenseurs correspondant à leur activation. Par addition des inhibiteurs U0126 et H89 provoque une augmentation de la durée de vie mesurée des deux biosenseurs correspondant à leur inhibition. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5μM, [IBMX]=75μM, [u0126]=20μM et [H89]=20μM.

L'application de cette méthodologie a été faite sur deux autres systèmes de microscopie permettant la mesure de durée de vie par déclin de fluorescence (TCSPC) et par phase et modulation (LiFa). Lorsque la même expérience est faite sur ces deux autres systèmes de mesure de durée de vie, les résultats obtenus montrent la même tendance que les acquisitions faites avec le fastFLIM (Fig 2.15). En effet, lorsque les activateurs (EGF et forskoline) sont ajoutés, une diminution des durées de vie des deux biosenseurs est mesurée (avec un $\Delta\tau$ de -91ps pour AKAR^{dual} et un $\Delta\tau$ de -77ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=20min, valeurs obtenues avec le TCSPC ; avec un $\Delta\tau$ de -125ps pour AKAR^{dual} et un $\Delta\tau$ de -100ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=25min, valeurs obtenues avec le LiFa) correspondant à une activation des deux voies de signalisation. Le traitement à l'U0126 et à l'H89 provoque

l'inactivation des deux voies se mesurant par une augmentation des durées de vie mesurées (avec un $\Delta\tau$ de -47ps au lieu de -91ps pour AKAR^{dual} et un $\Delta\tau$ de 2ps au lieu de -77ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=50min, valeurs obtenues avec le TCSPC ; avec un $\Delta\tau$ de -95ps au lieu de -125ps pour AKAR^{dual} et un $\Delta\tau$ de -50ps au lieu de -100ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=40min, valeurs obtenues avec le LiFa). La mesure de durée de vie du biosenseur EKAR^{sREACH} obtenue après l'activation avec le système LiFa présente un délai. Nous relierons ce délai à la différence de température lors des acquisitions. En effet, toutes les acquisitions (TCSPC et fastFLIM) ont été effectuées avec une température de 37°C sauf pour le LiFa où les acquisitions ont été faites à température ambiante.

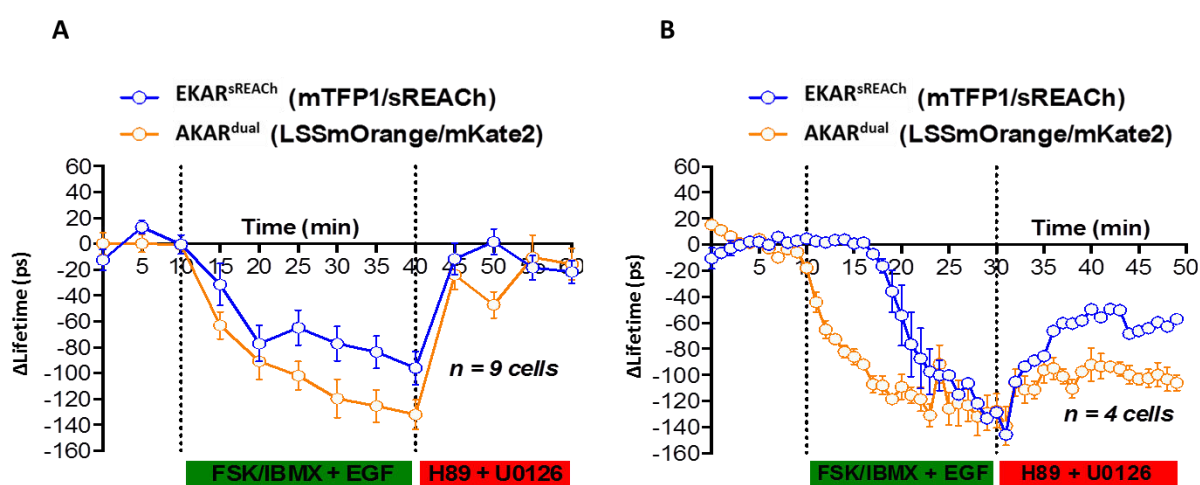


Fig 2.15 : Suivi spatio-temporel des activités kinases ERK et PKA en simultané en TCSPC (A n=9 cellules) et en LiFa (B, n=4 cellules). Les deux biosenseurs sont co-exprimés dans les cellules HeLa. Pour les deux systèmes de mesure TCSPC et LiFa, après l'ajout des activateurs (forskoline et EGF) les durées de vie mesurées diminuent correspondant au changement de conformation des biosenseurs qui ont été phosphorylés par PKA pour AKAR^{dual} et ERK pour EKAR^{sREACH}. Après l'addition des inhibiteurs (H89 et U0126), les durées de vie mesurées augmentent pour les deux biosenseurs correspondant à leur inhibition. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5 μ M, [IBMX]=75 μ M, [u0126]=20 μ M et [H89]=20 μ M.

Ces résultats montrent la possibilité de transposer notre méthodologie sur d'autres systèmes d'acquisitions.

Après avoir réalisées ces expériences de co-activation et co-inhibition, des expériences, nous permettant de contrôler si la fuite spectrale n'a pas d'effet sur le suivi spatio-temporel des deux activités kinases, ont été effectuées. Pour cela, les deux biosenseurs ont été co-exprimés et seule une des deux voies de signalisation a été modulée (Fig 2.16). Comme attendu, l'ajout de forskoline+IBMX provoque une activation de la voie

PKA correspondant à une diminution de la durée de vie mesurée pour AKAR^{dual} (avec un $\Delta\tau$ de -38ps pour AKAR^{dual} au temps t=20min) tandis que la voie ERK n'est pas impactée. Après ajout de H89, l'inhibition de PKA est mesurée par une augmentation de durée de vie de AKAR^{dual} qui revient à un niveau basal (avec un $\Delta\tau$ de -14ps au lieu de -38ps pour AKAR^{dual} au temps t=50min). Ce traitement provoque une inhibition de la voie ERK mesurée par une augmentation de durée de vie d'EKAR^{sREACH} (avec un $\Delta\tau$ de 44ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=50min). Ce résultat n'est pas une surprise car H89 n'est pas un inhibiteur spécifique de PKA et permet d'inhiber d'autres kinases incluant mes kinases MEK-1 (Murray 2008) (Fig 2.16A).

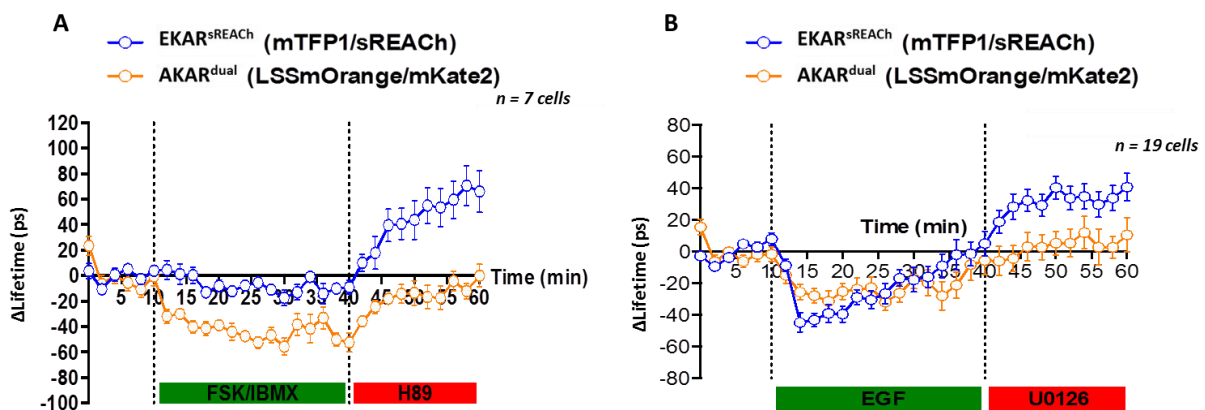


Fig 2.16 : Activation et inhibition du biosenseur AKAR^{dual} ou EKAR^{sREACH} quand les deux sont co-exprimés dans les cellules HeLa. Les acquisitions des durées de vie sont faites sur le fastFLIM. Les graphiques représentent la durée de vie d'AKAR^{dual} (orange) et EKAR^{sREACH} (bleu) au cours de l'activation et l'inhibition d'AKAR^{dual} (A) ou EKAR^{sREACH} (B). L'addition de la forskoline (A) provoque une diminution de durée de vie d'AKAR^{dual} correspondant au changement de conformation du biosenseur AKAR^{dual} suite à sa phosphorylation par PKA. La durée de vie d'EKAR^{sREACH} reste stable donc EKAR^{sREACH} n'est pas activée. L'addition de H89 provoque une augmentation des durées de vie mesurées pour les deux biosenseurs, correspondant à leur inhibition (n=7 cellules). La stimulation à l'EGF (B) occasionne une diminution de la durée de vie mesurée pour les deux biosenseurs. L'ajout de l'U0126 marque une augmentation de durée de vie d'EKAR^{sREACH} correspondant à son inhibition. La durée de vie d'AKAR^{dual} semble légèrement augmentée sous l'U0126 (n=16 cellules). Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5 μ M, [IBMX]=75 μ M, [u0126]=20 μ M et [H89]=20 μ M.

Quand les activités PKA et ERK sont suivies sous les traitements EGF et U0126 (Fig 2.16B), EKAR^{sREACH} présente un comportement caractéristique. En effet, une diminution suivie d'une augmentation de durée de vie du biosenseur EKAR^{sREACH} est mesurée lors de la stimulation à l'EGF et de l'inhibition à l'U0126 respectivement (avec un $\Delta\tau$ de -45ps au temps t=14min et de 40ps au temps t=50min). Curieusement, une augmentation de

l'activité PKA est mesurée avec la stimulation à l'EGF correspondant à une diminution de la durée de vie mesurée pour AKAR^{dual} (avec un $\Delta\tau$ de -26ps au temps t=14min). Cette activation est très peu affectée par le traitement à l'U0126. Beaucoup d'études se sont intéressées sur la relation entre les voies de signalisation PKA et ERK. Ces études s'intéressent sur comment la voie de signalisation PKA module l'activité de ERK1/2 (Gerits et al. 2008) où les niveaux d'expression des isoformes Raf sont impliqués dans les diverses réponses exercées par PKA sur la voie de signalisation des MAPKs. Récemment une position spécifique (Y330) sur la sous-unité catalytique de PKA a été identifiée et il a été démontré que cette position était directement régulée par les récepteurs à activité tyrosine kinase (Caldwell et al. 2011). Cette relation a été confirmée précédemment en montrant que la stimulation à l'EGF provoquait une augmentation de l'activité de PKA dans les cellules de mammifères (Fishman et al. 1997). Pour vérifier que l'augmentation de l'activité de PKA observée en présence d'EGF est bien une réponse spécifique et non de la fuite spectrale due à la présence du biosenseur EKAR^{sREACH}, le biosenseur AKAR^{dual} a été exprimé dans les cellules HeLa (Fig 2.17).

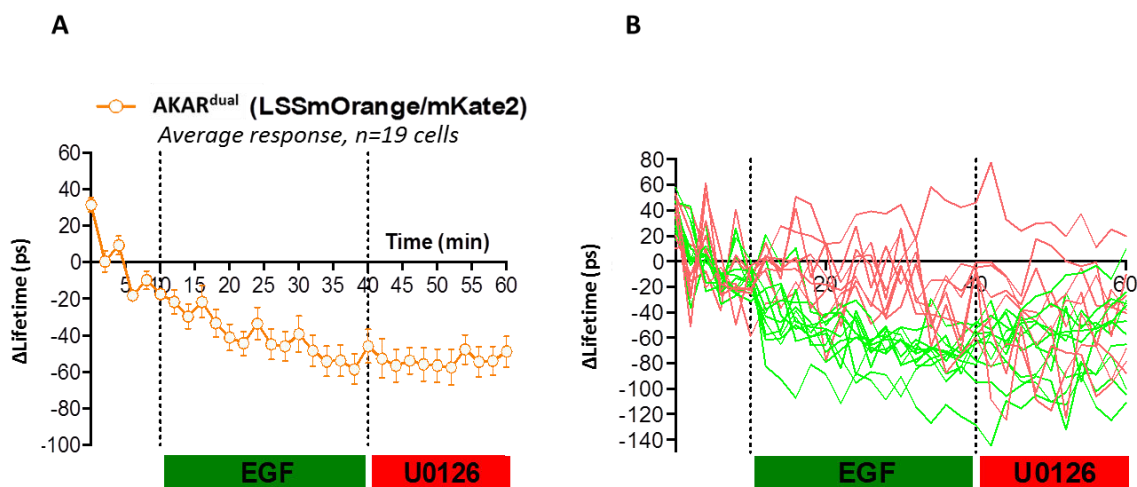


Fig 2.17 : Activation et inhibition par traitement EGF et U0126 du biosenseur AKAR^{dual}. Le graphique A représente la durée de vie moyenne du biosenseur AKAR^{dual} (n=19 cellules) durant la baseline, l'activation (traitement à l'EGF) et l'inhibition (traitement à l'U0126). Après stimulation à l'EGF, la durée de vie du biosenseur AKAR^{dual} diminue ce qui correspond à son activation. L'ajout de l'U0126 n'a pas d'impact sur l'activation du biosenseur AKAR^{dual}. Le graphique B représente les durées de vie individuelles mesurées du biosenseur AKAR^{dual}. Deux populations semblent se distinguer. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5μM, [IBMX]=75μM, [u0126]=20μM et [H89]=20μM.

La durée de vie moyenne mesurée du biosenseur AKAR^{dual} diminue (avec un $\Delta\tau$ de -41ps pour AKAR^{dual} au temps t=20min) confirmant l'augmentation d'activité de PKA en

présence d'EGF. L'inhibition par l'U0126 n'a pas impact sur l'activité de PKA (avec un $\Delta\tau$ de -57ps pour AKAR^{dual} au temps t=50min) (Fig 2.17A). Ce résultat a été par la suite confirmé par mesure de FRET par la méthode ratiométrique du biosenseur original AKAR4. Les courbes de durée de vie individuelles du biosenseur AKAR^{dual} supposent la présence de deux populations cellulaires répondant différemment à l'EGF (Fig 2.17B). Pour confirmer cette hypothèse, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée sur la partie activation (Fig 2.18A).

L'analyse en composante principale permet d'explorer les liaisons entre les variables et les ressemblances entre les individus. Chaque individu (ici une réponse du biosenseur AKAR^{dual} après l'EGF) va être représenté par un point dans un espace 2D. L'espace 2D est représenté sous une forme de deux axes orthogonaux. Ces axes sont associés à une variable qui sera appelée composante principale. Chaque individu sera placé dans l'espace suivant son lien avec les composantes principales.

En faisant cette ACP, la visualisation des deux populations n'est pas optimale, il est donc utile de faire une analyse de regroupement sur les données. Cette analyse statistique permet de regrouper les individus qui sont très proches dans l'espace c'est-à-dire que ces individus ont un comportement très proche. Dans notre cas, les cellules où les biosenseurs AKAR^{dual} répondent de manière semblable seront regroupées (Fig 2.18B).

En décidant de séparer nos cellules en deux populations cellulaires, on retrouve un groupe de 9 cellules (Fig 2.18B, cadre vert) et un groupe de 10 cellules (Fig 2.18B, cadre rouge). En moyennant les durées de vie mesurées du biosenseur AKAR^{dual} pour chaque groupe (Fig 2.18C), on peut conclure qu'il y a deux populations cellulaires : une population où la voie PKA n'est pas activée (courbe rouge) et une autre population où la voie PKA est activée (courbe verte) par l'EGF (avec un $\Delta\tau$ de -62ps pour AKAR^{dual} au temps t=20min) et n'est pas affectée par le traitement à l'U0126 (avec un $\Delta\tau$ de -73ps pour AKAR^{dual} au temps t=50min). La nature hétérogène des lignées cellulaires cultivées en particulier les cellules HeLa, pourrait être un début d'explication des deux populations cellulaires retrouvées.

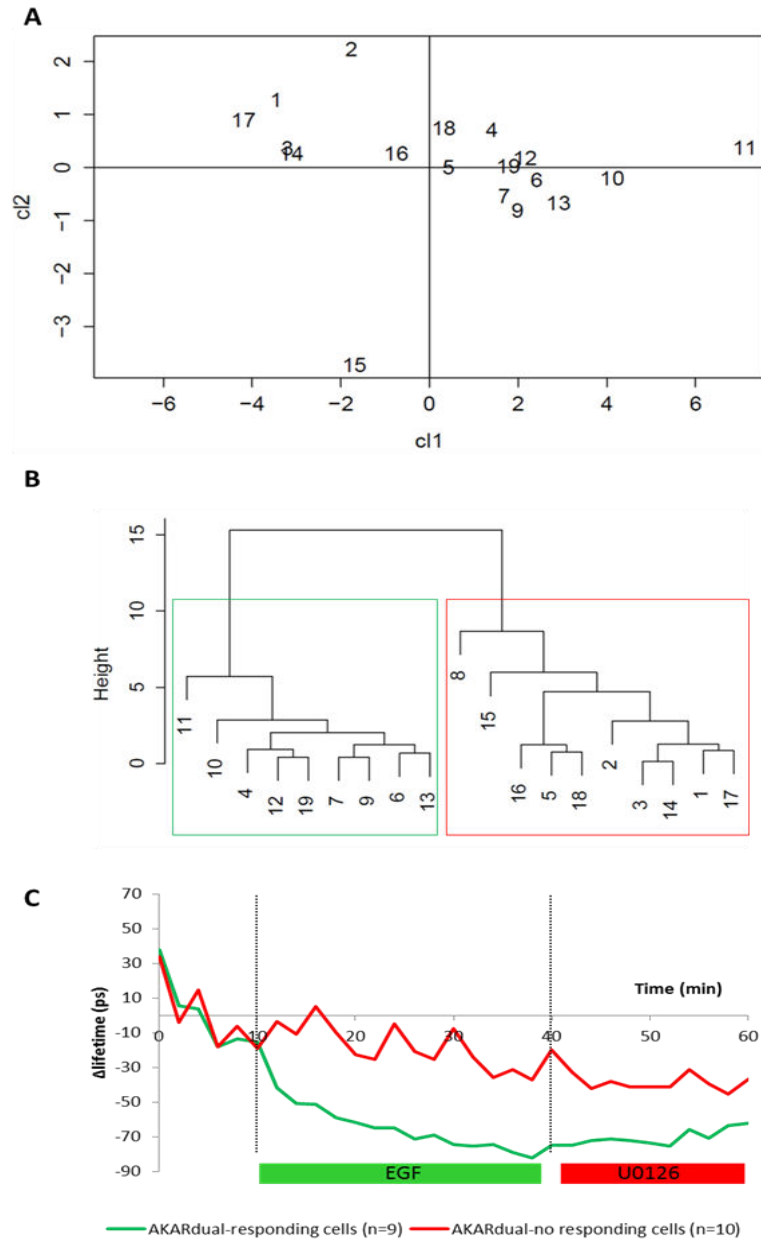


Fig 2.18 : Analyse en détail de l'activation de PKA par traitement à l'EGF. Représentation de l'analyse en composante principale (ACP) de l'activation des biosenseurs AKAR^{dual} par l'EGF (A). Représentation de chaque individu suivant deux variables. Résultat de l'analyse de regroupement (B) sur l'ACP. Deux populations cellulaires sont retrouvées : une de 9 cellules et l'autre de 10 cellules. La moyenne des durées de vie pour chaque population cellulaire est mesurée et représentée sur le graphique C. On note une population cellulaire où PKA ne répond pas au traitement à l'EGF ni à l'U0126 (courbe rouge) et une population où PKA est activée par l'EGF et qui n'est pas beaucoup affectée par l'U0126 (courbe verte). [EGF]=100ng/ml, [u0126]=20 μ M.

Prenant en compte que deux populations cellulaires sont retrouvées lorsque le biosenseur AKAR^{dual} est exprimé seul et stimulé avec l'EGF, les deux mêmes analyses statistiques ont été réalisées sur les cellules co-exprimant les biosenseurs AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH}. Le but de ces analyses est de confirmer si oui ou non les deux populations cellulaires sont retrouvées mais aussi de visualiser la réponse du biosenseur EKAR^{sREACH} dans le cas où PKA est activée ou non par l'EGF. Dans le cas où les deux biosenseurs sont co-exprimés (Fig 2.19), l'analyse en composante principale est effectuée sur les données du biosenseur AKAR^{dual} récupérées lors de l'activation par l'EGF. À partir cette ACP, l'analyse de regroupement est faite (Fig 2.19B), deux populations sont trouvées : une population de 7 individus (cadre rouge) et une population de 10 individus (cadre vert). Les durées de vie mesurées pour les biosenseurs AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH} sont moyennées pour chaque groupe d'individus (Fig 2.19C). Pour le biosenseur AKAR^{dual}, deux populations cellulaires sont bien retrouvées : une population où la voie PKA n'est pas activée par l'EGF, la durée de vie ne diminue pas (Fig 2.19C, à gauche courbe rouge) et une population où PKA est activée par l'EGF, une diminution de la durée de vie est mesurée (avec un $\Delta\tau$ de -37ps pour AKAR^{dual} au temps t=20min) (Fig 2.19C, à gauche courbe verte). En concordance, lorsque la voie PKA n'est pas activée, la voie ERK a une réponse plus faible à l'EGF, un $\Delta\tau$ de -20ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=20min est mesuré (Fig 2.19C, à droite courbe rouge). Tandis que lorsque la voie PKA est activée, la voie ERK a une réponse plus importante à l'EGF, un $\Delta\tau$ de -47ps pour EKAR^{sREACH} au temps t=20min est mesuré (Fig 2.19C, à droite courbe verte).

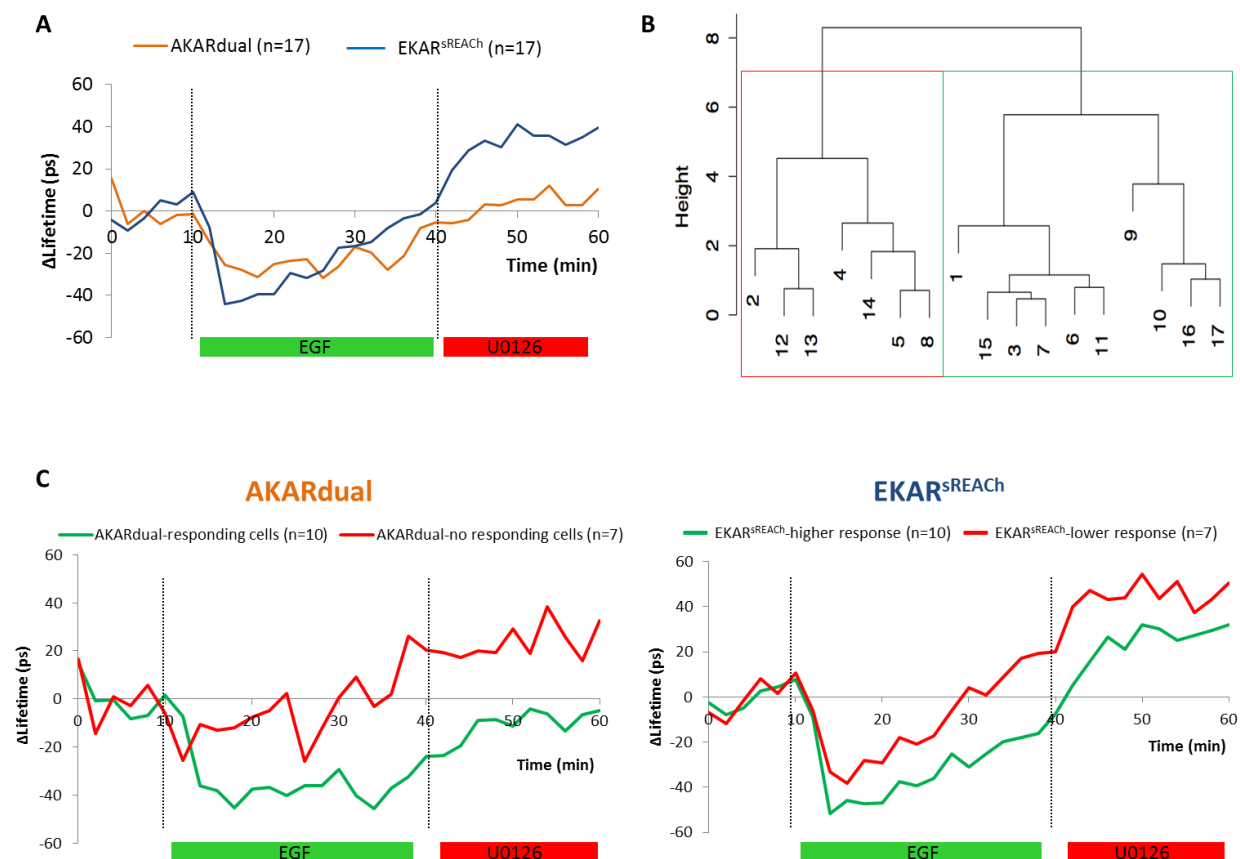


Fig 2.19 : Analyse en détail de l'activation des voies ERK et PKA par stimulation à l'EGF et inhibition à l'U0126. (A) Représentation des durées de vie moyennes mesurées (n=17 cellules) des biosenseurs AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH} pendant la baseline, la stimulation par l'EGF et l'inhibition par l'U0126. Après ajout de l'EGF, une diminution des durées de vie d'AKAR^{dual} et EKAR^{sREACH} est mesurée signifiant l'activation des voies PKA et ERK. Après ajout d'U0126, une inactivation des deux voies est détectée. En effet, une augmentation des durées de vie est mesurée pour les deux biosenseurs (Inactivation plus faible de la voie PKA). (B) Résultat de l'analyse de regroupement après l'analyse en composante principale sur les données d'activation du biosenseur AKAR^{dual}. Deux groupes ressortent. (C) Graphiques représentant la durée de vie moyenne de chaque groupe de cellule pour le biosenseur AKAR^{dual} (graphique de gauche) et EKAR^{sREACH} (graphique de droite). Lorsque le biosenseur AKAR^{dual} ne répond pas à l'EGF (courbe rouge, n=7 cellules) le biosenseur EKAR^{sREACH} a une réponse plus faible que lorsque la voie PKA est activée par l'EGF (courbe verte, n=10 cellules). [EGF]=100ng/ml, [u0126]=20μM.

À l'aide des biosenseurs EKAR^{sREACH} et AKAR^{dual} marqués respectivement avec TFP1/sREACH et LSSmOrange/mKate2, il est possible de suivre les activités ERK et PKA en simultané. L'inconvénient est que la fuite spectrale n'est pas totalement enlevée. En effet, nous avons vu que lorsque la concentration de mTFP1-sREACH augmentait, la durée de vie

mesurée dans le canal orange diminuait. Pour diminuer encore davantage ce problème une protéine fluorescente a été récemment développée. Cette protéine s'appelle ShadowG (Murakoshi et al. 2015). Cette protéine fluorescente est spectralement similaire à l'EGFP (pic de son spectre d'absorption à 486nm et pic d'émission à 510nm) mais elle émet une faible fluorescence (Fig 2.20). ShadowG est un mutant de la protéine sREACH, en effet quatre mutations ont été appliquées sur cette dernière : V148H, Y203T, A206K, R223F. La durée de vie de fluorescence de ShadowG est de 0,16ns, plus courte que sREACH (0,32ns). Cette protéine fluorescente a un coefficient d'extinction molaire, un rendement quantique et une brillance respectivement de 89000, 0.005 et 1.1. Parce que ShadowG est moins fluorescente que sREACH, il est intéressant de tester l'effet de cette nouvelle protéine sur la fuite spectrale.

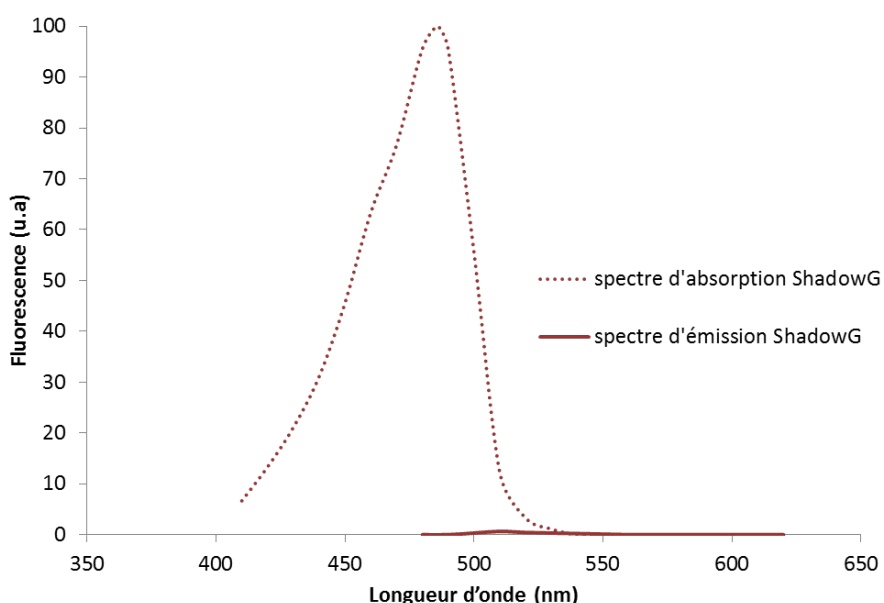


Fig 2.20 : Spectres d'absorption et d'émission de ShadowG

ShadowG est un bon accepteur pour mTFP1, en effet, la durée de vie mesurée du tandem mTFP1-ShadowG avec le fastFLIM est de 2.14 ± 0.05 ns ($n=21$). Une fois ce point vérifié, la fuite spectrale provoquée par ShadowG a été caractérisée. Pour cela, le tandem LSSmOrange-mKate2 a été co-exprimé avec les tandems mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH et mTFP1-ShadowG. Ces trois dernières constructions ont été exprimées avec un gradient de concentration de 0.25 à $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.25, 0.5, 0.75 et $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), tandis que le tandem LSSmOrange-mKate2 a été exprimé à une concentration de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les résultats sont présentés sous la forme d'un graphique de la durée de vie mesurée du tandem

LSSmOrange-mKate2 (canal orange) en fonction du ratio d'intensité de fluorescence mesurée dans le canal bleu sur celle mesurée dans le canal orange (Fig 2.21).

L'augmentation très rapide de la durée de vie mesurée dans le canal orange en présence du tandem mTFP1-EYFP est retrouvée lorsque la concentration de celui-ci est augmentée (2.47ns à 2.82ns avec des ratios d'intensité compris entre 0.4 et 2.67, Fig 2.21 croix). Une diminution de la durée de vie est mesurée dans le canal orange lorsque la concentration du tandem mTFP1-sREACH augmente (2.27ns à 2.15ns avec des ratios d'intensité compris entre 0.81 et 3.67, Fig 2.21 triangles). En présence de mTFP1-ShadowG, malgré l'augmentation de la concentration de ce tandem, la durée de vie mesurée dans le canal orange reste stable (environ 2.21ns sur des ratios d'intensité s'étalant de 0.81 à 3.67, Fig 2.21 carrés). Cette caractérisation montre que la protéine ShadowG réduit la fuite spectrale dans le canal orange.

Après cette observation, la protéine sREACH a été échangée par la protéine ShadowG sur le biosenseur EKAR^{sREACH}. Ce nouveau biosenseur avec mTFP1/ShadowG est appelé EKAR^{dual}. Toutes les conditions mesurées avec sREACH ont été effectuées avec ShadowG. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les biosenseurs EKAR^{sREACH} (mTFP1/sREACH) et EKAR^{dual} (mTFP1/ShadowG).

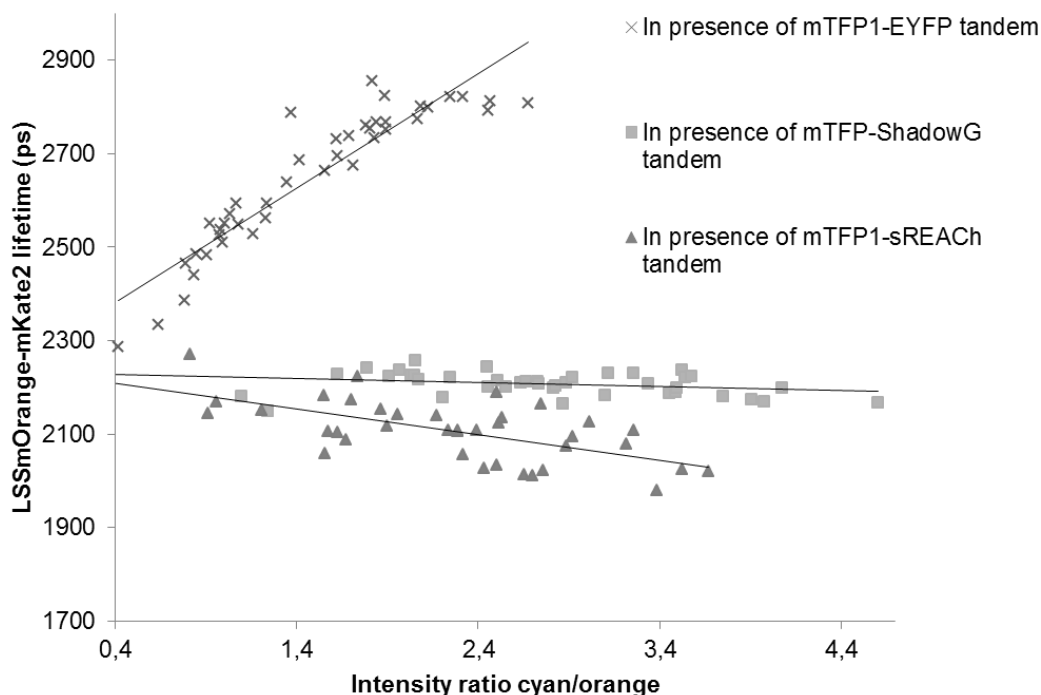


Fig 2.21 : Graphique représentant la durée de vie mesurée dans le canal orange en présence de mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH et mTFP1-ShadowG en fonction du ratio d'intensité du canal bleu sur le canal orange. En présence de mTFP-EYFP (croix), la durée de vie de LSSmOrange-mKate2 augmente fortement jusqu'à mesurer la durée de vie de EYFP dans le canal orange. En présence de mTFP1-sREACH (triangles), la durée de vie mesurée dans le canal orange diminue due à la fuite spectrale de sREACH (qui a une durée de vie de 0.32ns). En présence de mTFP1-ShadowG (carrés), la durée de vie mesurée de LSSmOrange-mKate2 reste stable (environ 2.21ns). Chaque courbe est ajustée par une régression linéaire.

