



HAL
open science

Développement d'un criblage automatisé de l'activité kinase d'un biosenseur Aurora A par FLIM

Florian Sizaire

► **To cite this version:**

Florian Sizaire. Développement d'un criblage automatisé de l'activité kinase d'un biosenseur Aurora A par FLIM. Biologie du développement. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B033 . tel-02498589

HAL Id: tel-02498589

<https://theses.hal.science/tel-02498589>

Submitted on 4 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « Biologie Cellulaire, Biologie du Développement »

Par

Florian SIZAIRE

Développement d'un criblage automatisé de l'activité kinase d'un biosenseur Aurora A par FLIM

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 1er octobre 2019

Unité de recherche : Institut de Génétique et de Développement de Rennes UMR6290

Rapporteurs avant soutenance :

Aurélie DUPONT Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Grenoble
May MORRIS Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier

Composition du jury :

Président du jury :

Marie-Dominique GALIBERT Institut de Génétique et de Développement de Rennes, Rennes

Examineurs :

Laurent HELIOT Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, Lille
Pierre VINCENT Institut de Biologie Paris Seine, Paris
Aurélie DUPONT Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Grenoble
May MORRIS Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier

Directeur de thèse :

Marc TRAMIER Institut de Génétique et de Développement de Rennes, Rennes

Remerciements

L'aboutissement de mes travaux de thèse n'aurait pas été possible sans un ensemble de personnes que je tiens à remercier ici.

Pour commencer je souhaite remercier Marc Tramier pour m'avoir accueilli dans l'équipe Microscopie de Fluorescence Quantitative. Dès les entretiens, le courant est bien passé et s'est établi pour le reste de la thèse. Merci de m'avoir soutenu et aidé, de m'avoir poussé quand il le fallait et de m'avoir offert la liberté d'être autonome quand il le fallait. Je souhaite sincèrement à tout thésard d'avoir un directeur de thèse aussi passionné, chaleureux, compréhensif, de bonne humeur et à l'écoute. Merci à Giulia Bertolin pour m'avoir pris sous son aile dès le début, de m'avoir permis de l'assister dans ses travaux avant de commencer les miens mais aussi d'avoir toujours été disponible pour m'aider tout au long de ma thèse avec bonne humeur. Je remercie aussi Gilles (4417) qui est arrivé dans l'équipe au bon moment et avec qui il a été agréable de travailler afin de développer mon propre projet, mais aussi d'avoir partagé de bons moments dans notre bureau et bravo à lui de m'avoir supporté tout du long. Merci aux membres passés comme Claire Démeautis et aux nouveaux comme Elif Begum pour perpétuer la bonne humeur dans cette équipe.

Je remercie les membres des équipes de Jacques Pécréaux et Sébastien Huet pour avoir partagé tous ces bons moments dans notre bout de couloir mais aussi pour tous les échanges scientifiques. Je remercie particulièrement Catherine Chapuis dont l'aide a toujours été précieuse. Merci à Rebecca, Audrey, Ostiane pour toute cette bonne humeur et bon courage pour la suite. Merci à Yann Le Cunff pour nous faire gagner 2kg chaque année avec la semaine de la galette et bien sûr pour toute l'aide apportée dans l'analyse des résultats. Je remercie aussi les équipes de Claude Prigent et de Gwenaël Rabut, nos échanges ont été constructifs et ont apporté un plus dans le déroulement de ma thèse. Je tiens à remercier l'équipe des chiens et les membres avec qui il était agréable de discuter, faire des pauses ou bien d'aller courir les midis.

Merci à la plateforme de microscopie MRic avec qui j'ai beaucoup collaboré et qui m'a toujours aidé et supporté quand il le fallait. Merci aux membres d'Inscoper Otmane, Olivier, Baptiste, Jérémy .Ce fut un réel plaisir de travailler en étroite collaboration et de développer tous ces projets dont je suis fier et bien sûr toujours dans la bonne humeur.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Sandrine Lagarrigue, Franck Riquet, Nathalie Maubon et Roland le Borgne, qui m'ont permis de prendre le recul nécessaire sur ma thèse et qui m'ont guidé afin de la mener à bien.

Un grand merci aux membres de la gestion Nadine, Isabelle, Rolande qui font un travail formidable et qui m'ont beaucoup aidé dans toutes les démarches administratives. Un grand merci à Géraldine Le Provost d'avoir toujours veillé sur moi, de prendre autant soin des thésards et aussi pour les sorties en bar ou au cinéma. Et merci à Philippe pour sa très bonne gestion du magasin et toutes nos petites discussions. Je tiens à remercier l'institut en général et la direction pour m'avoir offert un bon cadre de travail, dans lequel j'ai pu m'épanouir mais aussi participer à travers les conseils de laboratoire. Je remercie tous les jeunes de l'IGDR avec qui j'ai pu partager des soirées un peu folles, Aslak, Matthieu, Thomas, Clara, Anaïs, Manu, Artem, Céline, Mélanie.

Un grand merci à Tim, Chris, Jon, Guy, Will, Drew, Alex et Alessandro qui m'ont accompagné et apporté de la motivation tout au long de cette thèse.

Merci aux membres du CPB badminton pour la super ambiance du club et toutes nos soirées.

Milles mercis au gang de Rennes sans vegan, Clément, Marion, Giulia, Xavier, Sylvain, Gilles, Stéphanie et Leslie. On a passé de supers moments quand on travaillait au même endroit mais aussi pour tout ce qu'on a fait à côté. Un gros big'up aux éditions Mifobio que l'on a passées ensemble et dédicace à Bruno!

Je remercie particulièrement le groupe d'amis que j'ai rencontré au cours de ma thèse, Lucie, Guillaume, Lilian, Marie, Solenne, Vincent, Antoine, Maël, Olivia, Julien. C'est grâce à vous que j'ai pu aussi facilement tenir pendant ces quatre ans. Le bureau des plaintes a été utile pour tout le monde et nos (nombreuses ?) pauses étaient d'une grande aide pour garder la motivation. J'ai conscience d'avoir été bien entouré et je ne doute pas que je continuerai à l'être. Merci pour toutes ces soirées, ces cinémas, ces escapes games, ces sorties vélo, ces VnB et tout le reste.

Merci à Daniel, Thomas, Claire pour toujours réussir à se voir après toutes ces années.

Merci à toi Mathilde pour avoir été là quand il le fallait et pour tous ces moments qui comptent tant. Il me faudrait écrire une seconde thèse pour développer tout ce que tu m'apportes.

Et enfin un immense merci à ma famille et à mes parents qui m'ont toujours soutenu. J'ai toujours pu compter sur vous, et c'est grâce à vous que j'en suis arrivé là. Cette thèse est la vôtre.

Table des matières

ABRÉVIATIONS	5
PREAMBULE	7
INTRODUCTION	9
I) LES BASES DE LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	9
1) Principes optiques de la microscopie photonique	9
a) <i>Les propriétés historiques de la lumière</i>	9
b) <i>Principe de fonctionnement d'un microscope</i>	11
2) <i>La fluorescence au service de la microscopie</i>	16
a) <i>Propriétés de la fluorescence</i>	16
b) <i>Développement des fluorophores</i>	18
3) Les principaux types de microscope à fluorescence.....	21
a) <i>Microscope champs large</i>	21
b) <i>Microscope confocal</i>	23
II) LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE QUANTITATIVE POUR MESURER LE FRET	26
1) Le principe de FRET.....	26
a) <i>Description du phénomène physique</i>	26
b) <i>Utilisation du FRET dans les interactions protéine-protéine</i>	30
2) Emergence et développement des biosenseurs FRET	31
a) <i>Quelques exemples de biosenseurs FRET</i>	31
b) <i>Les biosenseurs FRET d'activité kinase</i>	35
3) Mesure de FRET ratiométrique	51
4) Mesure de FRET par mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM)	52
a) <i>Durée de vie de fluorescence et FRET</i>	52
b) <i>Comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC)</i>	55
c) <i>Mesure du déclin de fluorescence par porte temporelle (time-gated FLIM)</i>	56
III) LA PROTEINE KINASE AURORA A	60
1) Structure et rôles d'Aurora A	60
a) <i>Le gène d'Aurora A et structure de la protéine</i>	60
b) <i>Rôles mitotiques d'Aurora A</i>	63
c) <i>Rôles non mitotiques d'Aurora</i>	64
2) Implication d'Aurora A dans le cancer.....	64
a) <i>Aurora A est un oncogène</i>	65
b) <i>Rôle suppresseur de tumeur d'Aurora A</i>	65

3)	Aurora A est les thérapies anti-cancéreuses	66
a)	<i>Les principaux inhibiteurs d'Aurora A</i>	66
b)	<i>Aurora A, une cible dans les essais cliniques</i>	68
RESULTATS		70
I) VALIDATION DU BIOSENSEUR FRET DE L'ACTIVITE D'AURORA A.....		70
1)	Présentation du biosenseur.....	70
2)	Validation du biosenseur	72
II) MISE EN PLACE D'UN SYSTEME DE CRIBLAGE DU BIOSENSEUR D'ACTIVITE KINASE D'AURORA A.....		97
1)	Adaptation du protocole d'acquisition pour du criblage	97
2)	Intégration de nouveaux modules pour une acquisition en 96 puits	100
3)	Mise en place d'un pipe-line d'analyse des données	105
4)	Validation de la méthodologie de criblage.....	108
5)	Criblage de molécules.....	127
III) NOUVELLES METHODOLOGIES POUR SUIVRE L'ACTIVITE FRET DU BIOSENSEUR AURORA A.....		130
1)	Homo-FRET par mesure d'anisotropie (FAIM).....	130
2)	Mesure d'hétéroFRET par 2c-FCCS.....	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		154
MATERIEL ET METHODES		162
ANNEXE.....		167
RÉFÉRENCES.....		175

Abréviations

AKAR: A-Kinase Activity Reporter 4

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé)

APD: Avalanche Photodiode

ATP: Adenosine Triphosphate

CCD: Charge Coupled Device

Cep192: Centrosomal Protein of 192kDa

CFP: Cyan Fluorescent Protein

DMSO: Diméthylsulfoxyde

EKAR: Extracellular signal-regulated Kinase Activity Reporter

Epac: Exchange Protein directly Activated by cAMP

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

FCCS (ou 2c-FCCS): (2color) Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

FDA: Food and Drug Administration

FLCS: Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

GFP: Green Fluorescent Protein

HRI: High Rate Imager

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRFP: near-infrared Fluorescent Protein

MLCK: Myosin Light-Chain Kinase

mRFP1: Monomeric Red Fluorescent Protein

mTFP1: monomeric Teal Fluorescent Protein

O.N : ouverture numérique

PFA : Paraformaldéhyde

PKA: Protein kinase A

SAC: Spindle Assembly Checkpoint

TCSPC: Time Correlated Single Photon Counting

TPX2: Targeting Protein for Xenopus kinesin-like protein 2

YFP: Yellow Fluorescent Protein

Préambule

Aurora A est une protéine retrouvée surexprimée dans certains cancers épithéliaux tels que le cancer du sein, colorectal, des ovaires, de l'utérus ou gastro-intestinal. C'est pourquoi elle est une cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Au sein de mon équipe, un biosenseur FRET de l'activité kinase d'Aurora A a été développé ainsi qu'un microscope appelé fastFLIM capable de mesurer la durée de vie de fluorescence, propriété liée au FRET. Le but de ma thèse a été de mettre en place une méthodologie pour être en mesure de cribler des potentiels inhibiteurs de la kinase Aurora A en utilisant la microscopie dite FLIM et un biosenseur FRET.

Mon introduction commence avec un bref historique des découvertes de propriétés de la lumière qui ouvre la voie à une première partie expliquant le fonctionnement général d'un microscope à fluorescence. La seconde partie concerne la microscopie de fluorescence quantitative et plus précisément comment le phénomène physique de FRET est utilisé en microscopie, notamment avec l'usage de biosenseurs FRET. J'ai d'ailleurs intégré un chapitre de livre dans Intech pour lequel je suis auteur principal et décrivant les biosenseurs FRET d'activité kinase. Enfin une dernière partie concerne Aurora A et permet de comprendre les modes d'activation de cette kinase ainsi que son rôle dans le cycle cellulaire.

J'ai ensuite décidé de présenter mes résultats sous la forme de trois grandes parties. La première partie correspond au développement du biosenseur FRET de l'activité kinase d'Aurora A. Cet outil a été développé au sein de l'équipe et ma contribution à ce travail a été de vérifier par des tests kinase que ce biosenseur est fonctionnel. Ce travail mené par Giulia Bertolin a fait l'objet d'une publication dans Nature Communication en 2016 dans laquelle je suis deuxième auteur et dont le manuscrit est inséré à la fin de cette partie.

La deuxième partie concerne le développement de la méthodologie permettant de faire du criblage d'une plaque 96-puits sur le fastFLIM. Jusqu'à présent ce microscope ne pouvait être utilisé qu'« à la main » et le but a été de pouvoir automatiser son mode d'acquisition. Ce travail a pu être effectué à l'aide d'un assistant ingénieur, Gilles Le Marchand, puis en collaboration avec la start-up Inscoper (créée par un ancien membre de l'équipe). Ces résultats ont fait l'objet d'un article dont je suis premier auteur (en soumission dans Methods and Applications in Fluorescence) visant à valider la méthodologie et dont le manuscrit est inséré en fin de partie.

La troisième et dernière partie porte sur un projet d'optimisation de la mesure de FRET du biosenseur Aurora A. Au sein de ce projet, j'ai pu tester l'utilisation de la mesure d'anisotropie ou bien l'utilisation de la technique de FCCS-2C pour mesurer le FRET au sein du biosenseur. Ces résultats s'inscrivent dans un travail de Giulia Bertolin et tout juste accepté en juillet 2019 dans ACS Sensors pour lequel je suis deuxième auteur, et dont le manuscrit est inséré en fin de partie.

Introduction

I) Les bases de la microscopie de fluorescence

1) Principes optiques de la microscopie photonique

a) Les propriétés historiques de la lumière

La microscopie photonique repose sur l'utilisation des propriétés de la lumière. Il est donc important de comprendre les propriétés générales de ce phénomène physique. La lumière est un phénomène physique observé et décrit depuis des siècles. De nombreuses théories ont émergé afin de décrire ses différents comportements. En 1678, Christiaan Huygens publie le *Traité de la Lumière* qui pose les bases d'une théorie ondulatoire de la lumière, c'est-à-dire qu'il était possible de décrire la lumière comme une onde (Huygens, 1690). Il décrit que chaque point atteint par une source de lumière agit comme une source secondaire et réémet une onde sphérique de lumière. C'est cependant la théorie corpusculaire d'Isaac Newton qui sera plus populaire et considérée comme le bon modèle. Celui-ci avait d'ailleurs décrit que la lumière était composée d'un spectre de couleurs, ce qui peut s'observer lorsqu'une lumière blanche traverse un prisme (Newton, 1704). En 1801, Thomas Young met en place l'expérience célèbre des fentes de Young, qui consiste à faire diffracter la lumière provenant d'une même source par deux fentes ce qui entraîne des interférences lumineuses (Young, 1801) (fig 1).

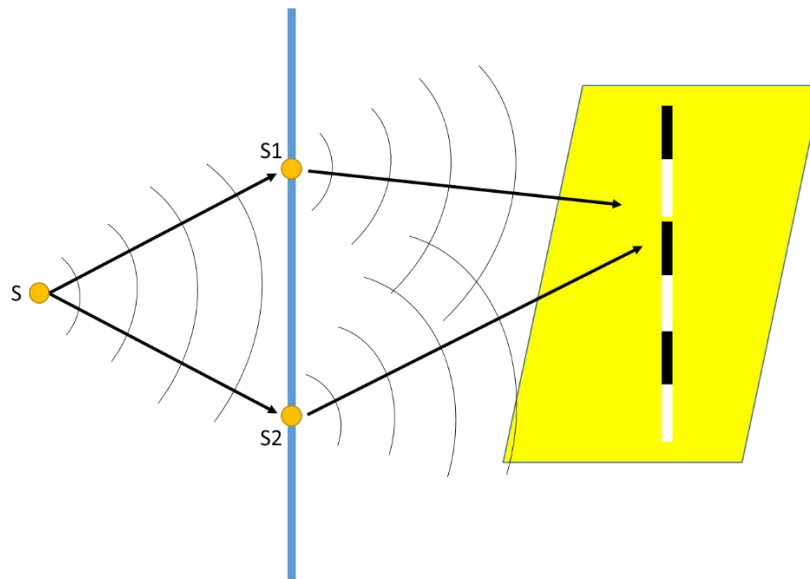


Fig 1. Expérience des fentes de Young

Une source lumineuse S monochromatique est émise en direction d'un plan contenant deux fentes. Au passage de ces fentes, le phénomène de diffraction de la lumière a lieu. On observe deux sources lumineuses secondaires S1 et S2 qui émettent en direction d'un plan contenant un écran permettant de projeter les interférences. On observe sur l'écran une succession de franges claires (en blanc) correspondantes aux interférences constructives et de franges sombres correspondantes à des interférences destructives.

Celles-ci consistent en des bandes alternativement lumineuses ou sombres qui sont finalement la résultante des deux sources secondaires. Cette observation ne peut s'expliquer qu'en prenant un modèle ondulatoire pour la lumière. De façon indépendante et à partir de 1815, Augustin Fresnel travaille lui aussi sur les principes de diffraction et d'interférence (Fresnel, 1815). En utilisant les travaux de Huygens, il développera le principe de Huygens-Fresnel qui permet de calculer l'intensité en un point après diffraction d'une source lumineuse. Ces travaux permettent de généraliser l'expérience de Young mais aussi d'apporter des descriptions mathématiques au phénomène ondulatoire de la lumière. En 1864, James Clerk Maxwell unifie électricité, magnétisme et optique en fondant les quatre équations fondamentales de l'électromagnétisme qui intègrent les théorèmes de Carl Friedrich Gauss, Michael Faraday, André-Marie Ampère et William Thomson (Maxwell, 1864). La lumière se comporte comme une onde électromagnétique dont la vitesse est finie et constante ($c \approx 299\,792\,458$ m/s). Il est intéressant de noter que l'idée d'onde suggère la propagation dans un milieu. A cette époque, pour expliquer la propagation des ondes électromagnétiques, il était théorisé l'existence de l'éther comme une substance invisible qui recouvrait l'espace et dans lequel la propagation des ondes était possible. En 1900, Max Planck établit de façon empirique la loi de Planck qui

formule la luminance énergétique d'un corps noir (objet virtuel qui absorbe toute l'énergie électromagnétique qu'il reçoit) en fonction de sa température et qui introduit la constante de Planck (Planck, 1901). Ces travaux ouvrent la voie à la mécanique quantique et donc à l'hypothèse que les échanges entre la matière et la lumière se font par des « quantas » (sortes de paquets d'énergie). Enfin, les travaux d'Albert Einstein publiés en 1905 viendront confirmer cette hypothèse. Il va d'abord établir que l'échange d'énergie entre lumière et matière ne peut se faire que par ces paquets d'énergie et de façon discrète (Einstein, 1905a). Il utilise pour cela l'effet photoélectrique, principalement décrit par Heinrich Rudolf Hertz en 1887 et plus précisément l'effet de seuil de ce phénomène décrit par Philipp Lenard en 1902 (Hertz, 1887; Lenard, 1902). L'effet photoélectrique, au sein d'un métal par exemple, ne dépend pas de l'intensité de l'onde électromagnétique émise mais de sa fréquence. Ainsi la lumière est composée de ces quantas et peut être considérée comme un phénomène corpusculaire, ces quantas seront par la suite nommés photons. On peut aussi citer son article sur l'électrodynamique des corps en mouvement qui établit la théorie de la relativité restreinte et qui permet de s'affranchir de l'éther (Einstein, 1905b). La lumière est une onde électromagnétique qui se propage dans le vide. On parle ainsi de dualité onde-corpuscule de la lumière. Cette notion est extrêmement importante, notamment en microscopie, puisque certaines propriétés de la lumière ne peuvent être expliquées que par l'un ou l'autre de ces modèles.

b) Principe de fonctionnement d'un microscope

On peut se demander pourquoi a-t-on besoin d'un microscope pour observer le vivant ? L'unité du vivant est la cellule, et bien que la taille varie selon le type cellulaire, l'ordre de grandeur est autour du μm . Il faut donc être capable de distinguer entre eux des objets de cette ordre de grandeur et même inférieur si on veut étudier les évènements intra-cellulaires. Dans le cas de l'œil humain, l'angle qui définit le pouvoir de résolution vaut environ une minute d'arc ce qui correspond à environ $0,017^\circ$ (Fig 2). Du fait de la vision binoculaire, la distance minimum et idéale d'observation, appelée punctum proximum D est de 25cm. On peut donc calculer $d = 2D \tan\left(\frac{\theta}{2}\right) \simeq 74\mu\text{m}$

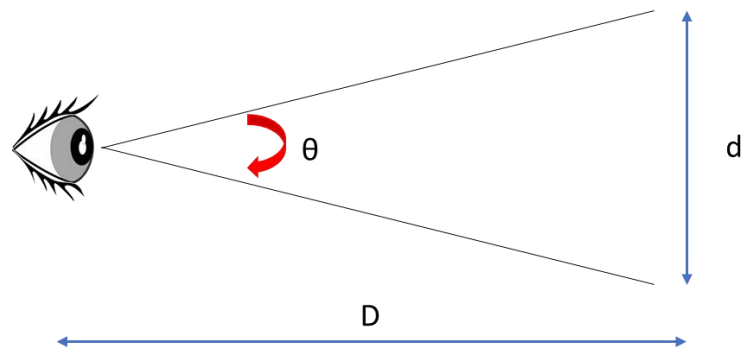


Fig 2. Schéma représentant le pouvoir de résolution de l'œil humain.

Un observateur regarde un objet de taille d à une distance D . θ est l'angle qui caractérise le pouvoir de résolution.

Il est donc impossible pour un œil humain (avec une acuité visuelle quasi parfaite) de distinguer des objets plus petits que cette distance. C'est pourquoi l'utilisation d'outils comme la loupe ou le microscope sont nécessaires.

En optique géométrique, on peut représenter schématiquement le comportement de la lumière en utilisant des rayons à la propagation rectiligne. On utilise très souvent la loi de Snell-Descartes qui permet de décrire le comportement d'un rayon lorsque celui-ci est réfléchi ou bien réfracté (Fig 3).

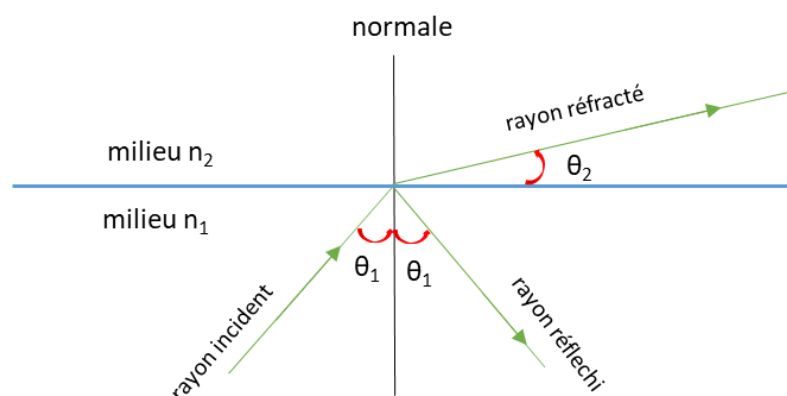


Fig 3. Schéma illustrant la loi de Snell-Descartes

Lorsqu'un rayon incident qui se propage dans un milieu n_1 arrive sur une surface réfléchissante avec un angle θ_1 par rapport à la normale, il est réfléchi avec un angle identique à θ_1 .

Lorsqu'un rayon incident qui se propage dans un milieu n_1 arrive au point d'incidence avec un angle θ_1 par rapport à la normale, il est réfracté dans un milieu n_2 avec un angle θ_2 et la loi indique que $n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2$

De façon simplifiée, un microscope est composé d'un objectif et d'un oculaire (fig 4).

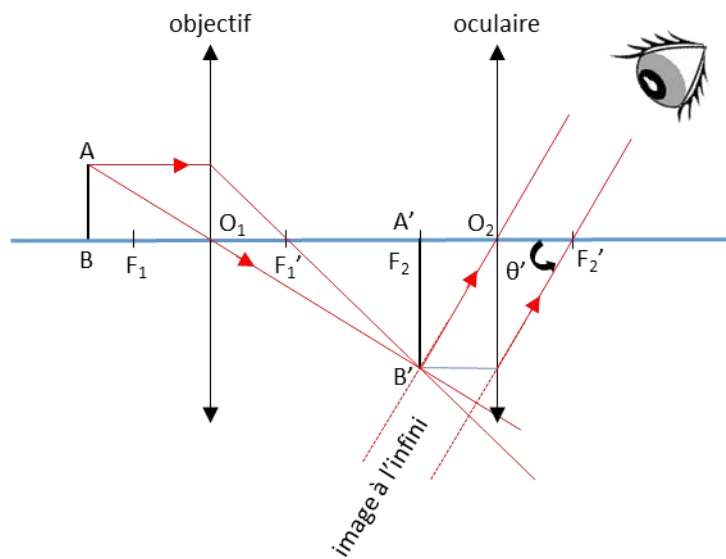


Fig 4. Schéma illustrant le principe de fonctionnement du microscope

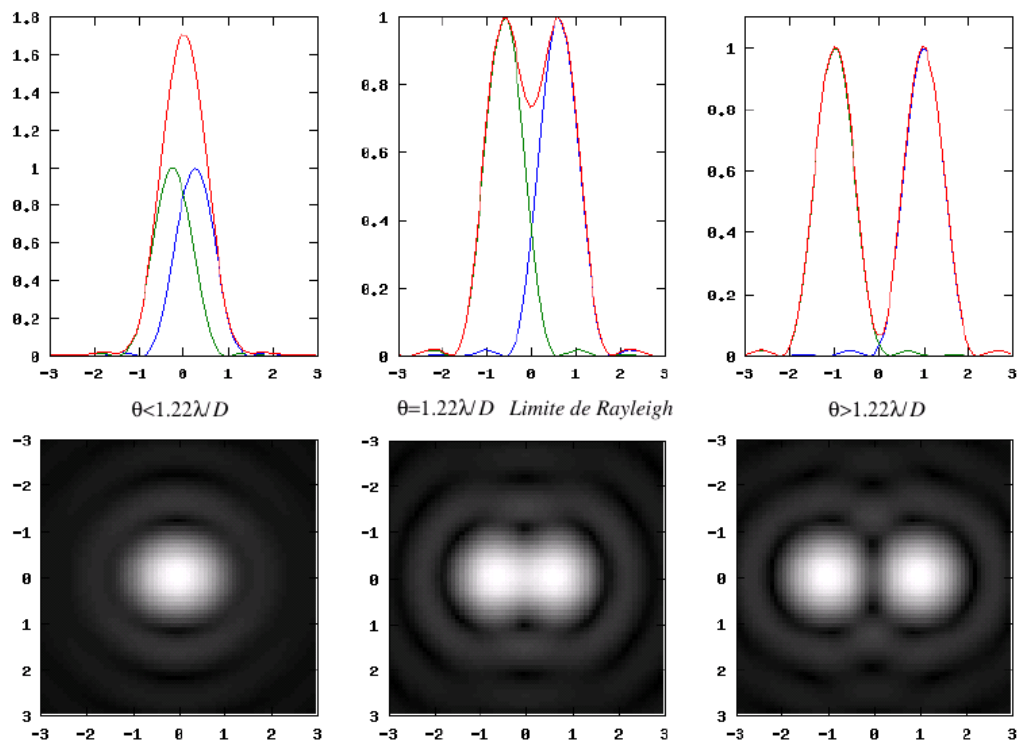
Le but principal d'un microscope est de créer une image à l'infini visible avec un angle inférieure à celui d'observation sans microscope permettant un grossissement de l'image objet.

Ces deux objets peuvent être schématisés chacun par une lentille convergente. Ces lentilles se comportent comme un milieu différent de l'air et vont entraîner une réfraction des rayons incidents qui les traversent. Une lentille est caractérisée par sa distance focale, f , qui est la distance séparant le centre de la lentille et le foyer image (sur le schéma O_1F_1 ou O_2F_2), c'est-à-dire le plan dans lequel l'image est créée. Tout rayon perpendiculaire au plan d'une lentille est réfracté en direction du foyer et tout rayon passant par le centre de la lentille ressort avec une direction inchangée. Cela permet ainsi de créer l'image finale d'un objet après que sa lumière émise soit passée par l'objectif puis l'oculaire. On obtient ainsi une image à l'infini vu sous un angle θ' . Par définition le grossissement G d'un microscope est le rapport de l'angle θ , angle sous lequel l'objet est vu sans aucun instrument, sur l'angle θ' . En utilisant le schéma on

peut finalement obtenir que $G = \frac{\Delta * D}{f_1 * f_2}$ avec Δ l'intervalle optique, c'est-à-dire la distance

entre le foyer image de l'objectif et le foyer objet de l'oculaire (sur le schéma $F_1'F_2$), D est la valeur de punctum proximum. On voit ainsi que le grossissement d'un microscope dépend des caractéristiques de la lentille et de l'oculaire. Les objectifs permettent des grossissements allant de 10x à 100x, tandis que les oculaires vont de 5x à 20x. Il est possible d'obtenir jusqu'à un grossissement de 2000x.

Une autre caractéristique importante d'un microscope concerne sa résolution. Il est important de connaître la capacité, et donc la limite, d'un microscope à pouvoir résoudre deux points proches. Cette limitation se base sur la diffraction de la lumière qui a lieu lors du passage au travers des lentilles. La diffraction de Fraunhofer permet de décrire la géométrie de cette diffraction lorsque la lumière passe à travers une ouverture de forme quelconque. En appliquant la formule mathématique au cas d'une ouverture circulaire, ce qui est le cas avec les microscopes, il est possible de montrer que l'image d'un objet ponctuel n'est pas un unique point mais est composée d'un disque lumineux entouré de cercles concentriques dont l'intensité décroît en s'éloignant du centre (fig 5).



<https://www.sciencesetavenir.fr>

Fig 5. Tâche d'Airy et principe de résolution.

Si deux points sont très proches, il sera impossible de les distinguer, leur tâche d'Airy se chevauchant. Le critère de Rayleigh indique la valeur à partir de laquelle les points peuvent être résolus.

Cela implique que deux points ponctuels proches peuvent voir leur tâche se chevaucher. En microscopie, on applique le critère de Rayleigh. Celui-ci indique que la limite de séparation de deux tâches se situe lorsque le maximum du disque intérieur d'une tâche coïncide avec le minimum du disque de la seconde. En microscopie, cela se traduit la fonction d'étalement du point (PSF) qui décrit en 3D (sur les axes x, y et z) l'image d'un point-objet au travers d'un

microscope (Pankajakshan et al., 2009). Si la fonction est connu, il est possible par déconvolution de restaurer en partie l'image réelle (Shaw and Rawlins, 1991). Numériquement, cela se traduit par $d_{min} = \frac{0.61\lambda}{O.N}$ avec d_{min} la distance minimum pouvant être résolue entre deux points, λ la longueur d'onde utilisée et O.N, l'ouverture numérique de l'objectif. L'ouverture numérique est le produit de la valeur du milieu de réfraction utilisé et du sinus de l'angle entre l'axe optique et le dernier rayon qui entre dans l'objectif (fig 6).

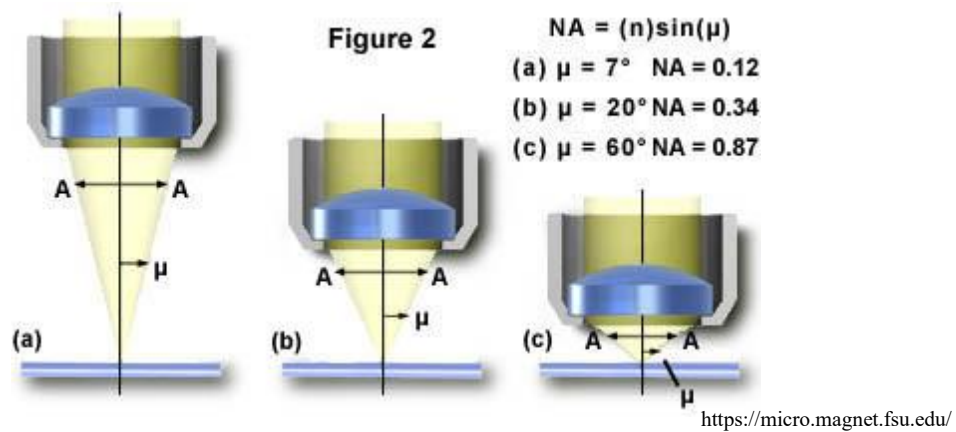


Fig 6. Schéma illustrant le principe de l'ouverture numérique d'un objectif

L'ouverture numérique est caractéristique d'un objectif et se calcule par le produit $n \cdot \sin(\mu)$ avec l'angle entre l'axe optique et le dernier rayon entrant dans l'objectif.

Souvent la valeur de l'ouverture numérique est entre 1 et 1.4. Si on prend une longueur d'onde moyenne d'environ 500nm, on obtient une résolution possible autour de 200nm (sur l'axe x,y). Ainsi avec ce type d'instrument, il est possible de distinguer des unités aussi petites que des cellules.

Toutefois, l'utilisation d'un microscope « simple » à fond clair ou à contraste de phase pose deux limitations. La première est le peu de contraste qu'il propose surtout lorsqu'il s'agit d'observer des cellules dont l'indice de réfraction est proche de celui du milieu de culture. La deuxième limitation est la spécificité puisqu'en observant ainsi une cellule, « on va tout voir » et donc être peu capable de distinguer les objets intra-cellulaires qui nous intéressent. Pour remédier à cette limitation, on utilise de façon courante le phénomène de fluorescence qui a joué un rôle clé dans l'étude et l'observation du vivant par microscopie.

2) La fluorescence au service de la microscopie

a) Propriétés de la fluorescence

Le terme de fluorescence a été introduit par Georges Stokes qui publie en 1852 ses travaux décrivant ce phénomène (Stokes George Gabriel, 1853). Le terme provient de la fluorine (CaF₂), qui est le minéral utilisé dans ses expériences. Il a ainsi montré que lorsque ce minéral était exposé à de la lumière dans l'ultra-violet, il émettait une lumière bleue. La fluorescence est un phénomène physique radiatif, c'est-à-dire impliquant l'émission de photons. On parle de fluorophore, un objet qui a la capacité d'émettre de la fluorescence. Le principe de fluorescence s'explique au niveau atomique. Lorsqu'un atome reçoit une certaine quantité d'énergie $E=h\nu$ (h constante de Planck et ν la fréquence de l'onde), il peut passer d'un état basal ou fondamental S_0 à un état excité. Un de ses électrons « saute » sur une orbite à plus forte énergie potentielle. Cet état n'est pas stable et pour que l'électron se retrouve à nouveau sur son orbite de départ, il va y avoir émission d'un photon, c'est la fluorescence. Cette émission se fait dans l'ordre de la nanoseconde. Ce principe peut se décrire par le diagramme de Jablonski, qui l'a établi en 1933 (Jablonski, 1933) (Fig 7).

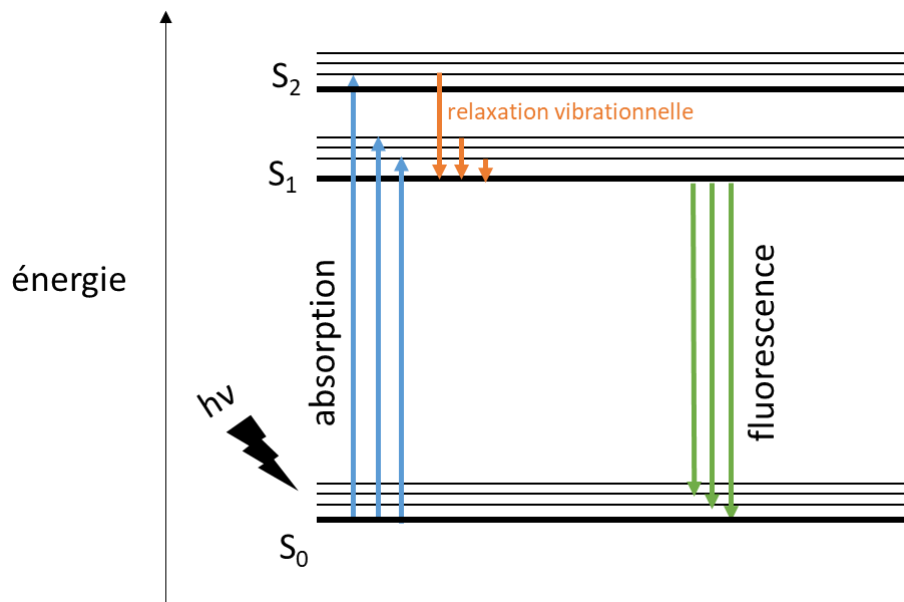


Fig 7. Diagramme de Jablonski

Le diagramme représente les états électroniques d'une molécule à l'état fondamental S_0 excitée par une source d'énergie $h\nu$. Le retour à l'état fondamental se fait par émission d'un photon.

A l'état excité S_1 , ou parfois S_2 , il peut y avoir des phénomènes de perte d'énergie interne par la relaxation vibrationnelle et rotationnelle des liaisons covalentes. Cette conversion interne se produit rapidement de l'ordre de la picoseconde et explique pourquoi l'énergie libérée sous forme de photon est de moins haute énergie que celle absorbée. Cela peut s'illustrer avec le décalage de Stokes qui est le décalage entre le spectre d'excitation d'un fluorophore et son spectre d'émission, puisque la longueur d'onde est inversement proportionnelle à l'énergie (Fig 8).

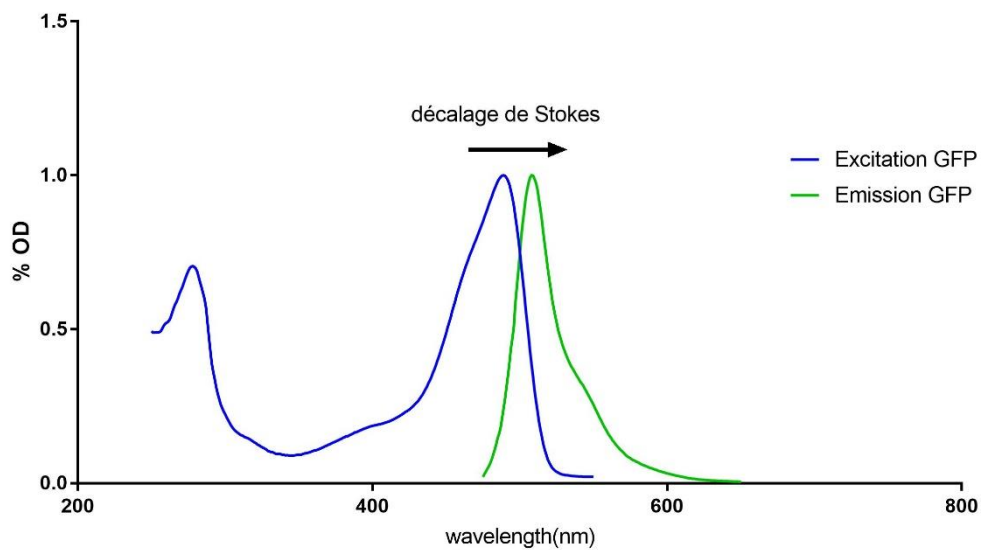


Fig 8. Schéma des longueurs d'onde de la GFP illustrant le décalage de Stokes

L'existence d'un spectre (et non pas de valeurs uniques) s'explique par l'existence de plusieurs sous-couches électroniques. En microscopie de fluorescence, on va pouvoir exploiter le décalage de Stokes puisqu'il est alors possible d'exciter un fluorophore avec une certaine bande spectrale, puis de ne sélectionner que le spectre correspondant à l'émission de fluorescence.

b) Développement des fluorophores

Le tournant majeur dans l'utilisation de la microscopie en biologie cellulaire a eu lieu avec la Green Fluorescent Protein (GFP) qui a donné lieu à un prix Nobel en 2008 pour Martin Chalfie, Osamu Shimomura et Roger Tsien. En 1962, les chercheurs de l'équipe d'Osamu Shimomura étudient la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*. Ils découvrent et purifient d'abord

l'aéuorine qui émet dans le bleu puis identifie la GFP, qui émettait dans le vert après excitation dans l'ultra-violet (Shimomura et al., 1962). La séquence génétique de la protéine sera isolée et clonée en 1992, la GFP contenant 238 acides aminés (Prasher et al., 1992). Grâce à cela il est possible d'utiliser l'expression génétique pour exprimer la GFP dans des modèles vivants (cellules ou organismes). La première utilisation de cette GFP a lieu en 1994 par l'équipe de Martin Chalfie (Chalfie et al., 1994). Les chercheurs ont fait exprimer la GFP dans *C.elegans* sous le contrôle d'un promoteur d'un gène codant pour une beta-tubuline. Ils ont ainsi pu relier les différentes intensités de fluorescences selon les cellules avec le niveau d'expression du gène. La structure cristallographique de la GFP est établie en 1996 par l'équipe de Roger Tsien (Ormö et al., 1996). La GFP est composée de feuillets beta et alpha. Les 11 feuillets beta entourent une hélice centrale qui contient le chromophore responsable de ses propriétés fluorescentes (fig 9).

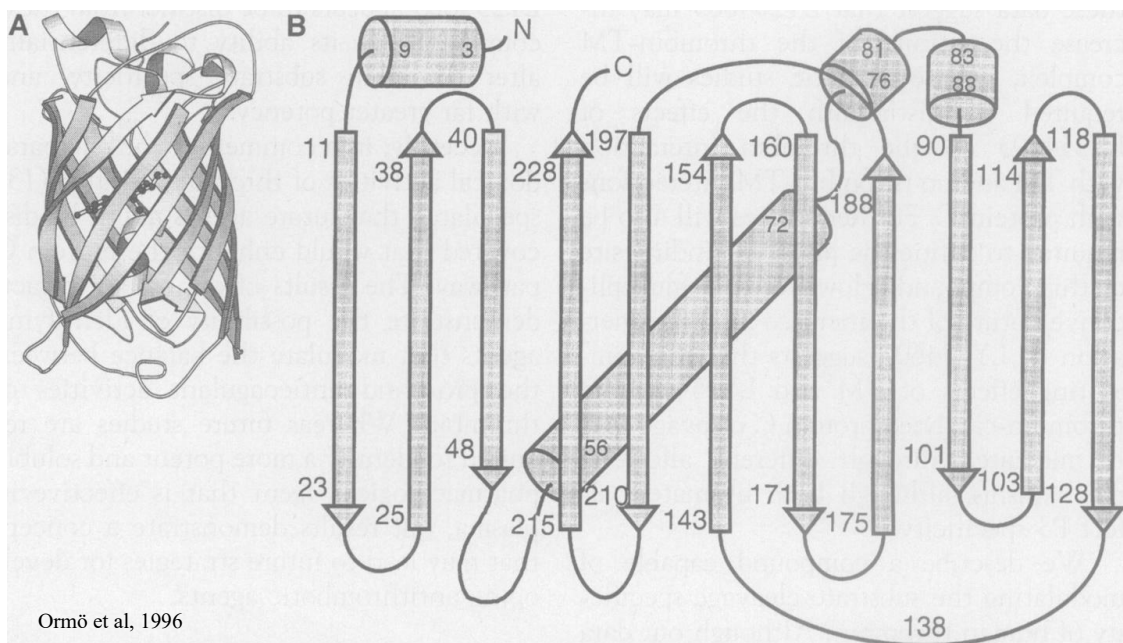


Fig 9. Schéma de la structure de la GFP

Les 11 feuillets bêtas forment une structure 3D qui permet de protéger à l'intérieur le chromophore responsable de la fluorescence.

Ils ont aussi pu montrer que des mutations au sein de ce chromophore pouvaient entraîner un décalage dans le rouge ou dans le bleu du spectre d'émission de la GFP. Cela ouvrira la voie au développement de nombreux dérivés de la GFP afin de couvrir le spectre de la lumière. Le chromophore de la GFP est constitué des acides aminés 65, 66 et 67 (Serine-Thréonine-Glycine) (Cody et al., 1993). Roger Tsien commencera l'amélioration de la GFP, en enlevant son double

pic d'excitation par exemple. En 1998, il émettait déjà l'hypothèse que la GFP avait un potentiel d'utilisation avec le FRET (Tsien, 1998). Des versions améliorées de la GFP parfois appelées Enhanced GFP (eGFP) ont été développées pouvant être jusqu'à 35 fois plus brillante que la GFP sauvage (Heim and Tsien, 1996; Zhang et al., 1996). D'autres dérivés de la GFP ont été générés comme la CFP (Cyan Protein Fluorescent) (Heim and Tsien, 1996) ou CyPet (Nguyen and Daugherty, 2005), qui émettent plus vers le bleu ou comme la mCitrine (Griesbeck et al., 2001), Venus (Nagai et al., 2002) et Ypet (Nguyen and Daugherty, 2005) qui sont des YFPs (Yellow Fluorescent Protein) qui émettent plus dans le jaune. A chaque fois, seule la mutation d'un ou quelques acides aminés suffisent pour changer les propriétés d'excitation et d'émission.

De la même façon que la GFP a été découverte existante dans le vivant, la DsRed est une protéine fluorescente qui a été découverte dans l'anémone de mer *Discosoma* et dont le spectre d'émission se situe dans le rouge. Son spectre qui est significativement séparée de la GFP permet ainsi de développer des approches à deux couleurs dans un même système. Cependant la DsRed est une protéine tétramérique (Wall et al., 2000) et sa vitesse de maturation est lente. La maturation est une étape post-traductionnelle pendant laquelle le réarrangement du chromophore permet à la protéine d'acquérir sa propriété de fluorescence. Ce temps est très variable parmi les différentes protéines fluorescentes (Balleza et al., 2018). Ainsi la DsRed a aussi subi des séries de développement par mutagenèse afin d'en améliorer les propriétés. Dans un premier temps, son monomère mRFP1 a pu être isolé. Celui-ci a une meilleure maturation mais un rendement quantique inférieur et une moins bonne photostabilité (Campbell et al., 2002). A partir de ce monomère, d'autres protéines ont été obtenues comme la mCherry (Shaner et al., 2004). Celle-ci s'avère avoir un temps de maturation correcte (bien qu'inférieur à la GFP) et une meilleure photostabilité. La Figure 10 illustre la couverture du spectre du visible par un ensemble de fluorophores dérivés de la GFP ou bien du monomère de la DsRed. (Rino et al., 2009).

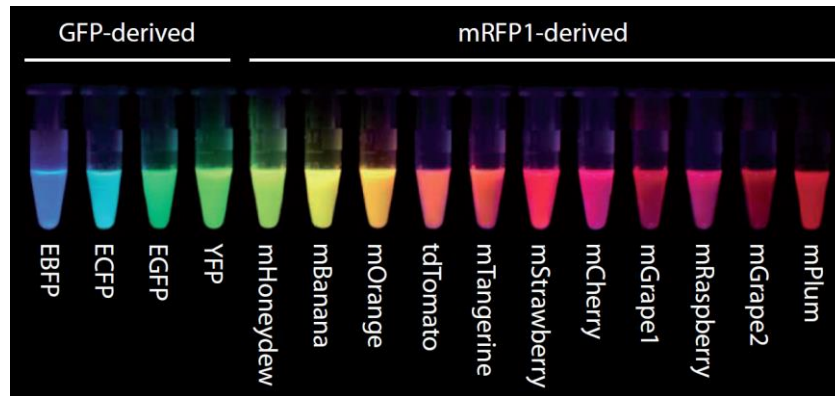


Fig 10. Image des spectres d'émission de différentes protéines fluorescentes.

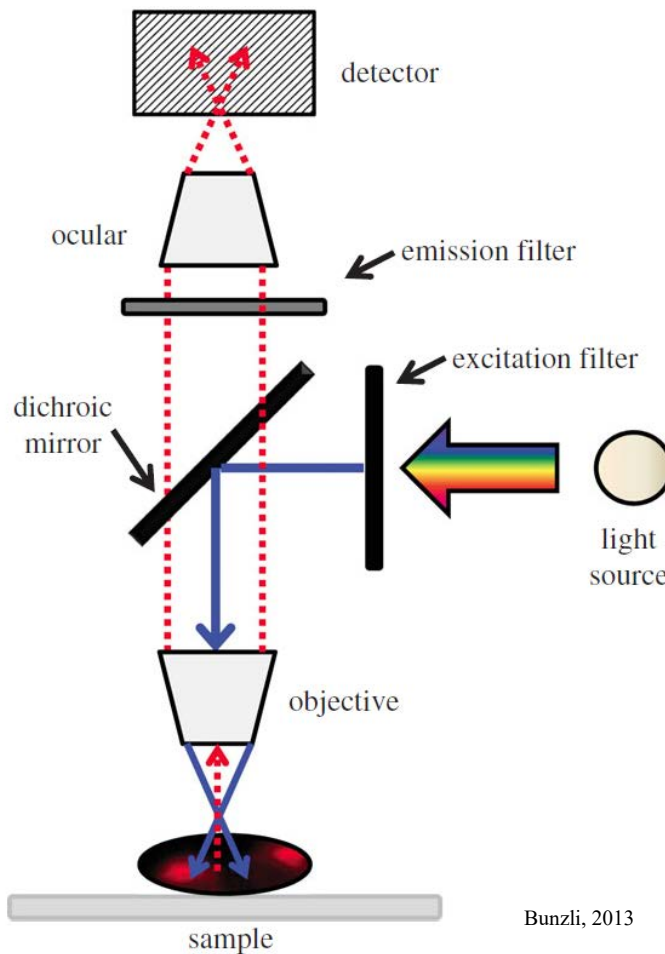
Ces protéines seront la base d'outils très puissants que l'on appelle biosenseurs. En théorie il est possible de faire exprimer ces protéines en fusion avec une ou plusieurs protéines d'intérêt dans des modèles vivants et ainsi d'avoir accès à la localisation, à la diffusion, à la concentration ou encore à la répartition dans des organismes vivants. Leur utilisation présente souvent un avantage de spécificité en comparaison à d'autres techniques de marquage comme l'immunofluorescence et est plus adaptée au vivant (Toseland, 2013).

Le développement de nouvelles protéines fluorescentes est toujours d'actualité. Les enjeux sont de développer des protéines dont le temps de maturation sera le plus court possible, dont la brillance sera la plus haute possible, dont la stabilité face au photoblanchiment ou au pH par exemple sera la plus haute possible (Campbell, 2001) et avec le meilleur rendement quantique possible. Le développement de ces protéines est aussi un enjeu lorsqu'elles sont à la base de l'utilisation de FRET comme on le verra prochainement. Dans ce cadre, l'aquamarine, obtenue par mutation de deux acides aminés de l'EGFP s'est révélé être un fluorophore idéal en tant que donneur pour le FRET (Mérola et al., 2014).

3) Les principaux types de microscope à fluorescence

a) Microscope champ large

Le microscope champ large est le microscope le plus simple pour capter et imager la fluorescence d'un système (fig 11) (Bunzli, 2013).