En plus de l'activation et l'inhibition des deux voies, du suivi d'une des deux voies lorsque les deux biosenseurs sont exprimés dans les cellules ; une activation et une inhibition séquentielles des voies ERK et PKA ont été mesurées (Fig 2.22). Pour cette expérience, les deux biosenseurs sont co-exprimés dans des cellules HeLa et les acquisitions sont faites avec le système fastFLIM. Lorsque l'EGF (activateur de la voie ERK), une diminution de durée de vie des deux biosenseurs est mesurée (avec un $\Delta\tau$ de -43ps pour AKAR^{dual} et de -56ps pour EKAR^{dual} au temps t=16min), correspondant à l'activation des voies ERK et PKA. Après l'ajout de la Forskoline et d'IBMX, la durée de vie du biosenseur EKAR^{dual} augmente (avec un $\Delta\tau$ de -33ps au lieu de -56ps pour EKAR^{dual} au temps t=30min) confirmant l'activation transitoire de la voie ERK par l'EGF et la durée de vie du biosenseur AKAR^{dual} diminue encore (avec un $\Delta\tau$ de -69ps pour AKAR^{dual} au temps t=30min),

correspondant à l'activation plus importante de la voie PKA. Finalement, après le traitement à l'U0126 (inhibiteur de la voie ERK), la durée de vie du biosenseur EKAR^{dual} augmente jusqu'à un niveau basal (avec un $\Delta\tau$ de -4ps au lieu de -33ps pour EKAR^{dual} au temps t=44min), confirmant l'inhibition de la voie ERK, tandis que celle du biosenseur AKAR^{dual} reste stable (avec un $\Delta\tau$ de -63ps pour AKAR^{dual} au temps t=44min) correspondant à une activation continue de la voie PKA. Lorsque le traitement H89 (inhibiteur de la voie PKA) est effectué, une augmentation de durée des deux biosenseurs est mesurée (avec un $\Delta\tau$ de -15ps pour AKAR^{dual} et de +36ps pour EKAR^{dual} au temps t=64min), correspondant à l'inhibition des voies PKA et ERK. La réponse de la voie ERK n'est pas une surprise sachant que H89 n'est pas un inhibiteur spécifique de PKA, il a pour cible d'autres kinases comme les MEKs.

Grâce à cette expérience, il est intéressant d'observer les réponses individuelles des biosenseurs lorsque les voies ERK ou PKA sont stimulées ou non.

La méthodologie et les résultats obtenus avec ShadowG sont regroupés et expliqués dans le manuscrit suivant qui sera envoyé pour publication.

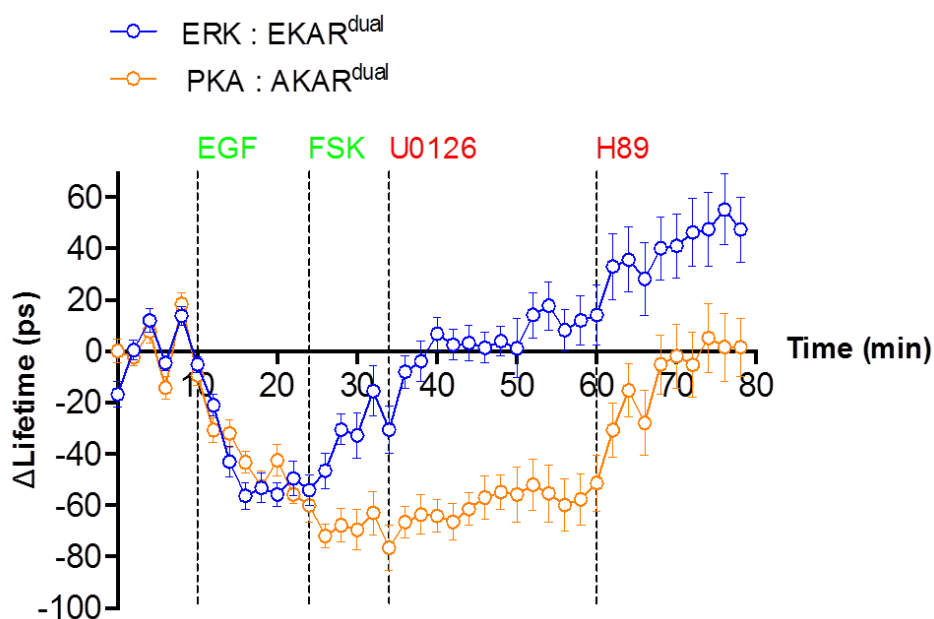


Fig 2.22 : Suivi spatio-temporel des activités kinases ERK (courbe bleue) et PKA (courbe orange) après activation et inhibition séquentielles (n=19 cellules). Après ajout de l'EGF, la durée de vie des deux biosenseurs diminue correspondant à l'activation des deux voies ERK et PKA. Après ajout de la Forskoline (+IBMX), la durée de vie du biosenseur EKAR^{dual} augmente confirmant l'activation transitoire de la voie ERK tandis que la voie PKA a une activation plus importante, la durée de vie diminue encore. Lors du traitement à l'U0126, la durée de vie augmente jusqu'au niveau basal correspondant à l'inhibition de la voie ERK alors que la voie PKA reste activée (la durée de vie reste stable). Après le traitement à l'H89, la durée de vie des deux biosenseurs augmente correspondant à l'inhibition des deux voies de signalisation. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). [EGF]=100ng/ml, [Fsk]=12,5 μ M, [IBMX]=75 μ M, [u0126]=20 μ M et [H89]=20 μ M.

1.3. Article

Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM.

Claire Déméautis^{1,2}, François Sipieter^{3,4,5}, Julien Roul^{1,2,7}, Catherine Chapuis^{1,2}, Sergi Padilla-Parra^{8,9}, Franck B. Riquet^{3,4,6} and Marc Tramier^{1,2,10}

Affiliations:

¹ CNRS, UMR 6290, Rennes, France

² Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, France

³ Molecular Signaling and Cell Death Unit, Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Ghent, Belgium.

⁴ Molecular Signaling and Cell Death Unit, Inflammation Research Center (IRC), VIB, Ghent, Belgium.

⁵ Equipe Biophotonique Cellulaire Fonctionnelle, Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM), CNRS-UMR 8523, Villeneuve d'Ascq, France.

⁶ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS-UMR 8576, Université Lille1, Villeneuve d'Ascq, France.

⁷ Present address: The Laboratory of Analysis and Architecture of Systems, University of Toulouse, 7, avenue du Colonel Roche BP 54200, 31031 Toulouse, France

⁸ Division of Structural Biology, University of Oxford, The Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, Headington, Oxford OX3 7BN, UK.

⁹ Cellular Imaging Core, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, UK

¹⁰ Microscopy Rennes Imaging Centre, Biosit, Université de Rennes 1, France

Corresponding authors:

Marc Tramier, marc.tramier@univ-rennes1.fr

and Franck Riquet, franck.riquet@irc.vib-ugent.be

Running title: Multiplex FRET by dual colour FLIM

Key words: mTFP1, ShadowG, LSSmOrange, mKate2, PKA, ERK, Crosstalk

Abstract

Monitoring of different signalling enzymes in a single assay using multiplex biosensing provides a multidimensional workspace to elucidate biological processes, signalling pathway crosstalk, and determine precise sequence of events at the single living cell level. In this study, we interrogate the complexity in cAMP/PKA-MAPK/ERK1&2 crosstalk by using multiparameter biosensing experiments to correlate biochemical activities simultaneously in time and space. Using a single excitation wavelength dual colour FLIM method we are able to detect fluorescence lifetime images of two donors to simultaneously measure PKA and ERK1&2 kinase activities in the same cellular localization by using FRET biosensors. To this end, we excite two FRET donors mTFP1 and LSSmOrange with a 440nm wavelength and we alleviate spectral bleed-through associated limitations with the very dim-fluorescent acceptor ShadowG for mTFP1 and the red-shifted mKate2 for LSSmOrange. The simultaneous recording of PKA and ERK1&2 kinase activities reveals concomitant EGF-mediated activations of both kinases in HeLa cells. In this situation the subsequent Forskolin-induced cAMP release reverses the transient increase of EGF-mediated ERK1&2 kinase activity while reinforcing PKA activation. Here we propose a validated methodology for multiparametric kinase biosensing in living cells using FRET-FLIM.

Introduction

External cues are integrated at the cellular level through a cascade of events that amplifies and transmits the incoming signal towards a specific outcome¹. To regulate intensity, duration and specificity of the response, a cell relies on several interconnected signal transduction pathways². This phenomenon, referred to as crosstalk, is defined by the orchestrated action of effector molecules to elicit a specific cellular response³. A typical example of signaling pathways crosstalk is that of cyclic adenosine monophosphate/protein kinase-A (cAMP/PKA) with the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1&2 (MAPK/ERK1&2)⁴.

The serine/threonine kinase ERK, one member of the MAPK family, propagates a variety of cellular activities depending on its spatiotemporal activation state. The MAPK cascade is composed of three-layers of kinases acting as a signalling relay: a MAPK kinase (Raf), a MAPK kinase (MEK) and a MAPK (ERK)⁵. Another layer of regulation of the pathway involves scaffold proteins as well as positive and negative feedbacks to control the duration, the magnitude and subcellular compartmentalization of ERK activity⁶⁻⁸. PKA is a serine/threonine kinase that forms a tetramer in its inactive state containing two regulatory (R) and two catalytic (C) units. Upon binding of cAMP to the two regulatory subunits, the two catalytic subunits dissociate from the holoenzyme and then become active⁹. Once activated, both PKA and ERK1&2 translocate into the nucleus to phosphorylate numerous downstream substrates. Although first described more than 20 years ago and well documented since, it is still intensively studied, as there are still some conflicting results and unresolved issues^{10,11}. In fact, combinatorial possibilities, expression patterns, activity profiles and spatiotemporal regulation of cell- and situation- specific effector molecules are complicating the analyses of dynamic signalling networks.

The best-characterized connections are PKA-dependent ERK activity modulation mediated by different Raf isoforms in different cell types¹¹. These differential effects are explained by the fact that Raf kinase family comprises different isoforms. These carry out non-redundant functions, are not ubiquitously found in all tissue, and can be expressed at different levels^{12,13}. PKA scaffold proteins such as the A-kinase anchoring proteins (AKAP) together with that of ERK1&2 named, kinase suppressor of Ras (KSR), can enhance cAMP control of the ERK1/2 cascade^{14,15} regulating PKA and ERK1&2 activation as well as phosphodiesterases (PDE) by controlling intracellular cAMP levels^{14,16}. Another connection is found at the level of PDEs, which terminate cAMP signalling by hydrolysing cAMP. PDEs that are directly targeted by ERK1&2¹⁷ were recently found to bind to and to regulate Raf-1 kinase¹⁸.

Such a level of complexity in cAMP/PKA-MAPK/ERK1&2 crosstalk calls for novel approaches. Genetically encoded Förster Resonance Energy Transfer (FRET) biosensors are powerful tools for monitoring spatiotemporal biochemical activities in living samples¹⁹. The main advantage of these tools is to monitor the amplitude, the duration and the localization of a biochemical activity during time-lapse fluorescence microscopy acquisition in living samples. Multi-parameter biosensing experiments have become essential to correlate biochemical activities during a dedicated cellular process. A very exciting challenge has thus been to follow several FRET biosensors in the same sample at the same time and location^{20–24}. Although simultaneous recording of multiple cellular events was managed, the multiplex FRET biosensors approaches suffer from two limitations: (i) a spectral bleed-through of the first acceptor in the second donor emission band dependent on biosensors concentration, and (ii) the multiple excitation wavelengths necessitate sequential acquisitions that are not optimal to follow simultaneously several biosensors. Here, we report on a method dealing with these different limitations for multiplexing genetically encoded FRET biosensors. We reasoned that single excitation wavelength combined with FRET-FLIM measurements could overcome such limitations. Taking advantage of the long stoke shift of Large Stoke Shift mOrange (LSSmOrange)²⁵, we have used a 440 nm single excitation wavelength for both donors, monomeric teal fluorescent protein (mTFP1) and LSSmOrange, and a dual colour fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to simultaneously measure signals from two genetically encoded FRET biosensors. We took advantage of dim-fluorescent acceptors; a yellow fluorescent protein (YFP)-based resonance energy accepting chromoprotein (sREACH) and its blue shift spectrum mutant (ShadowG)²⁶ for mTFP1, and the red-shifted mKate2²⁷ for LSSmOrange. Because ShadowG is darker than sREACH²⁶ (which is one hundred fold less fluorescent than YFP) the spectral bleed-trough between the two biosensors was reduced. We validated our approach by applying this methodology to simultaneously monitor, for the first time, two kinase activities at the same cellular location. MAPK/ERK1&2 and cAMP/PKA interplay in living HeLa cells was examined using EKAR2G²⁸ and AKAR4²⁹ biosensors respectively modified with mTFP1/ShadowG and LSSmOrange/mKate2 fluorescent protein pairs. We could report on EGF-mediated ERK1&2 and PKA activation in HeLa cells. The relevance of our methodology was clearly illustrated upon Forskolin-mediated increase in cAMP levels following EGF stimulation. In this context we could simultaneously record cAMP inhibitory effect on EGF-mediated ERK1&2 activity level together with its reinforcing of PKA activity.

Results

LSSmOrange is an appropriate FRET donor for mKate2 and can be simultaneously used with mTFP1 in single excitation wavelength dual colour FLIM.

To complement a conventional cyan FRET donor, we first searched for a second FRET donor that could also be excited at 440 nm but with a red-shifted emission spectrum to accommodate simultaneous acquisition of the two donors. We used Large Stoke Shift mOrange (LSSmOrange) that is excited at 440nm and emits in the orange at 572nm²⁵. To validate our choice, we needed to determine whether LSSmOrange was suitable for FRET-FLIM experiments. So fluorescence decay measurements in U2OS cells expressing LSSmOrange were performed by TCSPC. LSSmOrange fluorescence decay can be best fitted with a single exponential model, with a measured lifetime of 2.75 ± 0.07 ns (Figure 1A).

While mKate2 was already successfully used as an acceptor for LSSmOrange for intensity-based FRET studies²⁵, we verified that it is also the case for FRET-FLIM. LSSmOrange and LSSmOrange-mKate2 tandem plasmids were transfected in U2OS cells and cells subjected to FRET-FLIM measurements using both, time correlated single photon counting (TCSPC) and time gated FLIM systems³⁰. LSSmOrange-mKate2 tandem showed a faster decay compared to LSSmOrange alone (characteristic of the FRET process between both fluorophores (Figure 1A)). This difference in fluorescence decay indicates that mKate2 is an appropriate acceptor for LSSmOrange for FRET-FLIM studies. By using a bi-exponential model, we were able to quantify this decay with a FRET lifetime of 1.18 ± 0.12 ns and a fraction of donor exhibiting FRET (f_D) of 0.54 ± 0.02 . These values are similar to other validated FRET pairs for FLIM as Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)/mCherry ($f_D=0.51$) and mTFP1/EYFP ($f_D = 0.73$) with the same TCSPC method³¹.

Next, using the dual colour fastFLIM system combining the fastFLIM prototype³⁰ and a dual view system (see Methods for details), we confirmed that LSSmOrange fluorescence emission was only recorded in the orange channel and not in the blue channel (Figure 1B). In cells expressing the donor alone, we measured a mean fluorescence lifetime for LSSmOrange of 2.76 ± 0.03 ns (Figure 1B). But when expressed in tandem with mKate2 we measured a decreased mean lifetime of 2.32 ± 0.08 ns (Figure 1B), corresponding to a mean FRET efficiency of 0.16 (calculated using: $\text{pseudoE} = 1 - \langle \tau \rangle / \langle \tau \rangle_D$ where $\langle \tau \rangle_D$ relates to the lifetime of the donor alone³¹). Again here, quantitative comparison of LSSmOrange/mKate2 pair with the two other FRET pairs characterized for FRET-FLIM indicated an intermediate FRET efficiency higher than EGFP/mCherry pair (mean FRET efficiency of 0.09), but still lower than mTFP1/EYFP pair (mean FRET efficiency of 0.23)³¹. Actually, mTFP1³² used in the aforementioned study is an appropriate cyan donor for FRET by FLIM³¹.

Combining single excitation wavelength at 440nm with the cyan and orange channels of the dual colour FLIM set up, we measured mTFP1 and LSSmOrange fluorescence lifetimes expressed either alone or together in the same U2OS cells (Supplementary Figure S1). When expressed alone most of mTFP1 fluorescence emission was recovered in cyan channel. But, due to the large emission spectrum of mTFP1 (from 475nm to 525nm at half maximum), spectral bleed-through was detectable in the orange channel. It is noteworthy that mTFP1 fluorescence intensity levels were insufficient to determine a fluorescence lifetime in this channel. An average fluorescence lifetime of 2.62 ± 0.03 ns for mTFP1 was measured in the cyan channel, When LSSmOrange was expressed alone, as expected no signal was detectable in cyan channel and LSSmOrange average fluorescence lifetime measured in the orange channel was 2.76 ± 0.03 ns. Now, when both fluorescent proteins were co-expressed in U2OS cells, average fluorescence lifetimes were 2.62 ± 0.03 ns for mTFP1 and 2.76 ± 0.04 ns for LSSmOrange, in the cyan and the orange channel respectively. In spite of the mTFP1 spectral bleed-through in the orange channel, it did not pollute LSSmOrange lifetime determination. Our results indicate that these fluorescent proteins can be simultaneously used as donors in single wavelength excitation dual colour FLIM experiments.

ShadowG is an efficient dim-fluorescent FRET acceptor for mTFP1 to reduce acceptor spectral bleed-through in LSSmOrange channel when using dual colour FLIM.

Next, we co-expressed mTFP1-EYFP and LSSmOrange-mKate2 tandems in U2OS cell to determine whether both FRET acceptors, EYFP and mKate2, would be suitable with the single excitation wavelength dual colour FLIM approach (Supplementary Figure S2). Because of the concentration independence of lifetime measurement for a molecular specie, mTFP1 fluorescence lifetime was unaffected by the fluorescence intensity level and thus the amount of mTFP1 construct expressed in the cell. As expected, mTFP1 fluorescence lifetimes were unaffected by mTFP1-EYFP tandem expression levels (Supplementary Figure S2, cyan channel, lifetime images). Conversely a striking increase of 350ps in LSSmOrange fluorescence lifetime was calculated depending on mTFP1-EYFP fluorescence intensity (Supplementary Figure S2). While the mTFP1 spectral bleed-through did not affect the LSSmOrange fluorescence lifetime (Supplementary Figure S1), here the spectral bleed-through of EYFP in the LSSmOrange donor channel contributed to LSSmOrange fluorescence lifetime heterogeneity.

To overcome this problem, we took advantage of dim-fluorescent (“dark”) acceptors recently developed for FRET analysis^{26,33}. In FLIM, FRET is quantified by shortening of donor fluorescence lifetime, which requires an acceptor with a high molar absorption coefficient. However, for intramolecular FLIM-FRET measurements the brightness of the acceptor is not

relevant. So, we swapped, in our tandem constructs the EYFP acceptor with two different dim-acceptors: sREACH³³, a EYFP mutant, excited at 514nm or ShadowG²⁶, a sREACH mutant with a blue shift spectrum. ShadowG, which is excited at 470nm (same excitation spectrum as EGFP), is 114- and 18-fold dimmer than EYFP and sREACH respectively. Comparing fluorescence lifetime of mTFP1-EYFP, mTFP1-sREACH and mTFP1-ShadowG tandems with that of mTFP1 alone measured in U2OS cells indicated that, sREACH and ShadowG are also reliable acceptors for mTFP1 (Supplementary Figure S3). This was further confirmed by mean FRET efficiency values of 0.23, 0.22 and 0.18, for mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH and mTFP1-ShadowG tandems, respectively. Even if little amounts of spectral bleed-through was detected across all conditions (Supplementary Figure S3: second row of fluorescence intensity images), mTFP1-ShadowG turned out to be a good FRET-FLIM pair to be combined with LSSmOrange/mKate2 (Supplementary Figure S3: second row of fluorescence lifetime images), as we found similar bleed-through as compared to mTFP1 alone condition (Supplementary Figure S1 and S3).

To further investigate the effect of bleed-through in our dual FLIM set up, LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetime and potential associated spectral bleed-through signals in the orange channel were measured in cells spanning mTFP1-Yellow fluorescence expression with blue to orange intensity ratio ranging from 0.4 to 4.4 (Figure 2). In the presence of mTFP1-YFP, LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetime increased from 2.47ns to 2.82ns (Figure 2, crosses), representative images shown in Supplementary Figure S2. It decreased from 2.27ns to 2.15ns, In the presence of mTFP1-sREACH (Figure 2, triangle). Albeit slight, LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetime decreased for intensity ratio values spanning 0.81 up to 3.67 as represented by the linear regression. Even if spectral bleed-through of sREACH was really dim, the reported short sREACH fluorescence lifetime ($\tau_{sREACH}=0.32ns$) could provide an explanation³³ for this steady decrease in lifetime. Finally, in presence of mTFP1-ShadowG (Figure 2, squares), LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetimes measured in the orange channel were stable, $2.21\pm0.02ns$ ($n=40$), across intensity ratio ranging from 1.09 to 4.07. Here, we can conclude that, mTFP1-Yellow spectral bleed-through contribution to LSSmOrange fluorescence lifetime in the orange channel is extremely low with ShadowG compared to EYFP or sREACH.

So far, we have shown that LSSmOrange exhibits mono-exponential fluorescence decay and that mKate2 is a reliable acceptor for LSSmOrange. In single excitation dual colour FLIM-FRET measurements, LSSmOrange fluorescence lifetime was not affected by mTFP1 spectral bleed-through in the orange channel. More importantly, the use of ShadowG as acceptor for mTFP1 allows for consistent LSSmOrange fluorescence lifetime determination.

Taken together, we validated LSSmOrange/mKate2 and mTFP1/ShadowG FRET pairs, as best candidates for our single excitation wavelength dual colour FLIM methodology towards multiplexing genetically encoded FRET biosensors.

AKAR^{dual} and EKAR^{dual} validation for single excitation wavelength dual colour FLIM report on EGF-mediated PKA activation in HeLa cells.

As a proof of feasibility, we applied our approach to the simultaneous monitoring of two kinases, PKA and ERK1&2. Two main reasons motivated our choice. From the biological point of view, the interplay between cAMP/PKA and MAPK/ERK1&2 signaling pathways has long been established (for review¹¹). Both cascades modulate common cellular processes and multiple levels of crosstalk depending on the cellular type and the cellular context have been described^{10,11,15,34,35}. Because ERK1&2 is one of cAMP target associated with cell proliferation, emphasis has been on hormone-mediated cAMP/PKA effect on ERK1&2 activation. So, until recently³⁵, the GF-induced PKA activation effect has been less studied. From a biotechnological standpoint, we know from our own work³⁶ and that of others^{37,38} that modifying FRET pairs has an impact on the performance of KARs. Fortunately, both AKAR^{29,39,40} and EKAR^{28,41–43} have already passed few rounds of optimization, which steadily increased their respective performance^{28,29}. Accordingly, we anticipated that the effect of FRET pairs swapping on biosensors performances would not pre-empted kinase activity monitoring in living cells.

To test our methodology, we generated new versions of EKAR2G²⁸ and AKAR4²⁹, named EKAR^{dual} and AKAR^{dual}, that encode the following FRET pairs LSSmOrange/mKate2 and mTFP1/ShadowG, respectively. Standard biosensing reference experiments were carried out in HeLa cells expressing either AKAR^{dual} or EKAR^{dual} were performed using the dual colour-FLIM system. To verify biosensor appropriate behaviour and sensitivity, we first recorded single kinase activity profiles, upon dedicated activation and subsequent inhibition of either cAMP/PKA or ERK1/2 signalling pathways (Supplementary Figure S4). Forskolin/IBMX or EGF treatment resulted in a mean AKAR^{dual} and EKAR^{dual} fluorescence lifetime decrease characteristic of PKA and ERK1/2 pathway activation, which could be inhibited by either H89 or U0126, respectively. We could conclude from this first characterization step that AKAR^{dual} and EKAR^{dual} both exhibited the typical behaviour of the respective original biosensors^{28,29}.

To confirm that the spectral bleed-through had no impact on PKA kinase activity measurements, we crosschecked ERK1&2 and PKA kinase activity profiles by applying each dedicated biosensing reference experiments. HeLa cells transfected with both AKAR^{dual} and EKAR^{dual} were subjected to either forskolin/H89 or to EGF/U0126 treatment and both PKA

and ERK1&2 kinase activity profiles were recorded by single excitation wavelength dual colour FLIM (Figure 3). We have used a 3D representation for Δ Lifetime images to enhance the visualization of kinase activity variations. As expected, the cAMP-mediated PKA activation induced by forskolin resulted in a decrease of AKAR^{dual} fluorescence lifetime (Δ Lifetime of -40 ± 5 ps at $t=20$ min) while amounting to only mild effect on ERK1&2 activity (Δ Lifetime of -13 ± 5 ps at $t=20$ min). H89-mediated PKA inhibition counteracted the recorded PKA activation by an increase in AKAR^{dual} fluorescence lifetime back to the basal activity level (Δ Lifetime of -12 ± 10 ps at $t=60$ min) (Figure 3A). When monitoring ERK1&2 and PKA kinase activities upon EGF/U0126 treatment (Figure 3B), EKAR^{dual} presented its characteristic behaviour. First a decrease and then an increase of EKAR^{dual} fluorescence lifetime were measured upon EGF (Δ Lifetime of -59 ± 5 ps at $t=20$ min) and subsequent U0126 treatment (Δ Lifetime of -7 ± 11 ps at $t=60$ min), respectively. Interestingly, an increase of PKA activity was also recorded in response to EGF, as witness by the marked decrease of fluorescence lifetime for AKAR^{dual} (Δ Lifetime of -49 ± 4 ps at $t=20$ min), which was barely affected by U0126 treatment (Δ Lifetime of -34 ± 10 ps at $t=60$ min).

This confirmed earlier report showing an EGF-mediated PKA activity increase in mammalian cells ^{44,45}. In light of this, we performed two additional sets of experiments to confirm the EGF-mediated PKA activation in HeLa cells. The first, performed on the dual colour FLIM system in AKAR^{dual} expressing HeLa cells validated the previously observed response shown in Figure 3; a decrease of AKAR^{dual} mean fluorescence lifetime upon EGF treatment (Δ Lifetime of -41 ± 9 ps at $t=20$ min) symptomatic of an increase of PKA activity which was unaffected by U0126 treatment (mean Δ Lifetime from $t=42$ min to $t=60$ min of -53 ± 3 ps) (Figure 4). The second, using the original AKAR4 (Cerulean/cpVenus) biosensor ²⁹ and ratiometric FRET measurements also confirmed the EGF-mediated PKA activation in HeLa cells (Supplementary Figure S5). One could ask how this EGF-mediated PKA activation might shape ERK1&2 kinase activity in HeLa cells.

cAMP inhibition of EGF-mediated ERK1&2 activity is uncoupled from PKA activity level.

Aware that different modes of cAMP and PKA activation can lead to contradictory effect on ERK1&2, we finalized our study by exploring the effect of cAMP- versus EGF-induced PKA activation on ERK1&2 activity modulation. Using HeLa cells co-expressing AKAR^{dual} and EKAR^{dual}, we simultaneously monitored PKA and ERK1/2 activities by single excitation wavelength dual colour FLIM, upon co-activation and co-inhibition of both signalling pathways (Figure 5). EGF-mediated ERK1&2 and forskolin-mediated-cAMP-dependent PKA activations resulted in an almost concomitant activation of both PKA and ERK1&2, peaking

around 8 minutes after stimulation (Δ Lifetime of -58 ± 8 ps for EKAR^{dual} and -71 ± 6 ps for AKAR^{dual} at $t=18$ min). However, ERK1&2 activation profile upon combined forskolin and EGF stimulations was somewhat different from that of EGF treatment alone (Figure 3B and Supplementary Figure S4B). Indeed, it resulted in a more transient ERK1&2 activation (Δ Lifetime of -34 ± 12 ps at $t=30$ min), while PKA activity remained relatively stable until H89 inhibitor treatment (Δ Lifetime of -62 ± 9 ps at $t=30$ min), as previously shown (Figure 3A and Supplementary Figure S4A). While dual pathway inhibitions produced the symptomatic decrease in both PKA and ERK1&2 kinase activities, note that in these experimental conditions the inhibition reverted both kinase activity levels beyond baseline levels (Δ Lifetime of 51 ± 20 ps for AKAR^{dual} and Δ Lifetime of 57 ± 23 ps for EKAR^{dual} at $t=60$ min). We show a cAMP-mediated reversal on EGF-mediated ERK1&2 activity increase. Compelling evidences demonstrated that the ERK1&2 cascade is regulated by cAMP/PKA pathway (for review¹⁰). This crosstalk was reported to modulate the duration and the strength of ERK1/2 activity³⁵, mainly in a Raf-isoform-dependent manner¹¹.

To overcome problems with competition or synergistic effects with activator and inhibitors, we proceeded with a different treatment protocol. EGF and then Forskolin/IBMX stimulations, followed by U0126 and then H89 inhibitions were successively applied (Figure 6). EGF stimulation resulted in concomitant ERK1&2 and PKA activations (Δ Lifetime of -43 ± 4 ps for AKAR^{dual} and -56 ± 5 ps for EKAR^{dual} at $t=16$ min) as previously measured. The subsequent Forskolin/IBMX treatment potentiated PKA activation (Δ Lifetime of -69 ± 8 ps for AKAR^{dual} at $t=30$ min) while reverting ERK activation (Δ Lifetime of 33 ± 9 ps for EKAR^{dual} at $t=30$ min) in a manner comparable to what was initially observed with the combined EGF/Forskolin stimulation (Figure 5). Upon U0126 treatment, ERK1&2 activity returned to basal level (Δ Lifetime of -4 ± 8 ps at $t=38$ min), without affecting PKA activity (Δ Lifetime of -63 ± 8 ps at $t=38$ min). Only addition of H89, precipitated PKA activity back to basal level (Δ Lifetime of -15 ± 10 ps at $t=64$ min) and further decreased ERK1&2 activity levels (Δ Lifetime of 36 ± 13 ps at $t=64$ min) due to H89 off target effects. This come to no surprise with respect to the known multifaceted pharmacology of H89 that has also been reported to inhibit other kinases including the mitogen activated protein kinase kinase-1 (MEK1)⁴⁶. The simultaneous recording of PKA and ERK1&2 kinase activities revealed concomitant EGF-mediated activations of both kinases in HeLa cells. In this situation the subsequent Forskolin-induced cAMP release reversed the transient increase of EGF-mediated ERK1&2 kinase activity while reinforcing PKA activation.

This last set of experiments confirmed that we were able to monitor two kinases activity profiles modulated by different stimulus, with no lag time or spatial distribution discrimination.

Importantly, if the spectral bleed-through would have been of hill effect, we would never have been able to measure such independent variations of PKA and ERK1&2 signalling pathways. Overall, we confirm that our methodology is well adapted for multiplexing of genetically encoded FRET biosensor.

Discussion

Here we report on the validation of a multiplexing approach to follow two genetically encoded FRET-based kinase activity reporters at the same time in the same sample and in the same cellular compartment. Commonly, FRET is measured by the fluorescence intensity ratio of the acceptor to the donor. In that case, whatever the two fluorescent protein FRET pairs chosen, CFP/YFP and mOrange/mCherry²¹, mTFP1/mCitrine and mAmetrine/tdTomato^{22,23}, mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKok²⁴, the multiplex approach suffers from two limitations: (i) a spectral bleed-through of the first acceptor in the second donor emission band that depends directly from the respective quantities of the two biosensors and (ii) the multiple excitation wavelength which requires sequential acquisition that is not adequate to follow fast signal dynamics or signal changes in highly motile sample.

To overcome the first limitation, a meroCBD biosensor modified with a far red organic fluorophore (Alexa750) was used for probing Cdc42 simultaneously with a genetically encoded CFP/YFP FRET-based biosensor for Rho A⁴⁷. This approach prevents spectral bleed-through but cannot be generalized to all genetically encoded FRET biosensors where organic fluorophores are not easily usable to replace fluorescent proteins. Recently, an elegant method based on linear unmixing of 3D excitation/emission fingerprints applied to three biosensors simultaneously was published⁴⁸. This type of approach based on image calculation is often limited by the different biosensors expression level and a poor signal to noise ratio after complex image corrections. In our approach, we use FLIM instead of ratio imaging to measure FRET. When FRET occurs, donor fluorescence lifetime decreases. The method requires measurement of the donor fluorescence only and is independent of emission from the acceptor. Thus we can use a dim-fluorescent acceptor such as ShadowG to overcome the problems of spectral bleed-through. Other multiplex studies were carried out utilizing FLIM. By using CFP and YFP as donor and the same red acceptor (tHcRed), FLIM of CFP and YFP donor allows distinguishing the two different FRET signals⁴⁹. Combination of FLIM-FRET of a red-shifted TagRFP/mPlum pair with ratio imaging of a CFP/Venus pair allows maximizing the spectral separation while at the same time overcoming the low quantum yield of the far-red acceptor mPlum⁵⁰. Actually, in these two last examples the spectral bleed-through was alleviated but not the limitation associated to the multiple excitations.