Bunzli, 2013

Fig 11. Principe de fonctionnement d'un microscope champs large

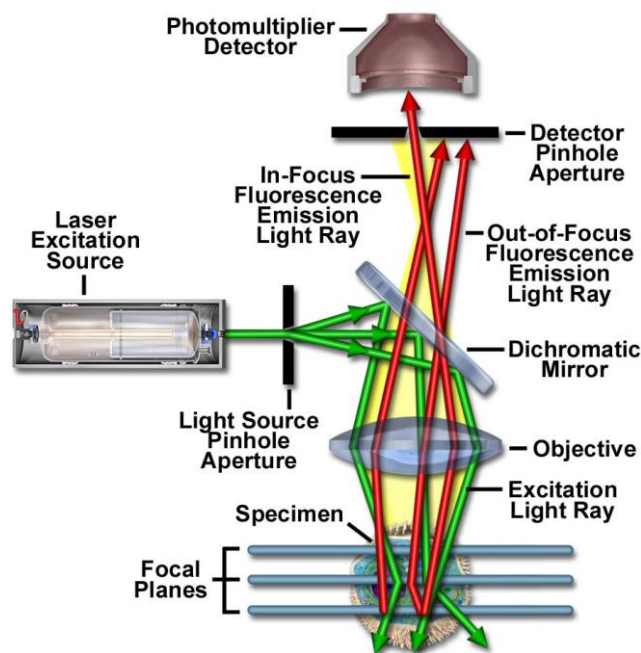
On parle de microscopie champs large car l'ensemble de l'échantillon est soumis à la source lumineuse et toute la fluorescence est collectée. L'utilisation d'un dichroïque permet d'envoyer la source lumineuse sur l'échantillon et de ne récupérer que la fluorescence émise. Un filtre d'émission permet de sélectionner la bande de longueur d'onde du fluorophore que l'on étudie évitant ainsi une fuite spectrale (pouvant provenir d'un autre fluorophore ou bien de l'autofluorescence de l'échantillon). La source d'illumination est le plus souvent une lampe à mercure ou à xénon couplée à des filtres d'excitation permet de d'exciter l'échantillon dans la gamme de longueur d'onde souhaitée. Elle a comme désavantage de beaucoup chauffer et d'avoir un temps de vie assez réduit. Plus récemment, des LEDs sont utilisées avec un meilleur temps de vie et un coût moins important mais aussi une meilleure sélectivité de la longueur d'onde (Young et al., 2004). Pour la détection de la fluorescence, c'est le plus souvent des caméras de type CCD qui utilisent la photo-électricité pour convertir les photons de la fluorescence en électrons (Boyle and Smith, 1970). Ceux-ci sont ensuite collectés dans des puits de potentiel, les photosites répartis en grilles ou matrice. On obtient ainsi un signal qui est

amplifié et peut être lu numériquement pour former une image en noir et blanc composée de pixels. Récemment les caméras CMOS sont de plus en plus utilisées, leur fonctionnement diffère par la méthode de lecture qui ne se fait plus ligne par ligne mais directement au sein du photosite.

Ainsi l'avantage de ce type de microscope est le coût et la simplicité. Cependant l'inconvénient est qu'il éclaire l'ensemble de l'échantillon en épaisseur et collecte l'ensemble de la fluorescence dans et hors du plan focal ce qui le rend peu sélectif.

b) Microscope confocal

Le principe du microscope confocal est d'utiliser pour l'illumination un système de lasers capables de scanner l'échantillon, c'est-à-dire de « balayer » l'échantillon point par point (Claxton et al., 2006) (Fig 12).



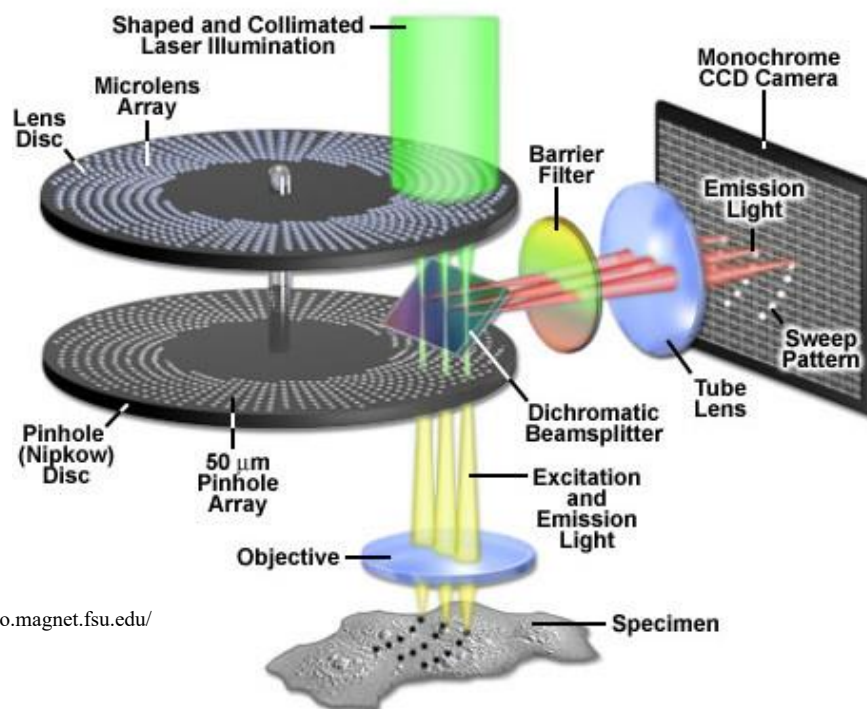
<https://www.microscopyu.com/>

Fig 12. Principe de fonctionnement d'un microscope confocal.

Le terme confocal réfère au principe de pouvoir concentrer (focus) le laser en un point et de sélectionner le volume focal par un pinhole. Un système de miroirs avec moteurs motorisés forme la tête de scan qui est capable ainsi de scanner l'échantillon. Pour la détection de la fluorescence, ce sont des détecteurs qui sont utilisés, différents des caméras en champs large. Les photons sont collectés par une photocathode et le signal électronique est amplifié par un

système de dynodes pour arriver sur une anode. Le signal peut être lu et l'image formée. Le pinhole est basé en amont de ces détecteurs ce qui permet de ne pas récupérer la fluorescence en dehors du plan focal. Le microscope confocal offre une meilleure résolution que celle d'un microscope champs large grâce à la sélection du volume focal ainsi qu'à une légère optimisation de la PSF en xy. Il permet aussi de faire des images par plan focaux en balayant l'échantillon dans l'axe z. Certains confocaux ont aussi l'avantage de disposer d'un système de détection spectrale permettant de suivre plusieurs fluorophores simultanément. Cependant, il a pour inconvénient de rendre les échantillons sensible aux photo-dommages, le laser étant concentré et devant être relativement puissant car on collecte moins de fluorescence à l'émission, mais aussi d'être lent car il faut balayer l'ensemble de l'échantillon.

Un autre type de microscope confocal existe et est appelé spinning disk (Fig 13).



<https://micro.magnet.fsu.edu/>

Fig 13. Principe de fonctionnement d'un microscope de type spinning disk.

Le terme fait référence à l'utilisation d'une tête de spinning qui contient deux types de disque qui tournent à grande vitesse (Jonkman and Brown, 2015). Le système d'illumination est un système laser qui passe à travers le premier disque composés de micro-lentilles qui vont permettre de concentrer le rayon laser et de le séparer en des centaines de faisceaux lasers. Chaque microlentilles est alignée avec un pinhole du second disque appelé disque Nipkow. De par leur rotation, le balayage de l'ensemble de l'échantillon se fait plus rapidement car tout se

passer comme si il y avait des centaines de faisceaux laser au lieu d'un seul. L'émission de fluorescence passe par le disque de pinhole permettant de sélectionner la fluorescence provenant du plan focal. Le système de détection est une caméra. Le spinning disk permet un balayage plus rapide que le microscope confocal mais est inférieur en termes de résolution spatiale. Cette perte en résolution spatiale s'explique par une taille de pinhole fixe et par la diaphonie qui correspond au passage de la fluorescence hors du plan focale dans les pinholes voisins (Shimozawa et al., 2013).

Le choix entre les différents microscopes se fera en fonction du contexte biologique, c'est-à-dire du type d'échantillon ainsi que des événements que l'on souhaite observer.

II) La microscopie de fluorescence quantitative pour mesurer le FRET

Les progrès dans l'instrumentation des microscopes permettant un meilleur rapport signal/bruit et le développement d'outils basés sur les fluorophores ont permis l'essor de la microscopie de fluorescence quantitative (Waters, 2009). Ainsi il ne s'agit pas seulement d'obtenir des images qui représentent qualitativement l'objet observé mais bien de pouvoir être en mesure de quantifier des objets ou des événements dans le temps et dans l'espace. La quantification la plus simple pourrait être celle de l'intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité de fluorophore. Mais d'autres techniques existent, comme l'utilisation du photoblanchiment pour mesurer la diffusion, on parle de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Reits and Neefjes, 2001) ou bien comme l'utilisation du phénomène de FRET qui sera utilisé au cours de ces travaux de thèse.

1) Le principe de FRET

a) Description du phénomène physique

Le Förster Resonance Energy Transfer, FRET, est un phénomène de transfert d'énergie de dipôle à dipôle non-radiatif, c'est-à-dire qui n'implique pas le transfert d'un photon (Forster, 1946). Les dipôles sont dans ce cas des molécules fluorescentes qui vont interagir. Le transfert se fait à partir d'un donneur qui se trouve à l'état excité vers un accepteur proche. L'efficacité de FRET dépend de trois paramètres i) la proximité entre les deux fluorophores, ii) le recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'excitation de l'accepteur, iii) l'orientation des fluorophores (Lakowicz, 2006).

i) Distance entre les dipôles

Le taux de transfert d'énergie $k_T(r)$ d'un donneur vers un accepteur est défini par

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

τ_D correspond à la durée de vie de fluorescence du donneur en absence de l'accepteur

R_0 correspond à la distance de Förster

r correspond à la distance entre les deux fluorophores

On constate grâce à cette formule le taux de transfert d'énergie est inversement proportionnel à la distance à la puissance 6. Ainsi plus la distance augmente plus le FRET diminue d'autant plus fortement.

L'efficacité de transfert d'énergie E se définit comme le rendement quantique du phénomène de FRET, c'est-à-dire le nombre de donneur transférant à l'accepteur sur le nombre de donneur excité. Elle peut s'écrire aussi

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

On voit ici que si la distance r entre le donneur et l'accepteur vaut R_0 alors l'efficacité de transfert est de 50%. Il est admis que l'efficacité de FRET devient significative pour des distances entre dipôles inférieures à 10nm ce qui correspond à un voisinage proche et à des interactions protéine-protéine (Fig 14). Dans le cas du couple GFP et mCherry, la distance Förster a pu être calculée et vaut environ 5,24nm (Akrap et al., 2010).

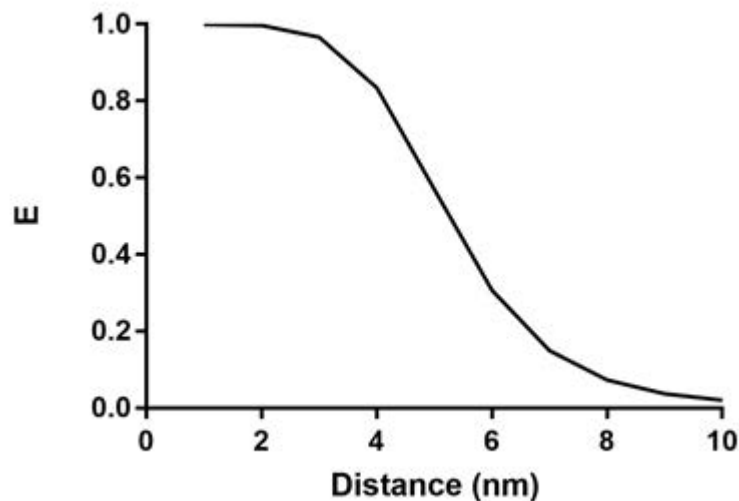


Fig 14 Efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance entre GFP et mCherry

ii) Recouvrement des spectres

Le recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'excitation de l'accepteur est un paramètre important dans l'efficacité de FRET. La distance Förster se définit sous la forme suivante

$$R_0^6 = C \kappa^2 Q_D J(\lambda)$$

C est une constante qui dépend de l'indice du milieu et du nombre d'Avogadro

κ est un facteur qui décrit l'orientation des dipôles

Q_D est le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur

λ correspond à la longueur d'onde en nm

$J(\lambda)$ est une intégrale qui exprime le degré de recouvrement des spectres d'émission du donneur

et d'excitation de l'accepteur. $J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$

Où $F_D(\lambda)$ correspond au spectre d'émission du donneur, et $\varepsilon_A(\lambda)$ correspond au coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.

Le recouvrement des spectres de la GFP et de la mCherry (Fig 15) permet le transfert d'énergie entre la GFP (donneur) et la mCherry (accepteur).

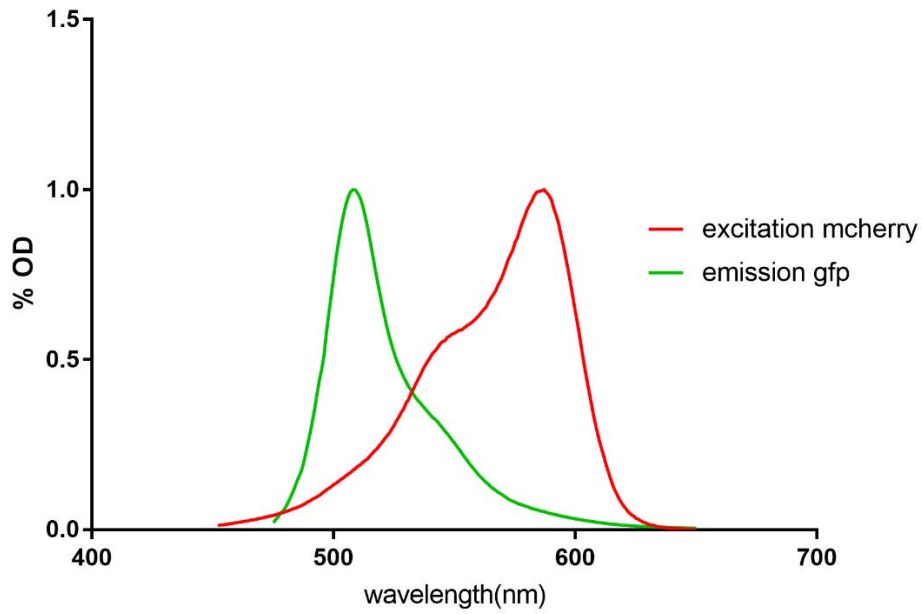
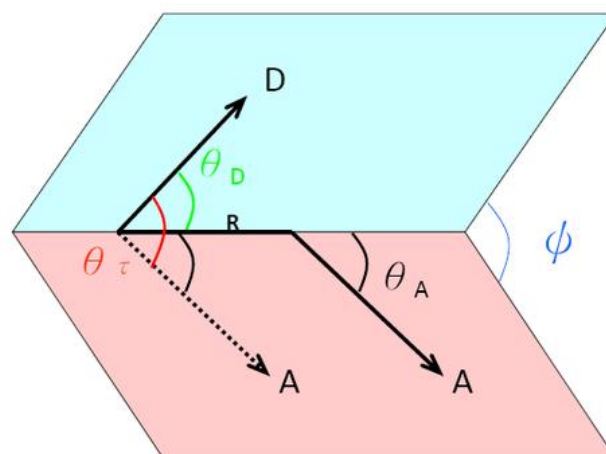


Fig 15. Chevauchement des spectres de la GFP et de la Mcherry

iii) Orientation des fluorophores

On a vu précédemment que la distance Förster dépendait de κ qui est un facteur décrivant l'orientation des fluorophores (Fig 16).



<https://chem.libretexts.org/>

Fig 16. Schéma de l'orientation de deux dipôles

Il se définit par

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2$$

θ_T est l'angle entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur

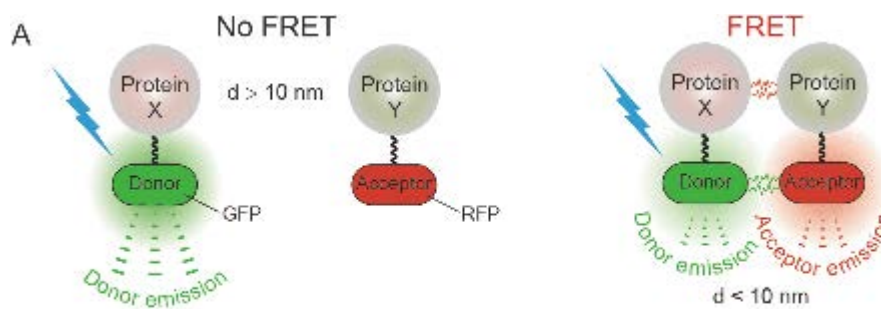
θ_D et θ_A sont les angles entre le dipôle du donneur D ou de l'accepteur A et le vecteur reliant ces dipôles

La valeur de κ^2 va de 0 à 4 et plus particulièrement, lorsque les dipôles sont orientés de façon parallèle, κ^2 vaut 1 et lorsque les dipôles sont orientés de façon perpendiculaire κ^2 vaut 0. Dans ce dernier cas, l'efficacité de FRET serait alors nulle. C'est pourquoi l'orientation joue un rôle important dans le transfert d'énergie mais paradoxalement c'est le paramètre le plus difficile à mesurer (Loura, 2012).

Il est ainsi possible d'utiliser une paire de fluorophore qui vérifie les conditions pour un FRET efficace, et en mesurant les variations de FRET, on obtient les variations de distance et d'orientation entre ces deux fluorophores. C'est pourquoi ce phénomène est très répandu pour l'étude des interactions protéines-protéine.

b) Utilisation du FRET dans les interactions protéine-protéine

Il existe plusieurs techniques d'étude d'interaction protéine-protéine comme in vitro la co-immunoprécipitation (Phizicky and Fields, 1995) et in cellulo, la colocalisation (Cui et al., 2019). Les limitations de la première méthode sont qu'elle nécessite de disposer des bons anticorps et une faible résolution spatio-temporelle puisqu'on n'observe pas l'interaction dans les cellules. La technique de colocalisation en utilisant des marqueurs fluorescents est largement utilisée in cellulo, elle requiert cependant une certaine analyse et est très sensible à la résolution optique du système. Il pourra être difficile de déterminer si les protéines sont bien en interactions ou si elles sont au sein d'un complexe ou d'un compartiment. Comme on l'a vu précédemment, la limite de résolution optique des microscopes est d'environ 200nm, insuffisant pour établir une véritable interaction. Le FRET apparait comme une approche complémentaire puisque s'il est possible de mesurer ses variations alors celles-ci seront dues aux variations de l'ordre du nanomètre entre les fluorophores étudiés ce qui correspond à une interaction protéine-protéine (Fig 17).



Yanning Cui et al, 2019

Fig 17. Principe d'utilisation du FRET dans l'étude d'interaction protéine-protéine.

En théorie, il est possible d'encoder la séquence du donneur et de l'accepteur à n'importe quel couple de protéine dont on veut étudier l'interaction. La paire ECFP/EYFP est souvent la plus utilisée, les CFPs présentant souvent de bons rendements quantiques (Bajar et al., 2016).

2) Emergence et développement des biosenseurs FRET

a) Quelques exemples de biosenseurs FRET

Les biosenseurs sont des outils analytiques intégrés avec un motif récepteur qui reconnaît un domaine élément entraînant une transduction physico-chimique (Morris, 2009). Les biosenseurs FRET utilisent le phénomène de FRET entre des protéines fluorescentes comme signal. On parle aussi de biosenseur génétiquement encodé puisque dans la plupart des cas, il est possible de faire exprimer le biosenseur comme une protéine au sein du système vivant que l'on veut étudier. Le biosenseur FRET historique développé dans l'équipe de Roger Tsien était appelé Cameleon et était un senseur du signal Ca^{2+} (Miyawaki et al., 1997). Ce biosenseur est constitué de la calmoduline (CaM) fusionnée au peptide M13 qui est un peptide synthétique qui correspond au domaine de liaison à la calmoduline de la kinase MLCK. Le biosenseur est flanquée d'une paire de fluorophore donneur/accepteur FRET, soit BFP/GFP soit CFP/YFP. Dans les cellules musculaires, lorsque les ions Ca^{2+} sont libérés, ils se lient à la calmoduline ce qui change sa conformation et fait ainsi augmenter son affinité pour des kinases telles que la MLCK (Ikura et al., 1992). Ainsi lorsque le Ca^{2+} se lie à la calmoduline du biosenseur, celle-ci entre en interaction avec le peptide M13 ce qui entraîne de part et d'autre les fluorophores (Fig 18).

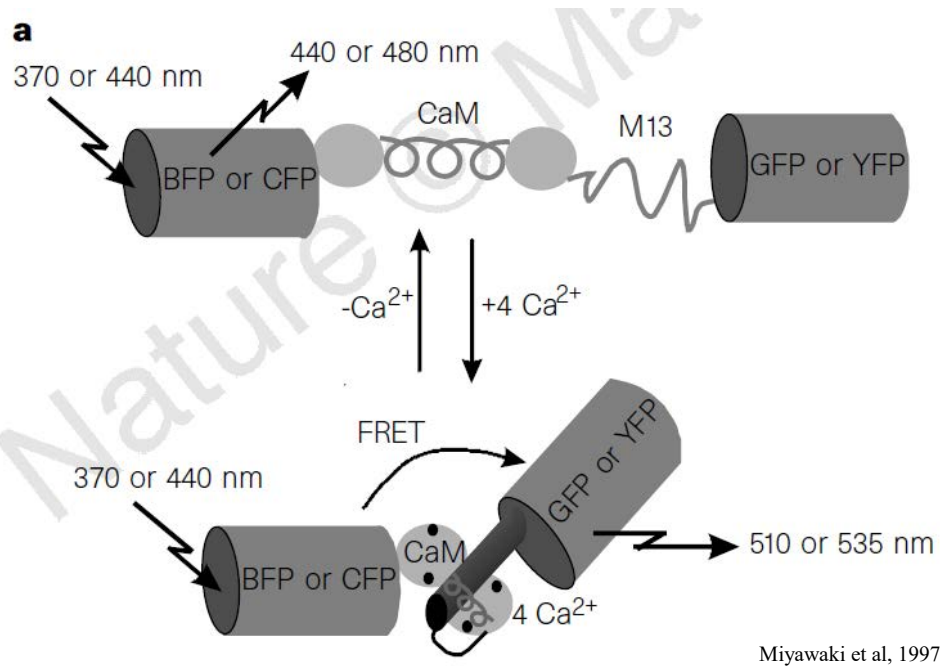


Fig 18. Principe de fonctionnement du biosenseur Ca^{2+}

La liaison du Ca^{2+} à la calmoduline entraîne une interaction avec le peptide M13 ce qui modifie la conformation du biosenseur augmentant l'efficacité de FRET au sein de la paire de fluorophores.

Ces derniers sont alors rapprochés ce qui augmente l'efficacité de FRET. La quantité de Ca^{2+} est bien responsable des variations de FRET ce qui fait que ce biosenseur est capable de mesurer les variations de concentration de Ca^{2+} . Ils ont aussi pu modifier l'affinité de la calmoduline du biosenseur pour le Ca^{2+} par mutation permettant ainsi d'utiliser le biosenseur avec différentes gammes de concentration de Ca^{2+} . Cet outil est particulièrement efficace car les variations de concentration de Ca^{2+} se déroulent à des temps très rapides et sont responsables de nombreux signaux dans les cellules. Avec ce type de biosenseur, il est possible de mesurer dans le temps, de l'ordre de la seconde, les variations de concentration en Ca^{2+} dans des cellules vivantes (McCombs and Palmer, 2008).

Un autre type de biosenseur a été généré et permet de rendre comptes des forces de tension au sein de cellules (Grashoff et al., 2010) (fig 19).



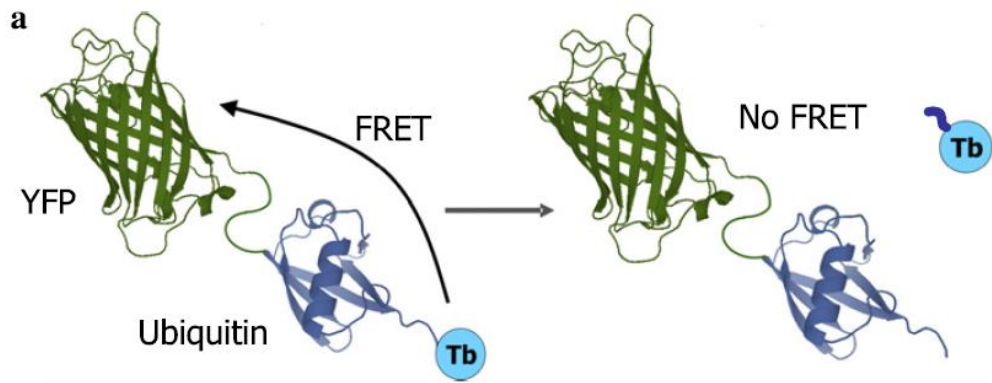
Grashoff et al, 2010

Fig 19. Schéma du biosenseur de tension VinTS

Vh : vinculin head, Vt : vinculin tail

Ce biosenseur est basé sur la vinculine qui est une protéine intracellulaire faisant partie des adhésions cellulaires (Focal Adhesion). Elle est globalement constituée d'un domaine de tête qui peut se fixer à la protéine taline ce qui entraîne son recrutement au niveau des adhésions et une interaction entre son domaine de queue avec la F-actine. Un liant peptidique à la caractéristique élastique relie ces deux domaines. La vinculine subit des forces de tension qui sont liées à son recrutement aux adhésions cellulaires et cela joue un rôle sur la capacité de migration de la cellule (Alenghat et al., 2000; Galbraith et al., 2002). Le biosenseur de la vinculine est constitué dans l'ordre du domaine tête, du donneur FRET mTFP1, du liant élastique, de l'accepteur FRET Venus et du domaine queue. Ainsi lorsque le biosenseur n'est soumis à aucune force de tension, la paire de fluorophores est à proximité permettant le FRET, tandis que plus le biosenseur sera soumis à des tensions plus la paire de fluorophores aura tendance à s'éloigner diminuant le FRET. Il est ainsi possible de mesurer les forces de tension de l'ordre du pico Newton au cours de la migration cellulaire. De la même façon un biosenseur de tension de la E-cadhérine a été généré (Borghini et al., 2012). Il a permis d'étudier les forces de tensions au niveau des jonctions cellulaires au cours de la mitose dans des embryons de Xénope (Herbomel et al., 2017).

Une approche à partir d'un biosenseur FRET a permis l'étude de protéases, enzymes capable de cliver des peptides (Horton et al., 2007). Dans ce cas le biosenseur est constitué dans l'ordre du donneur FRET terbium, d'une ubiquitine et de l'accepteur FRET YFP (Fig 20).



Horton et al., 2007

Fig 20. Principe du fonctionnement du biosenseur protéase

Lorsque l'ubiquitine est clivée, cela libère le donneur terbium ce qui abolit le FRET

L'ubiquitine est le substrat des protéases de type DUB (deubiquitinating enzymes). Ainsi le biosenseur montre du FRET entre le terbium et YFP. Si l'ubiquitine est clivée par les protéases, le terbium est libéré ce qui abolit le FRET. Une diminution de la mesure de FRET est donc un indicateur de l'activité protéase des enzymes.

Plus récemment, des biosenseurs sont développés afin d'être utilisés en multiplex, qui est la possibilité de suivre simultanément ou quasi simultanément plusieurs biosenseurs dans un même système vivant (Demeautis et al., 2017). Pour cela, un biosenseur ERK a été généré à partir du biosenseur EKAR (Fritz et al., 2013; Vandame et al., 2014), en utilisant la paire de fluorophores mTFP1/shadowG. ShadowG est un bon accepteur FRET mais considéré « dark » car il n'émet quasiment pas de fluorescence (Murakoshi et al., 2015). De même, à partir d'un biosenseur de PKA, AKAR (Depry et al., 2011), un nouveau biosenseur a été généré avec la paire LSSmOrange/ mKate2. Les deux donneurs mTFP1 et LSSmOrange peuvent être excités à une même longueur d'onde à 440nm, et leur spectre d'émission est assez séparé pour pouvoir être observé simultanément. Il est ainsi possible de suivre l'activité de ERK et de PKA simultanément et dans des cellules vivantes.

Ces exemples de biosenseurs montrent la variété possible d'évènements biologiques qui peuvent être suivis au sein des cellules.

b) Les biosenseurs FRET d'activité kinase

Cette section se présente sous la forme d'une review que j'ai eu l'occasion d'écrire et de publier dans IntechOpen en 2017 : Sizaïre, F., and Tramier, M. (2017). **FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells**. IntechOpen Protein Phosphorylation. (Sizaïre and Tramier, 2017)

Le but de cette review était de présenter les différents types de biosenseur FRET d'activité kinase et les nouvelles méthodologies pour mesurer des biosenseur FRET dans un cadre de multiplex (plusieurs biosenseurs suivis dans le même système). Plus particulièrement, j'ai pu discuter des biosenseurs FRET basés sur le substrat de l'enzyme étudié ou basé sur la kinase elle-même. Ce dernier type de biosenseur consiste en une protéine kinase flanquée d'une paire de fluorophores donneur/accepteur FRET et dont le changement d'activation s'accompagne d'un changement de conformation qui va faire varier la distance entre les fluorophores. C'est ce type de biosenseur, plus particulièrement le biosenseur d'activité kinase d'Aurora A (Bertolin et al., 2016) qui a été développé au sein de l'équipe et sur lequel vont porter mes travaux de thèse.

FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells

Florian Sizaire and Marc Tramier

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71005>

Abstract

Fluorescence microscopy is widely used in biology to localize, to track, or to quantify proteins in single cells. However, following particular events in living cells with good spatio-temporal resolution is much more complex. In this context, Förster resonance energy transfer (FRET) biosensors are tools that have been developed to monitor various events such as dimerization, cleavage, elasticity, or the activation state of a protein. In particular, genetically encoded FRET biosensors are strong tools to study mechanisms of activation and activity of a large panel of kinases in living cells. Their principles are based on a conformational change of a genetically encoded probe that modulates the distance between a pair of fluorescent proteins leading to FRET variations. Recent advances in fluorescence microscopy such as fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) have made the quantification of FRET efficiency easier. This review aims to address the different kinase biosensors that have been developed, how they allow specific tracking of the activity or activation of a kinase, and to give an overview of the future challenging methods to simultaneously track several biosensors in the same system.

Keywords: kinase, biosensor, FRET, multiplex, protein conformation, fluorescence microscopy

1. Introduction

Investigating kinase activity in living cells remains a challenge, and usual methods are limited when one wishes to study cellular dynamic events. For a large panel of kinases, the phosphorylation state of the kinase or its substrate has become the main indicator of its activity [1]. One of the most common methods to study this activity is to perform Western Blot analysis on cell extracts by targeting the phosphorylated kinase residue or the phosphorylated substrate residue with an antibody. However, this semi-quantification of the activity state of the kinase

applies only for the whole population of the cells [2]. Thus, the other most frequent way to investigate kinase activity is to perform immunofluorescence by targeting the phosphorylated kinase or the phosphorylated substrate with a fluorescent antibody for microscopy observation. This method allows localization of the proteins phosphorylation state in a single cell. However, these two methods suffer from one major limitation: the inability to track this activation state both in space and in time to track dynamic events in living cells. Indeed, this requires lysing the cells or fixing them and permeabilizing them, which prevents sufficient spatio-temporal resolution to investigate intracellular events [3].

To overcome this limitation, new tools have been developed including Förster resonance energy transfer (FRET) biosensors [4]. FRET is a nonradiative transfer of energy of one donor fluorophore to an acceptor fluorophore and relies on (i) an overlap of the emission spectrum of the donor with the excitation spectrum of the acceptor, (ii) an adequate orientation between the two fluorophores, and (iii) a distance less than 10 nm between the two [5]. This feature has been used to investigate various cellular events such as protein–protein interactions by genetically tagging the two proteins of interest with a donor and an acceptor fluorescent protein [6], the intra-cellular Ca^{2+} signal by using calmodulin biosensor [7], proteases activity where the substrate is flanked by two fluorescent proteins, and the decrease of FRET indicates a cleavage of the protein [8], Rho GTPases for cytoskeleton dynamics [9, 10], and mechanical forces at adherent junctions [11, 12, 13]. The first kinase biosensor has been developed for cAMP-dependant protein kinase A (PKA) [14]. From this example and by taking advantage of the FRET characteristics and the conformational modifications of the phosphorylated sensors, several tools to monitor the kinase activity in space and time in living cells have been developed.

By conception, these tools are genetically encoded providing an invaluable advantage to endogenously producing the biosensor in live samples. In this review, we will first present genetically encoded FRET biosensors to monitor kinase activities based on phosphorylated peptide substrate. We will then introduce an alternative way of designing biosensors based on a conformational change of the kinase itself. Finally, we will present new methodological challenges such as multiplex FRET measurements in the same cell, thus allowing simultaneous monitoring of several kinase activities in time and space.

2. Substrate-based kinase activity biosensors

The first genetically encoded FRET biosensor for kinase activity was called A-kinase activity reporter (AKAR) and was designed to investigate the activity of PKA [14]. The idea was to follow a conformational change by FRET in a fusion protein composed of a substrate peptide sequence and a phosphorylated recognition domain. In this foundational work, the biosensor was composed of two fluorescent proteins, CFP and YFP (cyan and yellow fluorescent proteins). Between them sits a first domain, “the peptide substrate,” containing a sequence phosphorylated by PKA, followed by a second domain, “the phosphorylation recognition domain,” that binds to the peptide substrate when phosphorylated, these two domains are separated by an elastic linker. In the presence of active PKA, the peptide substrate becomes

phosphorylated, triggering its affinity for the phosphorylation-binding domain. This association between the two domains induces a conformational change of the biosensor that brings closer both fluorophores and increases FRET efficiency between CPF donor and YFP acceptor (**Figure 1**). The efficiency of FRET can be detected by ratiometric measurements between the intensity signal of the donor and the acceptor. This biosensor can be expressed in cell and is able to provide a response to cell treatment such as forskolin that raises the level of cAMP-activating PKA [14]. This tool has then been improved several times by using a better reversible phospho-binding domain called FHA1 [15] or by changing the fluorophore couple to improve the ratiometric measurements [16, 17]. The AKAR biosensor has been used to report the activity of PKA in neurons of mouse brain slices, showing its value in neurosciences [18].

Based on this concept, several new kinase FRET biosensors were developed. The E-kinase activity reporter (EKAR) biosensor is a FRET-based probe to study ERK activity [19]. The fluorophore pair is composed of the green donor eGFP and the red acceptor mRFP1. The consensus substrate peptide originates from Cdc25c, a member of the MAPK family. As other kinases from this family could phosphorylate the substrate, an ERK binding domain has been inserted to ensure ERK specificity. A WW domain (containing 2 tryptophans separated by around 20 aa) was used to bind the phosphorylated substrate [20], and a flexible linker allows a conformational change, when the Cdc25C peptide substrate is phosphorylated. This biosensor has also experienced several steps of optimization by modifying the fluorophores or the flexible linker [21, 22]. Among all these biosensors, the reversibility of the conformational modification is a major feature to study variations of kinase activation states [23].

Kinase biosensors are such powerful tools to investigate the dynamic of kinase activity events in cells that several of these biosensors have been created to study mitotic kinases activity through the cell cycle, including cyclin B1-Cdk1 [24]. A kinase biosensor has also been used to study PKC (protein kinase C) activation which is involved in tumor promotion. CKAR (C-kinase activity reporter) is composed of the CFP/YFP fluorophore pair, a specific peptide substrate for PKC, and the FHA2 domain of Rad53p that can bind to the phosphorylated substrate [25]. In this particular case, the unphosphorylated biosensor harbors a maximum

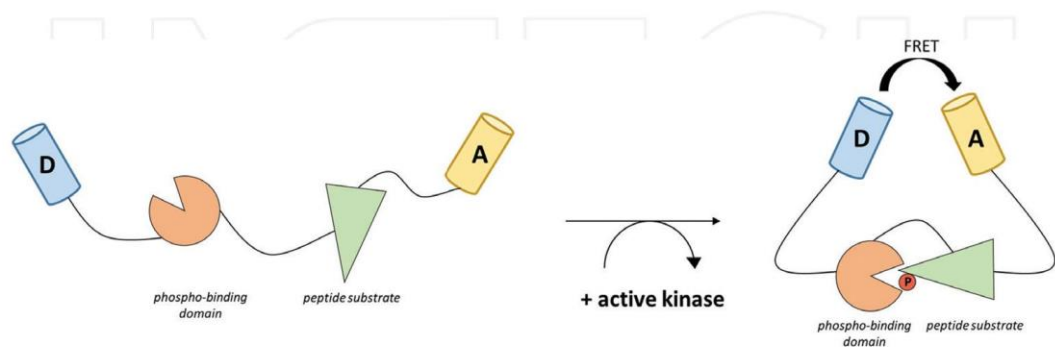


Figure 1. Mechanism of a substrate-based FRET biosensor. When the biosensor is not phosphorylated, it adopts an opened conformation keeping away the donor fluorophore D, and the acceptor fluorophore, A. After the peptide substrate phosphorylation by the kinase, a phospho-binding domain can bind to it gathering the fluorophore pair and allowing FRET.

FRET efficiency conformation, and FRET signal decreases once phosphorylated. By rapidly acquiring FRET efficiency, oscillations of PKC phosphorylation in a range of a minute were highlighted [25].

Other biosensors have been derived from CKAR. Polo-like kinase-1 (PLK1) is a major mitotic kinase that activates Cdc25C phosphatase, which abrogates the inhibitory phosphorylation of proteins controlling the entry to mitosis. A FRET-based biosensor has been created by replacing the peptide substrate of PKC with a peptide substrate of PLK1, the use of which revealed that the timed-control activation of PLK1 depends on Aurora A [26]. The choice of the kinase peptide substrate to construct the biosensor is a key point to improve its specificity. For Plk1, a c-Jun substrate-based biosensor was developed [27], since the previous version based on Myt1 substrate sequence was also sensitive to Mts1 activity [28]. The c-jun-based version was then used to demonstrate that Plk1 activity is required for commitment to mitosis during cell cycles [29].

A biosensor to study Aurora B activation has also been developed [30]. But in this work, authors wanted to monitor the kinase activity at a specific location, since it has been postulated that an activity gradient of Aurora B at the mitotic spindle may play a role for mitotic progression. If one considers a conventional version of the FRET biosensor, its diffusion throughout the cell is too fast, and it is not possible to reveal a precise localization of the activation. Thus, Fuller and co-workers have added different localization sequences to target the biosensor either to the centromere using a peptide from CENP-B or to the chromatin using histone H2B [30].

FRET-based substrate kinase biosensors are good tools to investigate kinase activity, but they have some limitations and present three major challenges: (i) the biosensor relies on the endogenous kinase phosphorylating the substrate peptide, and thus, FRET variation is observed only when the kinase is particularly abundant or heavily stimulated, (ii) the sequence flanking the phosphorylation residue(s) targeted by the kinase must be known and selective for the kinase under study, and (iii) these biosensors only explore the catalytic activity of the kinase toward a specific substrate at once and not the activation process of the kinase itself. To solve this last issue, a new set of kinase FRET biosensors has been developed based on conformational changes of the kinase when active.

3. Conformational kinase-based biosensor

An alternative way of genetically encoded FRET-based substrate kinase biosensors has been developed by directly using the full-length kinase peptide sequence. Activation of a kinase frequently relies on a conformational opening of the enzymatic pocket. The idea is then to tag the whole kinase at its N- and C-terminus with a FRET pair of fluorescent proteins to be able to monitor this kinase activation related to the conformational change (Figure 2). To our knowledge, the first kinase FRET biosensor using this concept was developed to study c-Raf conformation [31]. This biosensor called Prin-c-Raf uses the CFP/YFP pair to flank c-Raf. A flexible linker has been added between the acceptor fluorophore and the kinase to enhance

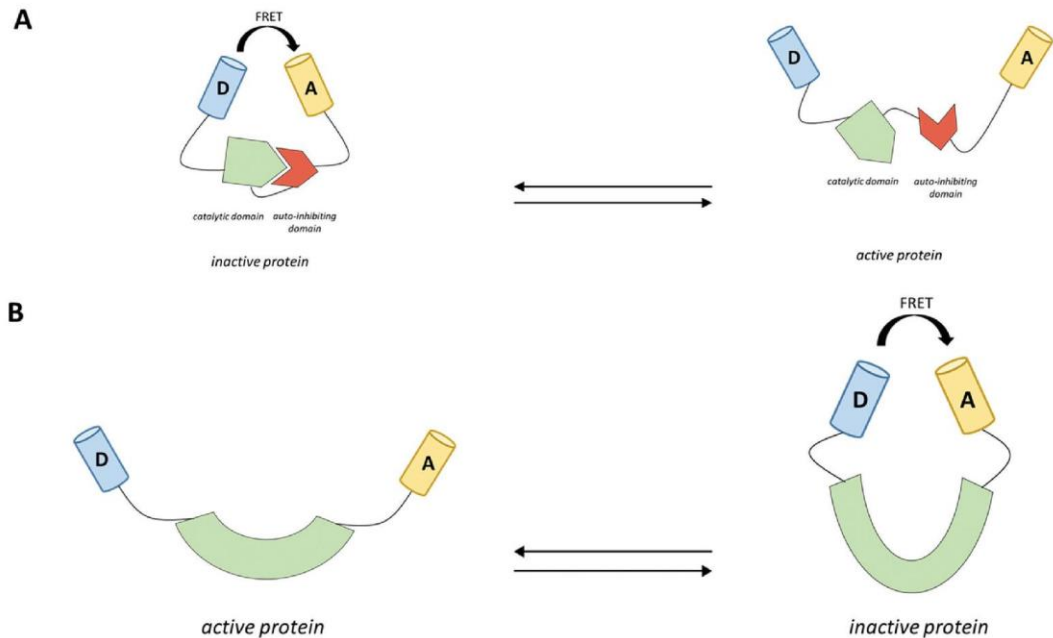


Figure 2. Mechanisms of a conformational-based FRET biosensor. (A) The auto-inhibiting domain can bin the catalytic domain of the kinase bringing closer the donor fluorophore D and the acceptor fluorophore A, allowing FRET. When the kinase is activated, the auto-inhibiting domain unbinds and the kinase adopts an opened and active conformation with a FRET decrease. (B) A lot of proteins adopt a new conformation when activated that modulates the distance between the pair of fluorophores.

FRET efficiency. Mutation of the residues Ser259 and Ser261 preventing c-RAF phosphorylation and mimicking the active state of the kinase leads to an open conformation of Prin-c-RAF as FRET ratio is decreased. When a constitutively active mutant of AKT that negatively regulates c-RAF is expressed, the wild-type version of c-RAF shows high FRET signal consecutive to a closed inactive conformation, while the mutated version S259A and S261A stays open with a lower FRET ratio. By using this biosensor, authors were able to show that the constitutively active H-RasV12 localized at the plasma membrane binds and opens the wild-type biosensor in an active conformation, inducing the recruitment of MEK at the plasma membrane.

A biosensor for PKC γ consisting of the kinase flanked by the donor super cyan fluorescent protein 3 (SCFP3A) and the acceptor YFP has also been developed [32]. The kinase displays a pseudosubstrate domain that is able to bind and inhibit catalytic activity. In this work, they compared a different mutated form of the biosensor PKC γ -A24E, where the pseudosubstrate cannot bind to PKC γ and observed a decrease of FRET that they are associated with an opened active conformation.

Another conformational biosensor has been developed to study FAK (Focal Adhesion Kinase) activity by taking advantages of the conformational changes associated with the activation state of the kinase being controlled by an inhibitory domain [33]. For that, a biosensor was constructed with the full-length kinase containing a FERM domain (F for 4.1

protein, E for ezrin, R for radixin, and M for moesin) for membrane localization and a kinase domain using the CFP/YFP FRET pair, the donor at the N-terminus of the protein and the acceptor directly between the two domains. When the FERM domain binds to the catalytic domain of FAK, it inhibits the kinase activity and FRET occurs. On the contrary, the absence of FRET corresponds to an active and thus open conformation. It is then possible to monitor FAK activity at the focal adhesion of living cells by expressing the biosensor transiently in living cells.

A biosensor of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) has been created consisting of the MELK sequence flanked by the CFP/YFP pair [34]. As well as FAK, MELK has an auto-inhibited domain at the C-terminus that can bind to the catalytic domain of the kinase. This biosensor was expressed in *Xenopus* embryos, and conformational changes were monitored in dividing cells. It has been demonstrated that the biosensor exhibits a closed conformation in the cytosol and an open conformation at the cleavage furrow. But here again, as for previous conformational sensors, only conclusions on the conformational change of the kinase could be made. Its direct link to the kinase activation (and activity) was not tackled.

Recently, we have developed an Aurora A biosensor based on conformational changes [35]. It is composed of the full-length kinase flanked by a GFP donor and a mCherry acceptor. To be functional, Aurora A undergoes a conformational change following autophosphorylation on the T288 residue [36, 37]. By exploiting this mechanism, we designed a biosensor that directly associates the conformational change of the kinase with its state of activation. Indeed, *in vitro* treatment with ATP leads to a closed conformation when treatment with phosphatase leads to an opened conformation. The activation state is also monitored by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) in living cells. Through this work, we show that the biosensor was able to functionally replace the endogenous Aurora A depleted by siRNA. Thus, by replacing the endogenous kinase, this biosensor is a direct reporter of the activation state of Aurora A at endogenous levels in stable cell lines with a good spatio-temporal resolution. With this tool, by dissociating the quantity and the activation state of the kinase, we were able to highlight a new nonmitotic role of Aurora A in G1 phase [35].

This kind of biosensor can also be adapted to other enzymatic activities. As an example, a BRET (bioluminescence resonance energy transfer)-based biosensor of the PTEN (phosphatase and tensin homolog) phosphatase has been developed and is composed of the full-length PTEN protein flanked by a donor Rluc and the acceptor YFP [38]. PTEN biosensor immunoprecipitated from cells displays the same phosphatase activity on PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate) and AKT (or Protein kinase B) as the wild-type PTEN. This biosensor can also be expressed at endogenous levels in human embryonic kidney (HEK) cells. The mutation of four residues Ser380, Thr382, Thr383, and Ser385 favoring a closed conformation leads to a strong decrease of BRET signal. The association between conformational changes and the activity state has allowed the monitoring of PTEN regulation in living cells. Authors have thus been able to correlate inhibition of the known activation pathway of PTEN using a CK2 (Casein Kinase 2) inhibitor, with its change of conformation or inversely by co-expressing S1PR2, an activator of PTEN. Once the biosensor was validated, the authors used it to identify new GPCRs (G protein-coupled receptors) activating PTEN.

The reliability of these biosensors, consisting of the full-length protein flanked by a pair of fluorophores, was recently applied to study any protein function associated with a conformational change. For example, a study of the conformational change of the Tau protein has been tackled using the protein flanked by a CFP/YFP pair [39]. The use of this biosensor led to the demonstration that the binding of Tau to the microtubules induces a switch to a hair-pin conformation of Tau. In addition, it has been shown that mutations of Tau responsible of Frontotemporal dementia with parkinsonism-17 (FTDP-17) disorder alter this conformation change. This method has also been used to study vinculin conformation by using a biosensor consisting of the protein flanked by an mTurquoise donor and a NeonGreen acceptor [40]. Vinculin displays an auto-inhibited state, when the tail domain and the head domain are binding, increasing FRET signal. A mutated version of the biosensor that is unable to bind to talin showed a decreasing FRET signal and a disruption in the vinculin localization at focal adhesions. In contrast, paxillin knock-down or mutations leading to a decrease in actin binding did not modify FRET signal.

Thus, these genetically encoded biosensors are efficient at monitoring protein activation at cellular levels when expressed in living cells. A lot of proteins are known to adopt different conformation states according to their activation, and this is why FRET or BRET biosensors are best suited for tracking their activity in space and in time in living cells. It is likely that this tool will be used intensively to study protein conformation linked to activity in the next few years.

One can thus follow the activation of a kinase by following its conformational change using a conformation-based biosensor and follow its catalytic activity using a substrate-based biosensor. It would be of great interest to simultaneously follow activation and activity in a single living cell, a pursuit that calls for methods able to monitor the two different FRET biosensors simultaneously.

4. New methodological insights for multiplexing kinase biosensors

Owing to complex crosstalk between signaling pathways, multi-parameter biosensing experiments have become essential to correlate biochemical activities without lag time during a dedicated cellular process. A very exciting challenge has thus been to follow several FRET biosensors on the same sample at the same time and in the same location [41]. 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/mCherry [42], mTFP1/mCitrine and mAmetrine/tdTomato [43, 44], mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKok [45], 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 on the respective quantities of the two biosensors and (ii) the multiple excitation wavelength which requires sequential acquisition that does not adequately follow fast signal dynamics or signal changes in highly motile samples.

To overcome the first limitation, a meroCBD (merocyanine-Cdc42-binding domain) 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 A [46]. This approach prevents spectral bleed-through but cannot be generalized to all genetically encoded FRET biosensors, where organic fluorophores cannot easily replace fluorescent proteins. The same team also developed an environment-sensing dye called mero199 [47]. This dye can bind to the active form of Cdc42 leading to a shift of its excitation/emission ratio. In combination with a Rac1 biosensor, they were able to simultaneously monitor activation of both proteins and to correlate it with retraction or velocity of migrating MEF (mouse embryonic fibroblasts) cells. Very recently, an elegant method based on linear unmixing of 3D excitation/emission fingerprints applied to three biosensors simultaneously was published [48]. This type of approach based on image calculation is often limited by the different biosensors expression levels and a poor signal-to-noise ratio after complex image corrections.

To overcome the second limitation, the two FRET pairs CFP/YFP and Sapphire/RFP in combination with a single violet excitation were used [49], resulting in no lag time in biochemical activity recording. But again, in this case, the spectral bleed-through and excitation crosstalk necessitate linear unmixing. Another interesting approach for simultaneously multiplexing two FRET activities was developed using a "Large Stokes Shift" orange fluorescent protein, LSSmOrange [50]. The authors used a CFP-YFP together with LSSmOrange-mKate2 biosensors enabling imaging of apoptotic activity and calcium fluctuations in real time using intensity-based methods. Other studies were carried out utilizing FLIM instead of ratio imaging to measure FRET. When FRET occurs, donor fluorescence lifetime decreases. This method requires measurement of the donor fluorescence only and is independent of emission from the acceptor. By using CFP and YFP as donor and the same red acceptor (tHcRed), FLIM of CFP and YFP donors allow the two different FRET signals to be distinguished [51]. Combination of FLIM-FRET of a red-shifted TagRFP/mPlum pair with ratio imaging of a CFP/Venus pair allows maximal the spectral separation while, at the same time, overcoming the low quantum yield of the far-red acceptor mPlum [52]. The two last examples alleviated the spectral bleed-through but not the limitation associated with multiple excitations.