To overcome the second limitation, the two FRET pairs CFP/YFP and Sapphire/RFP in combination with a single violet excitation were used⁵¹ resulting in no lag time in biochemical activity recording. But again in this case the spectral bleed-through and excitation crosstalk necessitates linear unmixing. Another interesting approach for multiplexing two FRET activities was developed by Schervakova and co-workers, where a large Stokes shift orange fluorescent protein (LSSmOrange) was used. The authors combined a CFP-YFP together

with LSSmOrange-mKate2 biosensors enabling imaging of apoptotic activity and calcium fluctuations in real time using intensity-based methods²⁵. Note that in this work, apoptotic activity was monitored by cleaved FRET biosensor giving a 0-1 answer different to conformational FRET biosensor where quantification is required. In our method, we also take advantage of CFP like protein together with LSSmOrange to be able to use a single 440nm excitation. Moreover, because we combine it with dual colour FLIM approach, we are also able to significantly reduce the EYFP like spectral bleed-through in LSSmOrange channel by using dim-fluorescent acceptor such as ShadowG. Our approach overcomes both limitations in the multiplexing experiments using one excitation wavelength for two FRET fluorescent protein pairs, and reducing the spectral bleed-through between biosensors by using ShadowG as acceptor for mTFP1.

In a second part we wanted to assess whether our methodology would be a reliable one towards multiparametric biosensing. Because the study of the intricate relationship between cAMP/PKA and MAPK/ERK1&2 signal transduction pathways regularly provides new mechanistic insights^{15,18,35}, we opted for it as a structured and defined playground for application purposes.

Our results using EKAR^{dual} and AKAR^{dual} clearly reflect the complexity of cAMP/PKA-MAPK/ERK1&2 interconnections. This crosstalk is usually presented from the following perspective: how does cAMP/PKA modulate MAPK/ERK1&2 activity¹¹. Besides hormones receptors signalling effects on PKA, GF-induced PKA activation were also long reported⁵², with a keen interest for PKA implication in tumour biology⁵³.

Our first observation, using single excitation wavelength dual colour FLIM with specifically optimized PKA and ERK1&2 kinase activity reporters, is an EGF-mediated PKA activation concomitant to that of ERK1&2 in the cervical cancer HeLa cell line. The reported PKA-R1 subunit preponderance in cancer cells and its direct interaction with the EGFR via the Gbr2 adaptor protein⁵³ together with recent evidences of PKA-C α subunit phosphorylation by RTKs⁴⁴ can explain our observation. In addition, scaffolds proteins such as AKAP-Lbc and KSR-1, that were reported to favour discrete localizations of both PKA and ERK1&2 generating pockets of concentrated enzyme activities, were shown to provide platforms for mitogenic signal amplification¹⁵. Actually, compartmentalized GF-induced PKA activation modulating the features of ERK1&2 kinase activity was recently illustrated in an elegant study from Zhang's group investigated³⁵. While monitoring of compartmentalized PKA and ERK1&2 enzyme activities was beyond the scope of our study, it could now be performed in a multiplex manner thus maximizing crosstalk relevance at the single living cell level.

Raf isoforms expression levels were shown to be implicated in the various responses exerted by cAMP/PKA on MAPK/ERK1&2 signalling⁵⁴. Differences in ERK1&2 kinase activity

mainly result from the differential activation of either Ras/C-Raf-1/MEK/ERK or Rap1/B-Raf/MEK/ERK¹¹. Activation of the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) upon cAMP increasing levels triggers activation of Rap1 and sustained activation of B-Raf/MEK/ERK pathway⁵⁵. By contrast, cAMP-mediated PKA activation is generally known to directly inhibit C-Raf-1 mediated by AKAP preventing over-activation of cAMP-mediated ERK1&2 pathway. Our second observation would be in line with the latter since forskolin-induced cAMP levels increase reverted activation of EGF-mediated ERK1&2 while reinforcing PKA activity. But cAMP was reported to either inhibit C-Raf-1 or activate B-Raf. Therefore, cells expressing low B-Raf level will preferentially impair mitogenic signals in response to cAMP release. Actually, B-Raf kinase activity level has been found to be low in HeLa cells relative to A-Raf, while being intermediate for C-Raf-1⁵⁶. Thus, in HeLa cells, MEK/ERK1&2 signalling upon a mitogenic stimulation is mainly mediated by A-Raf. Actually, A-Raf triggers a MEK-1 dependent ERK1&2 activation upon EGF-treatment⁵⁷ with a known ERK1&2 nuclear translocation. Using the recently published ERK2-LOC translocation reporter⁵⁸ and a similar ERK1-LOC would be an elegant way to control whether the observed EGF-mediated ERK1&2 activation is A-Raf/MEK1 dependent. Although cAMP/PKA-mediated A-Raf regulation remains unclear, it is generally agreed that the target of cAMP is C-Raf-1². How and if PKA activity can contribute to both EGF-mediated ERK1&2 activation and Forskolin-induced reversal of EGF-mediated ERK1&2 kinase inhibition remains unanswered in this cellular context. Other possible explanations arise from recent studies involving a PDE isoforms (PDE8A), which associates with C-Raf to protect it from inhibitory phosphorylation by PKA¹⁸. This actually enhances C-Raf to stimulate ERK1&2 cascade. Another connection with MAPK/ERK1&2 at the PDEs level should be mentioned. Indeed, ERK2 was reported to phosphorylate the C-terminal catalytic domain of several PDEs¹⁷. Taken together one might speculate whether EGF- and cAMP-mediated exert different modus of active PKA.

Our methodology provides evidence of the relevance of a multidimensional kinase activity profiling in living cells. Indeed, we have depicted here a process where simultaneously ERK1&2 and PKA kinases activities recordings in HeLa cells were successfully carried out. Results obtained at the single living cell level, within the same cell, and at the same time provide a glimpse of how cells integrate in real-time external cues upon dual signalling pathways engagement. Questions raised from such multidimensional biochemical activities profiling pave the way for future experiments aiming at untangling signalling crosstalk.

As a perspective, since FLIM is adequate for quantitative intermolecular FRET⁵⁹, our approach is easily transposable to study protein-protein interactions. Additionally, the possibility to expand our method to three biosensors could be achieved by using a non-

fluorescent acceptor for LSSmOrange and a third large stoke shift donor such as LSSmKate⁶⁰ in combination with an infra-red acceptor such as IRFP670⁶¹.

Methods

Reagents

Human epithelial growth factor (EGF, #E9644), MEK inhibitor (U0126, #U120) and dimethylsulfoxide (DMSO, #D8418) were purchased from Sigma Aldrich. Forskoline (Fsk, #1099), an adenylate cyclase activator responsible for cAMP production, PKA inhibitor (H89 dihydrochloride, #2910) and phosphodiesterase inhibitor (IBMX, #2845) were purchased from Tocris.

Plasmids

GFP-sREACH (mGFP-10-sREACH-N3 from Dr Ryohei Yasuda, Addgene plasmid # 21947) and mTFP1 vectors were digested with *NheI* and *BamHI*. mTFP1 fragment was inserted into the corresponding restriction sites in the GFP-sREACH (-sREACH) vector to create the new vector mTFP-sREACH. EGFP-Shadow (was gift from Dr Murakoshi, National Institute for Physiological Sciences, Japan) and mTFP1-sREACH vectors were digested with *BamHI* and *NotI*. ShadowG fragment was inserted into the corresponding restriction sites in the mTFP1-sREACH (mTFP1/-) vector to create the new vector mTFP1-ShadowG. LSSmOrange (pLSSmOrange-C1 from Dr Vladislav Verkhusha, Addgene #37130 plasmid) was inserted in EGFP-C3 vector by digestion with *AgeI* and *BsrGI* to create a new vector LSSmOrange-C3. LSSmOrange-C3 generated is used to insert LSSmOrange in mKate2-N plasmid (from Dr Sergi Padilla-Parra) by digestion with *NdeI* and *BamHI* to create a new vector LSSmOrange-mKate2. FRET biosensor plasmid EKAR2G (monomeric Teal Fluorescent Protein (mTFP1)/Venus, Addgene plasmid #39813) was a gift from Dr. Olivier Pertz (Department of Biomedicine, University of Basel, Switzerland). AKAR4 plasmid was kindly provided by Dr. Jin Zhang (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA). EKAR2G (mTFP1/Venus) vector was digested with *NotI* and *KpnI* to release the Venus insert generating the EKAR2G (mTFP1/-) vector. ShadowG plasmid was a gift from Dr Murakoshi (National Institute for Physiological Sciences, Japan). ShadowG coding sequence was amplified from the ShadowG plasmid using the forward primer ShadowG.NotI (NotI site underlined) and the reverse primer ShadowG.KpnI (KpnI site underlined). ShadowG coding sequence was then inserted into the corresponding restriction sites in the EKAR2G (mTFP1/-) backbone in frame with EKAR2G Molecular Recognition Element (MRE) and the upstream mTFP1 fluorescent protein to create the new expression vector EKAR^{dual} (mTFP1/ShadowG). AKAR4 (Cerulean/cpVenus) vector was digested to remove sequentially Cerulean (*BamHI* and *SphI*) and cpVenus (*SacI* and *EcoRI*) inserts. LSSmOrange and mKate2 fluorescent proteins were then amplified from pLSSmOrange-C1 (from Dr Vladislav Verkhusha, Addgene plasmid # 37131) and pmKate2-N1 (from Dr Sergi Padilla-Parra) respectively using the following primers pairs

(forward/reverse): LSSmOrange.BamHI-F/ LSSmOrange.SphI-R and LSS-mKate2.SacI-F/mKate2.EcoRI-R. LSSmOrange and mKate2 PCR products were subsequently sub-cloned into the corresponding restriction sites in the AKAR4 (-/cpVenus) and AKAR4 (LSSmOrange/-) backbones respectively in frame with the AKAR4 MRE to create the new expression vector AKAR4^{dual} (LSSmOrange/mKate2). All resulting constructs were verified by restriction digestion onto agarose gel electrophoresis and then validated by sequencing (VIB for AKAR4 derivatives and IGDR for EKAR2G derivatives). All enzymes and buffers were purchased from New England Biolabs. Oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (Belgium) and Sigma-Aldrich (France) AKAR4 and EKAR2G, respectively. DNA fragments were all purified on Qiagen plasmid purification columns (#28106, #28706 and # 27106, Qiagen).

Cell Culture and Transfection

HeLa cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (UK) and U2OS cells were a gift from Dr Gyula Timinszky (LMU, Munchen, Germany). HeLa and U2OS cells were maintained at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, #E15-009, PAA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, #A15-101, PAA), 1% penicillin/streptomycin (P/S, #15140-122, Gibco, Life Technologies) and 1% L-Glutamine (Glu, #25030024, Gibco, Life Technologies). For live cell imaging, cells were seeded on Lab-Tek 4 wells (#055078, Dominique Dutscher) at 60% confluence 24h before transfection on day 1. On day 2, transfections were carried out using JetPrime reagent (#114-15, Polyplus) according to the manufacturer's instructions. After 4h of incubation with the transfection mixture, medium was replaced by 400µl per well of culture medium composed of FluoroBrite phenol red-free medium (#A18967-01, Life Technologies) containing 0.1% FBS for overnight starvation. For experiment relating to Figure 2, U2OS cells were transfected with 0.5µg/well of LSSmOrange-mKate2 plasmid, and 0.25, 0.5, 0.75, and 1µg/well of the different mTFP1-Yellow plasmids, in order to generate cells with an array of tandem constructs expression levels.

Imaging for biosensing experiments

For cell treatments, activators or inhibitors were diluted in pre-heated FluoroBrite medium in a final volume of 100µl and were carefully added to the well. Concentration used: [DMSO]=1/1000, [Fsk]=12,5µM, [IBMX]=75µM, [H89]= 20µM, [EGF]=100ng/ml, and [U0126]= 20 µM. Standard protocol for biosensing experiment was as follow. Cells were positioned on the microscope stage 30 min before the beginning of each experiment. The first 10 minutes of imaging where cells were untreated provided basal kinases activity levels (correspond to baseline phase). Upon signalling pathways activation, images were acquired

for a 30 minutes period, which was prolonged of 20 minutes upon signalling inhibitor. Images were acquired at 2 minutes interval.

FRET imaging

FLIM-FRET experiments: For the characterization of LSSmOrange fluorescence lifetime, we used a time correlated single photon counting (TCSPC) system. This system, a confocal microscope Leica SP8 (Manheim, Germany), is equipped with single molecule detection (SMD) module based on Picoquant hardware (Berlin, Germany). Briefly, a 440nm diode pulsed laser at 40MHz repetition rate is fiber-coupled to the confocal head of an inverted microscope with a 63x or 40x oil immersion objective (NA = 1.4 or 1.30 respectively) and the fluorescence emission after passing through pinhole set at 1 Airy unit is directed to the external port connected to a two colour coupling module with a dichroic mirror of 505nm splits the fluorescence in two channels with 480/30 nm and 579/34nm band pass filters. Two optical fibres are used to couple two single-photon avalanche diode (SPAD) detectors; photon counting detector (MPD from PDM) module for the cyan channel and a red sensitive SPAD (TauSPAD from Picoquant) for the orange channel used as Single Photon Counting detectors. A PicoHarp 300 is used for Time-Correlation and for image reconstruction using scanning signals to recover FLIM images (time-tagged time resolved (TTTR) method). Lifetime value from cell to cell was determined by fitting the fluorescence decay of the whole cell Region Of Interest with a single exponential model.

For single excitation wavelength dual colour FLIM system we used our FastFLIM system. This FLIM system equipped with a pulsed white light laser tuned at 80Mhz coupled to a live cell fluorescence microscope and dual colour emission coupled to a FLIM detection previously described in ³⁰. After wavelength selection of the supercontinuum at 440nm (with about 10 nm narrow band of excitation), the laser is coupled to a multifocal spinning disk CSUX1 (Yokogawa, Japan) and cells were imaged using a 63x or 20x oil immersion objective (NA = 1.4 or 0.70 respectively). At the emission side, a Dual View (DV2 multichannel imaging system, Photometrics, USA) was used to split the field of view of the camera in two colours, using a dichroic mirror at 505nm splitting the fluorescence emission in two channels: 480/30nm and 579/34nm band pass filters. Then the fluorescence image was directed to a High Rate Intensifier (Picostar, LaVision, Germany) coupled to a charged coupled device (CCD) camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, USA). Five time-gated images of 2ns gate width were sequentially acquired (using 100 to 300ms exposure time depending on the intensity of the sample) with different delays relative to the pulsed laser (from 0 to 8ns). The time-gated stack of 5 images was then used for direct calculation of mean fluorescence lifetime in a pixel by pixel basis ⁶².

Ratiometric FRET experiments: For sensitized emission measurements of AKAR4 biosensor in HeLa cells wide-field images were captured with a Nikon TiE inverted microscope with a 20x 0.5NA objective and a DS-Qi2 CMOS camera (Nikon, Japan). Images were acquired at intervals of 2 min with the Nikon NIS-Elements acquisition software using JOBS module (Nikon, Japan). A Lumencor Spectra X LED Light Engine (Lumencor, Beaverton, OR, USA) was used as excitation light source to reduce phototoxicity. Ratio imaging used a 440/30nm excitation filter, a t440/510/575rpc multi-band dichroic mirror, and two emission filters (ET480/40M (cyan fluorescent protein: CFP) and AT545/30M (FRET)). Lumencor provided excitation filters, and all dichroic mirrors and emission filters were obtained from Chroma Technology (Brattleboro, VT, USA). An automated emission filter wheel Lambda 10-B Smart Shutter (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) was used. The F480/F545 emission ratio, indicative of biosensor activation, calculated for each pixel on the whole image, was performed with custom routines written in IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Normalized F480/F545 emission ratio values were then plotted in PrismV (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) and displayed in two ways: cell trace for each individual cell (grey) overlaid with the population mean in red and the 25th and 75th percentile values in blue.

Data analysis

For the TCSPC analysis, Symphotime software (Picoquant, Berlin, Germany) was used to analyze our imaging data. The channel 1 (cyan channel) or 2 (orange channel) was selected. Regions of Interest on different cells were fitted using a single or a double-exponential decay.

The fastFLIM system produces an intensity image from the first time-gated image and a lifetime image from the calculation of the direct first order temporal mean of the recorded decay ($\langle \tau \rangle = \sum t_i I_i / \sum I_i$ where t_i and I_i correspond to the correlated time and the intensity of the time-gated channel I , respectively). Manual segmentation of the different cells was carried out to recover the mean lifetime at different time points of the experiments.

Bibliography :

1. Hunter, T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **100**, 113–127 (2000).
2. Dumaz, N. & Marais, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on The Anniversary Prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* **272**, 3491–3504 (2005).
3. Ubersax, J. A. & Ferrell Jr, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 530–541 (2007).
4. Houslay, M. D. & Kolch, W. Cell-Type Specific Integration of Cross-Talk between Extracellular Signal-Regulated Kinase and cAMP Signaling. *Mol. Pharmacol.* **58**, 659–668 (2000).
5. Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291–3310 (2007).
6. Fujita, Y., Komatsu, N., Matsuda, M. & Aoki, K. Fluorescence resonance energy transfer based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in epidermal growth factor receptor signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *FEBS J.* **281**, 3177–92 (2014).
7. Witzel, F., Maddison, L. & Blüthgen, N. How scaffolds shape MAPK signaling: what we know and opportunities for systems approaches. *Front. Physiol.* **3**, (2012).
8. Ebisuya, M., Kondoh, K. & Nishida, E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.* **118**, 2997–3002 (2005).
9. Taylor, S. S. *et al.* Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1754**, 25–37 (2005).
10. Stork, P. J. S. & Schmitt, J. M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology* **12**, 258–266 (2002).
11. Gerits, N., Kostenko, S., Shiryayev, A., Johannessen, M. & Moens, U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cell. Signal.* **20**, 1592–1607 (2008).
12. Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 875–885 (2004).
13. Gerits, N., Kostenko, S. & Moens, U. In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res.* **16**, 281–314 (2007).
14. Smith, F. D., Langeberg, L. K. & Scott, J. D. The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 316–323 (2006).
15. Smith, F. D. *et al.* AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1242–1249 (2010).
16. Conti, M. & Beavo, J. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. <http://dx.doi.org.gate1.inist.fr/10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444> (2007).
17. Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., McPhee, I. & Houslay, M. D. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 811–9 (2000).
18. Brown, K. M. *et al.* Phosphodiesterase-8A binds to and regulates Raf-1 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1533–42 (2013).

19. Hochreiter, B., Garcia, A. P. & Schmid, J. A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Basel)*. **15**, 26281–314 (2015).
20. Carlson, H. J. & Campbell, R. E. Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 19–27 (2009).
21. Piljic, A. & Schultz, C. Simultaneous recording of multiple cellular events by FRET. *ACS Chem. Biol.* **3**, 156–160 (2008).
22. Ai, H., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. & Campbell, R. E. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nat. Methods* **5**, 401–403 (2008).
23. Ding, Y., Ai, H. W., Hoi, H. & Campbell, R. E. Förster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Anal. Chem.* **83**, 9687–9693 (2011).
24. Su, T., Pan, S., Luo, Q. & Zhang, Z. Monitoring of dual bio-molecular events using FRET biosensors based on mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKO?? fluorescent protein pairs. *Biosens. Bioelectron.* **46**, 97–101 (2013).
25. Shcherbakova, D. M., Hink, M. A., Joosen, L., Gadella, T. W. J. & Verkhusha, V. V. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7913–7923 (2012).
26. Murakoshi, H., Shibata, A. C. E., Nakahata, Y. & Nabekura, J. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer. *Sci. Rep.* **5**, 15334 (2015).
27. Shcherbo, D. *et al.* Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.* **418**, 567–574 (2009).
28. Fritz, R. D. *et al.* A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal.* **6**, rs12 (2013).
29. Depry, C., Allen, M. D. & Zhang, J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol. Biosyst.* **7**, 52–58 (2011).
30. Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., H??liot, L. & Tramier, M. 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS One* **8**, (2013).
31. Padilla-Parra, S. *et al.* Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition. *Biophys. J.* **97**, 2368–2376 (2009).
32. Ai, H., Henderson, J. N., Remington, S. J. & Campbell, R. E. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem. J.* **400**, 531–40 (2006).
33. Ganesan, S., Ameer-Beg, S. M., Ng, T. T. C., Vojnovic, B. & Wouters, F. S. A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Förster resonance energy transfer with GFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4089–4094 (2006).
34. Sengupta, N., Vinod, P. K. & Venkatesh, K. V. Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate FLO11 expression. *Biophys. Chem.* **125**, 59–71 (2007).
35. Herbst, K. J., Allen, M. D. & Zhang, J. Spatiotemporally regulated protein kinase a activity is a critical regulator of growth factor-stimulated extracellular signal-regulated kinase signaling in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4063–4075 (2011).
36. Vandame, P. *et al.* Optimization of ERK Activity Biosensors for both Ratiometric and

- Lifetime FRET Measurements. *Sensors* **14**, 1140–1154 (2014).
37. Komatsu, N. *et al.* Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4647–4656 (2011).
 38. Fritz, R. D. *et al.* A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal.* **6**, rs12 (2013).
 39. Allen, M. D. & Zhang, J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 716–721 (2006).
 40. Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S. S. & Tsien, R. Y. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14997–15002 (2001).
 41. Harvey, C. D. *et al.* A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19264–19269 (2008).
 42. Komatsu, N. *et al.* Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4647–56 (2011).
 43. Vandame, P. *et al.* Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements. *Sensors (Basel)*. **14**, 1140–1154 (2013).
 44. Caldwell, G. B. *et al.* Direct modulation of the protein kinase a catalytic subunit alpha by growth factor receptor tyrosine kinases. *J Cell Biochem* **113**, 39–48 (2011).
 45. Fishman, D., Galitzki, L., Priel, E. & Segal, S. Epidermal growth factor regulates protein kinase A activity in murine fibrosarcoma cells: Differences between metastatic and nonmetastatic tumor cell variants. *Cancer Res.* **57**, 5410–5415 (1997).
 46. Murray, A. J. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci. Signal.* **1**, re4 (2008).
 47. Machacek, M. *et al.* Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99–103 (2009).
 48. Woehler, A. Simultaneous Quantitative Live Cell Imaging of Multiple FRET-Based Biosensors. *PLoS One* **8**, (2013).
 49. Peyker, A., Rocks, O. & Bastiaens, P. I. H. Imaging activation of two Ras isoforms simultaneously in a single cell. *ChemBioChem* **6**, 78–85 (2005).
 50. Grant, D. M. *et al.* Multiplexed FRET to image multiple signaling events in live cells. *Biophys. J.* **95**, L69–71 (2008).
 51. Niino, Y., Hotta, K. & Oka, K. Simultaneous live cell imaging using dual FRET sensors with a single excitation light. *PLoS One* **4**, (2009).
 52. Bornfeldt, K. E. & Krebs, E. G. Crosstalk Between Protein Kinase A and Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Arterial Smooth Muscle. *Cell. Signal.* **11**, 465–477 (1999).
 53. Ciardiello, F. & Tortora, G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **4**, 821–8 (1998).
 54. O'Neill, E. & Kolch, W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br. J. Cancer* **90**, 283–8 (2004).
 55. Wang, Z. *et al.* Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2130–45 (2006).
 56. McPhillips, F. *et al.* Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 729–39 (2006).

57. Wu, X., Noh, S. J., Zhou, G., Dixon, J. E. & Guan, K. L. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 3265–71 (1996).
58. Sipierter, F. *et al.* Novel Reporter for Faithful Monitoring of ERK2 Dynamics in Living Cells and Model Organisms. *PLoS One* **10**, e0140924 (2015).
59. Padilla-Parra, S. & Tramier, M. FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays* **34**, 369–376 (2012).
60. Piatkevich, K. D. *et al.* Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5369–74 (2010).
61. Shcherbakova, D. M. & Verkhusha, V. V. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods* **10**, 751–4 (2013).
62. Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisán, M. & Tramier, M. Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells. *Biophys. J.* **95**, 2976–2988 (2008).

Acknowledgment:

This work was mainly carried out at the Microscopy Rennes Imaging Centre (MRic) imaging facilities. We thank Dr Stéphanie Dutertre and Dr Clément Chevalier for their constant effort to provide the microscopes at their best performance. We also acknowledge Dr Sébastien Huet for advice and comments during the execution of this project. We thank Dr Jin Zhang (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) for AKAR4 plasmid, Dr Olivier Pertz (University of Basel, Basel, CH) for EKAR2G biosensor plasmid, Dr Murakoshi (National Institute for Physiological Sciences, Japan) for ShadowG plasmid, Dr Ryohei Yasuda (Max Planck Florida Institute for Neurosciences, FL, USA) for sREACH plasmid, Dr Vladislav Verkhusha (Albert Einstein College of Medicine, NY, USA) for LSSmOrange plasmid and Dr Gyula Timinszky (LMU, Munchen, Germany) for U2OS cell line. The authors also acknowledge Dr Pierre Vincent (UMR 8256, Biology of Adaptation and Aging (B2A), Paris, France.) for his continuous support, and specifically concerning the sharing of his dedicated biosensing data analysis software. This work was encouraged by the CNRS *Groupement de recherche* (GDR) 2588 “*Microscopie et Imagerie du Vivant*” scientific community. We also thank Benjamin Cappe for his kind assistance on this project. CD PhD fellowship is partly funded by Region Bretagne. The development of the fastFLIM prototype to MT is funded by IBISA, Region Bretagne and Rennes Metropole. Research in the MT group is further supported by CNRS and UR1. FS was at the time of the project a joint PhD student between Lille1 University and Ghent University, funded by Lille 1 University, the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS), and Vandenabeele’s group research funding: *Fonds Wetenschappelijk Onderzoek* (FWO G.0875.11) and Methusalem grant (*Bijzonder Onderzoeksfonds*, BOF09/01M00709). FR is a visiting research professor at Ghent University and full associate professor at Lille 1 University. Research in the Vandenabeele group is further supported by Belgian grants (Interuniversity Attraction Poles, IAP 7/32), Flemish grants (FWO G.0973.11, FWO G.0A45.12N, FWO G.0172.12, FWO G.0787.13N, FWO G.0C31.14N), Ghent University grants (Multidisciplinary Research Platforms (MRP), Ghent Researchers On Unfolded Proteins in Inflammatory Disease (GROUP-ID) consortium), grant from the Foundation against Cancer, 2012-188) and grants from *Vlaams Instituut voor Biotechnologie* (VIB). F.R acknowledges Nikon BELUX partnership. This research was supported by the *Agence Nationale pour la Recherche* (ANR): KinBioFRET program (ANR-11-BSV5-0023) to MT and G2Progress program (ANR-13-BSV2-0016-02) to FR and by the Ligue Contre le Cancer Comité d’Ille et Vilaine, Comité du Maine et Loire et Comité de la Sarthe to MT. S.P-P acknowledges funding from the Nuffield Department of Medicine Leadership Fellowship from University of Oxford and the Wellcome Trust (grant 090532/Z/09/X).

Author contributions:

M.T. and S.P.-P. designed the methodology; M.T. F.S, and F.R. designed the biological proof-of-concept; C.D. performed methodology validation; C.D. and F.S. performed biological application; J.R. and M.T. contributed new instrumentation; C.D., F.S., C.C. and S.P.-P. contributed new reagents/analytic tools; C.D. and F.S. analysed data; C.D., S.P.-P., F.S., F.R. and M.T. wrote the paper; and M.T. and F.R. supervised the work.

-

- **Conflict of interest:**

Authors declare no conflict of interest.

Figures and figures legends

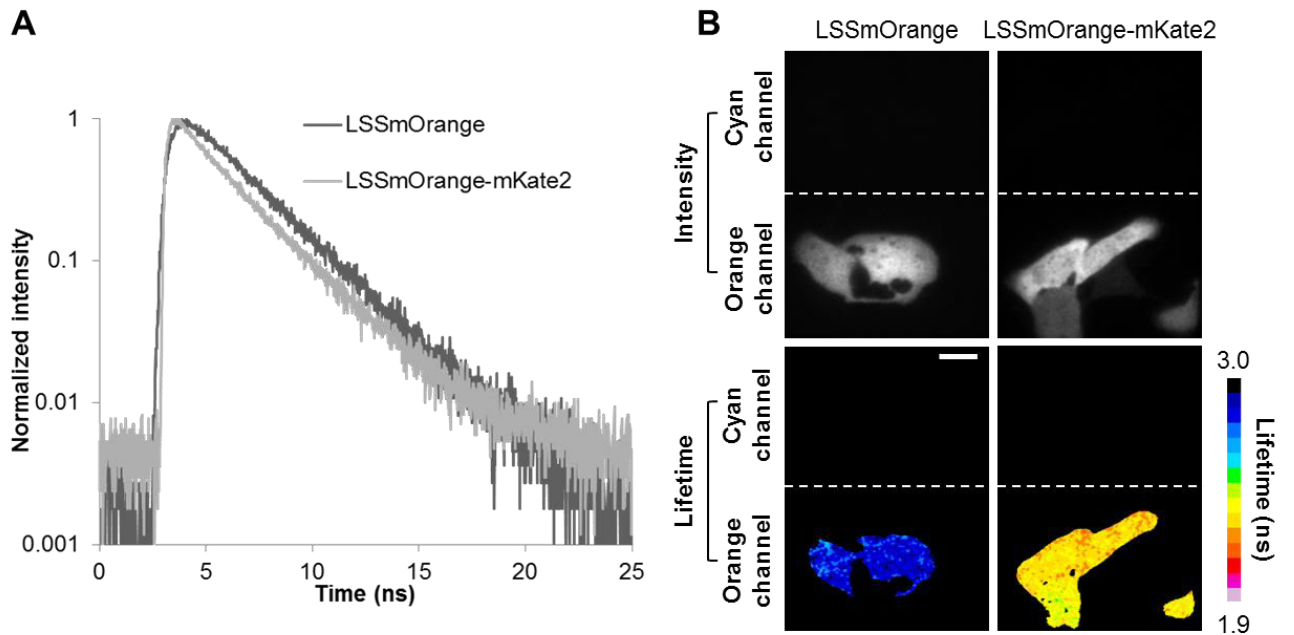


Figure 1: LSSmOrange has a mono-exponential decay and forms with mKate2 an effective FRET pair.

(A) Representative LSSmOrange fluorescence lifetime decay profiles measured by TCSPC in U2OS cells expressing either LSSmOrange or LSSmOrange-mKate2 tandem constructs. The LSSmOrange-mKate2 decay has a shorter slope than that of LSSmOrange. LSSmOrange shows a mono-exponential decay while LSSmOrange-mKate2 tandem harbors a bi-exponential decay. LSSmOrange alone: $\tau = 2.75 \pm 0.07 \text{ ns}$ ($n=11$) from mono-exponential fit; LSSmOrange-mKate2 tandem: $\tau_1 = 2.80 \text{ ns}$ (fixed), $\tau_2 = 1.18 \pm 0.12 \text{ ns}$ and $a_2/a_1 + a_2 = 0.54 \pm 0.02$ ($n=12$).

(B) Representative intensity and fluorescence lifetime images of either LSSmOrange or LSSmOrange-mKate2 tandem, expressed in U2OS cells, acquired with the fastFLIM system. The orange channel provides either intensity or fluorescence lifetimes: for LSSmOrange: $\tau_{\text{LSSmOrange}} = 2.76 \pm 0.03 \text{ ns}$ ($n=34$) and LSSmOrange-mKate2: $\tau_{\text{LSSmOrange-mKate2}} = 2.32 \pm 0.08 \text{ ns}$ ($n=56$). Note that LSSmOrange fluorescence intensity was only detectable in the orange channel. Fluorescence lifetimes were calculated as a mean $\pm$ SD. (n) indicates number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μm .