To overcome both limitations, a novel red-shifted fluorophore mCyRFP1 has been developed with a high Stokes shift [53]. This fluorophore has an excitation spectrum in the range of the GFP emission spectrum (around 500 nm), but its emission spectrum is shifted compared to GFP. An emission dichroic filter allows simultaneous detection of the GFP fluorescence lifetime and the mCyRFP1 fluorescence lifetime. The authors were able to perform two-photon fluorescence lifetime imaging by using only one excitation laser at 920 nm with a RhoA biosensor and a CaMKII α biosensor. Furthermore, while the RhoA biosensor uses the pair mCyRFP1/mMaroon1, the CaMKII α biosensor uses mEGFP and dimVenus which is a dark fluorophore preventing bleed-through with mCyRFP1.

Recently, our team has developed a similar method by taking advantages of the LSSmOrange (Large Stoke Shift) and the dark fluorophore ShadowG [54]. We modified two substrate kinase biosensors, EKAR2G and AKAR4 (E-Kinase Activity Reporter type 2G for ERK and A-Kinase Activity Reporter type 4 for PKA), with a new pair of fluorophores mTFP1/ShadowG and LSSmOrange/mKate2, respectively. LSSmOrange and mTFP1 are both excitable by using a single 440 nm wavelength. By single excitation wavelength dual-color FLIM, we are able to

simultaneously monitor the activity of ERK and PKA in living cells at the same location. Thus, the activity of each kinase in response to forskolin or EGF treatment can be imaged simultaneously. This approach overcomes the limitations of the multiple excitation wavelengths and bleed-through.

Because FLIM is now a widely used microscopy approach, the decrease of the donor lifetime is sufficient to quantify FRET, and fluorescence of the acceptor is not mandatory, as it is still the case when one uses ratiometric FRET. Changing the fluorescent acceptor with a nonfluorescent acceptor leads to the development of a new kind of single-color FRET biosensor (Figure 3A). It is then perfectly adapted for simultaneous monitoring of kinase FRET biosensing.

Another method to get a single-color biosensor to perform multiplex could be based on homoFRET measured by anisotropy [55, 56]. HomoFRET occurs when a fluorophore transfers its energy to a closely identical fluorophore. However, it is impossible to measure homoFRET by ratiometric or fluorescence lifetime measurements. Fluorescence anisotropy can be measured by detecting the parallel and the perpendicular light emitted by a fluorophore excited with a polarized light [57], and this anisotropy decreases when FRET occurs between nonparallel fluorescent dipoles. This method was already used to study protein oligomerization [58]. For example, a study has used fluorescence anisotropy to determine the degree of clustering of proteins such as GPI or EGFR fused to GFP in living cells [59]. This approach has been investigated to multiplex at the same time a conventional calcium heteroFRET biosensor using FLIM with the oligomerization of pleckstrin homology domains of Akt (Akt-PH) labeled

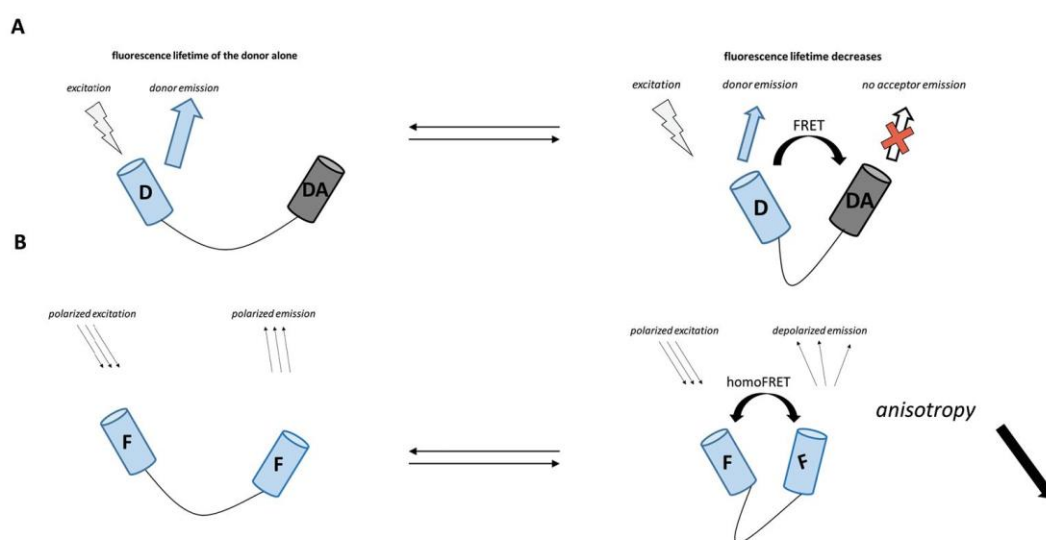


Figure 3. Single-color genetically encoded FRET biosensor. (A) When a fluorophore F is excited, it can transfer its energy to a dark acceptor DA by FRET. Even excited, the dark acceptor emits no detectable light, and FRET is measured by the measurement of donor fluorescence lifetime. It constitutes a single-color FRET biosensor. (B) When a fluorophore F is excited by a polarized light, it emits polarized fluorescence. When homoFRET occurs between two identical fluorophores, it can lead to the depolarization of fluorescence emission decreasing the anisotropy. Again, it constitutes a single-color FRET biosensor.

with mCherry [60]. From our knowledge, the development of an intramolecular homoFRET biosensor to follow a biochemical activity was not yet developed but has very interesting potential. Adapting this method to kinase biosensors would provide a new methodology to simultaneously follow multiple biosensors.

5. Concluding remarks

Kinases have multiple functions in cells, and their mechanisms are very dynamic in both space and time. We have focused our review on two types of kinase biosensors. The substrate-based kinase biosensors are good tools to specifically monitor the activity of a kinase, but it requires to have a good knowledge of the substrate peptide sequence, particularly for its specificity, and a biological system where the activity of the kinase is sufficient to detect FRET. The conformation-based biosensors provide information about the activation state of the kinase itself; however, they do not provide information about its catalytic activity that can be further regulated by other post-translational modifications. Gathering these different tools with a multiplex methodology by using the approaches of single-color FRET biosensor would provide new mechanistic insight to investigate kinase functions with an adequate spatio-temporal resolution.

Acknowledgements

We wish to apologize to the authors whose works were not cited in this review. We wish to thank G. Bertolin, G. Herbomel, and C. Demeautis for their many helpful discussions about FRET biosensors and D. Fairbass for critical reading the manuscript. Work in the laboratory is supported by the CNRS and the University of Rennes 1 and grant from the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (LNCC, region Grand Ouest). F. S. is fellow of the Région Bretagne and University of Rennes 1.

Author details

Florian Sizaire and Marc Tramier*

*Address all correspondence to: marc.tramier@univ-rennes1.fr

Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), CNRS, Université de Rennes, Rennes, France

References

- [1] Manning G, Whyte DB, Martinez H, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-1934

- [2] Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;**4**:429
- [3] Koley D, Bard AJ. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;**107**:16783-16787
- [4] Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo : Basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Development, Growth & Differentiation*. 2013;**55**:515-522
- [5] Padilla-Parra S, Tramier M. FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays*. 2012;**34**:369-376
- [6] Kenworthy AK. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*. 2001;**24**:289-296
- [7] Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, and others (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882.
- [8] Horton RA, Strachan EA, Vogel KW, Riddle SM. A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Analytical Biochemistry*. 2007;**360**:138-143
- [9] Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. 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*. 2002;**22**:6582-6591
- [10] Hinde E, Digman MA, Hahn KM, Gratton E. Millisecond spatiotemporal dynamics of FRET biosensors by the pair correlation function and the phasor approach to FLIM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;**110**:135-140
- [11] Herbomel G, Hatte G, Roul J, Padilla-Parra S, Tassan J-P, Tramier M. Actomyosin-generated tension on cadherin is similar between dividing and non-dividing epithelial cells in early *Xenopus laevis* embryos. *Scientific Reports*. 2017;**7**:45058
- [12] Borghi N, Sorokina M, Shcherbakova OG, Weis WI, Pruitt BL, Nelson WJ, Dunn AR. 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*. 2012;**109**:12568-12573
- [13] Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*. 2010;**466**:263-266
- [14] Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;**98**:14997-15002

- [15] Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY. Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*. 2005;**437**:569-573
- [16] Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;**348**:716-721
- [17] Depry C, Allen MD, Zhang J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Molecular BioSystems*. 2011;**7**:52-58
- [18] Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D, Vincent P. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *Journal of Neuroscience*. 2007;**27**:2744-2750
- [19] Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, Svoboda K. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;**105**:19264-19269
- [20] Lu P-J, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. Function of WW domains as phosphoserine-or phosphothreonine-binding modules. *Science*. 1999;**283**:1325-1328
- [21] Vandame P, Spriet C, Riquet F, Trinel D, Cailliau-Maggio K, Bodart J-F. Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements. *Sensors*. 2014;**14**:1140-1154
- [22] Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, Matsuda M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell*. 2011;**22**:4647-4656
- [23] González-Vera J, Morris M. Fluorescent reporters and biosensors for probing the dynamic behavior of protein kinases. *Proteomes*. 2015;**3**:369-410
- [24] Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *The Journal of Cell Biology*. 2010;**189**:247-259
- [25] Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *The Journal of Cell Biology*. 2003;**161**:899-909
- [26] Macůrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 2008;**455**:119-123
- [27] Liu D, Davydenko O, Lampson MA. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *The Journal of Cell Biology*. 2012;**198**:491-499
- [28] Bruinsma W, Macůrek L, Freire R, Lindqvist A, Medema RH. Bora and aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. *Journal of Cell Science*. 2014;**127**:801-811

- [29] Gheghiani L, Loew D, Lombard B, Mansfeld J, Gavet O. PLK1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis. *Cell Reports*. 2017;**19**:2060-2073
- [30] Fuller BG, Lampson MA, Foley EA, Rosasco-Nitcher S, Le KV, Tobelmann P, Brautigan DL, Stukenberg PT, Kapoor TM. Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature*. 2008;**453**:1132-1136
- [31] Terai K, Matsuda M. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Reports*. 2005;**6**:251-255
- [32] Verbeek DS, Goedhart J, Bruinsma L, Sinke RJ, Reits EA. PKC mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling. *Journal of Cell Science*. 2008;**121**:2339-2349
- [33] Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, Karginov AV, Rajfur Z, Jacobson K, Hahn KM, Eck MJ, Schaller MD. Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;**28**:201-214
- [34] Le Page Y, Chartrain I, Badouel C, Tassan J-P. A functional analysis of MELK in cell division reveals a transition in the mode of cytokinesis during *Xenopus* development. *Journal of Cell Science*. 2011;**124**:958-968
- [35] Bertolin G, Sizaire F, Herbomel G, Reboutier D, Prigent C, Tramier M. A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nature Communications*. 2016;**7**:12674
- [36] Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*. 2000;**19**(42):4906-4916
- [37] Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular Cell*. 2003;**12**(4):851-862
- [38] Lima-Fernandes E, Misticone S, Boularan C, Paradis JS, Enslin H, Roux PP, Bouvier M, Baillie GS, Marullo S, Scott MGH. A biosensor to monitor dynamic regulation and function of tumour suppressor PTEN in living cells. *Nature Communications*. 2014;**5**
- [39] Di Primio C, Quercioli V, Siano G, Rovere M, Kovacech B, Novak M, Cattaneo A. The distance between N and C termini of tau and of FTDP-17 mutants is modulated by microtubule interactions in living cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;**10**
- [40] Case LB, Baird MA, Shtengel G, Campbell SL, Hess HF, Davidson MW, Waterman CM. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nature Cell Biology*. 2015;**17**:880-892
- [41] Carlson HJ, Campbell RE. Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;**20**:19-27
- [42] Piljic A, Schultz C. Simultaneous recording of multiple cellular events by FRET. *ACS Chemical Biology*. 2008;**3**:156-160

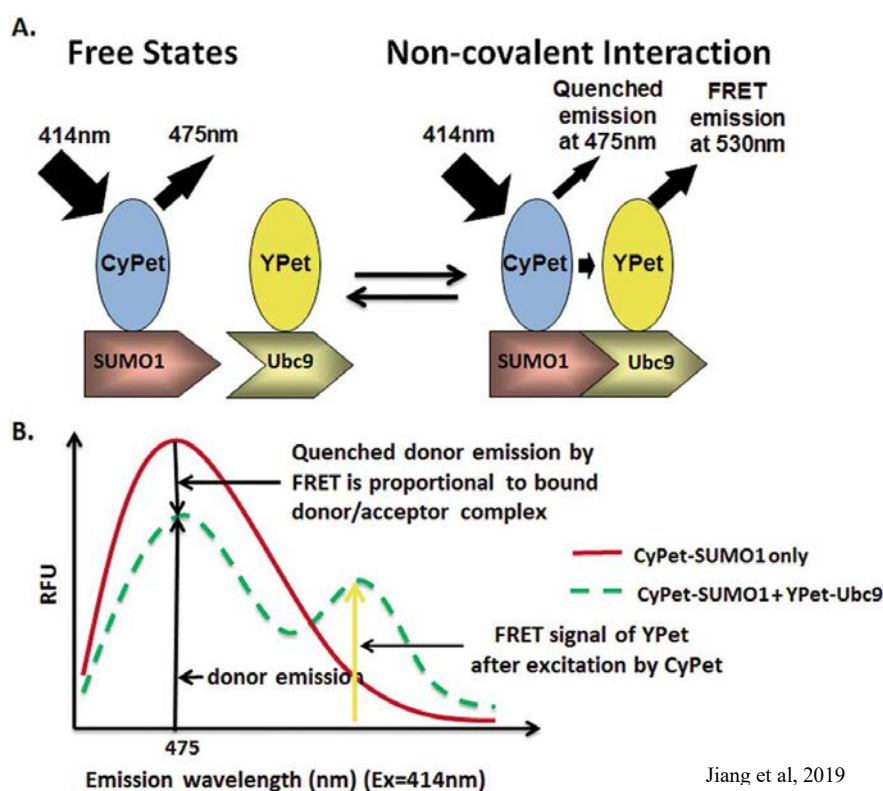
- [43] Ai H, Hazelwood KL, Davidson MW, Campbell RE. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature Methods*. 2008;**5**:401-403
- [44] Ding Y, Ai H, Hoi H, Campbell RE. Förster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical Chemistry*. 2011;**83**:9687-9693
- [45] Su T, Pan S, Luo Q, Zhang Z. Monitoring of dual bio-molecular events using FRET biosensors based on mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKOk fluorescent protein pairs. *Biosensors & Bioelectronics*. 2013;**46**:97-101
- [46] Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM, Danuser G. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 2009;**461**:99-103
- [47] MacNevin CJ, Gremyachinskiy D, Hsu C-W, Li L, Rougie M, Davis TT, Hahn KM. Environment-sensing merocyanine dyes for live cell imaging applications. *Bioconjugate Chemistry*. 2013;**24**:215-223
- [48] Woehler A. Simultaneous quantitative live cell imaging of multiple FRET-based biosensors. *PLoS One*. 2013;**8**:e61096
- [49] Niino Y, Hotta K, Oka K. Simultaneous live cell imaging using dual FRET sensors with a single excitation light. *PLoS One*. 2009;**4**:e6036
- [50] Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, Gadella TWJ, Verkhusha VV. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;**134**:7913-7923
- [51] Peyker A, Rocks O, Bastiaens PIH. Imaging activation of two Ras isoforms simultaneously in a single cell. *Chembiochem*. 2005;**6**:78-85
- [52] Grant DM, Zhang W, McGhee EJ, Bunney TD, Talbot CB, Kumar S, Munro I, Dunsby C, Neil MAA, Katan M, et al. Multiplexed FRET to image multiple signaling events in live cells. *Biophysical Journal*. 2008;**95**:L69-L71
- [53] Laviv T, Kim BB, Chu J, Lam AJ, Lin MZ, Yasuda R. Simultaneous dual-color fluorescence lifetime imaging with novel red-shifted fluorescent proteins. *Nature Methods*. 2016;**13**:989-992
- [54] Demeautis C, Sipieter F, Roul J, Chapuis C, Padilla-Parra S, Riquet FB, Tramier M. Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM. *Scientific Reports*. 2017;**7**:41026
- [55] Gautier I, Tramier M, Durieux C, Coppey J, Pansu RB, Nicolas J-C, Kemnitz K, Coppey-Moisan M. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophysical Journal*. 2001;**80**:3000-3008
- [56] Tramier M, and Coppey-Moisan M. (2008). Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-FRET in living cells. *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 395-414.

- [57] Chan FTS, Kaminski CF, Kaminski Schierle GS. HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *Chemphyschem*. 2011; 12:500-509
- [58] Yeow EKL, Clayton AHA. Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: Theory and application. *Biophysical Journal*. 2007;92:3098-3104
- [59] Bader AN, Hofman EG, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PMP, Gerritsen HC. Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution. *Biophysical Journal*. 2009;97:2613-2622
- [60] Warren S, Margineanu A, Katan M, Dunsby C, French P. Homo-FRET based biosensors and their application to multiplexed imaging of signalling events in live cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:14695-14716

INTECH

3) Mesure de FRET ratiométrique

Il existe différentes méthodologies pour mesurer les variations de FRET dans un système. La mesure de FRET par ratiométrie est la plus répandue. Elle se base sur le principe de mesurer l'intensité de l'émission du donneur après l'avoir excité puis de mesurer l'intensité de l'émission de l'accepteur après avoir excité le donneur (Spiering et al., 2013). En effet, s'il y a du FRET entre le donneur et l'accepteur, on devrait observer une émission de fluorescence de l'accepteur après excitation par transfert d'énergie du donneur. Le principe est résumé en figure 21 (Jiang et al., 2019).



Jiang et al, 2019

Fig 21. Principe de mesure de FRET ratiométrique

La protéine SUMO1 est fusionnée au donneur cyan CyPet et la protéine Ybc9 est fusionnée à l'accepteur jaune YpET. Sur la courbe on voit que lorsqu'il y a du FRET dû à l'interaction protéine-protéine, alors l'intensité de fluorescence du donneur diminue tandis que celle de l'accepteur augmente. En mesurant le ratio, on peut déterminer l'efficacité de FRET.

Cette technique présente l'avantage d'être simple et de pouvoir être utilisable sur de nombreux types de microscopes puisque seule l'intensité « steady-state » est mesurée. Toutefois elle requiert un système dans lequel il est possible de séparer spectralement les fluorophores à l'émission. Un des inconvénients concerne la fuite spectrale. Selon le recouvrement des spectres

il est possible de collecter une partie de l'émission du donneur lorsque l'on mesure l'intensité de fluorescence de l'accepteur. Sa contribution peut ainsi fausser la mesure d'efficacité de FRET. Il se peut aussi que l'illumination excite directement l'accepteur venant encore une fois fausser la mesure ratiométrique. C'est pourquoi, il est nécessaire d'utiliser des corrections lors de l'analyse ratiométrique (Gordon et al., 1998). Une autre limitation concerne les interactions protéines-protéines. Puisque l'on mesure un ratio d'intensité, il est primordial de s'assurer être dans un système où les concentrations en fluorophores soient proches ou bien connues.

4) Mesure de FRET par mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM)

a) Durée de vie de fluorescence et FRET

Le FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy est une technique de microscopie qui permet de mesurer et d'imager la durée de vie de fluorescence. La durée de vie de fluorescence d'un fluorophore est une caractéristique qui lui est intrinsèque (Berezin and Achilefu, 2010). Cette durée peut varier selon l'environnement du fluorophore, elle peut être par exemple sensible au pH (Nakabayashi et al., 2012). Elle correspond au temps moyen durant lequel un fluorophore reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental. Si une population homogène de fluorophore se retrouve dans un état excité, le temps de chaque molécule pour retourner à l'état fondamental ne sera pas le même (Fig 22).

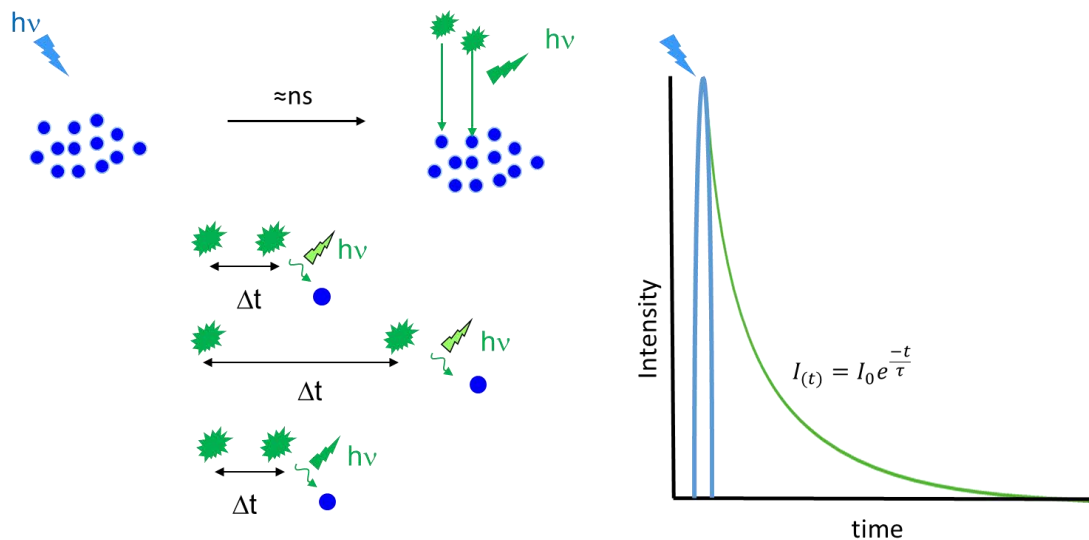


Fig 22. Schéma d'illustration de la durée de vie de fluorescence.

Si on excite une population d'un même fluorophore, on observe un déclin de fluorescence correspondant à une courbe mono-exponentielle.

On peut reprendre le diagramme de Jablonski en y ajoutant la désexcitation par FRET (Fig 23).

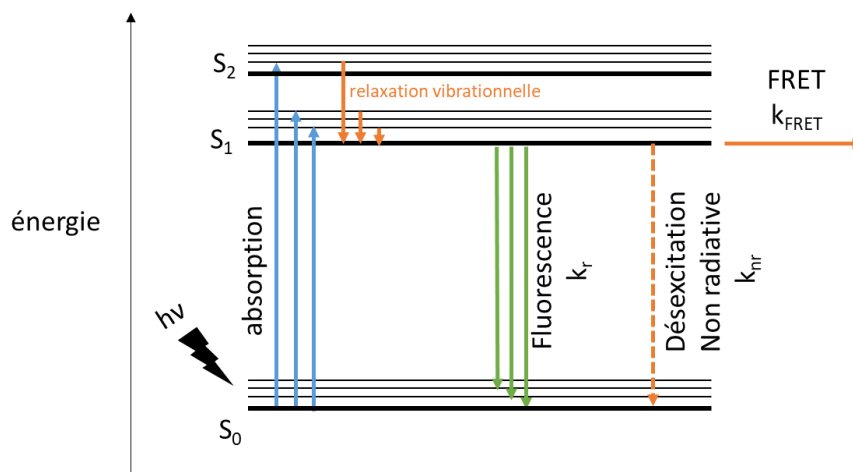


Fig 23. Diagramme de Jablonski en situation de FRET

k_r , k_{nr} , k_{FRET} représentent respectivement les constante de vitesse de la fluorescence, de la désexcitation non radiative et du phénomène de FRET.

Si on considère une population de $N(t)$ molécules excitées au temps t qui se désexcitent avec une vitesse k , alors pendant un temps dt on peut écrire que le nombre de molécules désexcitées est

$$dN(t) = -kN(t)dt$$

En intégrant cette équation, on obtient

$$N(t) = N_0 e^{-kt}$$

Si on mesure l'intensité de fluorescence au cours du temps d'une population de fluorophores, on obtient une décroissance exponentielle :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

avec I_0 l'intensité au temps $t=0$ et τ la durée de vie de fluorescence avec $\tau = \frac{1}{k}$

On peut aussi écrire $\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$ avec k_r est la constante de vitesse des phénomènes radiatifs principalement la fluorescence et k_{nr} la constante de vitesse des phénomènes non radiatifs comme la conversion interne.

Si cette population de fluorophores est en présence d'un accepteur FRET et que le transfert d'énergie est possible, alors il y a une nouvelle voie de désexcitation. Dans ce cas le déclin devient bi-exponentiel et on a alors $\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{FRET}}$ avec k_{FRET} la constante de vitesse associée au phénomène de FRET.

On voit ainsi mathématiquement que lorsqu'il y a du FRET entre un donneur et un accepteur, la durée de vie de fluorescence du donneur diminue.

L'efficacité de FRET E devient alors $E = 1 - \frac{\tau_D}{\tau_{D/A}}$ avec τ_D la durée de vie de fluorescence du donneur seul et $\tau_{D/A}$ la durée de vie de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur.

On peut faire le constat que la durée de vie de fluorescence ne dépend pas de la concentration du fluorophore dans son milieu. C'est pourquoi sa mesure est une approche pertinente dans un système d'étude d'interaction protéine-protéine par FRET. De plus, il est possible de mesurer les variations de FRET en utilisant uniquement la fluorescence du donneur. Il existe plusieurs méthodes de mesure de durée de vie de fluorescence.

b) Comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC)

La technique de TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) est une technique de microscopie qui cherche à mesurer le déclin de fluorescence afin de pouvoir en extraire le paramètre de durée de vie de fluorescence (Fig 24) (Becker and Bergmann, 2006).