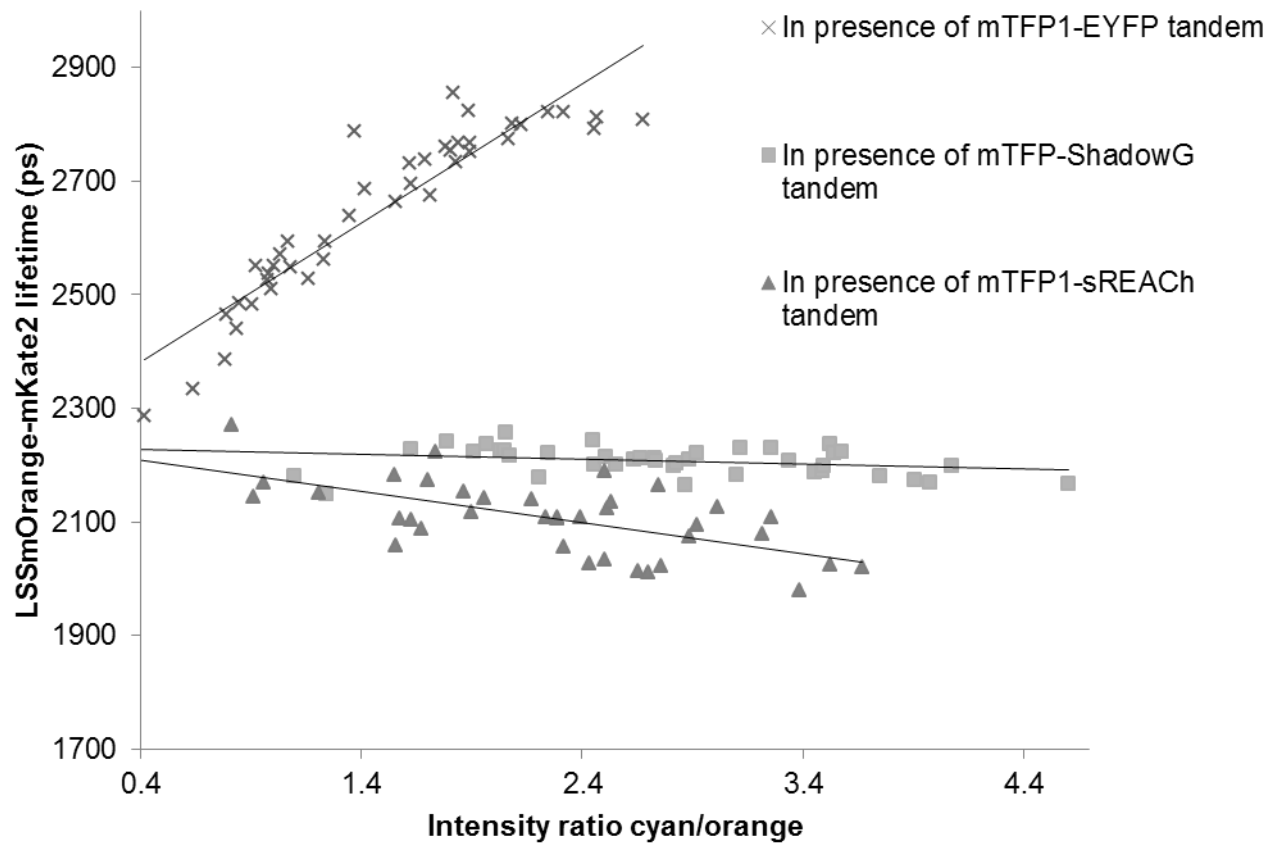


Figure 2: Using mTFP1-ShadowG FRET pair results in consistent LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetime determination by dual colour FLIM.

Graphical representation of LSSmOrange-mKate2 lifetimes in the presence of mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH, or mTFP1-ShadowG plotted as a function of cyan/orange channel intensity ratio. U2OS cells were co-transfected with a fixed amount of LSSmOrange-mKate2 plasmid (0.5µg/well) and increasing amounts of mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH or mTFP1-ShadowG plasmids (0.25, 0.5, 0.75 or 1µg/well). Each point corresponds to one cell. In the presence of mTFP1-YFP (crosses, n=42), LSSmOrange-mKate2 lifetime was markedly increased ($\tau_{\text{LSSmOrange-mKate2}}=2,47\text{ns}$ and $2,82\text{ns}$ at intensity ratio of 0.4 up to 2.67, respectively). In presence of mTFP1-sREACH (triangle n=47), LSSmOrange-mKate2 lifetime was decreased ($\tau_{\text{LSSmOrange-mKate2}}=2,27\text{ns}$ and $2,15\text{ns}$ at intensity ratio of 0.81 up to 3.67, respectively). In the presence of mTFP1-ShadowG (squares n=40), LSSmOrange-mKate2 lifetime remained stable ($\tau_{\text{LSSmOrange-mKate2}}= 2.21\pm0.02\text{ns}$ at intensity ratio of 1.09 up to 4.07).

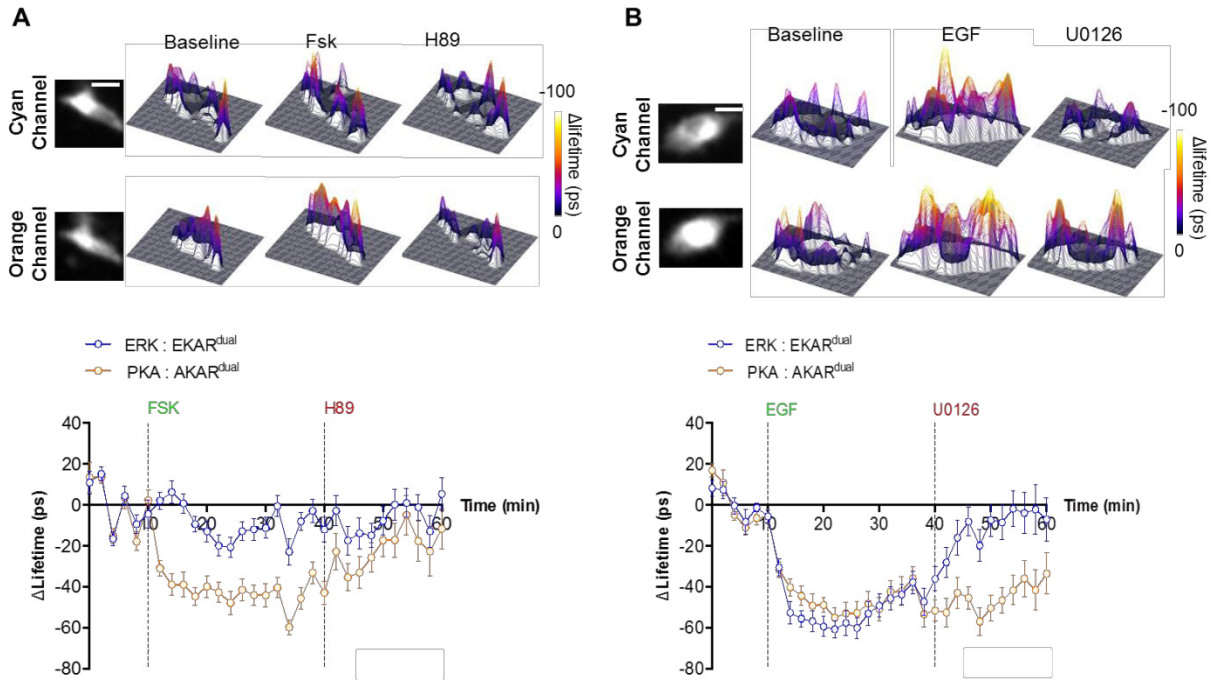


Figure 3: Validation of AKAR^{dual} and EKAR^{dual} using single wavelength excitation dual colour FLIM reveals an EGF-mediated PKA activation in HeLa cells.

For both sets of treatment, representative fluorescence intensity (most left images) and associated 3D Δ Lifetime images are shown for each channel: cyan for EKAR^{dual} (top row) and orange for AKAR^{dual} (bottom row). (A) and (B) baseline (left column), activation by Fsk or EGF (middle column) and H89 or U0126 inhibition (right column), respectively. Graphs represent mean EKAR^{dual} and AKAR^{dual} Δ Lifetime along time (60min) during baseline (mean Δ Lifetime from t=0min to t= 10min of 0 ± 2 ps for both EKAR^{dual} and AKAR^{dual} in A and B), upon activation by Fsk or EGF (mean Δ Lifetime from t=12min to t=40min of -9 ± 2 ps for EKAR^{dual} and -42 ± 1 ps for AKAR^{dual} in A and of -49 ± 2 ps for EKAR^{dual} and -46 ± 2 ps for AKAR^{dual} in B), and H89 or U0126 inhibition (mean Δ Lifetime from t=42min to t=60min of -6 ± 3 ps for EKAR^{dual} and -20 ± 3 ps for AKAR^{dual} in A and of -10 ± 3 ps for EKAR^{dual} and -44 ± 3 ps for AKAR^{dual} in B) phases. Fsk/H89 (n=20), EGF/U0126 (n=26).

Fluorescence lifetime curves were calculated as a mean $\pm$ SEMs. (n) indicates the number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μ m.

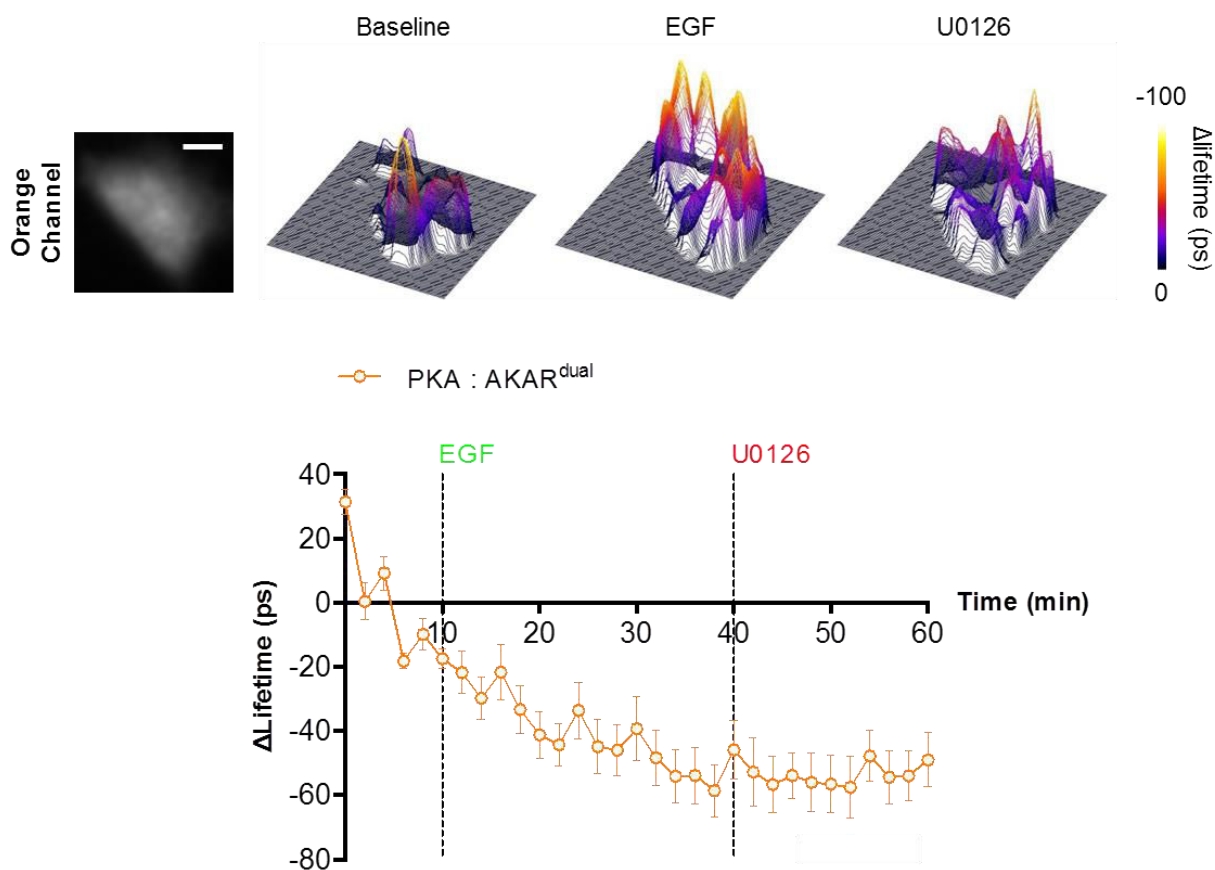


Figure 4: EGF-mediated PKA activation in HeLa cells confirmed on dual colour FLIM using AKAR^{dual}.

Representative fluorescence intensity (most left image) and associated 3D Δ Lifetime images are shown for the orange channel. AKAR^{dual} (n=19): baseline (left), activation by EGF (middle) and U0126 inhibition (right). The graph represents mean AKAR^{dual} Δ Lifetime along time (60min) during baseline (mean Δ Lifetime from t=0min to t=10 min of 0 ± 3 ps), upon activation by EGF (Δ Lifetime of -41 ± 9 ps at t=20min), and U0126 inhibition (mean Δ Lifetime from t=42min to t=60min of -53 ± 3 ps) phases.

Fluorescence lifetime curve was calculated as a mean $\pm$ SEMs. (n) indicates the number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μ m.

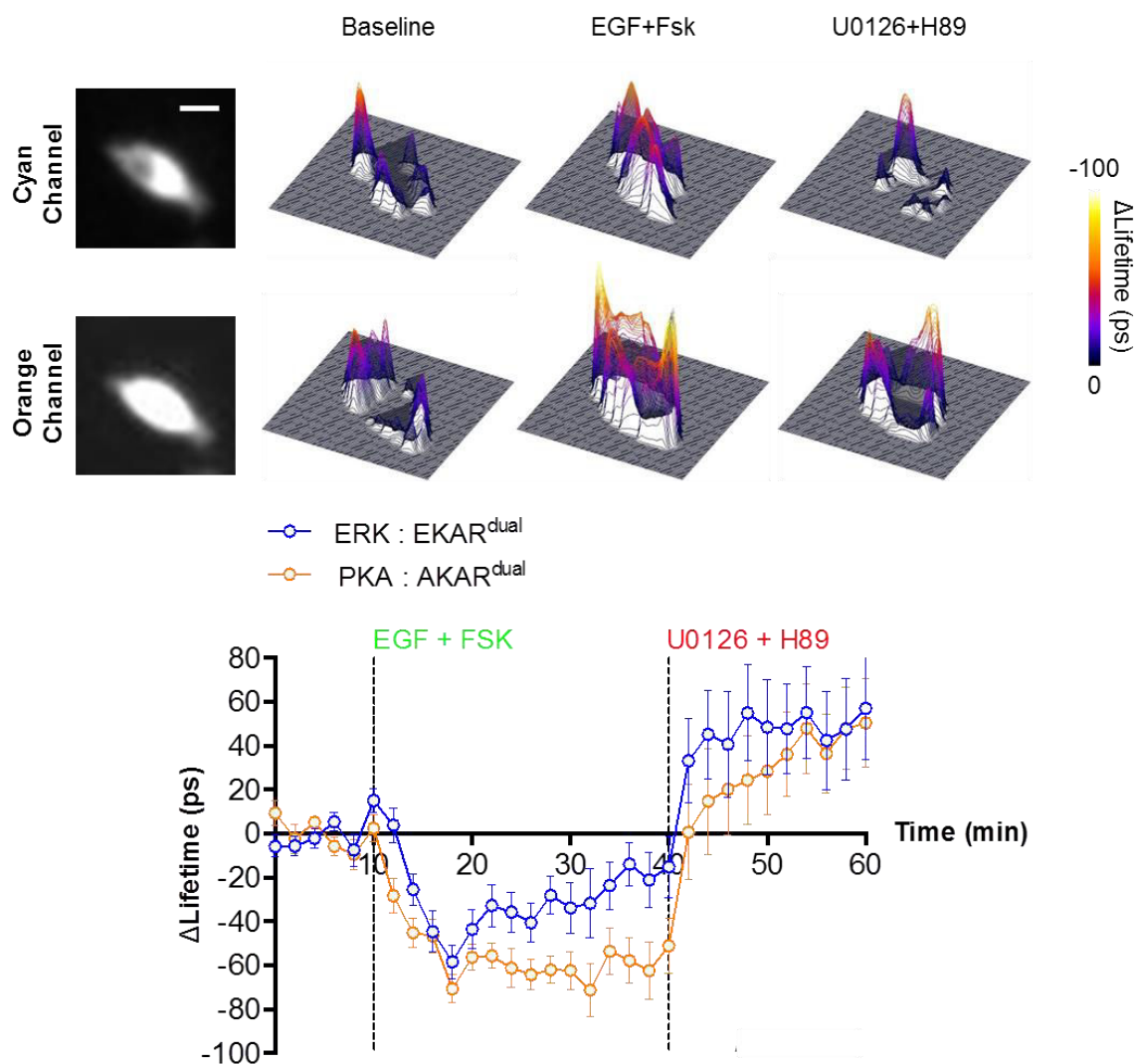


Figure 5: Forskolin treatment negatively impacts EGF-mediated ERK1&2 activation in HeLa cells.

Representative fluorescence intensity (most left images) and associated 3D Δ Lifetime images are shown for each channel: cyan for EKAR^{dual} (top row) and orange for AKAR^{dual} (bottom row): Baseline (left column), co-activation by Fsk and EGF (middle column), and H89 and U0126 inhibition (right column), respectively. Graph represents mean EKAR^{dual} (blue) and AKAR^{dual} (orange) Δ Lifetime along time (60min) during baseline (mean Δ Lifetime from t=0min to t=10min of 0±3ps for EKAR^{dual} and 0±3ps for AKAR^{dual}), upon co-activation by Fsk and EGF (peaking at Δ Lifetime of -58±7ps for EKAR^{dual} and -70±6ps for AKAR^{dual} at t=18min), and H89 and U0126 inhibition (Δ Lifetime of +45±20ps for EKAR^{dual} and +15±24ps for AKAR^{dual} at t=44min) phases; n=26.

Fluorescence lifetime curves were calculated as a mean±SEMs. (n) indicates the number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μ m.

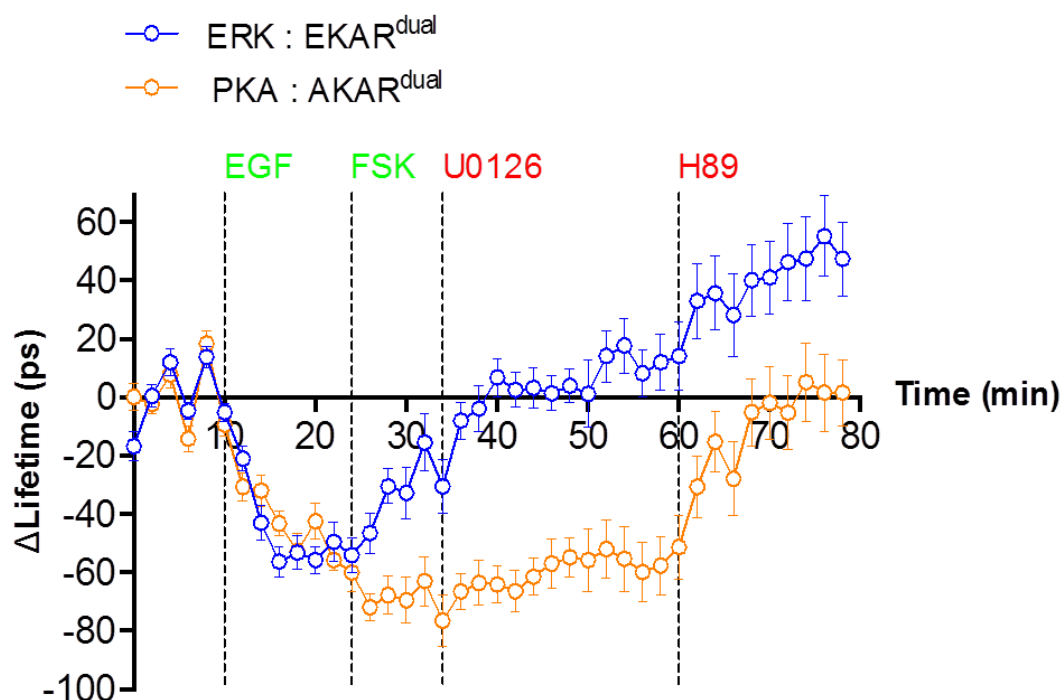


Figure 6: Increasing cAMP levels reverts EGF-mediated ERK1&2 activation while reinforcing PKA activity.

ERK1&2 and PKA kinase activity profiles measured in HeLa cells co-expressing EKAR^{dual} and AKAR^{dual} treated by indicated activators and inhibitors, using single wavelength excitation dual colour FLIM system. Graph represents mean EKAR^{dual} (blue) and AKAR^{dual} Δ Lifetime along time (78min) during baseline (Δ Lifetime of 0 ± 2 ps for EKAR^{dual} and 0 ± 2 ps for AKAR^{dual} over 10min), upon activation EGF (peaking of Δ Lifetime of -56 ± 5 ps for EKAR^{dual} and -43 ± 4 ps for AKAR^{dual} at $t=16$ min) followed by Fsk/IBMX treatment (Δ Lifetime of -33 ± 9 ps for EKAR^{dual} and -69 ± 8 ps for AKAR^{dual} at $t=30$ min) and U0126 (Δ Lifetime of -4 ± 8 ps for EKAR^{dual} and -63 ± 8 ps for AKAR^{dual} from inhibition to $t=38$ min) followed by H89 inhibition phases (Δ Lifetime of 35 ± 13 ps for EKAR^{dual} and -15 ± 10 ps for AKAR^{dual} at $t=64$ min); $n=19$.

Fluorescence lifetime curves were calculated as a mean $\pm$ SEMs. (n) indicates the number of cells from at least 3 independent experiments.

Supplementary Material:

Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single wavelength excitation dual color FLIM.

Claire Déméautis, François Sipieter, Julien Roul, Catherine Chapuis, Sergi Padilla-Parra, Franck B. Riquet and Marc Tramier

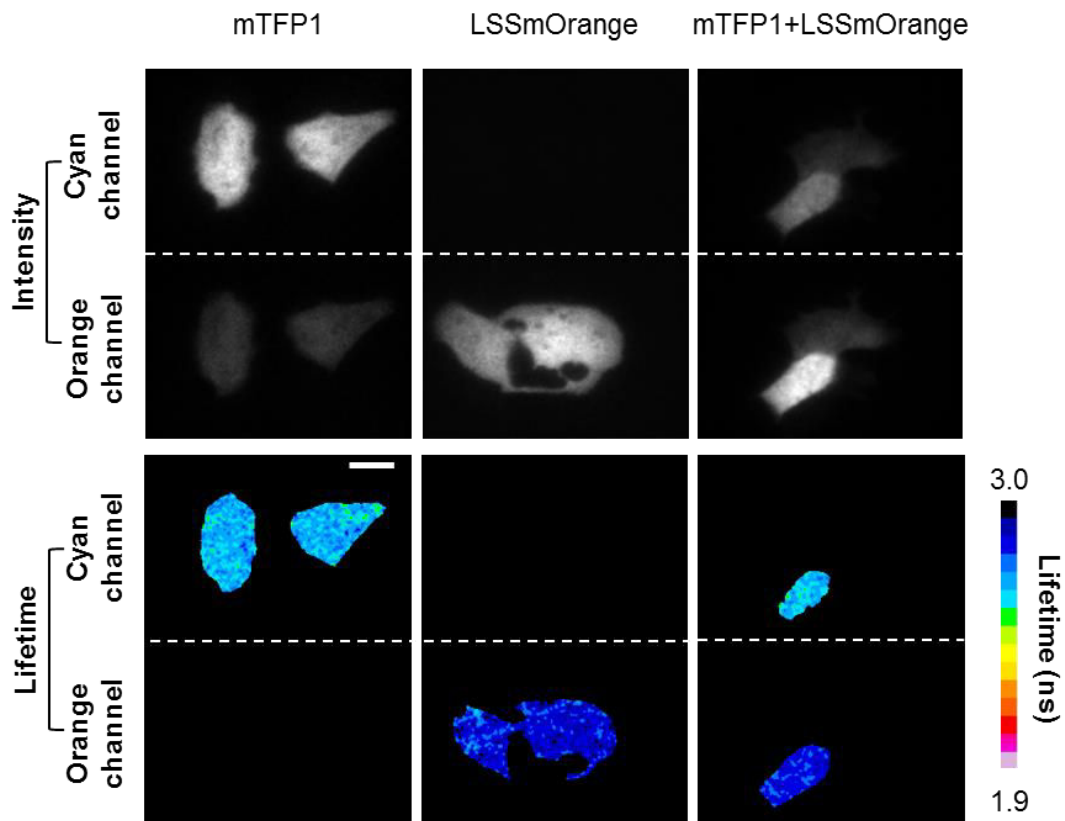


Figure S1: mTFP1 and LSSmOrange can be measured simultaneously by single wavelength excitation dual colour FLIM

Representative intensity and FLIM images acquired simultaneously in the cyan (480/30nm) and in the orange (579/34nm) channels in U2OS cells expressing either mTFP1 (left column) or LSSmOrange, (middle column) or both (right column) using a 440nm single wavelength excitation and dual color FLIM system. mTFP1 and LSSmOrange fluorescence lifetimes were recovered separately in the cyan and the orange channel, respectively. Due to the large emission spectrum of mTFP1, spectral bleed-through can be seen in the orange channel. Note that mTFP1 intensity levels were not sufficient for mTFP1 fluorescence lifetime determination in the orange channel. Average fluorescence lifetimes: Alone, $\tau_{\text{mTFP1}}=2.62\pm0.03\text{ns}$ (n=28), $\tau_{\text{LSSmOrange}}=2.76\pm0.03\text{ns}$ (n=34); Co-expressed, $\tau_{\text{mTFP1}}=2.62\pm0.03\text{ns}$ (n=23), $\tau_{\text{LSSmOrange}}=2.76\pm0.04\text{ns}$ (n=23). Fluorescence lifetimes were

calculated as a mean $\pm$ SD. (n) indicates number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μ m.

mTFP1-YFP+LSSmOrange-mKate2 tandems

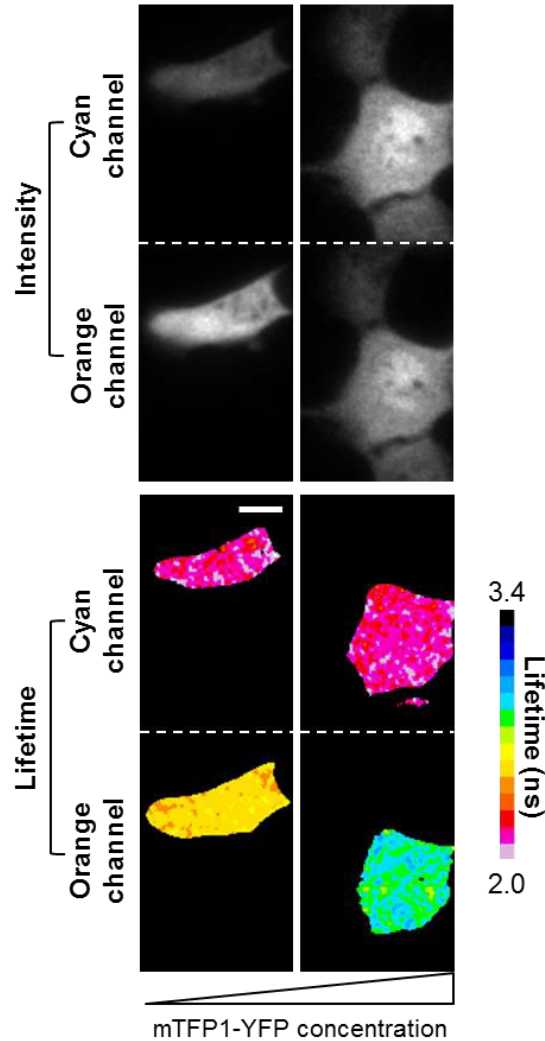


Figure S2: EYFP spectral bleed-through contributes to LSSmOrange-mKate2 fluorescence lifetime heterogeneity.

Representative fluorescence intensity and lifetime images acquired using the dual color FLIM system in U2OS cells expressing mTFP1-YFP and LSSmOrange-mKate2. From left to right: intensity ratios are $I_{\text{cyan}}/I_{\text{orange}} = 0.35$ (left) and 1.25 (right); mean lifetimes are $\tau_{\text{cyan}}=2,02\text{ns}$ for both and $\tau_{\text{orange}}=2,47\text{ns}$ (left) and $2,82\text{ns}$ (right). Note the difference in mTFP1-EYFP fluorescence intensities levels in the cyan channel in presence of LSSmOrange-mKate2 correlated with the measurement of a higher LSSmOrange fluorescence lifetime in the orange channel. Scale bar = 10 μ m.

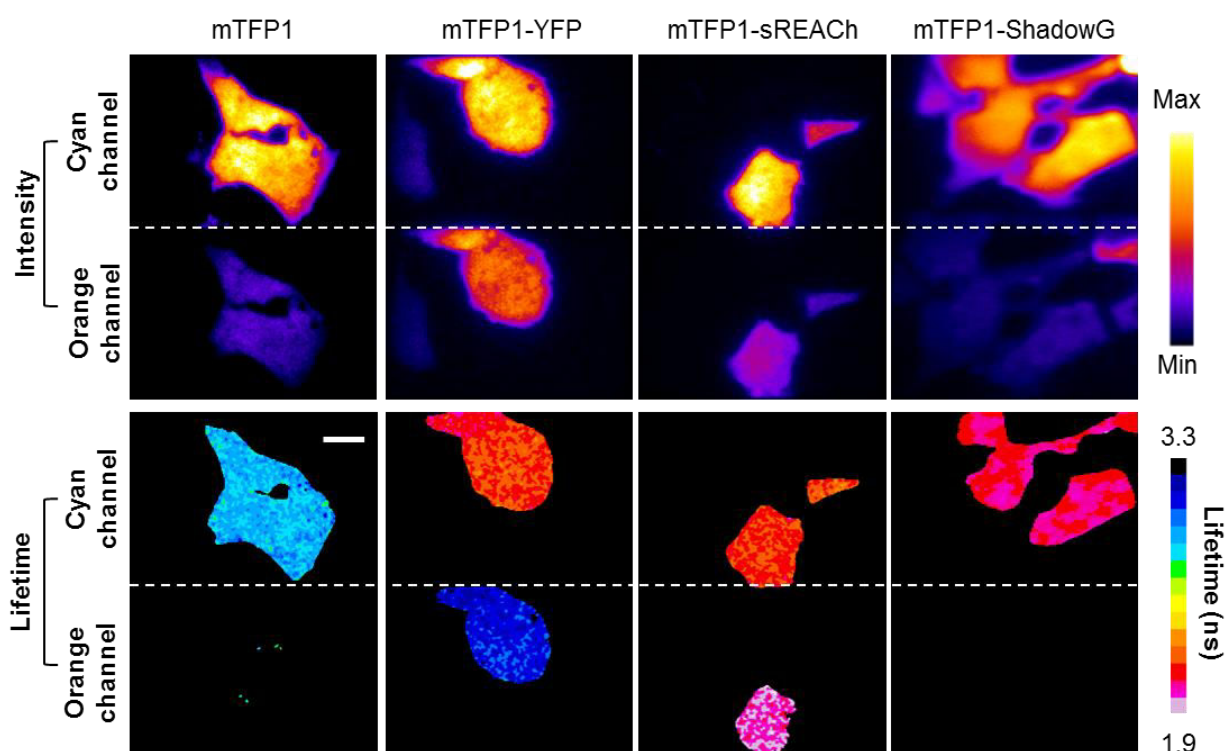
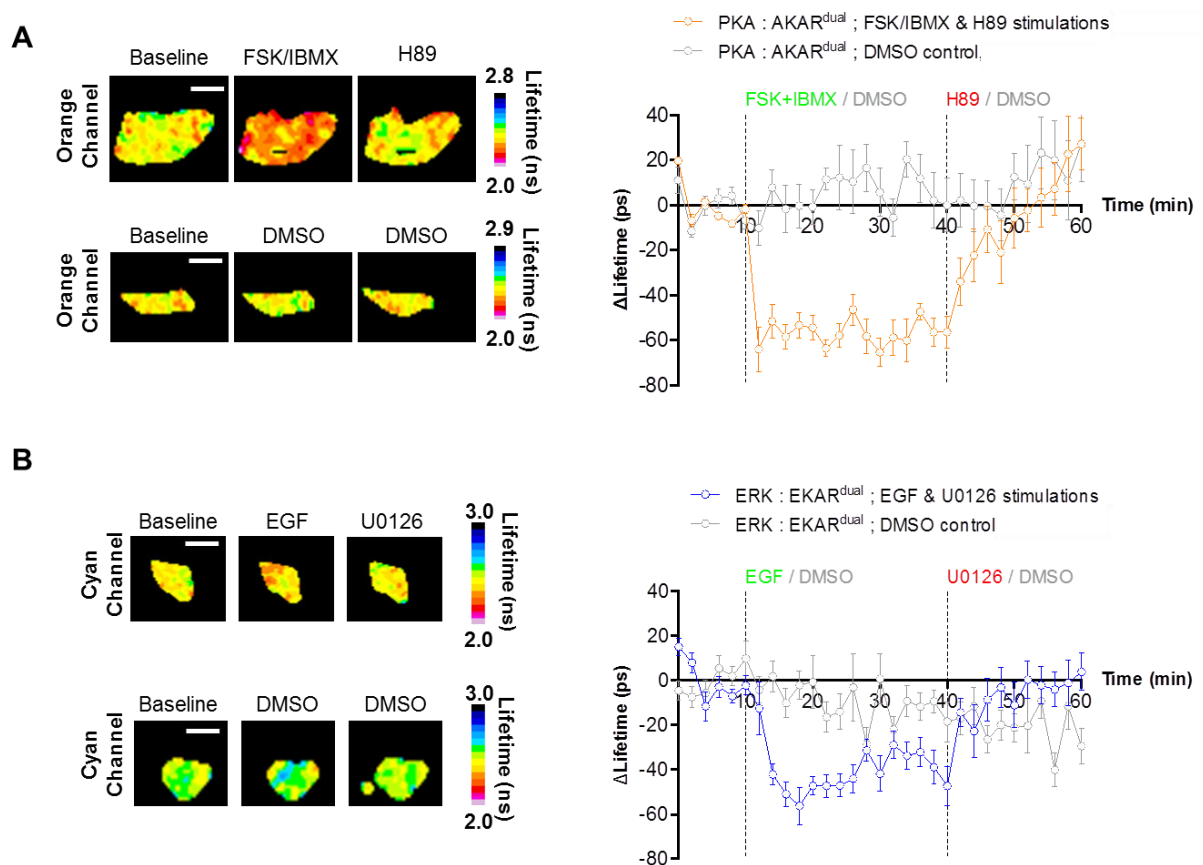


Figure S3: ShadowG is an effective FRET acceptor for mTFP1 minimizing its spectral bleed-through in the orange channel

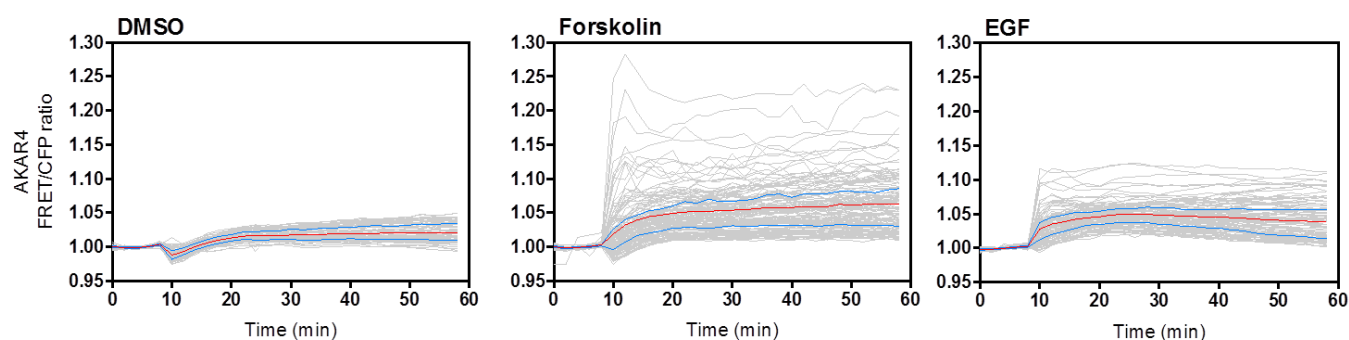
Representative fluorescence intensity and lifetime images of U2OS cells expressing mTFP1, mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH and mTFP1-ShadowG alone acquired on dual color FLIM system. Average fluorescence lifetimes from left to right; Cyan channel: $\tau_{\text{mTFP1}}=2.62\pm0.03\text{ns}$ (n=28), $\tau_{\text{mTFP1-EYFP}}=2.02\pm0.04\text{ns}$ (n=15), $\tau_{\text{mTFP1-sREACH}}=2.05\pm0.07\text{ns}$ (n=29), and $\tau_{\text{mTFP1-ShadowG}}=2.14\pm0.05\text{ns}$ (n=21). Orange channel: $\tau_{\text{mTFP1-EYFP}}=2.95\pm0.04\text{ns}$ (n=10), $\tau_{\text{mTFP1-sREACH}}=1.83\pm0.10\text{ns}$ (n=3) corresponding to the EYFP and sREACH fluorescence lifetime contributions. Note that no fluorescence lifetime was recovered for mTFP1-ShadowG and mTFP1, as already seen in figure S1. Also, for similar mTFP1 fluorescence intensity levels in all conditions (top row), spectral bleed-through was higher in mTFP1-YFP, mTFP1-sREACH conditions while mTFP1-ShadowG was identical to mTFP1 alone. Fluorescence lifetimes were calculated as a mean $\pm$ SD. (n) indicates number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar = 10 μm .