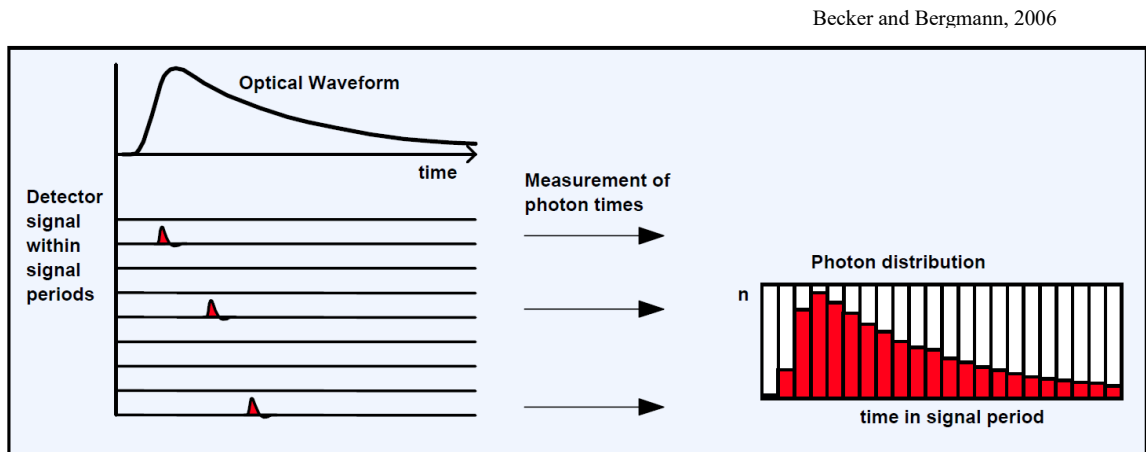


Fig 24. Principe de fonctionnement du TCSPC

En TCSPC, le détecteur mesure le temps d'arrivée de chaque photon émis après une impulsion laser. Les temps d'arrivées sont ensuite regroupés dans un graphique de distribution.

Pour utiliser cette technique, il faut disposer d'un microscope équipé d'un laser pulsé et de détecteurs capable de mesurer des événements de l'ordre du photon unique. Ces détecteurs peuvent être de type APD (Wahl, 2014) ou de type hybride (Patting et al., 2018). Ces détecteurs ont une très grande sensibilité, suffisante pour mesurer l'arrivée d'un photon. Plus particulièrement c'est le temps d'arrivée du photon sur le détecteur après chaque pulse d'excitation qui est mesuré. Comme décrit précédemment, les photons ne sont pas tous émis au même moment après l'excitation du fluorophore. Avec cette technique, on est en mesure d'établir la distribution des pixels selon leur temps d'arrivée et ainsi de recréer le déclin de fluorescence. Afin d'extraire l'information de la durée de vie de fluorescence, il faut établir un «fitting» de la courbe de déclin obtenue. Au cours de cette analyse post-acquisition, il est primordial d'utiliser le bon modèle de «fitting» pour ne pas fausser les résultats. L'enjeu avec cette technique est de pouvoir collecter le plus grand nombre de photons afin de disposer d'un histogramme sans bruit et ainsi d'avoir le fit le plus correct, tout en exposant le moins l'échantillon pour éviter les photo-dommages. Les avantages de cette technique est qu'étant utilisée sur des microscopes confocaux, elle fournit une bonne résolution spatiale et un bon

rapport signal sur bruit. Cependant, sa principale limitation est la vitesse puisqu'il faut acquérir à des temps de l'ordre de plusieurs secondes (voire de la minute) afin de disposer d'un nombre suffisant de photons (Peronio et al., 2015).

c) Mesure du déclin de fluorescence par porte temporelle (time-gated FLIM)

Le principe du FLIM en utilisant des portes temporelles consiste à échantillonner le déclin de fluorescence en acquérant plusieurs images successives à différents temps après l'excitation (Cole et al., 2001; Webb et al., 2002). Ces acquisitions à différents temps sont permises grâce à la génération de portes temporelles (Fig 25).

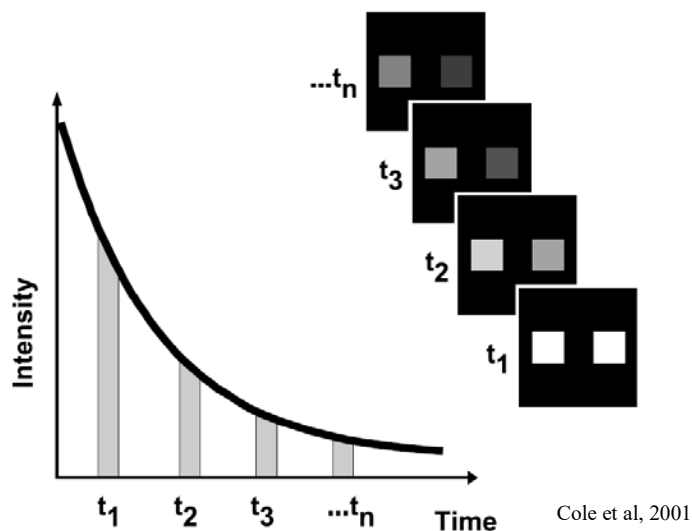
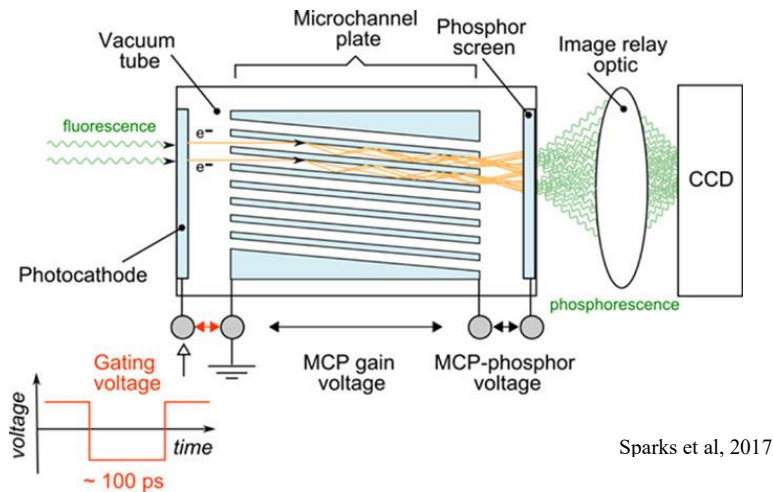


Fig 25. Principe de fonctionnement des portes temporelles.

Les acquisitions sont faites à différents temps après l'excitation, permettant d'obtenir des images avec la valeur d'intensité pour chaque pixel.

De même que pour le TCSPC, il faut donc disposer d'un laser pulsé (fig X). Ce type de microscopie peut utiliser du champs large mais aussi du spinning disk (Buranachai et al., 2008).

La génération des portes temporelles est permise par l'utilisation d'un intensificateur de lumière en amont de la caméra qui détecte la fluorescence, plus particulièrement un High Rate Intensifier (HRI) dont le principe est présenté figure 26 (Sparks et al., 2017).



Sparks et al, 2017

Fig 26. Principe de fonctionnement d'un intensificateur HRI

Le HRI est composé d'une photocathode sur laquelle arrivent les photons émis par fluorescence et le signal est converti en électrons. Ces électrons vont être amplifiés par une galette de microcanaux et vont arriver sur un écran phosphore qui va pouvoir créer l'image captée par la caméra. La génération des portes temporelles se fait en appliquant un certain voltage à la photocathode. La variation de potentiel permet de créer des portes temporelles rectangulaires d'une taille pouvant aller de la centaine de picosecondes à quelques nanosecondes pendant lesquelles les électrons peuvent circuler et être amplifiés. Avec cette technique, la génération d'image est plus rapide car tous les pixels sont imagés en même temps, la résolution temporelle d'acquisition est meilleure qu'un système TCSPC. Cependant, il y a une perte en résolution spatiale due à l'intensificateur dont la taille de pixel est de 30 μ m.

Au sein de l'équipe, un microscope de ce type a été développé, appelé fastFLIM (Leray et al., 2013; Sizaire et al., unpublished). Le principe est présenté en figure 27.

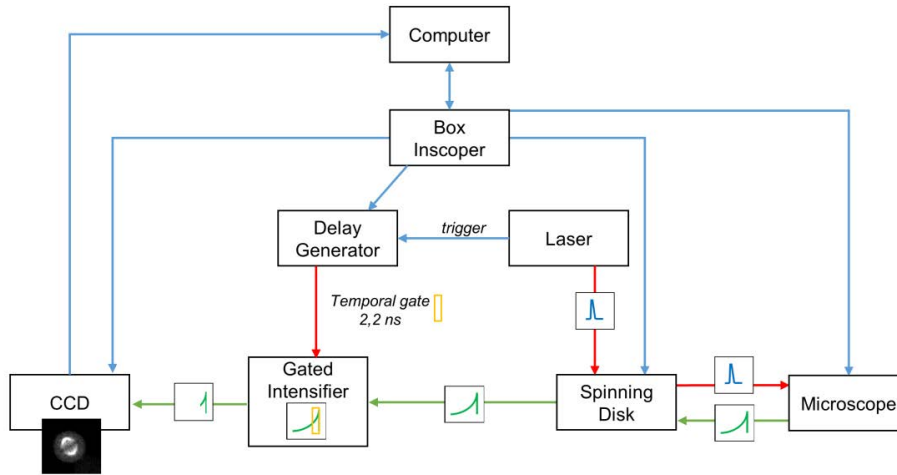


Fig 27. Fonctionnement général du fastFLIM

Le microscope dispose d'un laser blanc pulsé de type supercontinuum, qui a un spectre très large. Ce laser est couplé à un sélecteur d'onde qui permet de sélectionner la gamme de longueur d'onde voulu pour l'excitation. Grâce à ce système il est possible de couvrir l'ensemble du visible environ 420nm à 800nm) Le microscope dispose d'un spinning disk permettant de faire des sections optiques, et d'un système HRI en amont de la caméra qui génère les portes temporelles. Le HRI est relié à un générateur de délai qui permet de décaler les portes temporelles. Ainsi durant un certain temps d'acquisition (de l'ordre de dizaines ou centaines de ms), après chaque impulsion laser, les photons émis par fluorescence sont collectés et sélectionnés grâce à la porte temporelle pour former une image. L'avantage de ce système est qu'il a été montré que l'on pouvait s'affranchir du fitting en calculant la moyenne de durée de vie de fluorescence (Padilla-Parra et al., 2011a). En effet la définition exacte de la durée de vie

de fluorescence est $\langle \tau \rangle = \frac{\int t \cdot i(t) dt}{\int i(t) dt}$ avec $i(t)$ l'intensité au temps t . On peut approximer

de façon discrète cette formule nettement avec l'utilisation des portes temporelles et on obtient

alors $\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \Delta t_i \cdot I_i}{\sum_i I_i}$ avec Δt_i correspondant au temps de la porte temporelle i .

Pour un fluorophore comme la GFP dont le temps de vie de fluorescence est d'environ 2,5ns (soit environ 10ns de déclin de fluorescence), cinq portes temporelles avec une taille de 2,2ns sont suffisantes pour mesurer la durée de vie de fluorescence. Il n'y a pas de décalage entre chacune de ses portes comme on peut le voir en figure 28.

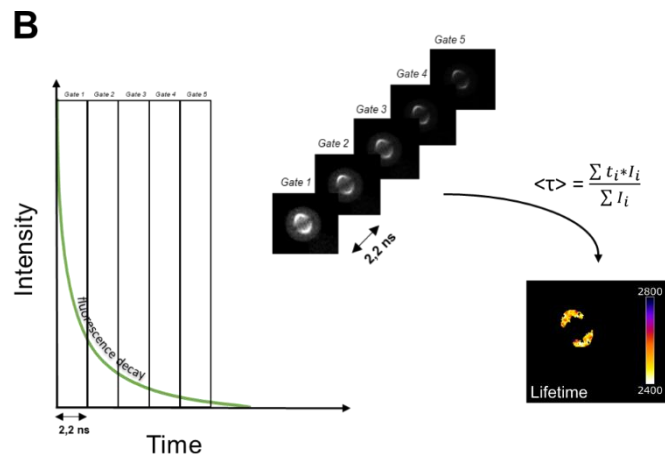


Fig 28. Fonctionnement des portes temporelles du fast-FLIM

5 portes temporelles de 2.2ns sont utilisées. Ainsi 5 images successives sont acquises, à partir desquelles la durée de vie de fluorescence est calculée pixel par pixel.

Ainsi, grâce à ce système, il est possible d'imager et de calculer la durée de vie de fluorescence et donc de mesurer le FRET avec une bonne résolution spatio-temporelle (Padilla-Parra et al., 2008). C'est ce système qui sera majoritairement utilisé dans mes travaux de thèse et sur lequel j'ai pu développer une méthodologie de criblage de l'activité kinase d'Aurora A.

III) La protéine kinase Aurora A

1) Structure et rôles d'Aurora A

a) Le gène d'Aurora A et structure de la protéine

Aurora A est une protéine kinase de type sérine/thréonine qui fait partie de la famille des protéines Aurora avec Aurora B et Aurora C (Nikonova et al., 2013). Le transcrit du gène Aurora A a été découvert pour la première fois dans des œufs de Xénope (Paris and Philippe, 1990). Des mutations du gène Aurora dans le modèle Drosophile ont été associées à des défauts de ségrégation des centrosomes pendant la mitose et à la formation de fuseaux monopolaires (Glover et al., 1995). Le centrosome est une structure macromoléculaire composé deux centrioles constitués de microtubules. (Wang et al., 2014). En amont de la mitose, le centrosome est dupliqué et c'est à partir de ces pôles que vont s'allonger les microtubules qui vont former le fuseau mitotique. Le fuseau mitotique est une structure bipolaire située de part et d'autre des chromosomes alignés sur le plan équatorial. (Petry, 2016; Walczak and Heald, 2007) (Fig 29).

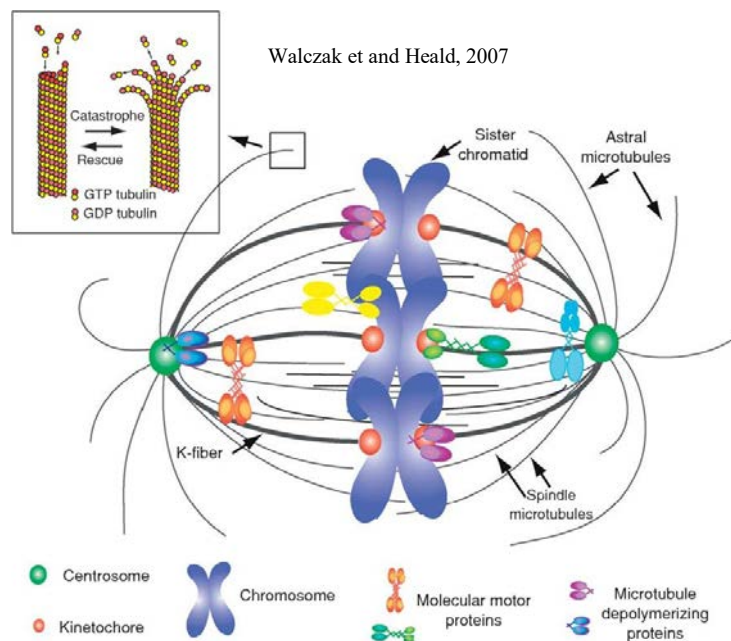


Fig 29. Schéma du fuseau mitotique

Le fuseau mitotique est une structure bipolaire dont les microtubules s'élongent depuis les pôles centrosomiques de part et d'autre de la plaque équatoriale formée par les chromosomes.

Les microtubules vont se fixer au niveau des centromères des chromosomes via les kinétochores et vont permettre d'exercer une force pour séparer les chromosomes. La correcte mise en place de cette structure est essentielle pour assurer la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. Des défauts dans cette structure sont associés à l'aneuploïdie, lorsqu'une cellule présente un nombre incorrect de chromosomes, et aux cellules cancéreuses (Potapova and Gorbsky, 2017).

Le gène codant pour la protéine Aurora A se situe dans la région 20q13 (Sen et al., 1997). Il code pour une protéine de 403 acides aminés (Baldini et al., 2014) (Fig 30).

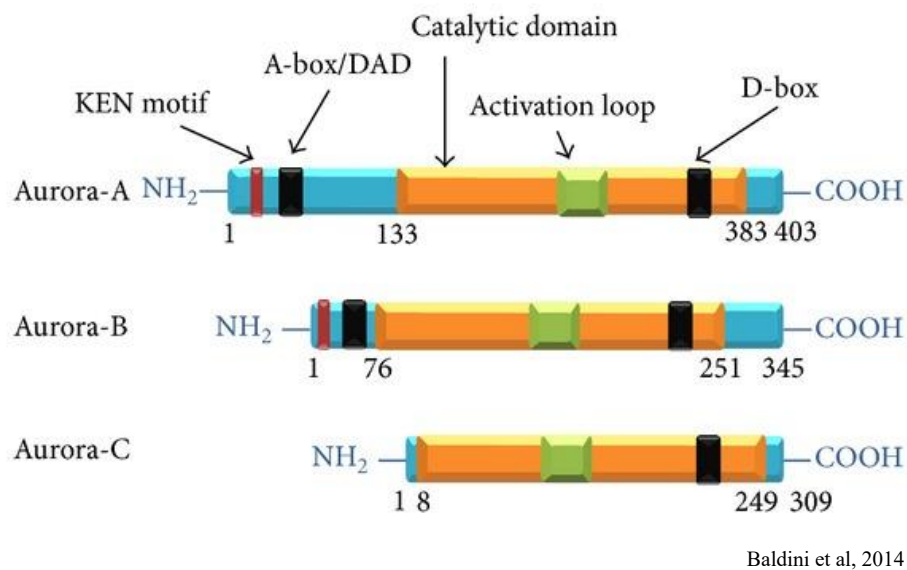


Fig 30. Structure des protéines de la famille Aurora A.

Le domaine catalytique est la partie la plus conservée dans la famille Aurora A, tandis que la partie N-terminale présente les plus grandes différences. En partie C-terminale se trouve une D-Box qui permet la dégradation protéolytique de la kinase par le complexe de promotion de l'anaphase (APC/C) (Castro et al., 2002). En N-terminal se trouve un motif KEN, et une A-Box qui jouent aussi un rôle dans la dégradation d'Aurora A via la protéine Cdh1 (Littlepage and Ruderman, 2002; Pflieger and Kirschner, 2000).

Aurora A est une kinase dont l'activation est nécessaire pour qu'elle puisse assurer ses fonctions. Le principal mécanisme d'activation d'Aurora A passe par l'auto-phosphorylation du résidu thréonine 288, situé dans la boucle d'activation de la protéine (Walter et al., 2000; Zorba et al., 2014). Cette activation est médiée par le co-activateur TPX2 (Targeting Protein for Xenopus kinesin-like protein 2) aussi identifiée chez le Xénope (Eyers et al., 2003; Tsai et

al., 2003). TPX2 interagit avec Aurora A, permettant son recrutement au niveau des microtubules et protège la déphosphorylation d'Aurora A par la phosphatase PP1 (Bayliss et al., 2003). La protéine Cep 192 (Centrosomal Protein of 192kDa) joue aussi un rôle important dans l'activation d'Aurora A en permettant son recrutement aux centrosomes en amont de l'entrée en mitose ainsi que son activation (Joukov et al., 2010, 2014). Il existe d'autres co-activateurs d'Aurora A comme Ajuba, NEDD9 ou encore la nucleophosmine dont l'interaction avec Aurora A est associée à la voie d'activation par phosphorylation de la sérine 89 (Hirota et al., 2003; Pugacheva and Golemis, 2005; Reboutier et al., 2012). Le cycle d'Aurora A associé au cycle mitotique est résumé en figure 31, Aurora est produite et s'accumule en phase G2/M au niveau des centrosomes où elle est activée.

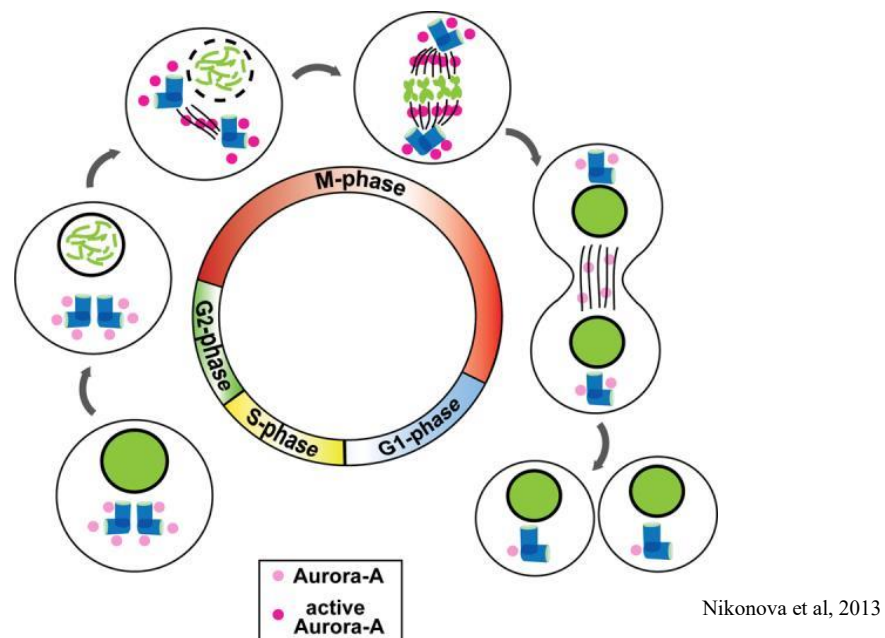


Fig 31. Aurora dans le cycle cellulaire

Aurora A s'accumule en fin de phase S et en phase G2 au niveau des centrosomes. Pendant la mitose, une partie de la population d'Aurora A se retrouve sur le fuseau mitotique ainsi que sur le fuseau central. Aurora A est en grande partie dégradée en fin de mitose mais une population reste au niveau des centrosomes.

Une partie de la population d'Aurora A se retrouve au niveau des microtubules de la plaque métaphasique, ainsi qu'au niveau du fuseau central (Uzbekova et al., 2008) et Aurora A est en grande partie dégradée en fin de mitose, bien qu'une partie restante soit localisée au niveau des centrosomes en G1.

b) Rôles mitotiques d'Aurora A

L'abondance d'Aurora A pendant la mitose a poussé les chercheurs à découvrir les différents rôles durant cette phase du cycle. Aurora A fait partie du réseau de l'entrée en mitose qui est composée de nombreuses protéines régulant l'entrée en mitose (Lindqvist et al., 2009). L'activation d'Aurora A par Bora lui permet de phosphoryler et d'activer Plk1 sur le résidu thréonine 210 dont l'activité est nécessaire dans un des points de contrôle de la mitose (Macûrek et al., 2008; van Vugt et al., 2004). Aurora A peut aussi phosphoryler et activer CDC25B qui a une activité phosphatase activatrice du complexe CDk1-cyclin B1 impliqué dans l'entrée en mitose (Dutertre et al., 2004).

Dès la fin de phase S, et pendant la phase G2, Aurora A s'accumule au niveau des centrosomes où elle est recrutée par Cep 192 (Joukov et al., 2010) . En amont de la mitose, les deux centrosomes subissent une étape de maturation pendant laquelle le matériel péricentriolaire augmente de volume et où plusieurs protéines sont recrutées (Mennella et al., 2014). Cette étape est nécessaire pour que les centrosomes puissent agir comme une plate-forme à la nucléation des microtubules qui formeront le fuseau mitotique. La présence d'Aurora A aux centrosomes est nécessaire pour une maturation correcte (Barretta et al., 2016; Hannak et al., 2001). Aurora A permet le recrutement de la γ -tubuline, un élément essentiel du matériel péricentriolaire formant des complexes en anneaux qui servent de site nucléation aux microtubules. Aurora A phosphoryle NDEL1, permettant son recrutement aux centrosomes où elle favorise leur maturation (Mori et al., 2007). NDEL1 peut se fixer à TACC3 qui est aussi un substrat d'Aurora A jouant un rôle dans la nucléation des microtubules (Kinoshita et al., 2005).

Un des rôles majeurs d'Aurora concerne la formation du fuseau mitotique (Marumoto et al., 2003). Ce rôle est favorisé par TPX2 qui permet de recruter Aurora A au niveau des microtubules et de l'activer ce qui est nécessaire pour que le fuseau atteigne une taille normale (Bird and Hyman, 2008). Aurora A peut aussi phosphoryler HURP sur son domaine C-ter ce qui lève l'auto-inhibition sur le domaine C-ter permettant à HURP de se fixer sur les microtubules et favorisant l'assemblage du fuseau dépendant du gradient Ran GTPase-TPX2 (Katayama et al., 2008; Wong et al., 2008) et cette nucléation se fait à la jonction kinetochore/chromatine. Aurora phosphoryle CENP-E sur son résidu threonine 422 ce qui est une étape important dans la mise en place de la plaque métaphasique et de l'alignement correct des chromosomes (Kim et al., 2010; Putkey et al., 2002). La présence d'Aurora A permet la localisation d'Aurora B aux centromères essentielle à la phosphorylation de l'histone H3 et

impliquée dans la mise en place du Spindle Assembly Checkpoint (SAC) (Yu et al., 2017) et son activité est requise pour maintenir l'activité du SAC (Courtheoux et al., 2018). Aurora A peut lever l'inhibition médiée par RASSF1A du complexe APC/Cdc20 qui permet la progression de la mitose en anaphase (Song et al., 2009).