Supplementary Figure 4: AKAR^{dual} and EKARsREACH display expected reference experiment profiles with dual color FLIM system.

Kinase activity profiles from HeLa cells expressing either AKAR^{dual} (A) or EKARsREACH (B) and subjected to reference biosensing experiments were recorded single wawlwenght dual color FLIM system (A) Representative fluorescence lifetime images AKAR^{dual} in the orange channel during: baseline (left top and bottom), upon Fsk/IBMX treatment (top middle), and H89 treatment (top right) or DMSO (bottom middle and right) as control. The graph represents the mean AKAR^{dual} ΔLifetime along time (60min) during baseline (ΔLifetime of 0±2ps over 10min), upon activation by Fsk/IBMX (ΔLifetime of -46±3ps over 30min) and H89 inhibition (ΔLifetime of 1±5ps over 20min) phases (orange, n=7), and baseline followed by DMSO treatment (ΔLifetime of 10±2ps over 60min) as control (grey n=10). (B) Representative fluorescence lifetime images EKARsREACH in the cyan channel during: baseline (left top and bottom), upon EGF treatment (top middle), and U0126 treatment (top right) or DMSO (bottom middle and right) as control. The graph represents the mean EKARsREACH ΔLifetime along time (60min) during the baseline (ΔLifetime of 0±2ps over 10min), upon activation by EGF (ΔLifetime of -40±2ps over 30min) and U0126 inhibition (ΔLifetime of -6 ±3ps over 20min) phases (blue, n=19), and baseline followed by DMSO treatment (ΔLifetime of -10±2ps over 60min) as control (grey n=12). [DMSO]=1/1000, [Fsk]=12,5μM, [IBMX]=75μM, [H89]= 20μM, [EGF]=100ng/ml, and [U0126]= 20 μM.

Fluorescence lifetimes curves and means were calculated as a mean $\pm$ SEMs. (n) indicates number of cells from at least 3 independent experiments. Scale bar =10 μ m.



Supplementary Figure 5: EGF-mediated PKA activation in HeLa cells confirmed in single biosensor experiments using ratiometric FRET measurements.

Ratiometric experiment on HeLa cells expressing the original AKAR4 biosensor (Cerulean/cpVenus). The graphs plot FRET/CFP intensity ratio of AKAR4 over time for the following treatment conditions: Left, DMSO (n=80); Middle, cAMP/PKA activation by Fsk (n=134); Right, MAPK/ERK1&2 activation by EGF (n=105). Normalized FRET values are displayed in two ways: cell trace for each individual cell (grey) overlaid with the population mean (red) and the 25th and 75th percentile values (blue). [DMSO]=1/1000, [Fsk]=12,5 μ M, [EGF]=100ng/ml. Data are shown as mean $\pm$ SEMs. (n) indicates number of cells from at least 3 independent experiments.

1.4. Discussion

Au cours de ce travail, une méthodologie originale de deux suivis d'activités biochimique par mesure de durée de vie a été développée. Des méthodologies déjà développées pour le suivi deux activités enzymatiques consistent à suivre des activités dans deux compartiments cellulaires différents pour éviter les problèmes de fuite spectrale dans les canaux de détection de fluorescence (Piljic & Schultz 2008; Niino et al. 2009), elles utilisent plusieurs longueurs d'onde d'excitation mais aussi peuvent mélanger les deux techniques généralement utilisées pour l'imagerie de FRET c'est-à-dire la mesure d'un ratio d'intensité et la mesure de durée de vie. Ces méthodologies sont très complexes dans l'instrumentation mais aussi dans le traitement post-acquisition. En effet, pour supprimer la fuite spectrale, de nombreuses acquisitions doivent être faites pour voir la contribution de chaque protéine fluorescente dans le canal de détection des autres protéines fluorescentes (Woehler 2013). Ensuite des soustractions de signaux sont faites pour avoir une image FRET correcte.

Ma nouvelle méthodologie permet de suivre deux activités enzymatiques dans le même compartiment cellulaire par mesure de durée de vie tout en utilisant une longueur d'onde d'excitation et récupérant en simultanée l'émission de fluorescence des deux donneurs. Cette méthodologie a été développée sur le prototype fastFLIM qui permet une mesure de durée de vie rapide par rapport aux autres systèmes FLIM existants (Leray et al. 2013).

En combinant, LSSmOrange (Shcherbakova et al. 2012) et mTFP1 en tant que donneur il est possible d'utiliser la longueur d'onde à 440nm pour les exciter. L'émission de fluorescence des deux donneurs est récupérée en simultanée à l'aide d'un Dual View, qui sépare le champ de la caméra en deux. Deux canaux de fluorescence sont observés à l'aide de deux filtres bande passante : 480/30nm (canal bleu) et 579/34nm (canal orange). Deux couples FRET (donneur/ accepteur) sont donc utilisés : LSSmOrange/mKate2 et mTFP1/ShadowG. L'utilisation de la protéine ShadowG comme accepteur non fluorescent (Murakoshi et al. 2015) permet de réduire la fuite spectrale dans le canal orange par rapport à l'utilisation de sREACH comme accepteur (Ganesan et al. 2006). Grâce à cette méthodologie, il a été possible de suivre spatio-temporellement, à l'aide des biosenseurs

EKARsREACH et AKARdual, la voie ERK et PKA dans le même compartiment cellulaire. Alors que l'activation de la voie PKA n'a pas d'incidence sur l'activation de la voie ERK, il est apparu que l'activation de la voie ERK par l'EGF provoque une activation de la voie PKA. Il serait intéressant de continuer cette étude pour comprendre par quel lien cette inter-activation se fait. En effet, dans la littérature le lien entre ces deux voies a été étudié (Gerits et al. 2008, review), l'hypothèse par laquelle il y aurait des réponses d'activation différentes de PKA en fonction de l'activation de la voie ERK serait la différence de type cellulaire qui aurait chacun un isoforme Raf différent et à des quantités différentes (O'Neill & Kolch 2004). Pour vérifier s'il notre activation de la voie PKA par l'EGF est due à la présence d'un isoforme Raf particulier, un traitement au siRNA contre cet isoforme pourrait être fait dans ces cellulaires. De plus il semblerait que l'activation de la voie PKA par l'EGF serait indépendante des MEKs car l'activation de la voie PKA est toujours présente en présence de l'inhibiteur U0126 qui est un inhibiteur des MEKs.

Grâce à cette méthodologie, il est possible de suivre deux activités enzymatiques dans un même compartiment cellulaire à l'aide de biosenseur FRET en s'affranchissant des problèmes de fuite spectrale et d'utilisation de plusieurs longueurs d'onde d'excitation rencontrés dans les méthodologies déjà existantes. De plus, cette méthodologie est transposable sur les autres systèmes FLIM existants. En effet, il suffit d'adapter les filtres d'émission et si le système est composé que d'un détecteur il est possible d'installer un Dual View permettant de couper le champ en deux et donc de récupérer les deux émissions de fluorescence. Des tests ont été faits sur un microscope SP8 comportant un module de détection de molécule unique et sur un système de mesure de durée de vie en phase et modulation (LiFa). Les résultats obtenus avec ces systèmes sont identiques à ceux obtenus avec le prototype fastFLIM.

De plus, cette méthodologie permet d'ouvrir des portes pour l'étude des activités enzymatiques avec des biosenseurs FRET car elle peut s'appliquer pour suivre des biosenseurs déjà développés et d'étudier plus précisément les liens qu'il peut y avoir entre différentes voies de signalisation ou activités biochimiques. On peut imaginer appliquer cette méthodologie pour suivre l'activité et l'activation de la kinase Aurora A en simultanément avec un biosenseur FRET de changement de conformation de la protéine kinase Aurora A (Bertolin et al. 2016, accepté dans Nature Communications) et un biosenseur composé d'un

substrat de la protéine kinase Aurora A (Bruinsma et al. 2015), comme pour AKAR ou EKAR. Elle pourrait être aussi appliquée pour mesurer la tension de deux protéines situées au niveau des points d'adhésion focaux dans les cellules comme par exemple la Vinculine (Grashoff et al. 2010) et la Taline (Austen et al. 2015).

La possibilité de faire évoluer cette méthodologie pour un suivi de trois activités peut être envisagée. En effet, en combinant mTFP1, LSSmOrange et LSSmKate1 (Piatkevich et al. 2010) en tant que donneurs, il serait possible de suivre trois couples FRET avec une seule longueur d'onde d'excitation à 440nm. Ces couples seraient mTFP1 avec ShadowG, LSSmOrange avec un accepteur non fluorescent et LSSmKate1 avec un accepteur dans l'infrarouge comme par exemple iRFP670 (Shcherbakova & Verkhusha 2013). La mise en place d'un Quad View (Photometrics) sur le système, à la place du Dual View, permettrait la récupération de l'émission de fluorescence de mTFP1, LSSmOrange et LSSmKate1 simultanément.

2. Changement de conformation protéique : suivi de FRET par FCCS

2.1. Introduction

La mesure du FRET intramoléculaire avec l'utilisation des biosenseurs permet d'identifier un changement de conformation protéique. Ce changement de conformation est souvent lié à l'activité de la protéine d'intérêt.

Certaines protéines sont faiblement exprimées dans les cellules et interviennent à des moments particuliers dans le cycle cellulaires. Due à cette faible expression dans les cellules, il est parfois difficile de pouvoir mesurer le FRET par les techniques traditionnelles. En effet ces techniques nécessitent une expression assez forte des protéines fluorescentes. Il est nécessaire de mesurer des intensités suffisantes pour la mesure du FRET par mesure d'intensité du donneur et de l'accepteur ou pour sortir du bruit de mesure dans le cas de la mesure de FRET par FLIM. Le problème est de trouver le bon compromis pour avoir assez de photons pour les mesures mais aussi d'éviter le photoblanchiment des échantillons par excitation trop importante. C'est pourquoi il est difficile pour des protéines exprimées à concentration endogène ou qui ont une localisation particulière dans un échantillon de mesurer le FRET à l'aide des techniques conventionnelles. On se propose ici d'essayer de mesurer le changement de conformation protéique à l'aide de biosenseur FRET par mesure

de Spectroscopie à Corrélation Croisée de Fluorescence. Cette technique décrite dans la partie *Techniques utilisées* a un avantage : plus les fluctuations proviennent d'un petit nombre de fluorophores, meilleure sera la mesure. On peut donc observer des protéines fluorescentes à très faible niveau d'expression.

Cette technique permet généralement de suivre l'interaction entre deux protéines différentes qui sont marquées avec deux fluorophores différents. Pour rappel, la FCCS permet de suivre les fluctuations de fluorescence de deux fluorophores (généralement deux protéines fluorescentes, une verte et une rouge, accrochées à deux protéines d'intérêt différentes). Ces fluctuations de fluorescence sont traduites en deux courbes d'autocorrélation (ACF) : une courbe d'autocorrélation traduisant la fluctuation des molécules vertes et une autre traduisant la fluctuation des molécules rouges. Ces courbes vont nous permettre de déterminer le temps de résidence des molécules mais aussi leur nombre dans le volume focal. Une troisième courbe, la courbe de corrélation croisée (CC) va être obtenue. Cette courbe nous renseigne sur la co-diffusion ou non des deux molécules dans le volume focal. Une courbe de corrélation croisée positive nous informe que les deux protéines diffusent ensemble alors qu'une courbe de corrélation croisée nulle nous informe que les deux protéines diffusent indépendamment. Dans notre étude cette courbe de corrélation croisée est analysée à l'aide de la méthode de FLCS qui nous permet de supprimer la fuite spectrale des photons verts détectés dans le canal de détections des photons rouges (décrit dans la partie *méthode utilisée*) En récupérant au temps 0 l'amplitude des courbes d'autocorrélation verte ($G_{0,v}$), rouge ($G_{0,r}$) et de corrélation croisée ($G_{0,x}$), on peut donc calculer les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$. Ces ratios sont directement reliés à la proportion des molécules en complexe. Une étude a montré que le FRET influençait l'amplitude de ces courbes (Kohl et al. 2002). En effet, il a été montré que l'amplitude des courbes d'autocorrélations des molécules vertes et rouges est liée à la brillance moléculaire. La brillance des molécules vertes diminue et celle des molécules rouges reste stable en présence de FRET. Ces changements de brillance en présence du FRET se répercutent sur les amplitudes des courbes d'autocorrélation et de corrélation croisée. En effet, une augmentation et une diminution respective des amplitudes de la courbe d'autocorrélation verte et de corrélation croisée sont observables en présence de FRET (Foo

et al. 2012). L'amplitude de la courbe d'autocorrélation rouge ne présente aucun changement.

Dans le cas de biosenseurs intramoléculaires où les deux couleurs co-diffusent, on doit pouvoir observer le FRET par la mesure de corrélation-croisée. Ayant ces changements d'amplitude au temps 0, on s'attend alors à observer une diminution pour les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,y}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$, qui serait plus importante pour le premier ratio en présence de FRET. Il est donc intéressant d'essayer de suivre une activité enzymatique à l'aide de biosenseur FRET avec cette technique.

En suivant les biosenseurs de changement de conformation par cette technique, nous sommes dans la condition où nos protéines fluorescentes diffusent ensemble car elles sont attachées sur la même protéine, une courbe de corrélation croisée positive sera obtenue après analyse. Pour ces biosenseurs FRET, lorsqu'un changement de conformation va s'opérer, les protéines fluorescentes seront à proximité, un transfert d'énergie entre elles va pouvoir s'effectuer. On peut donc supposer que les ratios d'amplitude diminueront lorsque ces biosenseurs seront en conformation fermée.

Dans cette partie, je vais m'intéresser au suivi du changement de conformation de la protéine kinase Aurora A. Au sein de l'équipe, un biosenseur FRET Aurora A a été développé. Ce biosenseur nous permet de suivre l'activation de la protéine kinase Aurora A au cours du temps (Fig 2.19).

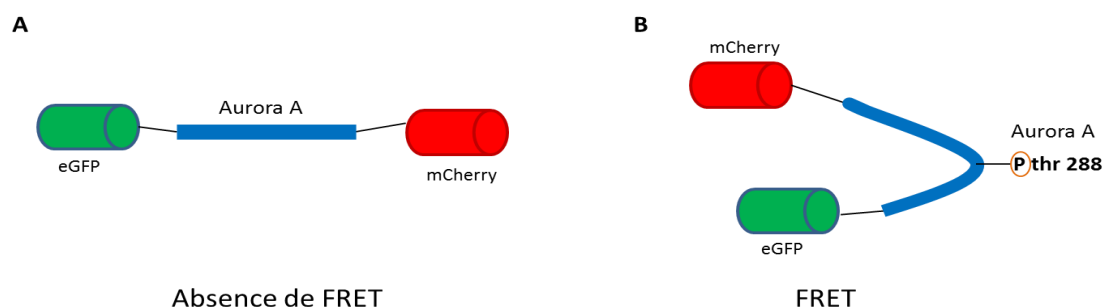


Fig 2.19 : Biosenseur FRET pour le suivi de changement de conformation de la protéine kinase Aurora A. (A) biosenseur en conformation ouverte lorsque la protéine kinase Aurora A n'est pas phosphorylée donc n'est pas active. Les protéines fluorescentes sont éloignées, il n'y a donc pas possibilité de transfert d'énergie entre eGFP et mCherry. (B) changement de conformation quand Aurora A est phosphorylée sur la thréonine 288. eGFP et mCherry sont proches, il y a donc transfert d'énergie entre les deux protéines fluorescentes.

La protéine Aurora A est une protéine serine/thréonine kinase. Elle joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. Plusieurs rôles lui sont associés comme la participation à la séparation et la maturation des centrosomes, l'établissement du fuseau mitotique bipolaire dès la fin de la phase S et durant la phase G2/M. Lors d'une immunodéplétion dirigée contre la protéine Aurora A, les cellules traitées sont rendues monopolaire impliquant une absence de séparation des centrosomes (Marumoto et al. 2003). La protéine Aurora A est également impliquée dans la maturation des centrosomes. En son absence, le recrutement de composants péricentriolaires tels que la centrosomine et la γ -tubuline n'est plus possible (Terada et al. 2003). Or ces acteurs sont indispensables dans l'assemblage des microtubules et donc dans l'établissement du fuseau mitotique. La kinase peut également jouer un rôle de régulateur du complexe cyclineB/cdk1 durant la phase G2 (Dutertre et al. 2004; Hirota et al. 2003). Aurora A est un élément important dans la progression vers la mitose. Lors de cette dernière, d'autres rôles sont attribués à la kinase Aurora A : elle phosphoryle par exemple l'histone H3 responsable de la condensation de la chromatine en début de mitose, elle permet aussi l'élongation des microtubules par la signalisation Ran GTP et son association avec des molécules telle que TPX2 lui permet d'inhiber des phosphatases tel que PP1 (inhibiteur de cdk1) (Bayliss et al. 2003). En notant tous les rôles importants joués par la kinase Aurora A il semble judicieux de suivre son activité. Dans le cas de surexpression, cette protéine kinase provoque l'apparition de centrosomes surnuméraires entraînant des anomalies au cours de la mitose et lors de la cytokinèse (Zhang et al. 2008). Il est donc essentiel de pouvoir suivre l'activité de la kinase sans modifier sa concentration endogène.

L'étude de son activité par la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence peut être une solution en évitant sa surexpression.

Les biosenseurs Aurora A utilisés pour ce travail ont été développés au sein de notre équipe. Le biosenseur Aurora A sauvage est composé de la protéine Aurora A entière avec à ses extrémités les protéines fluorescentes EGFP (à l'extrémité N-terminale) et mCherry (à l'extrémité C-terminale). Il a été mesuré une différence de durée de vie de 150ps entre le biosenseur Aurora A sauvage (durée de vie mesurée entre 2.30 et 2.35ns) et le biosenseur contrôle EGFP-Aurora A (durée de vie mesurée entre 2.4 et 2.5ns) en sortie de bactéries *Escherichia coli* (Bertolin et al. 2016). Cette diminution de durée de vie correspond au FRET

induit par le changement de conformation de la protéine Aurora A dû à son autophosphorylation sur la thréonine 288 (Fig 2.20).

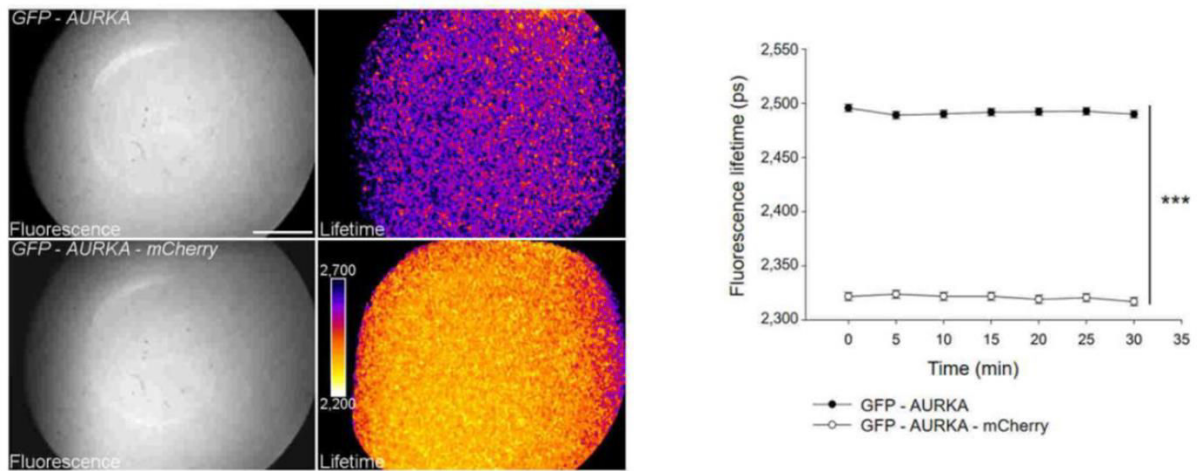


Fig 2.20 : Caractérisation du biosenseur Aurora A sauvage in vitro. (À gauche) Images représentant l'intensité et la durée de vie mesurée dans le canal EGFP pour les biosenseurs EGFP-Aurora A et EGFP-Aurora A-mCherry purifiés en sortie de bactéries *Escherichia coli*. (À droite) Graphique illustrant la durée de vie de la protéine EGFP pour les deux biosenseurs au cours du temps (1 acquisition toutes les 5min). Les données représentent la moyenne de durée de vie $\pm$ SEM de trois expériences indépendantes. (Bertolin et al.2016 ; Nature Com accepté)

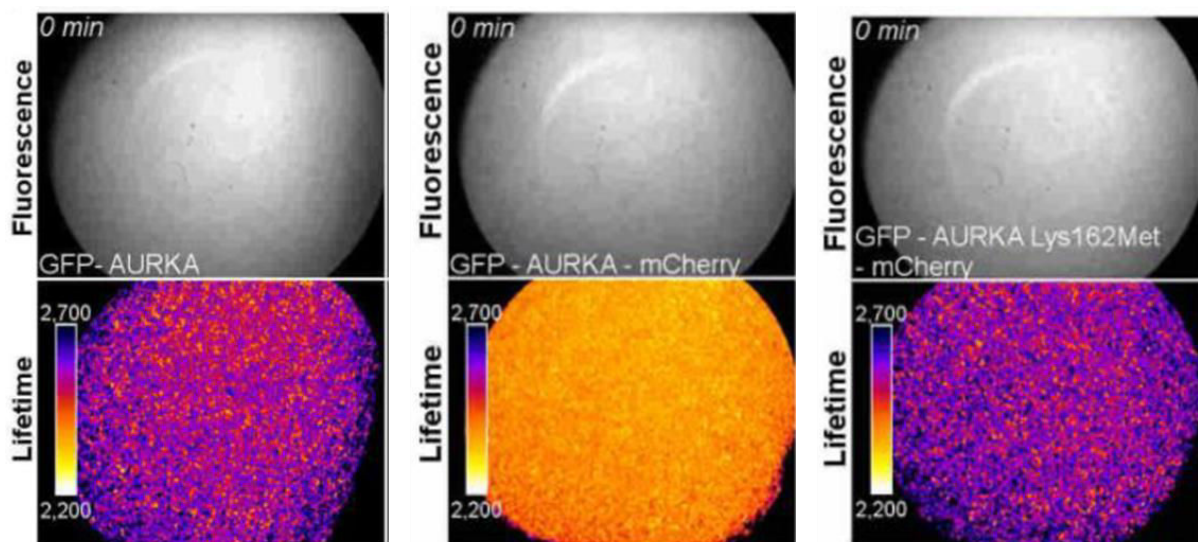


Fig 2.21 : Caractérisation du biosenseur mutant K162M in vitro. Images représentant l'intensité et la durée de vie mesurée dans le canal EGFP pour les biosenseurs EGFP-AuroraA (gauche) ; EGFP-AuroraA-mCherry (milieu) ; EGFP-AuroraA K162M-mCherry (droite). Les durées de vie mesurées pour EGFP-AuroraA et GFP-AuroraA K162M-mCherry sont identiques (2.4ns). Une diminution de durée de vie est mesurée pour le biosenseur EGFP-AuroraA-mCherry (2.3ns). (Adapté de Bertolin et al.2016 ; Nature Com accepté)

Pour évoluer la relation entre l'autophosphorylation sur la thréonine 288 et l'activité de la kinase Aurora A, le biosenseur Aurora A sauvage a été muté sur la Lysine 162 (appelé biosenseur K162M). Ce biosenseur K162M est une kinase dead entraînant l'incapacité de la protéine kinase de phosphoryler ses substrats et de s'autophosphoryler (Bertolin et al. 2016). Il a été montré que le biosenseur K162M a une durée de vie similaire à celle du biosenseur contrôle EGFP-Aurora A en sortie de bactéries *Escherichia coli* confirmant l'incapacité d'autophosphorylation de ce biosenseur (Fig 2.21).

Des mesures de durée de vie ont été effectuées sur des lignées cellulaires U2OS stables exprimant les biosenseurs EGFP-Aurora A et EGFP-Aurora A-mCherry sauvages ou mutés. Des résultats similaires aux mesures in vitro ont été obtenus. Une diminution de durée de vie de 150ps a été mesurée aux centrosomes et au fuseau mitotique entre le biosenseur contrôle EGFP-Aurora A et le biosenseur sauvage EGFP-Aurora A-mCherry. Pour les cellules exprimant les biosenseurs EGFP-Aurora A et EGFP-Aurora A-mCherry avec la mutation K162M, aucune différence de durée de vie n'est mesurée entre ces deux constructions aux centrosomes et au fuseau mitotique (Fig 2.22).

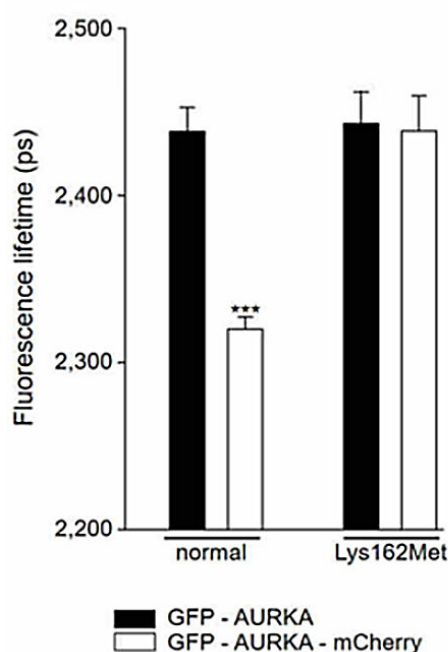


Fig 2.22 : Caractérisation des biosenseurs EGFP-AuroraA et EGFP-AuroraA-mCherry sauvage et mutant. Mesure de durée de vie du donneur EGFP aux centrosomes des lignées cellulaires stables exprimant les différents biosenseurs. (Bertolin et al.2016 ; Nature Com accepté)

Le but de ce projet est d'obtenir les mêmes résultats obtenus par mesure de FLIM, en mesurant le FRET intramoléculaire avec la technique de FCCS.

2.2. Résultats

Pour mettre en place cette méthodologie, deux étapes vont être nécessaires : 1) des acquisitions in vitro sur des biosenseurs Aurora A sauvage et mutant vont être effectuées et 2) des mesures sur les lignées cellulaires stables exprimant ces biosenseurs seront faites.

2.2.1. Suivi du biosenseur Aurora A in vitro par FCCS

Premièrement, il est nécessaire de vérifier si une différence de ratio est observable entre la conformation fermée et ouverte du biosenseur en solution. Pour cela, deux constructions sont utilisées : un biosenseur K162M qui est une kinase dead donc il n'y a pas d'autophosphorylation en bactéries. Le biosenseur en sort en conformation ouverte ; et un biosenseur sauvage qui s'autophosphoryle en bactéries. Ce biosenseur en sort en conformation fermée. Des mesures FCCS ont été effectuées sur ces biosenseurs, qui sont dilués dans du tampon kinase (ce qui évite l'agrégation des constructions). Un exemple d'analyse de FCCS pour les deux biosenseurs Aurora A sauvage et mutant est représenté par la figure 2.23. En comparant les courbes d'autocorrélation et de corrélation croisée obtenues après analyse des constructions sauvage (Fig 2.23A) et mutante (Fig 2.23B), il est visible qu'en présence de FRET (Biosenseur WT), l'amplitude des courbes d'autocorrélation verte et de corrélation croisée augmentent ($G_{0,v} = 0,2067$ et $G_{0,x} = 0,0312$) alors que celle de la courbe d'autocorrélation rouge diminue ($G_{0,r} = 0.0651$) par rapport aux amplitudes obtenues lorsqu'il n'y a pas de FRET ($G_{0,v} = 0,0904$, $G_{0,x} = 0.0265$ et $G_{0,r} = 0.0703$). Après analyse des courbes et calcul des ratios (Fig 2.23C), il est observé une diminution significative de 0.10 du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ en présence de FRET (biosenseur WT). Par contre, une augmentation non significative de 0.05 du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ est observée en présence de FRET. Une autre remarque est observable, les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ ne sont pas égaux pour chaque condition.

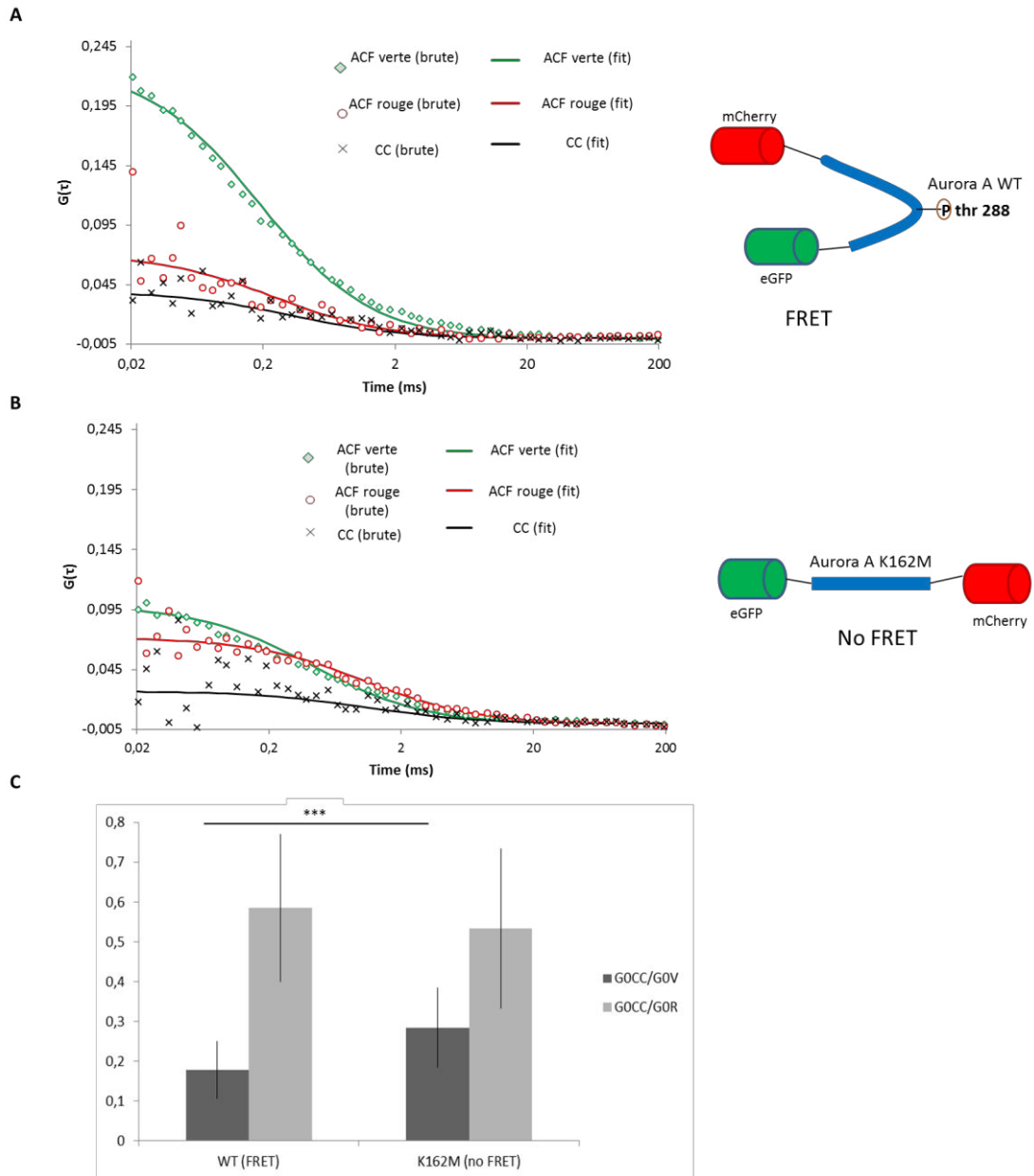


Fig 2.23 : Mesure de FCCS sur les biosenseurs Aurora A en solution. Les graphiques représentent les courbes d'autocorrélation verte et rouge ainsi que la courbe de corrélation croisée pour les biosenseurs Aurora A sauvage FRET (A) et mutant Non FRET (B) en solution. Les losanges verts, les ronds rouges ainsi que les croix noires correspondent respectivement aux données brutes des courbes d'autocorrélation verte et rouge et de la courbe de corrélation croisée. Les lignes vertes, rouges et noires correspondent respectivement aux données ajustées des courbes d'autocorrélation verte, rouge et de la courbe de corrélation croisée. Il est noté qu'en présence de FRET, l'amplitude des courbes d'autocorrélation verte et de corrélation croisée augmente alors que celle de la courbe d'autocorrélation rouge diminue. L'histogramme C représente les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ calculés pour les biosenseurs sauvages WT (n=131) et mutants K162M (n=124). En présence de FRET, le ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ diminue de façon significative. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard entre chaque mesure.

2.2.2. Suivi du biosenseur Aurora A en cellules par FCCS

Au vu de ces résultats, on peut supposer que le suivi du changement de conformation du biosenseur Aurora A peut se faire en calculant le ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$. Pour confirmer ce résultat, des acquisitions ont été effectuées sur des lignées cellulaires U2OS exprimant les biosenseurs WT et K162M sous promoteur endogène. Pour faire des acquisitions en FCCS, les cellules ont été traitées au nocodazole, ce qui permet de synchroniser les cellules en phase G2M du cycle cellulaire. En effet, après 16h de traitement au nocodazole, le milieu de culture a été remplacé ce qui permet aux cellules de partir en mitose. Visuellement les deux lignées cellulaires, après traitement, ont un phénotype différent. En effet, la lignée cellulaire WT a un marquage localisé très précisément au niveau des centrosomes et sur les microtubules alors que la lignée cellulaire K162M a un marquage plus diffus dans le cytoplasme et localisé au centrosome (Fig 2.24). Du fait du marquage dans le cytoplasme, les microtubules marqués sont moins visibles.

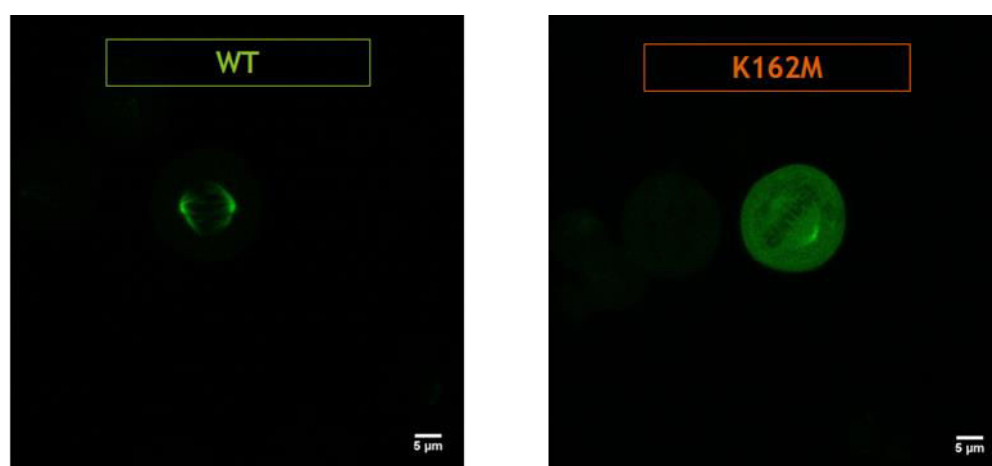


Fig 2.24 : Images acquises au microscope confocal des cellules exprimant le biosenseur Aurora A sauvage (WT, à gauche) et mutant (K162M, à droite) après traitement au nocodazole. Il est observé que le mutant a une localisation plus diffuse par rapport au biosenseur sauvage. Les mesures de FCCS ont été effectuées sur l'extrémité des microtubules.

Malgré cette observation, des acquisitions en FCCS ont été effectuées sur l'extrémité des microtubules. Une diminution significative de 0.24 du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ est observable en présence de FRET. Et au contraire une augmentation de 0.11 du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ est mesurée pour les cellules exprimant le biosenseur WT (Fig 2.25). Comme pour les acquisitions en solution, les deux ratios pour chaque condition ne sont pas égaux.

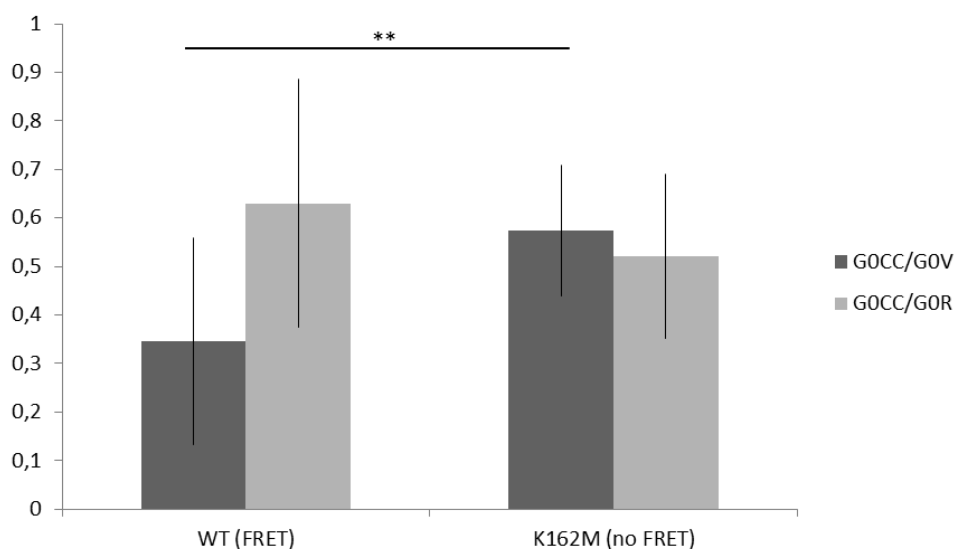


Fig 2.25 : Mesure de FCCS sur les biosenseurs Aurora A en cellules. L'histogramme C représente les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ calculés pour les biosenseurs WT (n=17) et mutant K162M (n=12). Une diminution significative du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ est mesurée dans les cellules exprimant le biosenseur Aurora A WT. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard entre chaque mesure.

Attention, pour cette partie très peu de mesure ont été effectuées et au vu des phénotypes cellulaires, des questions peuvent se poser. En se basant sur les résultats préliminaires, une diminution du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ est mesurée avec le biosenseur sauvage Aurora A. On peut donc dire qu'il est possible de suivre l'activité de la protéine kinase Aurora A à l'aide d'un biosenseur FRET par la technique de FCCS.

1.1. Discussion

Ce mon projet a consisté à mettre en place des mesures de suivi de FRET par spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCCS). Le but de cette mise en place a été de voir la possibilité de mesurer une diminution des ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ où $G_{0,x}$ représente l'amplitude de la courbe de corrélation croisée, $G_{0,v}$ et $G_{0,r}$ correspondent respectivement à l'amplitude des courbes d'autocorrélation du vert et rouge.

Deux phases dans ce projet ont été appréhendées : des mesures de FCCS sur les biosenseurs Aurora A sauvage et mutant en solution et sur des cellules exprimant ces

biosenseurs de manière endogène. La mesure d'une diminution du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ pour toutes les étapes de validation (biosenseur sauvage et mutant K162M en solution et en cellules) nous laisse penser à la possibilité de suivre la FRET par mesure de FCCS.

L'intérêt de cette méthodologie de suivi de FRET par FCCS est de prendre avantage de la technique de FCCS c'est-à-dire faible expression et mesure dans un petit volume pour le suivi d'activité enzymatique à l'aide d'un biosenseur FRET. L'intérêt des études biologiques est de suivre une activité de manière endogène dans des conditions physiologiques, ce qui implique une faible expression protéique. Lorsqu'une activité protéique est étudiée avec l'utilisation d'un biosenseur FRET, il est difficile de la suivre de manière endogène par FRET. En effet, pour mesurer le FRET par les méthodes généralement utilisées, il faut un signal fluorescent assez important.

Néanmoins des questions peuvent se poser au vu des résultats obtenus lors des mesures de FCCS des biosenseurs en solution et en cellules. En effet, pour chaque biosenseur (WT et K162M) les ratios $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ et $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$ ne sont pas égaux, le ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ est toujours plus petit que le ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$. Cette différence laisse penser que le nombre de molécules vertes et rouges détectées dans le volume focal n'est pas identique. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence de ratios : (i) la présence d'autofluorescence du milieu et ce malgré un changement de milieu avant les acquisitions, (ii) l'état triplet de la protéine fluorescente mCherry. L'état triplet est un état noir de la molécule avec un temps caractéristique de l'ns, ce qui fait clignoter les molécules dans le volume confocal. Cela a pour conséquence de modifier l'amplitude de la courbe d'autocorrélation des molécules rouges. La brillance et la maturation de la protéine fluorescente mCherry est un troisième point qui peut influencer l'amplitude de la courbe d'autocorrélation rouge et donc le ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,r}}$. Durant les acquisitions le problème de photoblanchiment des protéines fluorescentes rouges a été rencontré, ce qui peut aussi biaiser les mesures de FCCS. Un phénomène d'aggrégation du biosenseur K162M en solution a également été observé, ce qui peut influencer les mesures de FCCS et donc biaiser les mesures de ratio d'amplitude.

En cellules, il a été observé une différence de localisation suivant le biosenseur exprimé. Le biosenseur mutant K162M a une localisation beaucoup plus diffuse que le

biosenseur WT qui a une localisation au niveau des microtubules et des centrosomes. Serai ce dû à cette mutation ? Cette mutation modifie-t-elle les interactions entre le biosenseur Aurora A et ses partenaires ? Ces questions n'ont pas pu être approfondies.

Pour valider avec une autre expérience la mesure de FRET par FCCS, il serait utile de suivre le changement de conformation du biosenseur sauvage (WT) en solution au cours du temps avec un traitement à la phosphatase et ensuite à l'ATP. En sortie de bactéries, le biosenseur est en conformation fermée (Aurora A est phosphorylée) donc en présence de FRET, après traitement à la phosphatase Aurora A doit se déphosphoryler, il n'y aura donc plus de FRET. Le traitement à l'ATP doit re-phosphoryler Aurora A, le phénomène de FRET est donc observé. Ces traitements ont déjà été caractérisés par FLIM (Bertolin et al.2016) (Fig 2.26).

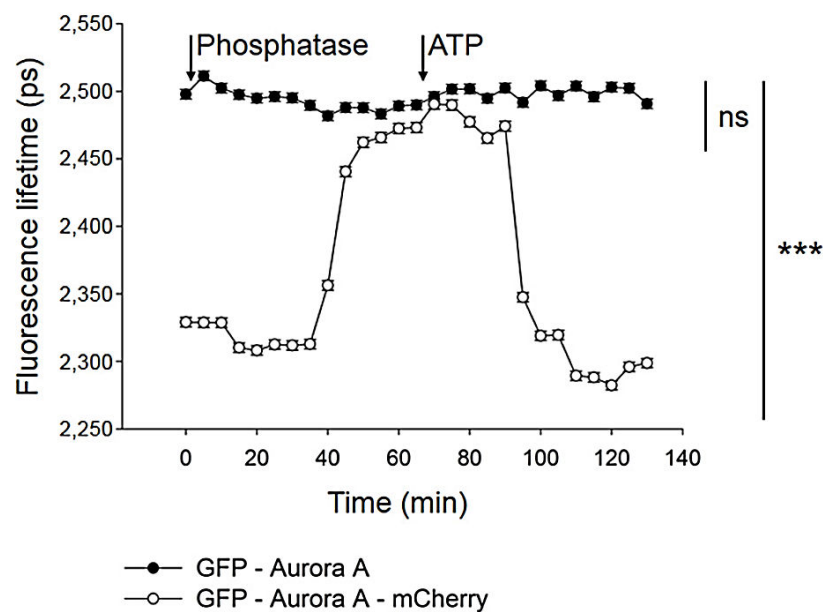


Fig 2.26 : Suivi des biosenseurs EGFP-Aurora et EGFP-AuroraA-mCherry avec un traitement à la phosphatase et à l'ATP. Ces deux traitements n'ont pas d'impact sur la durée de vie mesurée pour le biosenseur contrôle EGFP-AuroraA. L'ajout de la phosphatase provoque une augmentation de la durée de vie du biosenseur sauvage EGFP-AuroraA-mCherry correspondant à la déphosphorylation de la protéine kinase AuroraA. L'ajout de l'ATP provoque une diminution de la durée de vie mesurée du biosenseur sauvage correspondant à la phosphorylation de la protéine kinase Aurora A. Les traitements ont été faits à 30°C et les acquisitions ont été effectuées toutes les 5min. L'addition de la phosphatase et de l'ATP est indiquée par des flèches sur le graphique. Les données représentent la moyenne des durées de vie mesurées $\pm$ SEM de trois expériences indépendantes. (Bertolin et al.2016 ; Nature Com accepté)

Lors du traitement à la phosphatase, la durée de vie du biosenseur EGFP-AuroraA-mCherry mesurée dans le canal du donneur augmente (passe de 2.32ns à 2.46ns) correspondant à un passage de la conformation fermée à ouverte induit par la déphosphorylation de la protéine kinase Aurora A. Le traitement à l'ATP entraîne une diminution (passe de 2.46ns à 2.30ns) de la durée de vie mesurée du biosenseur sauvage correspondant au passage d'une conformation ouverte à fermée induit par la phosphorylation de la protéine kinase Aurora A. Le biosenseur contrôle EGFP-AuroraA n'est pas affecté par les traitements, sa durée de vie reste stable (2.5ns). Des résultats préliminaires ont montré qu'il y avait une tendance à l'augmentation du ratio $\frac{G_{0,x}}{G_{0,v}}$ 1h après traitement à la phosphatase et une tendance à la diminution de ce même ratio 1h après traitement à l'ATP. Il faudrait réitérer ces acquisitions car ce sont de résultats préliminaires et non significatif.

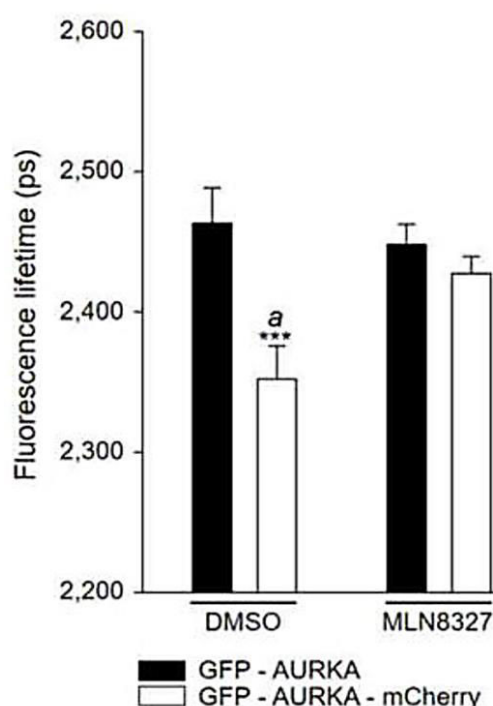


Fig 2.27 : Durée de vie mesurée dans des lignées cellulaires stables exprimant les biosenseurs EGFP-Aurora (en noir) et EGFP-AuroraA-mCherry (en blanc), synchronisées en mitose et traitées avec du DMSO ou avec l'inhibiteur MLN8237. Avec le traitement au DMSO une diminution de durée de vie est mesurée pour le biosenseur EGFP-AuroraA-mCherry. Ce traitement n'a pas d'effet sur l'activité du biosenseur EGFP-AuroraA-mCherry. Avec le traitement au MLN8237, aucune différence de durée de vie n'est mesurée entre les deux biosenseurs. Ce traitement empêche l'autophosphorylation de la protéine kinase Aurora A, un changement de conformation n'est donc pas observé. (Bertolin et al.2016 ; Nature Com accepté)

Il serait aussi possible de faire des mesures de FCCS sur les cellules exprimant le biosenseur WT et d'effectuer un traitement au MLN8237. Cette substance est inhibiteur catalytique de la protéine Aurora A. Il a déjà été montré par FLIM que le phénomène de FRET n'est pas mesuré lorsque des cellules exprimant le biosenseur sauvage et synchronisées en mitose étaient traitées avec MLN8237 (Bertolin et al.2016) (Fig 2.27). L'avantage de cette dernière expérience est la mesure de FCCS sur des échantillons vivants.

D'une manière générale, l'utilisation de la FCCS pour la mesure de FRET permettrait de suivre des activités enzymatiques en condition endogène mais aussi à des endroits où la protéine d'intérêt est localisée de manière très faible comme par exemple dans les organelles, la membrane plasmique ou nucléaire ; et donc où la mesure de FRET par FLIM ou par ratio d'intensité reste difficile. Les résultats préliminaires obtenus semblent prometteurs pour l'utilisation de la technique de FCCS pour suivre un biosenseur faiblement exprimé dans les cellules.

Chapitre 3 Projets secondaires

1. Rapid Lifetime Determination

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'aller travailler trois mois en collaboration avec le Dr Sergi Padilla-Parra au Wellcome Trust Centre for Human Genetics situé à Oxford.

Cette collaboration portait sur la mise en place d'une mesure de durée de vie à l'aide de détecteur Hybride en mode « gated » sur un SP8.

1.1. Introduction

La durée de vie est généralement mesurée par la méthode des déclin de fluorescence (TCSPC). Pour obtenir des déclin de fluorescence avec cette méthode, il est nécessaire d'acquérir quelques minutes (trois à cinq minutes) pour collecter assez de photons et donc pour obtenir un déclin de fluorescence avec suffisamment d'évènements que l'on pourra ajuster avec un modèle exponentiel. L'approche que l'on propose est une méthode d'estimation de la durée de vie d'un déclin de fluorescence exponentiel en utilisant un ensemble d'intégrales entre des points de temps (j'appellerai au cours de cette partie cette méthode RLD pour Rapid Lifetime Determination). Dans la figure 3.1, il est décrit les deux intégrales comme étant T_1 et T_2 (Sharman et al. 1999). La durée de vie calculée à l'aide de cette estimation est décrite avec l'équation suivante

$$\tau = \frac{-\Delta t}{\ln(T_2^2 / T_1^2)}$$

Où Δt représente la largeur de la porte temporelle; T_1 correspond à la moyenne d'intensité de la première porte temporelle et T_2 correspond à la moyenne d'intensité de la deuxième porte temporelle.

Le développement de cette méthode a pour but de voir s'il est possible de mesurer rapidement la durée de vie avec les hybrides en mode « gated » sur le SP8 de Leica en prenant deux images d'intensités de fluorescence à différentes portes temporelles correspondant aux deux intégrales (T_1 et T_2).

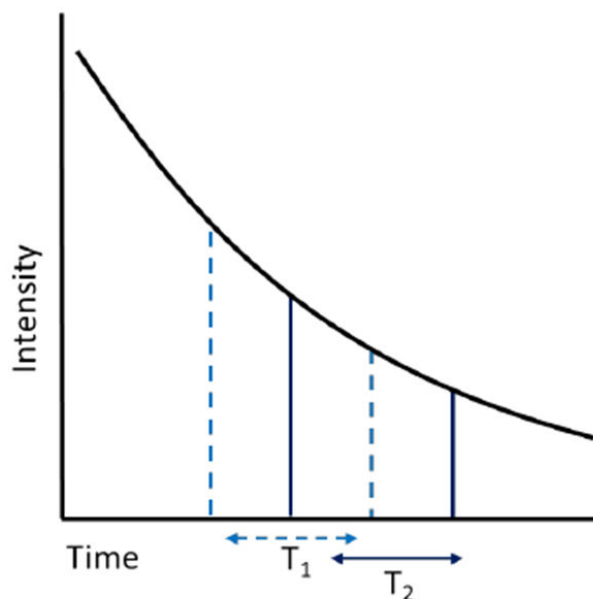


Fig 3.1 : Exemple d'un déclin de fluorescence. L'aire entre les deux paires de lignes pointillés et lignes pleines correspond à chaque intégrale (T_1 et T_2) requises pour la méthode RLD.

Pour notre approche, nous avons choisi d'acquérir deux portes temporelles de 4ns. Ces portes temporelles se chevauchent à 50% : la première est acquise de 0 à 4ns et la deuxième est de 2 à 6ns.

1.2. Mesure de durée de vie en solution test

Les premiers tests se sont portés sur des acquisitions de la rhodamine6G en présence ou non d'iodure de potassium (KI) (Leray et al. 2013). Ce dernier est un « extincteur » c'est à dire qu'il va permettre de désactiver l'état excité de la rhodamine6G par transfert d'énergie provoquant une diminution de durée de vie de la rhodamine6G. Nous savons que plus la concentration de KI est importante plus la durée de vie de la rhodamine6G diminue. Grâce à cette certitude, deux points vont être vérifiés : (i) la méthode RLD permet-elle de mesurer une diminution de durée de vie de la rhodamine suivant la concentration de KI ? (ii) la durée de vie mesurée avec la méthode RLD est-elle identique à celle mesurée avec la méthode TCSPC (fit mono-exponentiel) ?

Pour répondre à ces questions des solutions de rhodamine6G avec différents pourcentages (de 0 à 90%) de KI ont été réalisées. La durée de vie de ces solutions a été

mesurée avec la méthode RLD et en TCSPC avec un fit mono-exponentiel. Pour les deux méthodes, une diminution de la durée de vie de la rhodamine6G est mesurée en concordance avec l'augmentation du pourcentage de KI dans les solutions (Fig 3.2). L'inconvénient dans ces mesures est la non-récupération des mêmes durées de vie pour chaque solution par ces deux méthodes. En effet, avec la méthode RLD la durée de vie mesurée est supérieure à celle mesurée par la méthode TCSPC (qui est une méthode sûre pour la mesure de durée de vie). Par exemple, la durée de vie mesurée pour la rhodamine6G pure est de 3.86ns avec la méthode TCSPC et de 4.74ns pour la méthode RLD.

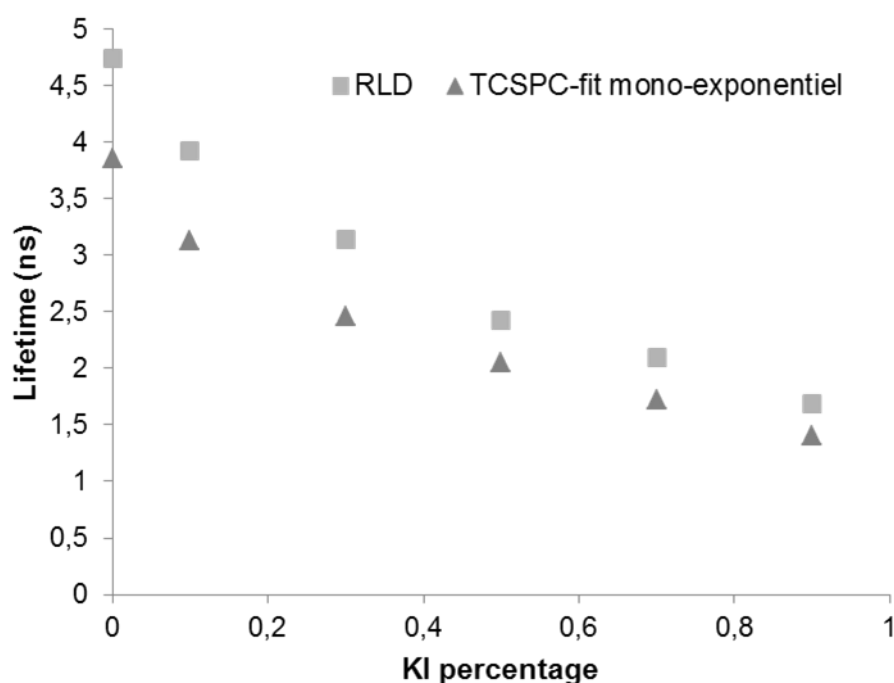


Fig 3.2 : Comparaison des durées de vie de fluorescence mesurées par la méthode RLD (carrés) et la méthode TCSPC (triangle) pour différents mélanges de rhodamine6G et d'iodure de potassium. Diminution de la durée de vie mesurée avec l'augmentation du pourcentage de KI dans les solutions. Par contre, les durées de vie mesurées pour les deux méthodes ne sont pas identiques.

Les durées de vie obtenues avec la méthode RLD ne sont pas absolues mais relatives. En tenant compte de ce point, il est néanmoins intéressant de tester s'il est possible de mesurer des différences de durées de vie dans des échantillons vivants.

1.3. *Mesure de durée de vie dans des échantillons vivants*

Pour cette partie, le but est de vérifier s'il est possible de mesurer dans des échantillons vivants une différence de durée en présence ou non de FRET. Pour cela, des cellules U2OS ont été transfectées avec la protéine fluorescente Clover (donneur seul) qui est notre condition où il n'y a pas de FRET et un tandem Clover-mRuby2 (donneur et accepteur liés par un petit lien peptidique) qui est notre condition où il y a un transfert d'énergie entre Clover et Ruby2.

Les durées de vie de fluorescence ont été mesurées par la méthode TCSPC et RLD (Fig 3.3). Ces mesures sont faites avec les mêmes paramètres que pour les mesures en solution. Une diminution significative de la durée de vie est mesurée lorsque le donneur est lié à l'accepteur par les deux méthodes. Pour la méthode TCSPC (Fig 3.3B), la durée de vie mesurée du tandem est de $2.06 \pm 0.3\text{ns}$ ($n=30$) alors que Clover seul a une durée de vie de $2.58 \pm 0.16\text{ns}$ ($n=25$). Pour la méthode RLD, (Fig 3.3C) la durée de vie mesurée du tandem est de $2.79 \pm 0.22\text{ns}$ ($n=30$) alors que Clover seul a une durée de vie de $3.39 \pm 0.08\text{ns}$ ($n=25$). Comme pour les solutions rhodamine6G et KI, les durées de vie mesurées pour Clover et le tandem Clover-Ruby2 par les deux méthodes sont différentes. La méthode RLD surestime la durée de vie par rapport à la méthode TCSPC. Malgré cette surestimation, la différence de durée de vie mesurée entre le donneur seul et le tandem avec la méthode RLD reste très proche de celle mesurée avec la méthode TCSPC (0.60ns pour la méthode RLD et 0.52ns pour la méthode TCSPC). La différence de durée de vie mesurée pour le donneur et le tandem entre ces deux méthodes est respectivement de 0.81ns et 0.73ns .

Après ces acquisitions, on peut conclure que la méthode RLD permet de mesurer des durées de vie de fluorescence relatives et qu'elle est assez « précise » pour mesurer une différence entre une condition FRET et pas FRET.

La prochaine étape est de valider la possibilité de suivre une activité enzymatique à l'aide de biosenseur par la technique RLD.

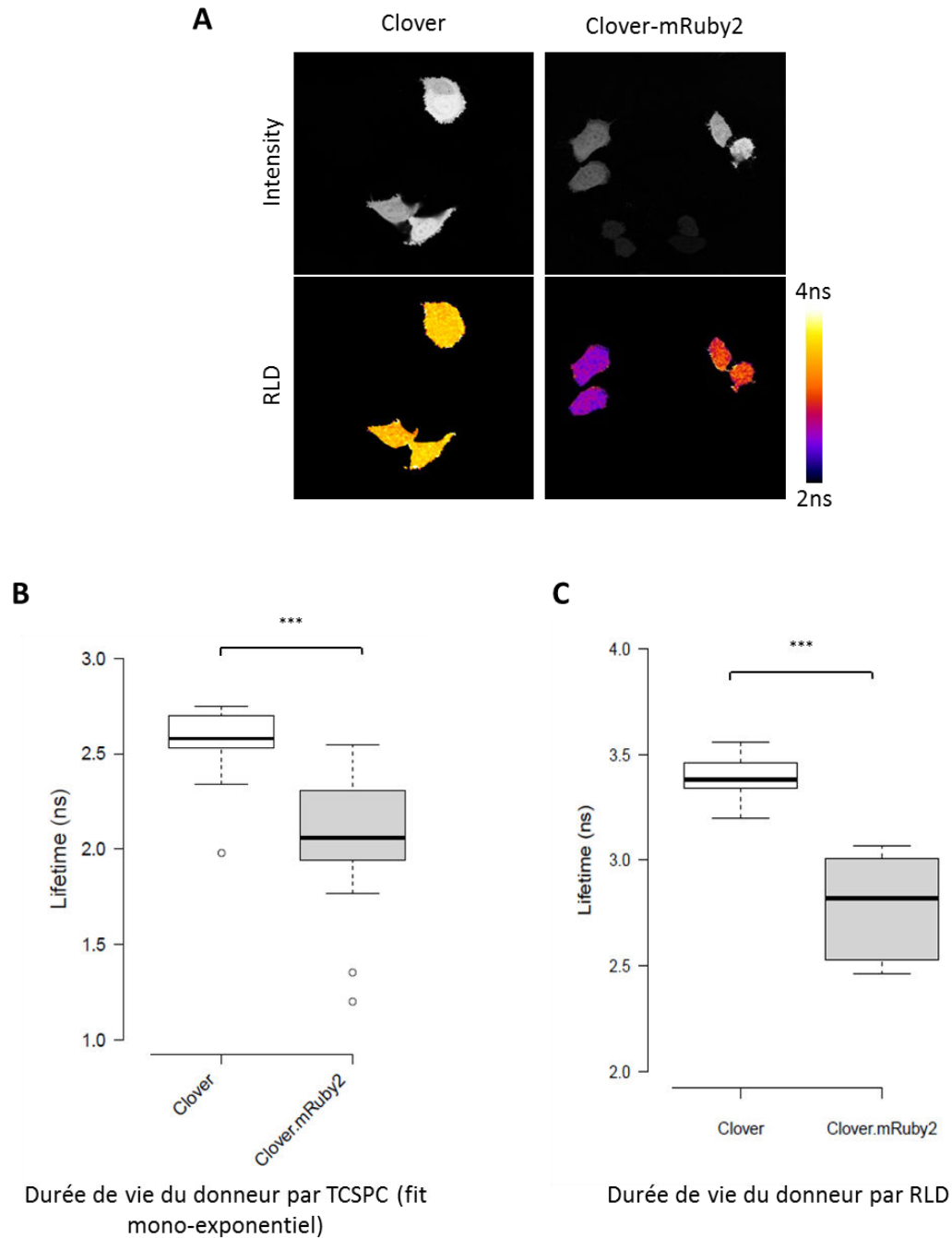


Fig 3.3 : (A) Images représentant l'intensité et la durée de vie mesurée pour des cellules exprimant Clover et le tandem Clover-mRuby2 par la technique RLD. Les images d'intensité représentent la première image d'intensité acquise (T_1) et les images de durée de vie sont obtenues en appliquant la formule d'estimation de durée de vie. Boxplot représentant les durées de vie mesurées pour Clover et le tandem Clover-Ruby2 par les méthodes TCSPC (B) et RLD (C). Avec la technique TCSPC (B), la durée de vie moyenne mesurée à l'aide d'un modèle mono-exponentiel de Clover et du tandem Clover-mRuby2 est respectivement de 2.58 ± 0.16 ns et 2.06 ± 0.3 ns. Avec la technique RLD (C), la durée de vie moyenne mesurée de Clover et du tandem Clover-mRuby2 est respectivement de 3.39 ± 0.08 ns et 2.79 ± 0.2 ns.

Juste après mon départ, la forme de la porte temporelle, acquise avec le détecteur hybride en mode « gated », a été caractérisée (Fig 3.4). Quelques points sont à noter sur cette porte temporelle. Tout d'abord, la porte ne commence pas à 0ns mais plutôt à 2ns. La largeur de la porte est de 5ns et un pic d'une intensité importante (plus grande que l'intensité de la porte temporelle) est visible entre 0 et 2ns. Le pic d'intensité est quelque peu difficile à rationaliser bien qu'il est certainement lié au mécanisme de déclenchement utilisé pour activer le détecteur. La caractérisation de la porte temporelle a été effectuée avant et après les acquisitions sur plusieurs jours. La figure 4 représente trois exemples de portes temporelles caractérisées. Ces trois exemples montrent que la porte temporelle reste identique entre chaque acquisition. Après discussion avec le service après-vente de Leica, il s'avère que le pic à 0ns correspond à la fin de la porte temporelle et que la porte entre 2 et 7ns est une porte secondaire (réflexion dans la tête confocale). C'est pour eux le moyen d'enlever tous les phénomènes rapides (réflexion, autofluorescence) de la mesure même à 0ns. Dans notre cas, c'est comme si nous avions mesuré la RLD avec des portes de 4 à 8ns et de 6 à 10ns. La RLD est une mesure indépendante de là où commence la porte temporelle (l'intensité et la taille de la porte temporelle acquise interviennent dans le calcul de la RLD). Il faudrait donc régler l'hybride autrement pour avoir une intensité maximale.