Plus tard dans la mitose, en anaphase, on retrouve une population d'Aurora au niveau du fuseau central qui se met en place entre les deux jeux de chromosomes en séparation. L'activité d'Aurora A est requise dans la formation de ce fuseau via APC/Cdh1 (Floyd et al., 2008) ou via la phosphorylation de P150Glued (Reboutier et al., 2013).

c) Rôles non mitotiques d'Aurora

Si Aurora A est une protéine au rôle majeur dans le bon déroulement de la mitose, certains travaux ont montré qu'elle pouvait avoir un rôle à d'autres moments du cycle. Des chercheurs ont pu montrer qu'Aurora pouvait être localisée au noyau et favoriser le phénotype oncogénique de cellules souche du cancer du sein, et que cet effet était indépendant de son activité kinase (Zheng et al., 2016). Aurora A agirait ici comme un facteur de transcription du gène MYC. De façon similaire il a été montré qu'Aurora A pouvait stabiliser N-Myc indépendamment de son activité dans un contexte de neuroblastome (Otto et al., 2009).

Au sein de mon équipe, l'utilisation du biosenseur FRET d'activité kinase d'Aurora A a permis de mettre en évidence un rôle de la protéine en phase G1, jusque-là jamais établi (Bertolin et al., 2016). Bien qu'Aurora A soit dégradée en fin de mitose, une population d'Aurora A est toujours active au niveau des centrosomes en G1 et son activité, médiée par TPX2 et Cep192, est essentielle dans la stabilisation du réseau de microtubules. Il a aussi été montré qu'Aurora A pouvait être importée dans les mitochondries de cellules de cancer du sein (Bertolin et al., 2018). Une sur-abondance d'Aurora A favoriserait la fusion des mitochondries et augmenterait ainsi la capacité de la cellule à produire de l'énergie.

2) Implication d'Aurora A dans le cancer

a) Aurora A est un oncogène

Peu de temps après sa découverte, le gène d'Aurora A a été considéré comme oncogène et a été retrouvé amplifié dans de nombreux types de cancer tels que le cancer du sein (Sen et al., 1997), le cancer colorectal (Bischoff et al., 1998), le cancer de l'estomac (Sakakura et al., 2001), le cancer de la prostate (Zhou et al., 1998) ou encore le cancer des ovaires (Gritsko et al., 2003). La phosphorylation constitutive de la kinase a été retrouvée dans des cellules cancéreuses de cancer des voies aérodigestives supérieures et associée à la transformation en cellules cancéreuses (Kitajima et al., 2007). Des travaux ont aussi pu mettre en évidence qu'une surexpression prolongée d'Aurora A dans l'épithélium de souris pouvait induire des adénocarcinomes (Treekitkarnmongkol et al., 2016). La surexpression d'Aurora A est liée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Guo et al., 2018; Wang-Bishop et al., 2019; Zhong et al., 2016). Des co-activateurs comme TPX2 sont parfois retrouvés surexprimés dans des cellules cancéreuses (Zou et al., 2018) augmentant la stabilité et les effets oncogéniques d'Aurora A (Giubettini et al., 2011). Des cas de polymorphisme impliquant les substitutions Phe-31-Ile et Val-57-Ile ont été reportés dans des patients atteints de cancer du sein (Golmohammadi et al., 2017).

C'est pour cela qu'Aurora A est devenue une cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer.

b) Rôle suppresseur de tumeur d'Aurora A

Bien que le rôle oncogénique d'Aurora A soit largement étudié, il est intéressant de noter que des fonctions de suppresseur de tumeur lui ont été trouvées chez la drosophile. Des travaux sur le cerveau de la drosophile ont montré qu'Aurora A pouvait inhiber l'auto-renouveaulement par division asymétrique des neuroblastes (Lee et al., 2006). Des mutations de l'activité kinase ont été reliées à des anomalies des centrosomes et à une augmentation de la tumorigenèse dans des tissus de cerveau de larves de drosophile (Castellanos et al., 2008). Des mutations de l'activité kinase ont aussi été reliées à une augmentation du nombre de cellules positives pour Deadpan, un marqueur des neuroblastes, dans des larves de drosophile (Vaufrey, 2017). Bien que ces résultats n'aient pas été mis en évidence dans des modèles autres que celui de la drosophile, on peut noter que des travaux montrant que le knock-out d'Aurora A dans le modèle souris induit des défauts de mitose, tandis que des souris hétérozygotes présentaient une incidence d'apparition de tumeur plus élevée (Lu et al., 2008). Ces résultats indiquent qu'Aurora A

pourrait être une kinase pivot ayant à la fois un rôle oncogénique mais aussi suppresseur de tumeur, ce qui est à prendre en compte dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses visant son activité.

3) Aurora A et les thérapies anti-cancéreuses

Une stratégie des thérapies anti-cancéreuses est de cibler et d'inhiber l'activité des kinases qui sont surexprimées ou suractivées dans les cellules cancéreuses. Les enjeux sont de trouver des molécules efficaces, sélectives, et avec un rapport bénéfice sur risque le plus acceptable possible. Ces inhibiteurs sont le plus souvent de petites molécules capable de traverser la membrane des cellules afin d'agir sur leurs cibles (Hoelder et al., 2012). Il existe actuellement 48 petites molécules inhibitrices qui ciblent l'activité kinase et qui sont approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) (Roskoski, 2019). Dans la plupart des cas, ces molécules sont développées pour cibler la poche ATP des kinases et ainsi bloquer leur activité. Toutefois cette région est souvent la plus conservée parmi les kinases ce qui rend difficile de développer des inhibiteurs spécifiques.

a) Les principaux inhibiteurs d'Aurora A

Cette notion d'inhibiteur spécifique est importante dans la famille des kinases Aurora A car la séquence correspondant au domaine catalytique est dans une région conservée.

Un des premiers inhibiteurs d'Aurora A est le MLN8054 développé par l'entreprise Millenium Pharmaceuticals (Manfredi et al., 2007). Les effets des inhibiteurs sont souvent mesurés grâce à l'IC50, qui correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber l'activité biologique de 50%. Dans des expériences in vitro, cet inhibiteur présente un IC50 de 0.004 μ M et est 40 fois plus sélectif qu'Aurora B. Dans des cellules tumorales du colon, il présente un IC50, calculé par immunofluorescence, d'environ 0.034 μ M alors que celui-ci est de 5,5 μ M pour Aurora B. Le MLN8054 est capable de bloquer les cellules en mitose, d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose des cellules. L'effet inhibiteur du ML N8054 a aussi pu être montré dans des xénogreffes de cellules humaines tumorales dans des souris nudes.

Un dérivé du MLN8054 appelé MLN8237 a été développé et utilisé dans des tests cliniques (Sells et al., 2008). Aussi appelé Alisertib, cet inhibiteur présente un meilleur IC50 d'environ

1,2nM in vitro et de 6,7,nM dans des cellules (Manfredi et al., 2011). L'alisertib est 200 fois plus sélectif pour Aurora A que pour Aurora B. Il permet aussi d'inhiber la prolifération cellulaire dans des tests in cellulo et dans des expériences de xénogreffes de cellules tumorales dans des souris nudes (Fig 32).

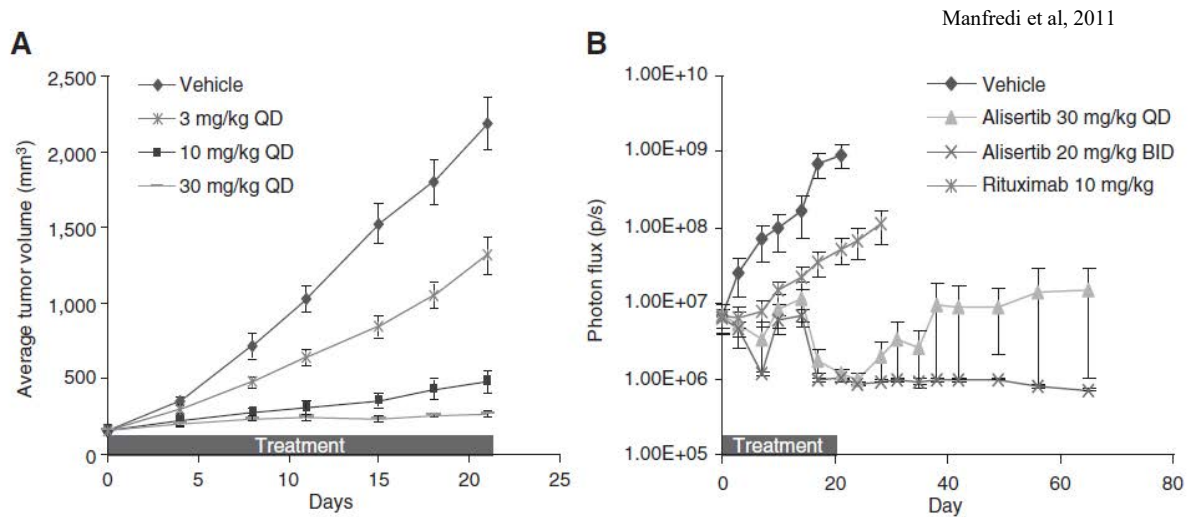


Fig 32. Effet de l'alisertib sur des xénogreffes de tumeurs humaines dans des souris nudes

(A gauche) Graphique représentant l'évolution dans le temps du volume tumoral de xénogreffes de cellules HCT-116 dans des souris nudes traitées oralement avec le MLN8237. (A droite) graphique représentant l'évolution de la charge tumorale, mesurée en flux de photons, de souris nudes traitées oralement avec le MLN8237.

L'alisertib présente une très bonne efficacité dans les tests pré-cliniques et est considéré comme un traitement prometteur pour les futurs tests cliniques (Damodaran et al., 2017; Durlacher et al., 2016).

Un autre inhibiteur, le MK-5108 a été développé par l'entreprise Merck (Shimomura et al., 2010). Il présente un IC50 de 0.064 nM in vitro pour Aurora A, plus de 200 fois plus sélectif qu'Aurora B, et un IC50 de l'ordre du μ M dans plusieurs lignées cellulaires. Il a été montré que la combinaison de MK-5108 avec le Docetaxel, un anti-cancéreux qui agit en induisant un arrêt du cycle cellulaire (Montero et al., 2005), présente un effet synergétique anti-tumoral dans des expériences de xénogreffes dans des souris nudes. Cette synergie s'avère intéressante car des cas de patients atteints de cancer du sein et présentant une faible sensibilité au Docetaxel présentent une sur-expression d'ARNm d'Aurora A (Tanaka et al., 2007).

Il existe d'autres inhibiteurs d'Aurora A tels que le Danusertib, le Barasertib ou AT9283 mais présentant une sélectivité inférieure pour Aurora A (Bavetsias and Linardopoulos, 2015).

Récemment de nouvelles stratégies d'inhibition sont apparues. Plutôt que de cibler la poche ATP, des petites molécules pourraient cibler l'interaction des kinases avec leur co-activateur. Des travaux ont mis en évidence un inhibiteur capable de cibler l'interaction TPX2-Aurora A et ainsi d'empêcher Aurora A d'être recruté au fuseau mitotique et diminuant son activité (Janeček et al., 2016). D'autres travaux ont consisté en un crible virtuel de petites molécules capables d'inhiber cette interaction en se basant sur la cristallographie des domaines d'Aurora A et TPX2 en interaction (Asteriti et al., 2017; Bayliss et al., 2003).

b) Aurora A, une cible dans les essais cliniques

Les effets antitumoraux des inhibiteurs d'Aurora A dans les tests précliniques se sont révélés efficaces et plusieurs molécules sont entrées dans les tests cliniques. Un test clinique est composé de quatre phases, la première permettant d'évaluer la toxicité de la molécule, la deuxième permettant de déterminer la dose optimale d'effet de la molécule, la troisième permettant de comparer l'effet avec une molécule de référence ou un placebo et enfin la dernière phase consiste en un suivi sur le long terme des effets de la molécule (Umscheid et al., 2011). La phase IV commence au moment où la molécule est mise sur le marché après avoir été approuvée par les agences sanitaires, FDA aux Etats-Unis, ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) en France. Actuellement, il n'existe aucun inhibiteur spécifique d'Aurora A commercialisé.

Le plus prometteur des inhibiteurs, l'Alisertib, est utilisé en phase I dans des thérapies contre plusieurs types de cancer parfois en combinaison avec d'autres anti-cancéreux (Graff et al., 2016; Kelly et al., 2018). Certaines études en phase II se sont montrées prometteuses dans le cadre de leucémie aiguë myéloblastique (Brunner et al., 2018) tandis que d'autres, comme dans le cas de cancer neuroendocrine de la prostate, ont dû s'arrêter en cours, n'ayant pas atteint l'"endpoint" défini au préalable (Beltran et al., 2019). Jusqu'à présent, l'Alisertib n'a atteint une phase III qu'une seule fois dans le cadre de lymphome T périphérique (réfractaire ou en rechute) (O'Connor et al., 2015) (Fig 33).

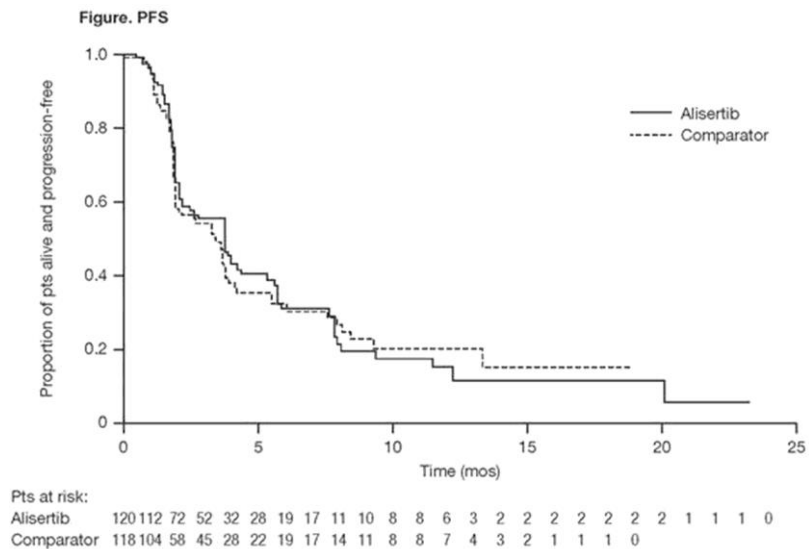


Fig 33. Comparaison de la courbe de survie de patients atteints de lymphome T périphérique traités avec l'Alisertib ou un comparateur

L'Alisertib n'a pas montré d'effet significativement différent sur la survie de patients en comparaison avec un autre traitement, ce qui explique l'arrêt prématuré de l'essai.

Les autres inhibiteurs font partie de phase I et II mais aucune phase II n'a pour le moment été terminée.

Ainsi, malgré une efficacité anti-tumorale en phases précliniques, le plus prometteur des inhibiteurs d'Aurora A, n'a pas encore montré de résultats convaincants dans les traitements de patients atteints de cancer.

Résultats

I) Validation du biosenseur FRET de l'activité d'Aurora A

1) Présentation du biosenseur

Les biosenseurs FRET d'activité kinases sont des outils puissants afin de suivre et de mesurer des évènements intra-cellulaires. Historiquement, les constructions de ces biosenseurs étaient basées sur un peptide substrat relié par un linker peptidique à un domaine de liaison de phosphorylation ainsi qu'à deux fluorophores (Sizaire and Tramier, 2017). Lorsque le substrat est phosphorylé par la kinase étudiée, il est reconnu par le domaine de liaison de phosphorylation ce qui entraîne un changement de conformation du biosenseur et un rapprochement des fluorophores. Ainsi l'efficacité de FRET augmente, et sa quantification dans les cellules est un indicateur de l'état d'activité de la kinase. Toutefois, ces biosenseurs souffrent de certaines limitations comme la nécessité de connaître les sites de phosphorylation du peptide substrat spécifiques de la kinase étudiée, ou bien que la kinase étudiée doit se trouver en concentrations importantes ou hautement active pour pouvoir observer les variations de FRET du biosenseur. Afin de passer au-delà de ces limitations, de nouveaux biosenseurs FRET d'activité kinase ont été développés, les biosenseurs de changement de conformation. Ceux-ci sont construits sur la base de la séquence peptidique de la kinase flanquée respectivement en C-terminus et N-terminus d'un fluorophore donneur et accepteur pour le FRET. L'activation de nombreuses kinases s'accompagne de l'ouverture de la poche enzymatique et donc d'un changement de conformation. L'équipe a développé un biosenseur FRET d'activité kinase pour étudier la kinase Aurora A. Ce biosenseur est basé sur la séquence peptidique complète de la kinase Aurora A flanquée de deux fluorophores pour le FRET, une GFP et une mCherry. Ce couple de fluorophores présente un bon recouvrement des spectres d'émission du donneur GFP et de l'accepteur mCherry (Fig 34).

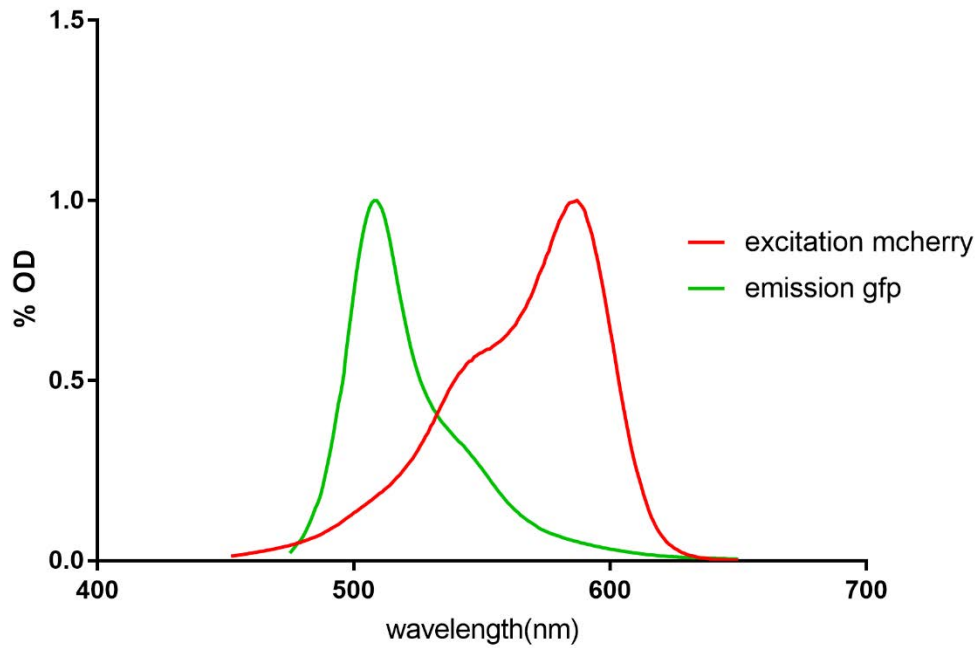


Fig 34. Recouvrement spectral des spectres d'émission de la GFP et d'excitation de la mCherry

Le principe de fonctionnement de ce biosenseur est résumé dans la figure 35. L'activation d'Aurora A par la phosphorylation du résidu T288 s'accompagne d'un changement de conformation (Zorba et al., 2014). Ainsi lorsque la kinase est inactive, en conformation « ouverte », la GFP est éloignée de la mCherry empêchant le transfert d'énergie à la mCherry. L'activation de la kinase par phosphorylation entraîne un changement en conformation « fermée » rapprochant la GFP et la mCherry et ainsi augmentant l'efficacité de FRET.

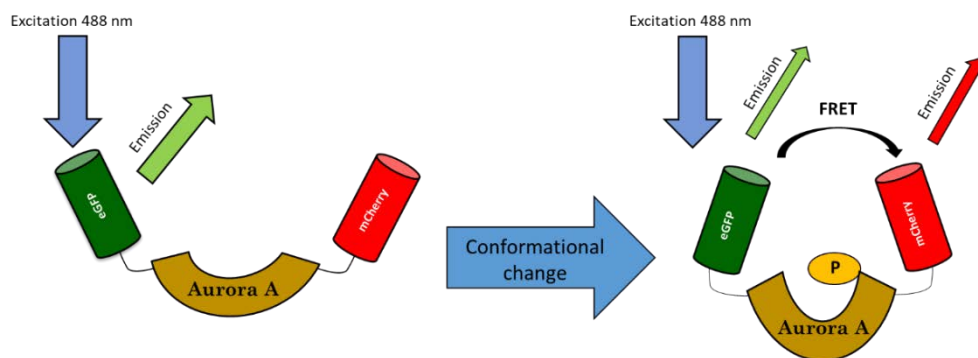


Fig 35. Principe de fonctionnement du biosenseur FRET d'activité kinase d'Aurora A.

Lorsque le biosenseur passe d'un état inactif (gauche) à un état actif (droite), le changement de conformation de la kinase rapproche la GFP et la mCherry ce qui augmente l'efficacité de FRET.

La mesure de FRET est donc un indicateur de l'état d'activation de la kinase.

En utilisant le fastFLIM, il est possible de mesurer la durée de vie de fluorescence de la GFP. L'augmentation d'efficacité de FRET induit par le changement de conformation d'Aurora A activée entraîne une diminution de la durée de vie de fluorescence de la GFP. La stratégie de l'équipe était donc de valider ce biosenseur en tant qu'outil pour suivre les variations d'activation d'Aurora A en mesurant la durée de vie de fluorescence du donneur GFP. Ce projet a été dirigé par Giulia Bertolin et ma participation a été d'effectuer des tests kinases sur le biosenseur FRET et ses dérivés (mutant ou avec le donneur GFP seul) afin de vérifier la corrélation entre les variations de durée de vie de fluorescence et l'activation ou activité d'Aurora A (Bertolin et al., 2016).

2) Validation du biosenseur

Il est possible de produire le biosenseur Aurora A *in vitro*. Pour cela nous pouvons transformer des bactéries BL21 avec le plasmide codant pour le biosenseur. Ce plasmide contient un opéron lactose en amont de la séquence du biosenseur. Cela permet d'induire la transcription du gène du biosenseur en incubant les bactéries avec de l'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) qui se fixe sur le répresseur de l'opéron. Les bactéries sont ensuite lysées et la forme protéique du biosenseur peut être purifiée. La purification se fait grâce à l'ajout d'une séquence codant pour l'étiquette poly-histidine (six histidines) en aval de la séquence du biosenseur. Le protocole de purification comprend une étape d'incubation du lysat avec des billes de nickel, pendant laquelle les noyaux imidazole de l'histidine se lient au nickel. Une étape d'élution permet enfin de récupérer la forme protéique du biosenseur purifiée. Nous disposons de deux formes du biosenseur, GFP-Aurora A qui est le témoin négatif sans FRET possible car il n'y a pas d'accepteur et GFP-Aurora A-mCherry où le FRET est possible entre la GFP et la mCherry. On peut mesurer la durée de vie de fluorescence de ces deux biosenseurs au fastFLIM après les avoir dilués dans un tampon kinase (Fig 36).

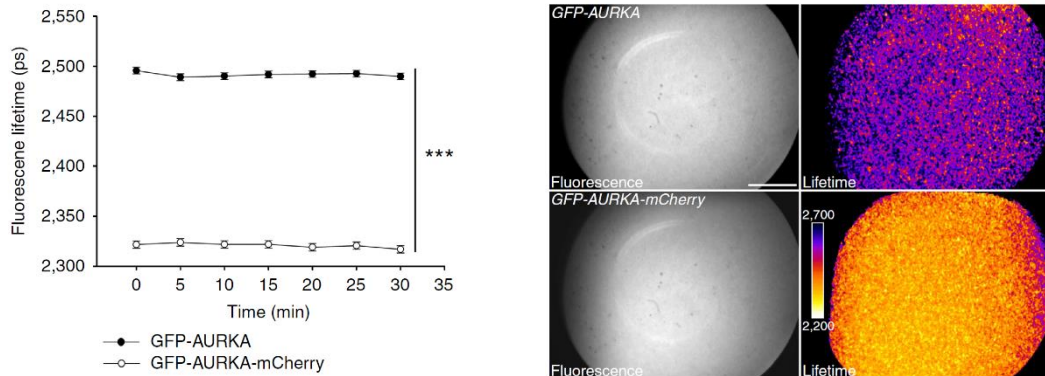


Fig 36. Mesure de FRET du biosenseur Aurora A in vitro par durée de vie de fluorescence
 (A gauche) La durée de vie de fluorescence de la GFP est mesurée au fastFLIM au cours du temps pour le biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry in vitro. (A droite) L'image en noir et blanc correspond à l'image d'intensité de la première porte temporelle et l'image en fausses couleurs représente les mesures de durée de vie de fluorescence.

On mesure une durée de vie de fluorescence d'environ 2500 ps pour le biosenseur GFP-Aurora A ce qui correspond à la durée de vie de fluorescence de la GFP seule (Schleifenbaum et al., 2010), et on mesure environ 2350 ps pour le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry. La différence d'environ 150ps correspond ainsi au FRET entre la GFP et la mCherry. Des tests kinases ont été effectués afin de vérifier la capacité du biosenseur à se phosphoryler ou à se déphosphoryler sur le résidu T288, et ainsi corréler ces changements d'état aux variations de mesure de durée de vie de fluorescence. On peut traiter le biosenseur avec de la phosphatase puis ensuite avec de l'ATP (fig 37). On constate qu'après quelques minutes, la durée de vie de fluorescence du biosenseur GFP-Aurora A-mCherry augmente pour atteindre les valeurs du biosenseur GFP-Aurora A. Après quelques minutes de traitement à l'ATP (consécutif au traitement à la phosphatase), la durée de vie de fluorescence diminue pour atteindre la valeur initiale.