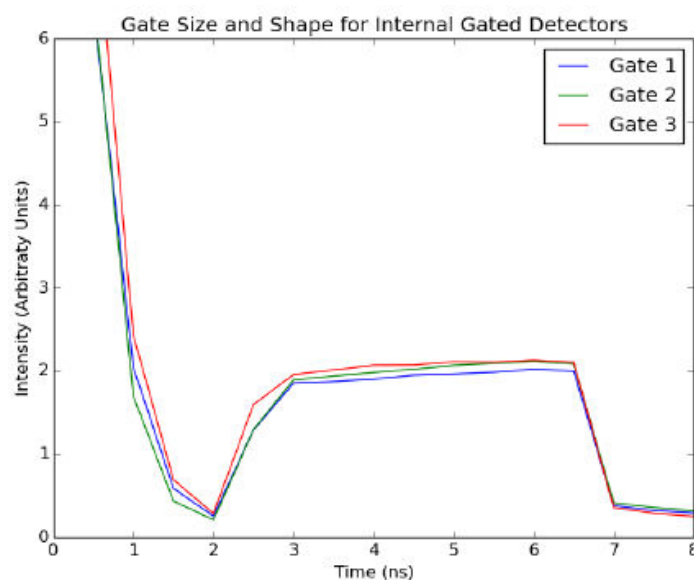


Fig 3.4 : Les graphiques représentent la porte temporelle d'un détecteur hybride interne. Les porte 1-3 ont été collectées au cours de plusieurs occasions en utilisant le même détecteur.

Malheureusement, mon travail s'est arrêté ici, je n'avais pas accès à un hybride en mode « gated » à Rennes. Mais j'ai bon espoir que la mesure de durée de vie de fluorescence soit possible à l'aide des détecteurs hybride sur le SP8 de Leica. Cette possibilité pourra ouvrir la porte au suivi du FRET par FLIM dans des laboratoires ayant un SP8 avec hybride en mode « gated ». La mesure de durée de vie sera plus accessible : il n'y aura plus besoin d'acheter des modules supplémentaires pour pouvoir faire des acquisitions.

2. Visualisation d'interaction protéine-protéine par FCCS chez la levure

En collaboration avec le Dr Gwenaél Rabut, dans le cadre de l'étude sur l'ubiquitination et plus particulièrement à l'interaction des acteurs de ce processus biologique, j'ai mis en place des mesures de FCCS en levure.

2.1. Introduction

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle importante dans la survie cellulaire. En effet ce processus a plusieurs rôles tels que la stabilité protéique, les protéines marquées par les ubiquitines pourront être adressées aux protéasomes pour leur dégradation ; le remodelage de la chromatine, la régulation de la localisation cellulaire, du trafic et de la signalisation intracellulaire. Principe générale de l'ubiquitination : trois enzymes sont impliquées dans ce processus. La première étape est l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme activatrice E1 qui se produit par hydrolyse de l'ATP. Cette étape provoque la fusion de l'ubiquitine avec l'enzyme E1. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un groupe sulfure de l'enzyme conjugante E2. L'ubiquitine passe sur la protéine substrat à l'aide de l'enzyme ligase appelée E3 qui est liée à la protéine substrat et l'enzyme conjugante E2. Plusieurs enzymes E3 permettent de passer l'ubiquitine directement de l'enzyme E2 à la protéine substrat. Ce processus d'ubiquitination peut être répété plusieurs fois pour créer des chaînes de plusieurs ubiquitines sur les protéines substrats (Mcdowell & Philpott 2016). La mono-ubiquitination est impliquée dans la signalisation cellulaire, la réparation à l'ADN, le marquage épigénétique de la chromatine ou la régulation de la localisation de certaines protéines. La poly-ubiquitination sur la lysine 48 entraîne l'adressage de la protéine modifiée au protéasome pour sa dégradation.

Plusieurs enzymes existent pour chaque étape de ce processus. Il y a deux enzymes activatrices E1 chez les vertébrés Uba1 (Hershko et al. 1983; Handley et al. 1991) et Uba6 (Jin et al. 2007). Ces enzymes ont des spécificités différentes comme les enzymes E2 à qui elles donneront l'ubiquitine. Il y a environ cinquante enzymes E2 qui sont classées en quatre groupes suivant leurs structures (Clague et al. 2015). Ces enzymes E2 peuvent interagir avec plusieurs centaines d'enzymes E3 dans les mammifères, permettant des milliers d'interaction entre les enzymes E2 et E3 (Markson et al. 2009). Ces nombreuses enzymes présentent une grande diversité dans les machines d'ubiquitination (Huibregtse et al. 1995; Jackson et al. 2000; King et al. 1995).

Au vu des nombreuses enzymes existantes, il est intéressant d'étudier et de découvrir de nouvelles interactions entre ces enzymes. Pour ça, l'équipe du Dr Gwenaél Rabut étudie l'interaction entre E2 et E3 dans les levures. Le nombre d'enzymes est plus petit dans cette organisme modèle par rapport au nombre d'enzyme retrouvés chez l'humain. En effet, onze enzymes E2 et environs soixante enzymes E3 sont retrouvées chez la levure.

Dans un premier temps, il a été question de déterminer si oui ou non une interaction entre Ubc13 et Mms2 était visible par FCCS chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et s'il était possible de quantifier l'interaction entre ces deux protéines. Ubc13 est une enzyme E2 qui permet de transférer l'ubiquitine sur la protéine substrat. Mms2 est une protéine participant à la réparation après un dommage à l'ADN post-réplication chez la levure (Broomfield et al. 1998).

2.2. Interaction Ubc13 et Mms2

Pour répondre à la première question qui était : « une interaction entre Ubc13 et Mms2 dans les levures est-elle visible par FCCS ? », trois souches de levures ont été étudiées (Fig 3.5): une souche exprimant Ubc13 marquée de trois mKate2 (protéine rouge) et Mms2 marquée de trois superfolderGFP (sfGFP) ; une deuxième souche exprimant Ubc13 fusionnée à Mms2 qui nous sert de contrôle positif car les protéines fluorescentes co-diffuseront ; et une troisième souche exprimant Ubc13 marquée de trois mKate2 et Ubc 4 marquée de trois sfGFP qui nous permet d'avoir un contrôle négatif car il est connu que ces deux protéines n'interagissent pas entre elle.

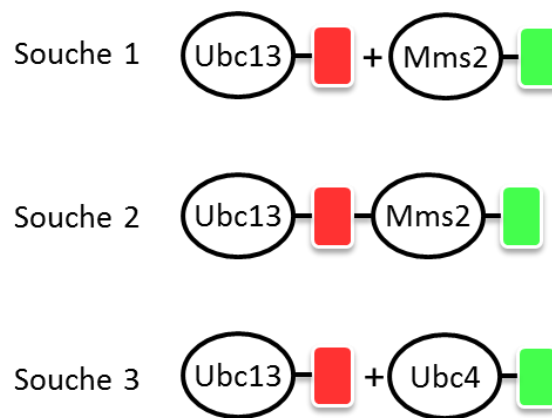


Fig 3.5 : Schéma des différentes souches de levure. La souche 1 est notre souche test, elle exprime Ubc13 marquée de 3xmKate2 et Mms2 marquée de 3xsfGFP. La souche 2 est notre contrôle positif où Ubc13 et Mms2 sont liées entre elles. La souche 3 est notre contrôle négatif, elle exprime Ubc13 marquée 3xmKate2 et Ubc4 marquée 3sfGFP. On sait que ces deux protéines n'interagissent pas entre elles.

Les levures utilisées sont diploïdes ce qui permet d'avoir une taille plus grande et un noyau plus grand donc plus visible afin de faciliter les mesures. De plus, le noyau est visible par un marquage à l'iRFP excité à 633. La protéine sfGFP est une GFP modifiée plus stable et plus brillante la protéine GFP. Pour chaque acquisition la mise au point a été effectuée sur le marquage à l'iRFP

Les mesures de FCCS ont été faites avec un laser pulsé à 470nm et un laser continu à 561nm. Comme vu précédemment, ces propriétés d'acquisition permettent de supprimer la détection des photons verts dans le canal rouge après une analyse en FLCS (analyse décrite dans le *Chapitre 1* paragraphe 2.2.2 *Analyse en FLCS*).

Les fluctuations d'intensité de fluorescence pour les deux canaux ont été mesurées dans le noyau et le cytoplasme pour chaque levure.

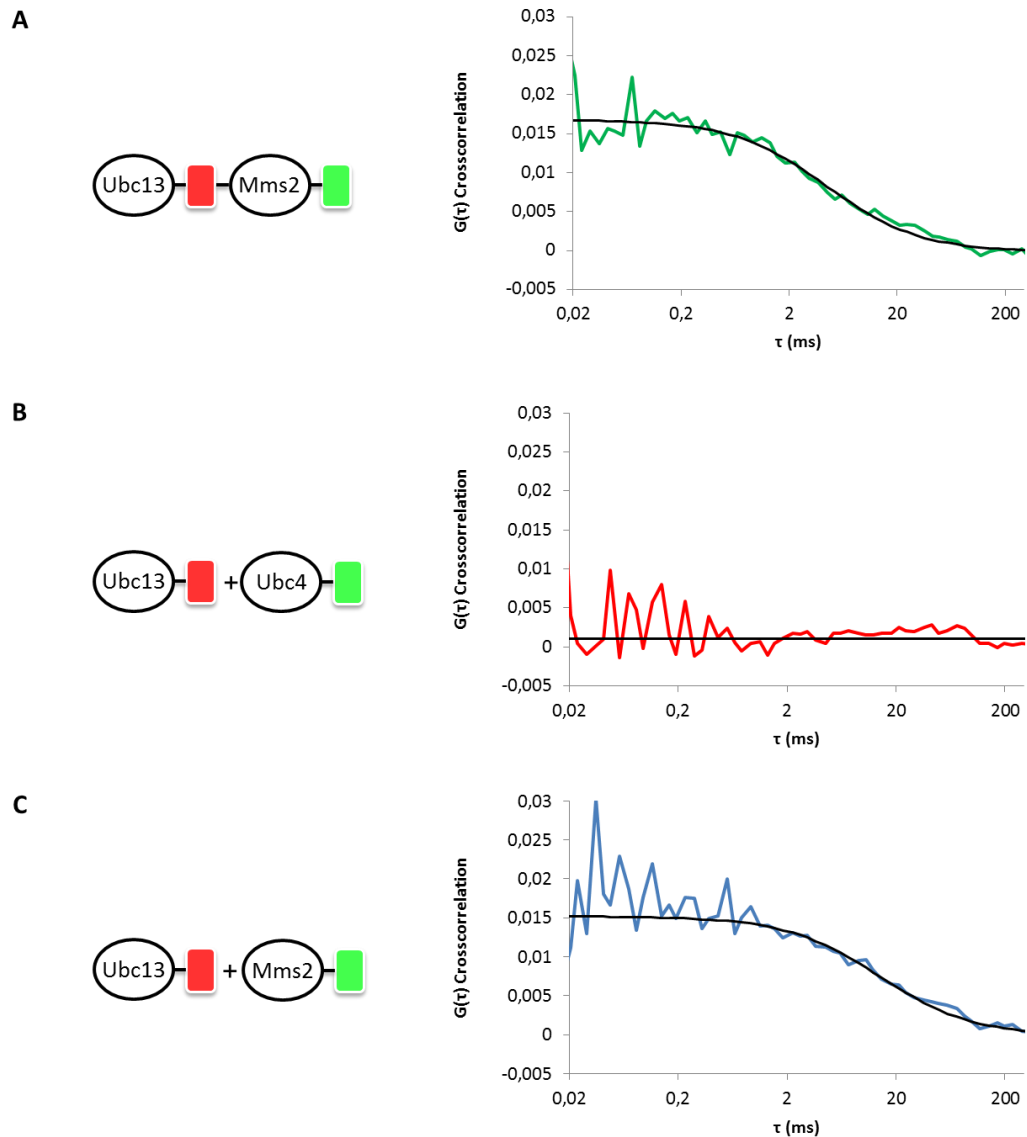


Fig 3.6 : Courbe de corrélation croisée obtenue pour chaque souche étudiée. Pour le contrôle positif une courbe de corrélation croisée positive est obtenue, pour le contrôle négatif une courbe de corrélation croisée nulle est mesurée confirmant la non interaction des protéines, pour la souche test, une courbe de corrélation croisée positive est obtenue résultant d'une interaction entre Ubc13 et Mms2.

Après analyse des mesures effectuées sur la souche contrôle positif où les deux protéines sont liées, il est observé une courbe de corrélation croisée positive confirmant bien la co-diffusion des deux protéines (Fig 3.6A). Il a été réalisé des mesures sur la souche exprimant le contrôle négatif. Après analyse, il est mesuré une courbe de corrélation croisée nulle, confirmant que les deux protéines Ubc13 et Ubc4 n'interagissent pas entre elles (Fig 3.6B). Après avoir obtenu les courbes de corrélation croisée attendues pour les contrôles positif et négatif, des mesures dans les levures exprimant Ubc13 et Mms2

librement ont été réalisées. Après analyse, une courbe de corrélation croisée positive est obtenue (Fig 3.6C). Cette courbe de corrélation positive nous indique qu'Ubc13 et Mms2 interagissent entre elles. En calculant les ratios d'amplitude des courbes de corrélation croisée sur amplitude des courbes d'autocorrélation pour chaque condition (le contrôle positif et l'expression libre des deux protéines Ubc13 et Mms2), il est possible de calculer le pourcentage de protéine Ubc13 ou Mms2 liée ou libre dans le noyau et le cytoplasme. D'après le tableau 1, on peut conclure que majoritairement des protéines Ubc13 et Mms2 sont liées quel que soit leur localisation noyau ou cytoplasme. En effet, dans le cytoplasme on retrouve 89% d'Ubc13 et Mms2 liées et dans le noyau on retrouve respectivement 96% et 87% d'Ubc13 et Mms2 liées.

	Ubc13		Mms2	
	Libre (%)	Liée (%)	Libre (%)	Liée (%)
Cytoplasme	11	89	11	89
Noyau	4	96	13	87

Tableau 1 : Tableau représentant le pourcentage de protéine Ubc13 et Mms2 liée ou libre dans le noyau et le cytoplasme. La plupart des protéines interagissent entre elles quel que soit leur localisation.

2.3. Test d'autres types d'interactions

Après ce résultat positif, d'autres souches ont été testées exprimant les protéines Ps1 et Ubc13 ou Rad5 et Ubc13. Le but de ces tests est de mesurer ou non des interactions entre Psh1 ou Rad5 et Ubc13 où Psh1 et Rad5 font parties de la famille des enzymes ligases E3 (Carlile et al. 2009; Hewawasam et al. 2010). Dans ces souches de levure, Psh1 et Rad5 sont marquées par trois sfGFP et Ubc13 marquée par trois mKate2. Pour chaque nouvelle protéine, un contrôle positif a été créé et la protéine d'intérêt Psh1 ou Rad5 a été marquée par trois sfGFP. Pour l'instant les acquisitions FCCS sont difficiles pour ces protéines car elles sont moins présentes dans la levure, un photoblanchiment des protéines vertes dans l'échantillon est observé.

Les acquisitions en FCCS chez la levure restent difficiles car il est souvent observé des mouvements de la cellule au cours du temps d'acquisition, la puissance laser doit être

réglée finement sinon un photoblanchiment est observé et enfin il faut surtout trouver un compromis entre une puissance laser permettant de récupérer assez de photons pour sortir du bruit de mesure mais tout en évitant le photoblanchiment. La brillance des protéines fluorescentes utilisées est aussi très importante en FCCS, plus la protéine est brillante plus il est facile de sortir du bruit de mesure. Au vu des résultats obtenus, on peut dire que la brillance de la protéine fluorescente sfGFP est convenable pour les mesures de FCCS mais que la protéine fluorescente mKate2 a une brillance un peu faible ce qui rend la détection de photons rouges assez difficile malgré l'expression de trois mKate2. On a commencé à comparer une souche exprimant mKate2 et une souche exprimant TagRFP. Je n'ai pas pu aller jusqu'au bout mais il semblerait que la protéine TagRFP est plus photostable que la protéine mKate2. Pour vérifier cette hypothèse d'autres mesures devront être réalisées.

Chapitre 4 Conclusion et perspectives

L'imagerie FRET est un outil efficace pour sonder la proximité entre protéines mais aussi pour suivre une activité enzymatique à l'aide de biosenseur. Généralement deux techniques sont utilisées pour l'imagerie FRET : soit une imagerie par ratio d'intensité de fluorescence soit la mesure de la durée de vie de fluorescence (FLIM). Ces deux techniques ont malheureusement quelques limitations comme la fuite spectrale de fluorescence, la méthode par ratio d'intensité est dépendante de la concentration des protéines fluorescentes exprimées ce qui n'est pas le cas de la mesure de la durée de vie, la difficulté de suivre plusieurs activités enzymatiques en simultanée.

L'objectif de mon travail était de développer des méthodes permettant de dépasser les limitations rencontrées dans le suivi de biosenseur FRET par microscopie de fluorescence quantitative. La question que l'on peut se poser est « est-il possible de continuer l'amélioration des outils moléculaires et techniques pour suivre une activité biochimique à l'aide de biosenseur FRET ? ».

Premièrement, les biosenseurs FRET sont généralement composés d'une paire de protéines fluorescentes donneur/accepteur. Le FRET est mesuré par un ratio d'intensité accepteur sur donneur ou par la mesure de durée de vie du donneur. Lors de la mesure du FRET par durée de vie, une question peut se poser : la diminution de durée de vie mesurée est-elle réellement due au phénomène de FRET ou à un phénomène biologique et environnemental qui se déroule autour du donneur comme par exemple un étirement de la protéine fluorescente. De nouveaux biosenseurs ont été développés pour suivre une activité biochimique en mesurant le changement de fluorescence d'un fluorophore. Par exemple, un biosenseur de ce type a été développé pour suivre l'activité CDK/Cycline (Van et al. 2014). Ce biosenseur est composé d'un peptide substrat des CDK/Cycline avec une seule cystéine comme site spécifique marquée avec une sonde fluorescente. Ce peptide substrat est lié au domaine de reconnaissance de l'acide aminé phosphorylé par une petite séquence peptidique. La phosphorylation du substrat induit un changement de conformation altérant l'environnement de la sonde fluorescente. L'activité des CDK/Cyclines est mesurée par une augmentation de fluorescence. La limitation de ces biosenseurs est leur internalisation dans

les cellules vivantes. En effet, ils sont généralement synthétiques et non génétiquement encodés, leur expression en cellules est donc difficile. Si cette limitation est abolie, beaucoup de biosenseurs seraient développés à l'aide de cette stratégie et il serait sans doute plus facile de suivre une activité biochimique. Lors de l'étude sur l'activité PKA dans les neurones à l'aide du biosenseur AKAR2 par Bonnot et Guiot (Bonnot et al. 2014), le donneur et l'accepteur de ce biosenseur ont été remplacés par les protéines fluorescentes GFP et une YFP non fluorescente. Lors de l'étude avec ce nouveau biosenseur, il a été montré que la fluorescence de la GFP ne diminuait pas mais augmentait lorsque PKA était stimulée. En voyant ce résultat surprenant les chromophores des deux protéines ont été inactivés, avec ce biosenseur aucune augmentation de fluorescence de la GFP n'est mesurée lorsque la voie PKA est stimulée. En remodifiant le chromophore de la protéine GFP, une augmentation de la fluorescence est mesurée quand la voie PKA est stimulée confirmant que la réponse mesurée du biosenseur n'est pas due au transfert d'énergie. Ils ont identifié des mutations dans le brin bêta 7 qui rendent l'intensité de fluorescence et la durée de vie de la GFP sensible aux changements de conformation dus à l'activité de PKA. Ces résultats sont intéressants car ils montrent que le changement de fluorescence observé lors du suivi d'une activité biochimique n'est pas forcément dû au FRET. Des questions donc se posent lorsqu'un biosenseur FRET est suivi par ratiométrie. Le suivi de biosenseur FRET par mesure de durée de vie est donc un avantage car le donneur est le seul observé. Pour le travail effectué au cours de ma thèse, il serait attrayant de modifier les biosenseurs EKARsREACH et AKAR^{dual} avec ce type de protéines fluorescentes mutées pour suivre les activités ERK et PKA en enlevant intégralement la fuite spectrale

Deuxièmement, il serait intéressant de suivre une activité biochimique avec un biosenseur FRET par anisotropie de fluorescence. Cette technique repose sur l'analyse de la dépolarisation de la lumière et est surtout utilisée pour suivre des interactions protéine-protéine marquées avec la même protéine fluorescente, dans le cas d'une oligomérisation. Par exemple, cette technique a été utilisée pour suivre la formation de dimères de la thymidine kinase du virus de l'Herpes HSV-1 (Herpes simplex virus) (Gautier et al. 2001). Dans le cas de l'homo-FRET (FRET entre deux protéines fluorescentes identiques), la dépolarisation de la lumière émise par le second fluorophore va permettre de caractériser le phénomène de FRET (Weber 1954). En effet, si les dipôles du donneur et de l'accepteur ne

sont pas parallèles, la fluorescence émise due au transfert d'énergie du donneur (qui a été photo-sélectionné) est dépolarisée par rapport à la lumière d'excitation. Tout changement de direction des dipôles pendant la durée de vie de l'état excité du fluorophore provoquera une diminution de l'anisotropie c'est-à-dire une dépolarisation partielle ou totale de la fluorescence. Dans le cas où les mouvements de rotation moléculaire sont moins rapides que l'état excité du fluorophore, l'anisotropie devient insensible à ces mouvements. C'est le cas des protéines marquées par des GFP, la durée de vie des GFP est de l'ordre de quelques nanosecondes quand les temps caractéristiques de rotation des protéines sont de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes. On peut donc penser qu'en marquant un biosenseur FRET avec deux protéines fluorescentes GFP, une diminution de l'anisotropie pourrait être mesurée lors d'un changement de conformation de ce biosenseur.

Troisièmement, en mesurant le FRET par FCCS, la composante spatiale est perdue. En effet, les mesures s'effectuent en mode point et il n'est pas toujours évident de rendre robuste les mesures en particulier si les résultats dépendent d'une localisation particulière dans les cellules. Pour rétablir la composante spatiale, des mesures en spectroscopie à corrélation d'image (ICS) pourraient être faites. C'est une technique permettant la mesure de fluctuation de fluorescence en mode image. Elle a été utilisée pour mesurer la mobilité des protéines récepteurs des intégrines marquées avec des protéines fluorescentes vertes (Wiseman et al. 2000), le mouvement des récepteurs androgènes à travers la cellule (Chiu et al. 2016). Un variant de l'ICS, la spectroscopie à corrélation croisée d'image (ICCS) a été développé pour suivre les fluctuations d'intensité de fluorescence en mode image de deux fluorophores. Cette technique a été utilisée pour mesurer des propriétés de transport des intégrines avec l'actine ou la paxilline (Wiseman et al. 2000; Wiseman et al. 2004) ou pour étudier la colocalisation de deux différentes molécules marquées (Brown & Petersen 1998). L'avantage des techniques de corrélation d'images est que les échelles de temps de l'imagerie permettent de mesurer des propriétés de transport lent, même dans des systèmes quasi-statiques, comme dans le cas des protéines transmembranaires dans les cellules. Une autre approche a été développée permettant de mesurer des coefficients de diffusion et les vecteurs de vitesse pour des protéines de la membrane marquées par des fluorophores dans des cellules vivantes. Cette technique est nommée la spectroscopie à corrélation croisée d'image spatio-temporelle (STICCS) (Hebert et al. 2005). Il est possible de

déterminer si des protéines marquées sont indépendantes ou diffuses ensemble en suivant la corrélation temporelle des pics de corrélation croisée spatiale. À l'aide de cette technique, les fluctuations d'intensité spatio-temporelles des intégrines marquées à l'EYFP et l'actine marquée à l'ECFP exprimées dans des cellules vivantes ont été analysées pour chaque canal de détection. Les résultats ont montré que les intégrines et l'actine étaient transportées en complexe dans certaines régions de la cellule. L'application de la technique de STICCS ouvre de nouvelles perspectives sur la détection des interactions moléculaires et le co-transport de macromolécules dans les cellules. Une dernière technique basée sur la spectroscopie à corrélation croisée d'image a été développée : la spectroscopie à corrélation croisée d'image pixelisée (ccRICS) (Digman et al. 2009). Cette technique permet l'étude de la dynamique moléculaire spatio-temporelle, elle permet de détecter l'interaction entre deux molécules marquées par des fluorophores en analysant les signaux fluorescents dans différents canaux de détections. L'inconvénient de cette technique est que l'analyse est faite sur une région d'intérêt. À l'aide de cette technique, des analyses en ccRICS sur de l'ADN fluorescent ont été effectuées et le processus de dégradation de l'ADN exogène dans le cytoplasme de cellules vivantes a pu être suivi (Sasaki et al. 2015). Dans notre cas, ce n'est pas la co-diffusion des molécules qui nous intéresse car le biosenseur FRET est marqué par deux protéines fluorescentes donc une co-diffusion sera détectée. Mais plutôt l'amplitude de la courbe de corrélation croisée et de l'autocorrélation verte qui doivent être modifiées en présence de FRET. Des tests doivent donc être faits pour s'assurer de la possibilité de suivre une activité biochimique par mesure de FRET par les techniques de spectroscopie à corrélation croisée d'image.

Les systèmes de mesure de durée de vie peuvent être lents comme par exemple le TCSPC. De nouveaux microscopes plus rapides dans la mesure de durée de vie ont été développés. Comme par exemple, le prototype fastFLIM sur lequel j'ai mis en place la méthodologie de suivi de deux activités biochimiques en simultané. Ce système est un microscope rapide pour la mesure de FLIM. La mesure de durée de vie par phase et modulation avec le microscope LiFa est également un système rapide de mesure. Un nouveau système de mesure de durée de vie par phase et modulation a été développé encore plus rapide, le siFLIM (Raspe et al. 2016). Généralement avec ce principe, une caméra CCD et un intensificateur sont utilisés et 12 images de phases sont utilisées pour

mesurer la durée de vie. Les inconvénients de la mesure de durée de vie par phase et modulation conventionnelle sont la lenteur des acquisitions, la phototoxicité et les artéfacts de mesures dus aux mouvements. Avec le siFLIM, la caméra et l'intensificateur sont remplacés par une nouvelle caméra, la MEMFLIM, qui est une caméra pour le FLIM modulé. Cette caméra a pour avantage d'avoir une meilleure résolution spatiale et d'acquérir deux images en simultanées suivant la phase. La première image représente l'intensité à la phase ϕ et la deuxième image représente l'intensité à la phase $\phi + \pi$. À cause du décalage de phase, la première image d'intensité sera plus brillante par rapport à la deuxième qui sera plus faible. Seules les deux images de phase acquises en simultanées sont nécessaires pour obtenir l'image en durée de vie. Le siFLIM est un système rapide et permet d'avoir une faible phototoxicité, un photoblanchiment minimal et réduit les artéfacts dus aux mouvements cellulaires rapides et aux signaux transitoires. Ce qui a été effectué en mode RLD sur détecteur hybride correspond aussi à cette tendance de mesurer de FLIM avec seulement deux images de phase ou temporelle, même si dans le cas présent la méthode s'effectue sur un confocal, avec ses limitations de vitesse par rapport au mode champ large. On pourrait aussi améliorer la fastFLIM en utilisant un mode à deux images seulement et voir l'impact que cela aurait sur la précision de mesure, en particulier pour le suivi de biosenseur FRET.

L'amélioration des techniques permettant de suivre les changements de conformation protéique par microscopie de fluorescence quantitative permet d'approfondir les études en échantillon vivant. Certes les techniques de microscopie de fluorescence peuvent être contraignantes mais ces techniques sont en perpétuelles évolutions (avec de nouvelles méthodes, le développement de nouvelles protéines fluorescentes, biosenseurs). Il est aujourd'hui plus facile d'utiliser ces techniques. Les méthodologies originales développées au cours de ma thèse contribuent à cet évolution, et je l'espère, pourront faciliter l'utilisation des techniques de microscopie de fluorescence quantitative pour la recherche en biologie.

Chapitre 5 Matériels et méthodes

1. Multiplex deux couleurs FLIM

1.1. Plasmides

Les plasmides GFP-sREACH (mGFP-10-sREACH-N3 du Dr Ryohei Yasuda, Addgene plasmid # 21947) et mTFP1 ont été digérés par les enzymes de restriction *NheI* et *BamHI*. Le fragment mTFP1 a été inséré dans le plasmide GFP-sREACH digéré (-/sREACH) pour créer le nouveau plasmide mTFP1-sREACH. Les plasmides EGFP-ShadowG (donné par le Dr Murakoshi, National Institute for Physiological Sciences, Japan) et mTFP1-sREACH ont été digérés par les enzymes de restriction *BamHI* et *NotI*. Le fragment ShadowG a été inséré dans le plasmide mTFP1-sREACH digéré (mTFP1/-) pour créer le nouveau plasmide mTFP1-ShadowG. Le plasmide LSSmOrange (pLSSmOrange-C1 du Dr Vladislav Verkhusha, Addgene #37130 plasmid) a été inséré dans le plasmide EGFP-C3 par digestion avec *AgeI* et *BsrGI* pour créer le plasmide LSSmOrange-C3. LSSmOrange-C3 généré a été utilisé pour insérer LSSmOrange dans le plasmide mKate2-N1 par digestion avec *NdeI* et *BamHI* pour créer le nouveau plasmide LSSmOrange-mKate2. Les constructions ont été vérifiées par séquençage (IGDR). Le biosenseur FRET EKAR2G (mTFP1/Venus, Addgene plasmid #39813) a été donné par le Dr Olivier Pertz (Department of Biomedicine, University of Basel, Switzerland). Le plasmide AKAR4 a été fourni par le Dr. Jin Zhang (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA). Le vecteur EKAR2G (mTFP1/Venus) a été digéré par les enzymes de digestion *NotI* and *KpnI* pour enlever Venus ce qui génère un vecteur EKAR2G (mTFP1/-). ShadowG a été amplifié à partir du plasmide ShadowG donné par le Dr Murakoshi. Au cours de l'amplification les sites de restriction des enzymes *NotI* et *KpnI* ont été ajoutées, ce qui permet après digestion par ces enzymes de récupérer la protéine ShadowG seul. Après ligation des vecteurs EKAR2G (mTFP1/-) et ShadowG, un nouveau vecteur a été créé EKAR2G (mTFP1/ShadowG). Le biosenseur EKAR2G (mTFP1/sREACH) a été construit avec le même protocole. Le vecteur AKAR4 (Cerulean/cpVenus) a été digéré pour enlever séquentiellement les protéines Cerulean (*BamHI* et *SphI*) et cpVenus (*SacI* et *EcoRI*). Les protéines fluorescentes LSSmOrange et mKate2 ont été amplifiées à partir des plasmides pLSSmOrange-C1 et pmKate2-N1 pour insérer respectivement les sites de restrictions des enzymes *BamHI*/ *SphI*

et *SacI/EcoRI*. Les produits de PCR de LSSmOrange et mKate2 ont été sous-clonés dans le vecteur AKAR4 (-/cpVenus) et ensuite dans le vecteur AKAR4 (LSSmOrange/-). Au final, un nouveau vecteur a été créé AKAR4 (LSSmOrange/mKate2). Les constructions de ces nouveaux vecteurs ont été vérifiées par séquençage (VIB, IGDR). Les fragments d'ADN ont été purifiés par des colonnes de purification Qiagen (#28106, #28706 and # 27106, Qiagen).

1.2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa ont été achetées à la Collection Européenne des Cultures Cellulaire (ECACC, UK). Les cellules Hela et U2OS sont maintenues à 37°C sous 5% CO₂ dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, #E15-009, PAA) complémenté avec 10% de serum de veau foetal (SVF, #A15-101, PAA), 1% pénicilline/streptomycin (P/S, #15140-122, Gibco, Life Technologies) et 1% L-Glutamine (Glu, #25030024, Gibco, Life Technologies). Pour l'imagerie, les cellules HeLa sont déposées dans un support Lab-Tek 4 puits (#055078, Dominique Dutscher). Les transfections ont été faites en suivant le protocole du produit de transfection JetPrime (#114-15, Polyplus). 4h après la transfection, le milieu a été remplacé par 400 µl (par puit) de milieu de déplétion composé de FluoroBrite sans phénol red (#A18967-01, Life Technologies) complémenté avec 0.1% de SVF. Les cellules sont ensuite placées à 37°C sous 5% de CO₂.

1.3. Agents chimiques

Le facteur de croissance épithélial humain (EGF, #E9644), l'inhibiteur des MEKs (U0126, #U120) et le diméthylsulfoxyde (DMSO, #D8418) ont été achetés chez Sigma Aldrich. La forskoline (Fsk, #1099), l'inhibiteur de la voie PKA (H89 dihydrochloride, #2910) et l'inhibiteur des phosphodiésterases (IBMX, #2845) ont été achetés chez Tocris. Les concentrations utilisées pour l'EGF, Fsk, IBMX, U0126 et H89 sont respectivement de 100ng/ml, 12,5µM, 75µM, 20µM et 20µM.

1.4. Imagerie des cellules exprimant les biosenseurs

Environ 12h après le changement de milieu, les cellules peuvent être observées. Pour l'induction des cellules sous le microscope, les activateurs et inhibiteurs sont pré-dilués dans du milieu de déplétion (qsp 100 µl) et sont ajoutés dans le puit d'intérêt.

1.5. Système de FLIM à deux couleurs avec une longueur d'onde d'excitation

Le prototype fastFLIM a été utilisé pour mesurer les durées de vie. Ce microscope est un prototype de microscope FLIM à porte temporelle avec la capacité de faire des acquisitions à temps rapide (Leray et al. 2013). Un laser supercontinuum pulse à une fréquence de 80 MHz est utilisé pour l'excitation. Après la sélection de la longueur d'onde d'excitation à 440nm, le laser est couplé à un spinning disk CSUX1 (Yokogawa, Japan). Les cellules sont imagées avec un objectif 63x ou 20x à immersion à l'huile (NA = 1.4 ou 0.70 respectivement). À l'émission, un Dual View (Photometrics, USA) est utilisé pour séparer le champ de la caméra en deux couleurs avec un miroir dichroïque à 505nm. Ce miroir permet de séparer la fluorescence en deux canaux avec des filtres à bande passante de 480/30nm et 579/34nm. L'image de fluorescence est dirigée à l'intensificateur (High Rate Intensifier, Picostar, LaVision, Germany) couplé à la caméra CCD (CoolSNAP HQ2, Photometrics, USA). Cinq images de porte temporelle de largeur de 2ns sont séquentiellement acquises avec différents retards de 0 à 8ns. Ces cinq images sont directement utilisées pour le calcul de la durée de vie moyenne pixel par pixel (Padilla-Parra et al. 2008). Ce système est plus rapide que les autres systèmes FLIM.

Pour la caractérisation de la durée de vie de LSSmOrange, un système de TCSPC a été utilisé. Ce système est un microscope confocal SP8 de Leica comprenant un module de détection de molécule unique basé sur le hardware de PicoQuant. Un laser pulsé à 440nm est couplé à la tête du confocal du microscope inversé avec des objectifs 63x or 40x à immersion à l'huile (NA = 1.4 or 1.30 respectivement). L'émission de fluorescence est dirigée vers un port externe, cette fluorescence est coupée en deux canaux par la présence d'un miroir dichroïque de 505nm. Ces deux canaux récupèrent la fluorescence d'intérêt à l'aide de filtres à bande passante de 480/30nm et 579/34nm. La durée de vie est déterminée par ajustement du déclin de fluorescence avec un modèle de mono-exponentiel.

1.6. Analyse des données

La durée de vie est calculée à l'aide des cinq images d'intensité obtenues après une acquisition suivant l'équation suivante $\langle \tau \rangle = \sum t_i I_i / \sum I_i$ avec t_i représentant le temps de retard à laquelle la porte temporelle i a été acquise (soit 1, 3, 5, 7ns) et I_i représente

l'intensité mesurée pour chaque temps de retard. Pour mesurer la durée de vie moyenne de chaque cellule pour chaque temps, une segmentation a été faite sous ImageJ.

Les analyses en TCSPC ont été effectuées par le logiciel SymPhoTime. Le canal 1 (collectant les photons bleus) ou le canal 2 (collectant les photons oranges) ont été sélectionnés. Le déclin de fluorescence a été mesuré sur une région d'intérêt sur les cellules (pour avoir assez de photons) et a été ajusté par un modèle mono-exponentiel.

2. Suivi de FET par FCCS

2.1. Culture cellulaire et transfections

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du DMEM complété avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 1% glutamine et 1% Pénicilline/Streptomycine. Les cellules U2OS ont été cultivées avec un milieu identique sauf qu'un antibiotique, la Généticine 418, a été ajouté en plus. Ces cellules ont été utilisées pour créer deux lignées cellulaires stables qui expriment le biosenseur Aurora A sauvage et le biosenseur mutant K162M (biosenseur qui ne peut se phosphoryler). Les cellules U2OS possèdent une robustesse plus importante que les cellules HeLa, ce qui permet une résistance plus importante lorsqu'elles sont traitées au nocodazole (nécessaire à la synchronisation des cellules). Pour nos expériences, quel que soit la lignée cellulaire utilisée, les cellules ont été étalées dans des supports Lab-Tek™ 4 puits (Dutscher).

Après étalement des cellules dans ces supports au cours de la matinée, les cellules sont transfectées plus tard dans la journée. Les cellules avaient environ 60-80% de confluence afin de maximiser leur survie suite à la transfection. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides suivants : un tandem Buffy (eGFP-mCherry) et un tandem MBP (eGFP-MBP-mCherry) en utilisant le protocole de transfection XtremeGENE HP de Roche. 1µg total d'ADN est transfecté par puit. Après la transfection, les cellules sont incubées à 37°C avec 5% CO₂.

Avant toute acquisition, le milieu de culture est remplacé par un milieu d'imagerie. Ce milieu est composé de L-15 (Leibovitz) complété avec 20% de Sérum Veau Fœtal

(SVF), 1% Pénicilline/Streptomycine et 1% glutamine. Ce milieu permet de supprimer l'autofluorescence du milieu complet.

2.2. *Synchronisation des cellules U2OS*

Lors de l'entretien des cellules U2OS, une partie de la suspension cellulaire est placée dans des tubes eppendorfs®. Dans ces tubes est fait le traitement au Nocodazole à une concentration de 0,1 µg/ml, ce qui permet la synchronisation des cellules. Après homogénéisation, la suspension cellulaire est placée dans des Lab-tek™ 4 puits. Le traitement doit durer entre 12 et 24h (dans notre cas, la durée du traitement est d'environ 16 heures). Environ 16h après traitement, le milieu avec le nocodazole est remplacé par un milieu d'imagerie. Ce changement de milieu permet de faire relancer le cycle cellulaire, la plupart des cellules observées seront en mitose.

2.3. *Acquisition des données*

Les mesures de FCCS ont été effectuées sur un microscope SP8 de Leica ayant un module de détection de molécule unique. L'objectif X63 immersion à eau a été utilisé. Une bague de réglage sur cet objectif permet d'optimiser le volume focal pour qu'il soit le plus petit possible. Le réglage de cette bague a été fait au début de chaque acquisition. Le fluorophore vert eGFP a été excité avec un laser pulsé à 470nm et le fluorophore rouge mCherry par une excitation continue à 561nm. L'émission de fluorescence des fluorophores est récupérée par des hybrides en mode image et par des photodiodes à avalanches (APD) pour les acquisitions FCCS. L'émission de fluorescence du vert et du rouge est récupérée à l'aide de filtre de 500-550nm et 581-657 respectivement. Les acquisitions FCCS ont été faites à l'aide du logiciel SymPhoTime 32 bits de PicoQuant.

Pour les acquisitions en solution, les biosenseurs sauvages et mutants ont été dilués dans une solution de tampon kinase pour obtenir une concentration finale de 0.05 pmol. Ces dilutions ont été effectuées juste avant chaque acquisition (soit biosenseur sauvage soit biosenseur mutant) pour éviter l'agrégation des biosenseurs. Les acquisitions ont été faites à 30°C.

Pour les acquisitions en cellules, la température était à 37°C au sein du microscope. Après avoir échangé le milieu de culture pour du milieu d'imagerie, les cellules sont apportées au microscope pour les mesures.

2.4. Analyse des données

Les acquisitions de FCCS sont analysées par le logiciel SymPhoTime 32bits. Pour chaque canal de détection, une courbe d'autocorrélation est récupérée. Cette courbe est ajustée par un modèle de diffusion pure en fixant le volume focal à 0.2 femtolitre. Grâce à cette analyse, les amplitudes des courbes d'autocorrélation verte G0 V, d'autocorrélation rouge G0 R et de corrélation croisée G0 CC sont récupérées. Pour enlever la fuite spectrale c'est-à-dire la détection du signal provenant des fluorophores verts dans le canal de détection rouge, une analyse de spectroscopie à corrélation basée sur la durée de vie de fluorescence (FLCS) est faite lors de l'analyse de la courbe de corrélation croisée. Pour chaque canal un filtre de durée de vie est appliqué car il est possible de distinguer les photons verts des photons rouges qui auront un signal différent du fait de la source d'excitation différente (laser pulsé pour les photons verts et laser continu pour les photons rouges). Grâce à l'application de ces filtres, il est possible de supprimer la fuite spectrale des photons verts dans le canal de détection rouge.

2.5. Analyses statistiques

Le calcul de la différence entre les conditions en présence de FRET et en absence de FRET se fait par des comparaisons de moyenne en utilisant le test non paramétrique de Mann-whitney sous R.

3. Rapid Lifetime Determination

3.1. Culture cellulaire

Les cellules Cos-7 ont été cultivées dans du DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% glutamine et 1% Pénicilline/Streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C en présence de 5% de CO₂.

3.2. Solutions

Les solutions stocks ont été préparées : Rhodamine6G (Sigma-Aldrich) 5 mM dans 50% d'éthanol et iodure de potassium (Sigm-Aldrich) 50 mM dans 50% d'éthanol.

3.3. Plasmides et transfection

Les plasmides mClover et le tandem mClover-mRuby2 ont été produits par l'équipe avant mon arrivée.

6h après la mise en place des cellules dans des supports MatTek®, une transfection des plasmides d'intérêt a été effectuée en utilisant le protocole de l'agent de transfection GeneJuice (Novagen). Les mesures de durée de vie de ces cellules ont été effectuées le jour suivant la transfection. Les cellules ont été imagées à une température de 37°C.

3.4. Acquisition des durées de vie de fluorescence

Les durées de vie dans les cellules et pour les solutions ont été mesurées avec deux techniques : en comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC) et en détermination rapide de la durée de vie (RLD). Les acquisitions ont été faites sur un microscope SP8 de Leica à l'aide d'un objectif 63X à immersion à l'huile.

Les mesures en TCSPC se sont effectuées sur un microscope SP8 composé d'un module de détection de molécule unique. Les cellules et les solutions ont été excitées par un laser blanc à 488nm à 80 MHz. La fluorescence est détectée par des détecteurs hybrides externes configurés pour le comptage de photon unique. Les mesures ont été faites jusqu'à l'obtention du nombre de photons désiré par pixel.

Les mesures d'intensité en RLD ont été faites sur le même microscope SP8. Les deux images d'intensités ont été acquises avec les hybrides internes à des portes temporelles de 0 à 4ns et 2 à 6ns se chevauchant à 50%. Les échantillons ont été excités avec un laser blanc à 488nm.

3.5. Analyse des données

Les images obtenues en TCSPC ont été analysées avec le logiciel SymPhoTime (PicoQuant). Les déclin de fluorescence obtenus ont été ajustés par modèle mono-exponentiel ce qui nous a permis de mesurer la durée de vie du donneur soit mClover soit de

la Rhodamine6G. Les images d'intensité pour la RLD ont été traitées sur ImageJ pour calculer la durée de vie.

4. Mesures FCCS dans la levure

Toutes les souches de levures ont été créées par le Dr Gwenaël Rabut. Ces levures sont des *Saccharomyces cerevisiae*. Pour l'imagerie les levures ont été mises en place dans un support Lab-TekTM préalablement traité avec de la concanavaline A. Cette molécule est une glycoprotéine de la famille des lectines ce qui lui permet de se lier avec les sucres présents à la surface des levures et donc permet de diminuer les mouvements des levures au cours des acquisitions. Les acquisitions ont été effectuées à température ambiante sur un microscope SP8 de Leica possédant un module de détection de molécule unique. Le laser pulsé à 470nm et le laser continu à 561nm ont été utilisés pour faire les mesures de FCCS. Un ajustement des courbes d'autocorrélation des molécules vertes et rouges et la courbe de corrélation croisée a été fait à l'aide d'un modèle de diffusion pure. La courbe de corrélation croisée a été obtenue après une utilisation des filtres de durée de vie (FLCS) qui a pour effet de supprimer la fuite spectrale des photons verts détectés dans le canal rouge. Les amplitudes de ces courbes ont pu être récupérées ce qui a permis le calcul des ratios d'amplitudes de la courbe de corrélation croisée sur l'amplitude de la courbe d'autocorrélation verte ou rouge. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel SymPhoTime.

Chapitre 6 Références

- Agronskaia, A. V, Tertoolen, L. & Gerritsen, H.C., 2003. High frame rate fluorescence lifetime imaging. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(14), pp.1655–1662. A
- Ai, H. et al., 2006. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *The Biochemical journal*, 400(3), pp.531–40.
- Ai, H. et al., 2008. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature methods*, 5(5), pp.401–403.
- Alivisatos, A.P., 1996. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science, New Series*, 271(5251), pp.933–937.
- Allen, M.D. & Zhang, J., 2006. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), pp.716–721.
- Andrews, N.L. et al., 2009. Small, Mobile FcεRI Receptor Aggregates Are Signaling Competent. *Immunity*, 31(3), pp.469–479.
- Austen, K. et al., 2015. Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nature cell biology*, 17(12), pp.1597–606.
- Axelrod, D. et al., 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9), pp.1055–1069.
- Bacia, K., Kim, S.A. & Schwille, P., 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nature methods*, 3(2), pp.83–9.
- Bacia, K. & Schwille, P., 2007. Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature protocols*, 2(11), pp.2842–2856.
- Bader, A.N. et al., 2011. Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. *ChemPhysChem*, 12(3), pp.475–483.
- Baillie, G.S. et al., 2000. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *British journal of pharmacology*, 131(4), pp.811–9.
- Bastiaens, P.I. & Squire, a, 1999. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in cell biology*, 9(2), pp.48–52.
- Bayliss, R. et al., 2003. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular Cell*, 12(4), pp.851–862.
- Beaudouin, J. et al., 2006. Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. *Biophysical journal*, 90(6), pp.1878–94.
- Becker, W., 2005. *Advanced Time-Related Single Photon Counting Techniques*,

- Belmont, A.S., 2001. Visualizing chromosome dynamics with GFP. *Trends in Cell Biology*, 11(6), pp.250–257.
- Böhmer, M. & Enderlein, J., 2003. Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: Methodology and technology. *ChemPhysChem*, 4(8), pp.792–808.
- Bonnot, A. et al., 2014. Single-fluorophore biosensors based on conformation-sensitive GFP variants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(3), pp.1375–85.
- Borghi, N. et al., 2012. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), pp.12568–73.
- Le Borgne, R., Bellaïche, Y. & Schweisguth, F., 2002. Drosophila E-Cadherin Regulates the Orientation of Asymmetric Cell Division in the Sensory Organ Lineage. *Current Biology*, 12(2), pp.95–104.
- Bornfeldt, K.E. & Krebs, E.G., 1999. Crosstalk Between Protein Kinase A and Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Arterial Smooth Muscle. *Cellular Signalling*, 11(7), pp.465–477.
- Bridson, S.J., 2004. Quantitative analysis of the formation and diffusion of A₁-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, pp.4673–4678.
- Broomfield, S., Chow, B.L. & Xiao, W., 1998. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), pp.5678–5683.
- Brown, C.M. & Petersen, N.O., 1998. An image correlation analysis of the distribution of clathrin associated adaptor protein (AP-2) at the plasma membrane. *Journal of cell science*, 111 (Pt 2, pp.271–81.
- Brown, K.M. et al., 2013. Phosphodiesterase-8A binds to and regulates Raf-1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), pp.E1533–42.
- Bruinsma, W. et al., 2015. Spatial Separation of Plk1 Phosphorylation and Activity. *Frontiers in oncology*, 5, p.132.
- Bugiel, I., König, K. & Wabnitz, H., 1989. Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution. *Lasers Life Sci*, 3(1), pp.47–53.
- Caldwell, G.B. et al., 2011. Direct modulation of the protein kinase a catalytic subunit α by growth factor receptor tyrosine kinases. *J Cell Biochem*, 113(1), pp.39–48.
- Caldwell, G.B. et al., 2012. Direct modulation of the protein kinase a catalytic subunit α by growth factor receptor tyrosine kinases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), pp.39–48.

- Carlile, C.M. et al., 2009. Synthesis of free and proliferating cell nuclear antigen-bound polyubiquitin chains by the RING E3 ubiquitin ligase Rad5. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), pp.29326–29334.
- Carlson, H.J. & Campbell, R.E., 2009. Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(1), pp.19–27.
- Castro, L.R. V. et al., 2014. Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Biotechnology Journal*, 9(2), pp.192–202.
- Chiu, C.-L. et al., 2016. Intracellular kinetics of the androgen receptor shown by multimodal Image Correlation Spectroscopy (mICS). *Scientific reports*, 6, p.22435.
- Ciardello, F. & Tortora, G., 1998. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(4), pp.821–8.
- Clague, M.J., Heride, C. & Urbé, S., 2015. The demographics of the ubiquitin system. *Trends in Cell Biology*, 25(7), pp.417–426.
- Conti, M. & Beavo, J., 2007. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling.
- Cubeddu, R. et al., 2002. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35(9), pp.R61–R76.
- Cullen, P.J. & Lockyer, P.J., 2002. Integration of calcium and ras signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp.339–348.
- Day, R.N. & Schaufele, F., 2005. Imaging molecular interactions in living cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(7), pp.1675–86.
- Depry, C., Allen, M.D. & Zhang, J., 2011. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Molecular bioSystems*, 7(1), pp.52–58.
- Digman, M.A. et al., 2009. Detecting protein complexes in living cells from laser scanning confocal image sequences by the cross correlation raster image spectroscopy method. *Biophysical Journal*, 96(2), pp.707–716.
- Ding, Y. et al., 2011. Forster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical Chemistry*, 83(24), pp.9687–9693.
- Dumaz, N. & Marais, R., 2005. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on The Anniversary Prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS Journal*, 272(14), pp.3491–3504.
- Dutertre, S. et al., 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of cell science*, 117(12), pp.2523–31.

- Ebisuya, M., Kondoh, K. & Nishida, E., 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science*, 118(Pt 14), pp.2997–3002.
- Eisinger, D.A. & Ammer, H., 2008. δ -Opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. *Cellular Signalling*, 20(12), pp.2324–2331.
- Elson, E.L. & Magde, D., 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13, pp.1–27.
- English, J.D. & Sweatt, J.D., 1997. A Requirement for the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), pp.19103–19106.
- Erard, M. et al., 2013. Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol. BioSyst.*, 9(2), pp.258–267.
- Ferrand, P., Wenger, J. & Rigneault, H., 2011. Fluorescence correlation spectroscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 783, pp.181–195.
- Fishman, D. et al., 1997. Epidermal growth factor regulates protein kinase A activity in murine fibrosarcoma cells: Differences between metastatic and nonmetastatic tumor cell variants. *Cancer Research*, 57(23), pp.5410–5415.
- Foo, Y.H. et al., 2012. Factors affecting the quantification of biomolecular interactions by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 102(5), pp.1174–1183.
- Förster, T., 1948. Intermolecular energy transference and fluorescence. *Ann Physik*, 2, pp.55–75.
- Fritz, R.D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., et al., 2013. A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Science signaling*, 6(285), p.rs12.
- Fritz, R.D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., et al., 2013. A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Science signaling*, 6(285), p.rs12.
- Fron, E. et al., 2015. Mechanism Behind the Apparent Large Stokes Shift in LSSmOrange Investigated by Time-Resolved Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(47), pp.14880–14891.
- Fujioka, Y. et al., 2015. Introduction Fluorescent Protein-based Biosensors to Visualize Signal Transduction beneath the Plasma Membrane. *ANALYTICAL SCIENCES APRIL*.
- Fujita, Y. et al., 2014. Fluorescence resonance energy transfer based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in epidermal growth factor receptor signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *The FEBS journal*, 281(14), pp.3177–92.

- Ganesan, S. et al., 2006. A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Förster resonance energy transfer with GFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), pp.4089–4094.
- Gao, L., Chao, L. & Chao, J., 2010. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: Activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Experimental Cell Research*, 316(3), pp.376–389.
- Garcia-Parajo, M.F. et al., 2014. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *Journal of Cell Science*, 127(23), pp.4995–5005.
- Gautier, I. et al., 2001. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophysical journal*, 80(6), pp.3000–3008.
- Gerits, N. et al., 2008. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cellular Signalling*, 20(9), pp.1592–1607.
- Gerits, N., Kostenko, S. & Moens, U., 2007. In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Research*, 16(3), pp.281–314.
- Gervasi, N. et al., 2007. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), pp.2744–2750.
- Giepmans, B.N.G. et al., 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5771), pp.217–24.
- Gillard, G. et al., 2015. Control of E-cadherin apical localisation and morphogenesis by a SOAP-1/AP-1/clathrin pathway in *C. elegans* epidermal cells. *Development (Cambridge, England)*, 142(9), pp.1684–94.
- Grant, D.M. et al., 2008. Multiplexed FRET to image multiple signaling events in live cells. *Biophysical journal*, 95(10), pp.L69–71.
- Grashoff, C. et al., 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303), pp.263–266.
- Gregor, I. & Enderlein, J., 2007. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 6(1), pp.13–8.
- Groves, J.T., Parthasarathy, R. & Forstner, M.B., 2008. Fluorescence imaging of membrane dynamics. *Annual review of biomedical engineering*, 10, pp.311–338.

- Handley, P.M. et al., 1991. Molecular cloning, sequence, and tissue distribution of the human ubiquitin-activating enzyme E1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), pp.258–62.
- Harvey, C.D. et al., 2008. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), pp.19264–19269.
- Harvey, C.D. et al., 2008. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), pp.19264–19269.
- Hatte, G. et al., 2014. Epithelial cell division in the *Xenopus laevis* embryo during gastrulation. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(10-11-12), pp.775–781.
- Haustein, E. & Schwille, P., 2007. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 36, pp.151–69.
- Hebert, B., Costantino, S. & Wiseman, P.W., 2005. Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells. *Biophysical journal*, 88(5), pp.3601–14.
- Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516), pp.663–4.
- Herbst, K.J., Allen, M.D. & Zhang, J., 2011. Spatiotemporally regulated protein kinase a activity is a critical regulator of growth factor-stimulated extracellular signal-regulated kinase signaling in PC12 cells. *Molecular and cellular biology*, 31(19), pp.4063–4075.
- Hershko, A. et al., 1983. Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(13), pp.8206–8214.
- Hewawasam, G. et al., 2010. Psh1 Is an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the Centromeric Histone Variant Cse4. *Molecular Cell*, 40(3), pp.444–454.
- Hinde, E. et al., 2013. Millisecond spatiotemporal dynamics of FRET biosensors by the pair correlation function and the phasor approach to FLIM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), pp.135–40.
- Hirota, T. et al., 2003. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, 114(5), pp.585–98.
- Hochreiter, B., Garcia, A.P. & Schmid, J.A., 2015. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(10), pp.26281–314.
- Houslay, M.D. & Kolch, W., 2000. Cell-Type Specific Integration of Cross-Talk between Extracellular Signal-Regulated Kinase and cAMP Signaling. *Molecular Pharmacology*, 58(4), pp.659–668.

- Huibregtse, J.M. et al., 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), pp.2563–2567.
- Hunter, T., 2000. Signaling—2000 and Beyond. *Cell*, 100(1), pp.113–127.
- Itoh, R.E. et al., 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and cellular biology*, 22(18), pp.6582–6591.
- Jackson, P.K. et al., 2000. The lore of the RINGs: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology*, 10(10), pp.429–439.
- Jin, J. et al., 2007. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature*, 447(7148), pp.1135–1138.
- Jones, D.M. et al., 2015. Imaging real-time HIV-1 virion fusion with FRET-based biosensors. *Scientific Reports*, 5, p.13449.
- Kahya, N. & Schwille, P., 2006. Fluorescence correlation studies of lipid domains in model membranes (Review). *Molecular Membrane Biology*, 23(1), pp.29–39.
- Kapusta, P. et al., 2007. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*, 17(1), pp.43–8.
- King, R.W. et al., 1995. A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, 81(2), pp.279–288.
- Klotzsch, E. & Schütz, G.J., 2013. A critical survey of methods to detect plasma membrane rafts. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1611), p.20120033.
- Kohl, T. et al., 2002. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), pp.12161–6.
- Komatsu, N. et al., 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), pp.4647–4656.
- Komatsu, N. et al., 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular biology of the cell*, 22(23), pp.4647–56.
- Kusumi, A. et al., 2011. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(11), pp.604–615.
- Lacroix, B. et al., 2014. In Situ Imaging in *C. elegans* Reveals Developmental Regulation of Microtubule Dynamics. *Developmental Cell*, 29(2), pp.203–216.
- Lakadamyali, M. et al., 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9280–5.

- Lam, A.J. et al., 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature methods*, 9(10), pp.1005–12.
- Leray, A. et al., 2013. 827Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS ONE*, 8(7).
- Louvet, E. et al., 2008. Time-lapse microscopy and fluorescence resonance energy transfer to analyze the dynamics and interactions of nucleolar proteins in living cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 463, pp.123–135.
- Low-Nam, S.T. et al., 2011. ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(11), pp.1244–1249.
- Machacek, M. et al., 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260), pp.99–103.
- MacNevin, C.J. et al., 2016. Ratiometric Imaging Using a Single Dye Enables Simultaneous Visualization of Rac1 and Cdc42 Activation.
- Markson, G. et al., 2009. Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Research*, 19(10), pp.1905–1911.
- Marumoto, T. et al., 2003. Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), pp.51786–51795.
- Matz, M. V. et al., 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 17(10), pp.969–973.
- Maxfield, F.R., 2002. Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(4), pp.483–487.
- Mcdowell, G.S. & Philpott, A., 2016. New Insights Into the Role of Ubiquitylation of Proteins.
- McPhillips, F. et al., 2006. Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 27(4), pp.729–39.
- Merzlyak, E.M. et al., 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*, 4(7), pp.555–557.
- Michalet, X. et al., 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5709), pp.538–44.
- Miyawaki, a et al., 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), pp.882–887.
- Morris, M.C., 2013. Fluorescent biosensors — Probing protein kinase function in cancer and drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(7), pp.1387–1395.
- Murakoshi, H. et al., 2015. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer. *Scientific reports*, 5, p.15334.

- Murray, A.J., 2008. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling*, 1(22), p.re4.
- Nicolson, G.L., 2013. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(6), pp.1451–66.
- Niino, Y., Hotta, K. & Oka, K., 2009. Simultaneous live cell imaging using dual FRET sensors with a single excitation light. *PLoS ONE*, 4(6).
- O'Neill, E. & Kolch, W., 2004. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *British journal of cancer*, 90(2), pp.283–8.
- Orenbuch, A. et al., 2012. Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), pp.3969–80.
- Ormö, M. et al., 1996. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5280), pp.1392–5.
- Padilla-Parra, S. et al., 2011. Dual-color fluorescence lifetime correlation spectroscopy to quantify protein-protein interactions in live cell. *Microscopy Research and Technique*, 74(8), pp.788–793.
- Padilla-Parra, S. et al., 2009. Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition. *Biophysical Journal*, 97(8), pp.2368–2376.
- Padilla-Parra, S. et al., 2008. Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells. *Biophysical journal*, 95(6), pp.2976–2988.
- Padilla-Parra, S. & Tramier, M., 2012. FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays*, 34(5), pp.369–376.
- Pertz, O. et al., 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, 440(7087), pp.1069–72.
- Peter, M. et al., 2005. Multiphoton-FLIM Quantification of the EGFP-mRFP1 FRET Pair for Localization of Membrane Receptor-Kinase Interactions. *Biophysical Journal*, 88(2), pp.1224–1237.
- Peyker, A., Rocks, O. & Bastiaens, P.I.H., 2005. Imaging activation of two Ras isoforms simultaneously in a single cell. *ChemBioChem*, 6(1), pp.78–85.
- Piatkevich, K.D. et al., 2010. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), pp.5369–74.
- Piljic, A. & Schultz, C., 2008. Simultaneous recording of multiple cellular events by FRET. *ACS Chemical Biology*, 3(3), pp.156–160.
- Rabut, G., Doye, V. & Ellenberg, J., 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nature cell biology*, 6(11), pp.1114–21.

- Raspe, M. et al., 2016. siFLIM: single-image frequency-domain FLIM provides fast and photon-efficient lifetime data. *Nature Methods*, (October 2015), pp.1–6.
- Ray, K., Zhang, J. & Lakowicz, J.R., 2008. Fluorescence lifetime correlation spectroscopic study of fluorophore-labeled silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 80(19), pp.7313–7318.
- Rino, J. et al., 2009. Frontiers in fluorescence microscopy. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), pp.1569–1579.
- Roberts, P.J. & Der, C.J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), pp.3291–3310.
- Sasaki, A. et al., 2015. Raster image cross-correlation analysis for spatiotemporal visualization of intracellular degradation activities against exogenous DNAs. *Scientific reports*, 5, p.14428.
- Schneider, P.C. & Clegg, R.M., 1997. Rapid acquisition, analysis, and display of fluorescence lifetime-resolved images for real-time applications. *Review of Scientific Instruments*, 68(11), pp.4107–4119.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F.J. & Rigler, R., 1997. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical journal*, 72(4), pp.1878–86.
- Sengupta, N., Vinod, P.K. & Venkatesh, K.V., 2007. Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate FLO11 expression. *Biophysical Chemistry*, 125(1), pp.59–71.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1567–72.
- Shaner, N.C. et al., 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods*, 5(6), pp.545–551.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H. & Davidson, M.W., 2007. Advances in fluorescent protein technology. *Journal of cell science*, 120(Pt 24), pp.4247–60.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), pp.905–909.
- Sharman, K.K. et al., 1999. Error analysis of the rapid lifetime determination method for double-exponential decays and new windowing schemes. *Analytical chemistry*, 71(5), pp.947–952.
- Shcherbakova, D.M. et al., 2012. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 134(18), pp.7913–7923.
- Shcherbakova, D.M. & Verkhusha, V. V, 2013. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature methods*, 10(8), pp.751–4.

- Shcherbo, D. et al., 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *The Biochemical journal*, 418, pp.567–574.
- Singer, S.J. & Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), pp.720–731.
- Sipietier, F. et al., 2015. Novel Reporter for Faithful Monitoring of ERK2 Dynamics in Living Cells and Model Organisms M.-J. Boucher, ed. *PLOS ONE*, 10(10), p.e0140924.
- Smith, F.D. et al., 2010. AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nature Cell Biology*, 12(12), pp.1242–1249.
- Smith, F.D., Langeberg, L.K. & Scott, J.D., 2006. The where's and when's of kinase anchoring. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(6), pp.316–323.
- Stork, P.J.S. & Schmitt, J.M., 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 12(6), pp.258–266.
- Su, T. et al., 2013. Monitoring of dual bio-molecular events using FRET biosensors based on mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKO?? fluorescent protein pairs. *Biosensors and Bioelectronics*, 46, pp.97–101.
- Tavares, E. et al., 2014. Live-cell FRET imaging reveals clustering of the prion protein at the cell surface induced by infectious prions. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(7), pp.981–91.
- Taylor, S.S. et al., 2005. Dynamics of signaling by PKA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1754(1), pp.25–37.
- Terada, Y., Uetake, Y. & Kuriyama, R., 2003. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 162(5), pp.757–763.
- Thaler, C. et al., 2009. Structural rearrangement of CaMKIIalpha catalytic domains encodes activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), pp.6369–74.
- Tokumasu, F. & Dvorak, J., 2003. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *Journal of Microscopy*, 211(3), pp.256–261.
- Tramier, M. et al., 2002. Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophysical journal*, 83(6), pp.3570–3577.
- Trewhella, J., 2006. Protein kinase A targeting and activation as seen by small-angle solution scattering. *European Journal of Cell Biology*, 85(7), pp.655–662.
- Tsien, R.Y., 1998. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annu. Rev. Biochem*, 67, pp.509–44.
- Ubersax, J.A. & Ferrell Jr, J.E., 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp.530–541.

- Van, T.N.N. et al., 2014. Fluorescent protein biosensor for probing CDK/cyclin activity in vitro and in living cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 15(15), pp.2298–305.
- Vandame, P. et al., 2014. Optimization of ERK Activity Biosensors for both Ratiometric and Lifetime FRET Measurements. *Sensors*, 14(1), pp.1140–1154.
- Vandame, P. et al., 2013. Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(1), pp.1140–1154.
- Wang, Z. et al., 2006. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Molecular and cellular biology*, 26(6), pp.2130–45.
- Webb, S.E.D. et al., 2002. A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning. *Review of Scientific Instruments*, 73(4), p.1898.
- Weber, G., 1954. Dependence of the polarization of the fluorescence on the concentration. *Transactions of the Faraday Society*, 50(0), p.552.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), pp.875–885.
- Wiseman, P.W. et al., 2004. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy. *Journal of cell science*, 117(Pt 23), pp.5521–34.
- Wiseman, P.W. et al., 2000. Two-photo image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy. *Journal of Microscopy*, 200(1), pp.14–25.
- Witzel, F., Maddison, L. & Blüthgen, N., 2012. How scaffolds shape MAPK signaling: what we know and opportunities for systems approaches. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Woehler, A., 2013. Simultaneous Quantitative Live Cell Imaging of Multiple FRET-Based Biosensors. *PLoS ONE*, 8(4).
- Wu, X. et al., 1996. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(6), pp.3265–71.
- Zhang, D. et al., 2008. Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene*, 27(31), pp.4305–14.
- Zhang, J. et al., 2001. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), pp.14997–15002.
- Zhang, J. et al., 2005. Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*, 437(7058), pp.569–573.