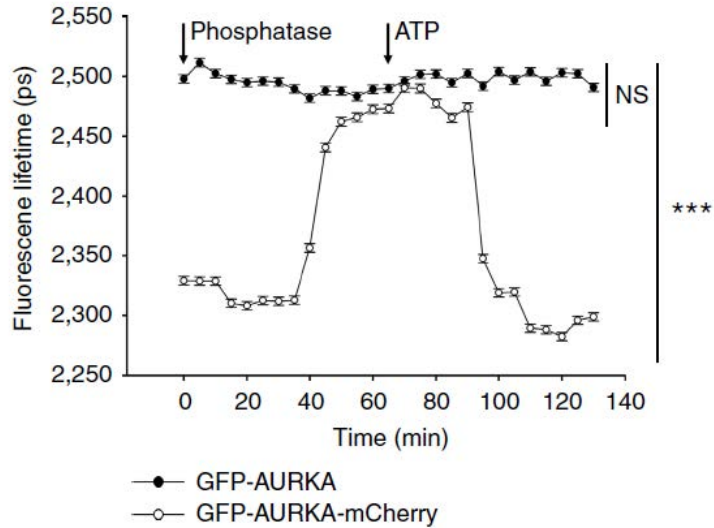


Fig 37. Suivi de l'activité du biosenseur Aurora A in vitro

Le graphique montre les valeurs de durée de vie de fluorescence au cours du temps du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry, après incubation avec la phosphatase puis avec de l'ATP.

On peut vérifier par Western Blot, que le traitement à la phosphatase déphosphoryle le biosenseur au niveau du résidu T288 et que le traitement à l'ATP permet au biosenseur d'être à nouveau phosphorylé (Fig 38). Ainsi en mesurant la durée de vie de fluorescence du biosenseur in vitro, il est possible d'accéder à son état de conformation spatiale qui reflète son état de phosphorylation et donc à son état d'activation.

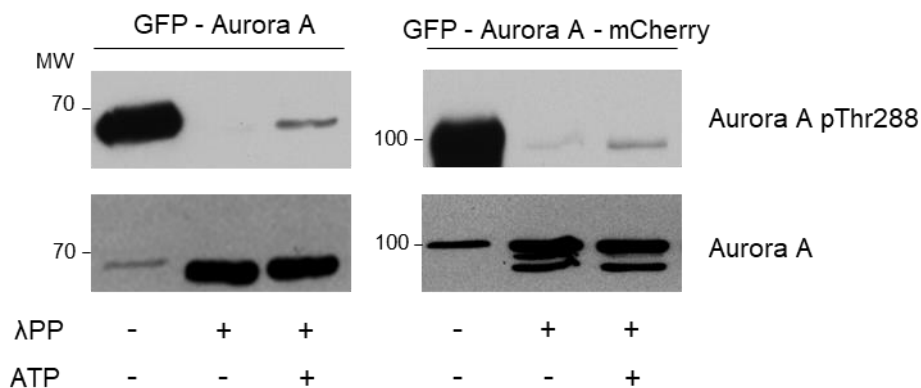


Fig 38. Test kinase du biosenseur Aurora A

Western Blot révélant l'auto-phosphorylation du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry in vitro après traitement à la phosphatase puis traitement à l'ATP.

Afin de vérifier si le biosenseur est bien fonctionnel, il est possible de vérifier sa capacité à phosphoryler un substrat. L'histone H3 est un substrat de la kinase Aurora A et sa phosphorylation en amont de la mitose entraîne une condensation des chromosomes (Wike et al., 2016). En incubant Aurora A et l'histone H3 en présence d'ATP, on peut constater la phosphorylation de l'histone montrant ainsi que le biosenseur est fonctionnel in vitro (Fig 39).

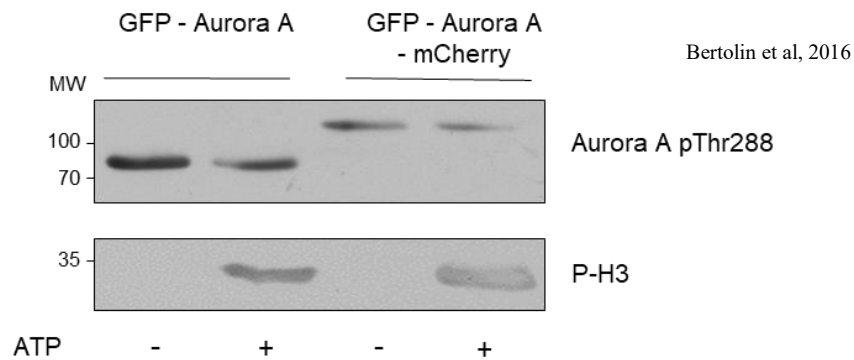


Fig 39. Test d'activité kinase du biosenseur Aurora A

Western Blot révélant l'autophosphorylation du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry, et l'abondance de phosphorylation du substrat H3

Afin de confirmer la corrélation entre durée de vie de fluorescence et activité kinase, un mutant du biosenseur a été généré. Par mutation ciblée, il est possible de changer la lysine en méthionine en position 162. Ce mutant est considéré comme « kinase-dead » et n'a donc pas d'activité kinase (Katayama et al., 2004). Par mesure au fast-FLIM, on voit que la durée de vie de fluorescence du biosenseur GFP-Aurora A K162M -mCherry est la même que celle du biosenseur GFP-Aurora A (Fig 39).

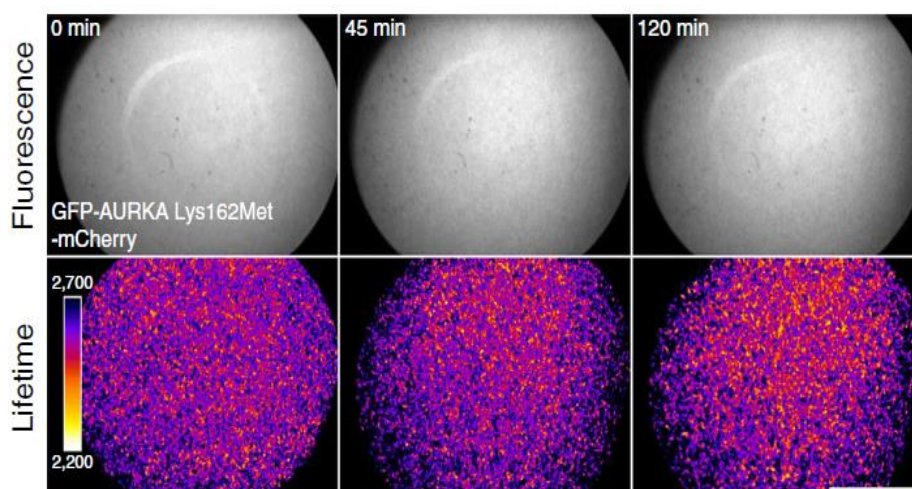


Fig 39. FLIM du biosenseur mutant K162M après test kinase

(En bas) Les images montrent les valeurs de durée de vie de fluorescence du biosenseur GFP-Aurora A K162M-mCherry après traitement à la phosphatase et ATP. (En haut) Les images montrent les intensités de fluorescence correspondantes.

La révélation des tests kinases par Western Blot montre que ce biosenseur n'est jamais phosphorylé et donc toujours inactif contrairement au biosenseur avec Aurora A sauvage (Fig 40). L'état d'inactivation du biosenseur correspond bien à une durée de vie de fluorescence plus importante.

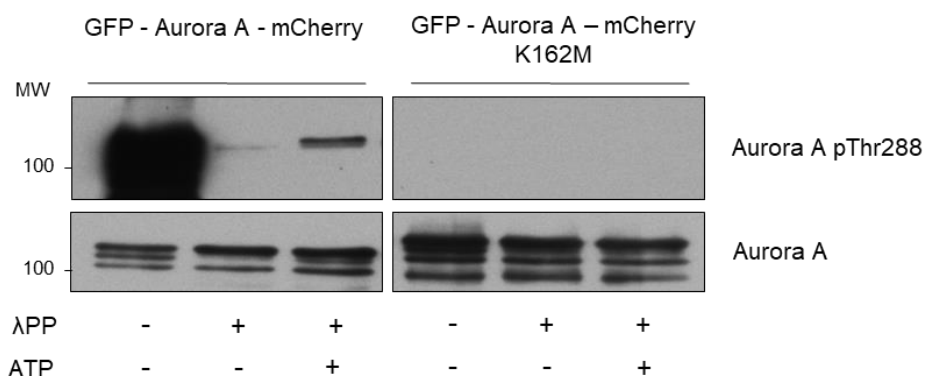


Fig 40. Test kinase du biosenseur muté K162M

Western Blot révélant la capacité d'autophosphorylation du biosenseur GFP-Aurora A- K162M mCherry en comparaison avec le biosenseur sauvage.

Une dernière vérification a pu être faite par utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase d'Aurora A. Le MLN8237 (Alisertib) et le MLN8054 sont deux inhibiteurs connus d'Aurora A (Hoar et al., 2007; Manfredi et al., 2007). On peut mesurer la durée de vie de fluorescence du

biosenseur après traitement par phosphatase puis ATP et en présence ou non d'inhibiteur (Fig 50). On constate qu'en présence d'inhibiteur, MLN8237 ou MLN8054, la durée de vie de fluorescence ne diminue pas après incubation avec ATP. Il est donc possible de mesurer l'inhibition de la kinase Aurora A par mesure de durée de vie de fluorescence.

Bertolin et al, 2016

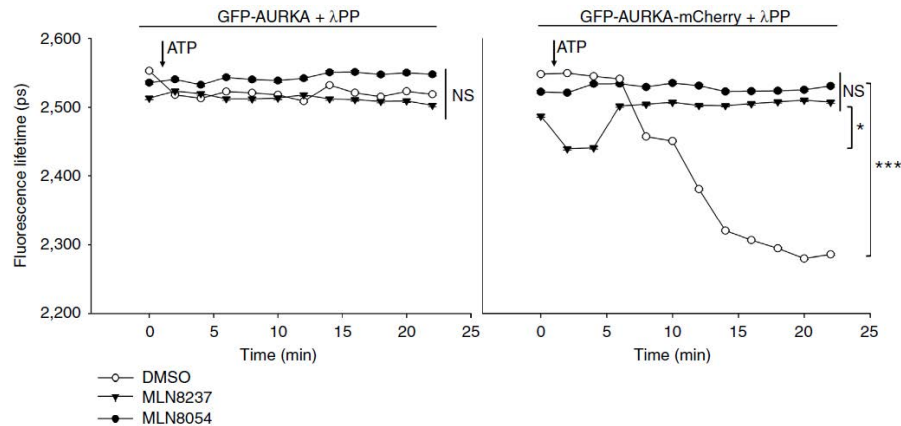


Fig 50. Effet d'inhibiteurs de l'activité kinase d'Aurora A sur le FRET

Les graphiques montrent les mesures de durée de vie de fluorescence dans le temps du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry après traitement par phosphatase puis ATP et avec traitement ou non avec le MLN8237 et le MLN8054.

On peut vérifier par Western Blot les effets des inhibiteurs sur l'activité de la kinase Aurora A (Fig 51). Les deux inhibiteurs entraînent bien une diminution de la phosphorylation du biosenseur. La phosphorylation de l'histone H3 diminue aussi lorsque le biosenseur est incubé avec les inhibiteurs.

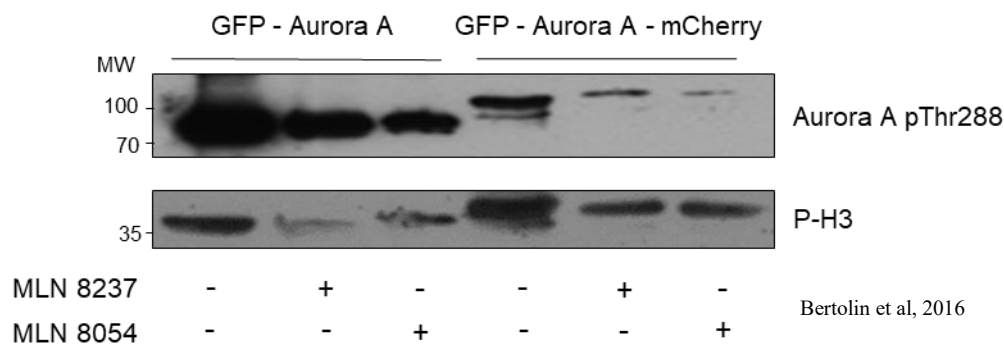


Fig 51. Effet des inhibiteurs de l'activité kinase d'Aurora A sur l'activation et l'activité du biosenseur

Western Blot révélant l'autophosphorylation du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry, ainsi que la phosphorylation du substrat H3 après traitement par MLN8237 ou MLN8054

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de suivre l'état d'activation ou d'inactivation du biosenseur Aurora A *in vitro* par mesure de durée de vie de fluorescence. De plus ce biosenseur est fonctionnel puisqu'il est capable de phosphoryler un substrat d'Aurora A. Cette méthode présente le premier avantage d'être plus rapide dans le temps si on compare le temps d'acquisition d'une image au fastFLIM de l'ordre de la seconde avec le temps de mise en place d'un Western Blot. De plus, elle permet le suivi dans le temps de l'activité kinase d'un même échantillon.

L'utilisation du biosenseur a aussi pu être validée *in cellulo*. Il est possible de générer des lignées stables de cellules U2OS exprimant le plasmide codant pour les différentes formes du biosenseur (donneur seul, donneur et accepteur, mutant K162M). Le plasmide contient une séquence génétique permettant une résistance à l'antibiotique G418 (génélicine). En transfectant les cellules avec ce plasmide, puis en les traitant avec de la généticine, il est possible de sélectionner majoritairement les cellules qui ont intégré et exprimé le plasmide. Une dernière étape de tri par cytométrie en flux permet de s'assurer de disposer d'une lignée stable et homogène dans les niveaux d'expression du biosenseur. Ces cellules peuvent ensuite être cultivées et expriment le plasmide à des niveaux plus faibles que lors d'une transfection transitoire et donc plus proches des niveaux endogènes. Le plasmide contient aussi la séquence codant pour le promoteur du gène Aurora A ce qui permet aussi aux cellules d'exprimer le biosenseur à des niveaux endogènes. Avant chaque mesure de durée de vie de fluorescence, les cellules sont synchronisées en phase G2/M par traitement au nocodazole (Blajeski et al., 2002).

Aurora A est synthétisée en phase G2 pour atteindre un pic juste avant la mitose, et est active tout au long de la mitose. Elle est ensuite dégradée en grande partie et c'est pourquoi elle est largement étudiée au cours de la mitose (Nikonova et al., 2013). On peut observer la localisation d'Aurora A au niveau des centrosomes et des microtubules de la plaque métaphasique. On peut ainsi mesurer une différence d'environ 100 ps entre les cellules exprimant GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry (Fig 52)

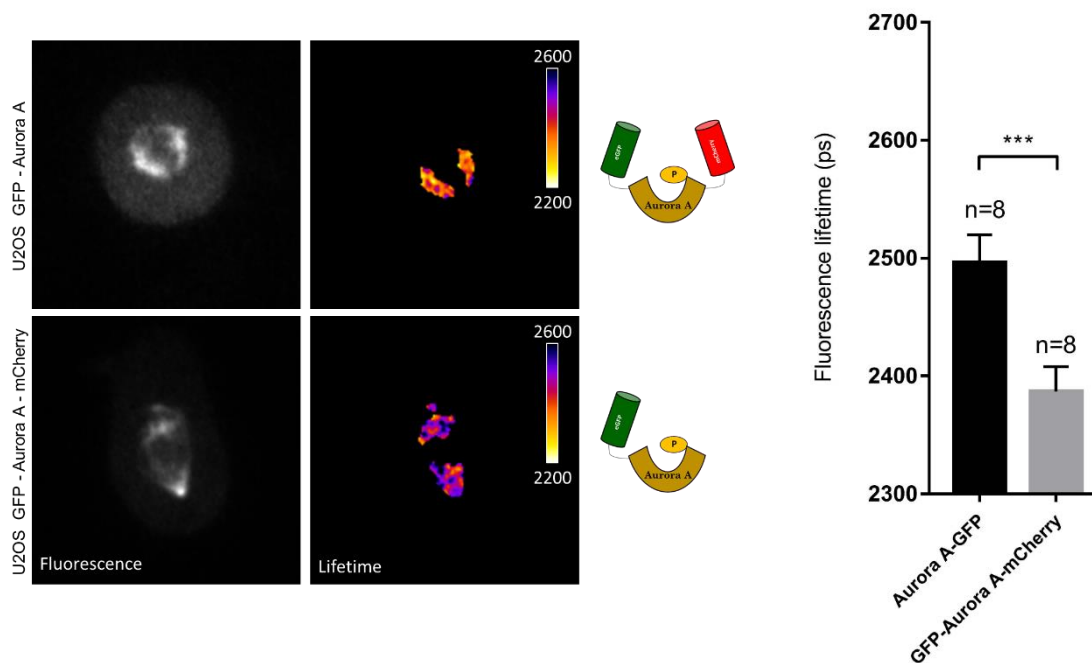


Fig 52. Mesure de FRET avec le biosenseur Aurora A exprimé dans des cellules

(Gauche) L'image en noir et blanc correspond à l'image d'intensité de la première porte temporelle et l'image en fausses couleurs représente les mesures de durée de vie de fluorescence. (Droite) Graphique représentant les résultats correspondant. *** p-value<0.001

Il est possible de montrer que le biosenseur est fonctionnel au sein de la cellule. Le plasmide contient une séquence génétique permettant d'être résistant à un siARN généré pour empêcher l'expression d'Aurora A sauvage. Une diminution de l'expression d'Aurora A sauvage entraîne des défauts au niveau de la plaque métaphasique (Asteriti et al., 2011). Ce phénotype peut être corrigé (rescue) lorsque le biosenseur est exprimé au sein d'une cellule dont la kinase endogène a été ciblée par un siRNA.

Enfin, un traitement des cellules avec le MLN8237 entraîne une augmentation de la durée de vie de fluorescence du biosenseur GFP-Aurora A-mCherry pour atteindre la même valeur que le biosenseur GFP-Aurora A (Fig 53). Cela montre qu'un traitement avec un inhibiteur

d'Aurora A entraîne un changement de conformation du biosenseur qui abolit le FRET. Il est donc possible de mesurer l'activité d'Aurora A dans des cellules vivantes. Ce biosenseur est donc un outil puissant pour mesurer rapidement l'activation ou l'inactivation de la kinase Aurora A dans des cellules vivantes.

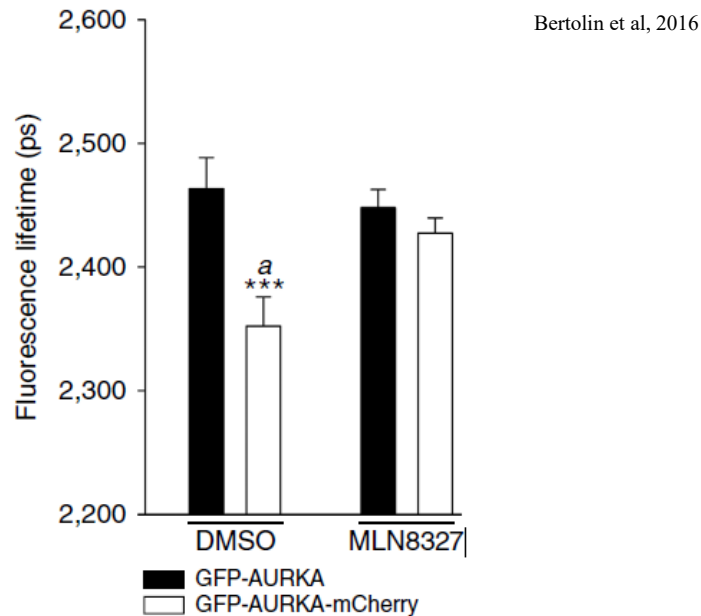


Fig 53. Effet de l'inhibiteur MLN8237 sur les cellules exprimant le biosenseur d'Aurora A.

Graphique représentant les données de durée de vie de fluorescence du biosenseur GFP-Aurora A ou GFP-Aurora A-mCherry après traitement au MLN8237

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans Nature Communications en 2016 : Bertolin, G., Sizaire, F., Herbolme, G., Rebutier, D., Prigent, C., and Tramier, M. (2016). **A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells.** Nature Communications 7, 12674.

ARTICLE

Received 12 Feb 2016 | Accepted 21 Jul 2016 | Published 14 Sep 2016

DOI: 10.1038/ncomms12674

OPEN

A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells

Giulia Bertolin^{1,2}, Florian Sizaire^{1,2}, Gaëtan Herbomel^{1,2}, David Rebutier^{1,2,3}, Claude Prigent^{1,2,3}
& Marc Tramier^{1,2,4}

Overexpression of *AURKA* is a major hallmark of epithelial cancers. It encodes the multifunctional serine/threonine kinase aurora A, which is activated at metaphase and is required for cell cycle progression; assessing its activation in living cells is mandatory for next-generation drug design. We describe here a Förster's resonance energy transfer (FRET) biosensor detecting the conformational changes of aurora kinase A induced by its autophosphorylation on Thr288. The biosensor functionally replaces the endogenous kinase in cells and allows the activation of the kinase to be followed throughout the cell cycle. Inhibiting the catalytic activity of the kinase prevents the conformational changes of the biosensor. Using this approach, we discover that aurora kinase A activates during G1 to regulate the stability of microtubules in cooperation with TPX2 and CEP192. These results demonstrate that the aurora kinase A biosensor is a powerful tool to identify new regulatory pathways controlling aurora kinase A activation.

¹CNRS, UMR 6290, Rennes 35043, France. ²Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, Rennes 35043, France. ³Equipe labéllisée Ligue Contre Le Cancer 2014-2016, Rennes 35043, France. ⁴Microscopy Rennes Imaging Centre, Biosit, Université de Rennes 1, Rennes 35043, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T. (email: marc.tramier@univ-rennes1.fr).

The cell cycle consists of a series of molecular events required to yield two daughter cells from one mother cell. To warrant the faithful duplication of the genetic material, the centrosomes operate as platforms for the nucleation of microtubules forming the bipolar spindle. Abnormalities in centrosome number, function or positioning cause the formation of defective spindles that induce the unfaithful repartition of sister chromatids at cell division, a cancer-causing condition known as aneuploidy¹. The fidelity of centrosomal functions is controlled by the interplay of several molecular actors, including centrosome-residing and non-residing proteins that cooperate in promoting spindle assembly and stability. These proteins include mitotic kinases in charge of cell cycle progression² such as the serine/threonine kinase AURKA. This protein regulates the duplication and the maturation of the centrosomes, the correct timing for mitotic entry, the assembly of the mitotic spindle and cytokinesis³. These multiple functions of AURKA at mitosis are ensured by the physical interaction of the kinase with a wide variety of protein partners. The genetic amplification of AURKA and its overexpression at the mRNA and at the protein levels is frequently observed in epithelial cancers, and it is associated with an increased number of centrosomes, defective mitotic spindles and aneuploidy^{3–5}.

Considering the key role of AURKA in the maintenance of cell physiology, it is essential to understand its mode of activation and inhibition *in vivo*. Structural and biochemical studies *in vitro* have demonstrated that AURKA activates through autophosphorylation on Thr288 (refs 6–8). The activated kinase physically interacts with the microtubule-associated protein TPX2 (targeting protein for Xklp2), and it constitutes to date the most well-characterized mechanism to yield a fully active AURKA, capable of interacting with its various partners^{7,9–13}. TPX2 is a microtubule-associated protein with no kinase activity *per se*; its physical interaction with AURKA buries the phosphate group on Thr288 in the ATP-binding pocket and prevents the access of phosphatases^{7,10,14}. Although a great number of molecular partners of AURKA are known from protein–protein interaction studies in cells, the AURKA–TPX2 complex was the only one to be resolved with crystallography approaches, suggesting that AURKA interacts with its substrates in a dynamic manner^{7,15}.

In cells, AURKA associates with centrosomes at interphase and with the mitotic spindle during mitosis³. The expression levels and the catalytic activity of AURKA are dynamically regulated throughout the cell cycle and peak at metaphase to promote an efficient cell division³. When cells exit the mitotic programme, AURKA is rapidly ubiquitinated and degraded by the ubiquitin–proteasome system before a novel G1 phase^{14,16,17}. At this stage, the kinase is present at very low and often undetectable levels; its abundance increases during the S phase, concomitantly with centrosome duplication and maturation¹⁸. However, it remains largely unexplored whether AURKA is enzymatically active during the G1 and S phases. This is mainly due to technical limitations as at present, the activation of AURKA and its catalytic activity can only be measured *in vitro* or in end-point assays in cells, and these approaches require the kinase to be heavily expressed and activated to measure its catalytic activity. Therefore, it was mandatory to develop new tools to follow the spatiotemporal activation of AURKA regardless of the expression levels of the kinase. Förster's resonance energy transfer (FRET)-based biosensors represent useful tools to address this issue, and they have been recently used to gain insight into the catalytic activity of mitotic kinases during cell cycle progression^{19,20}.

We here develop the first FRET-based biosensor of AURKA containing the full sequence of the kinase within a donor–acceptor fluorophore pair suitable for FRET. We demonstrate

that it measures the conformational changes of AURKA *in vitro* and *in cellulo*, and that these changes account for the activation of AURKA by autophosphorylation on Thr288. Furthermore, we provide a functional validation of the AURKA biosensor by showing that it replaces the endogenous kinase in living cells. The biosensor allows us to track the activation of AURKA in each phase of the cell cycle, and it responds to perturbations of the AURKA signalling pathway at mitosis as previously described for the endogenous protein^{21,22}. Finally, the AURKA biosensor uncovers an activation of AURKA in G1. In this phase, AURKA is required to regulate the stability of the microtubule network in an interplay with TPX2 and the centrosomal protein of 192 kDa CEP192.

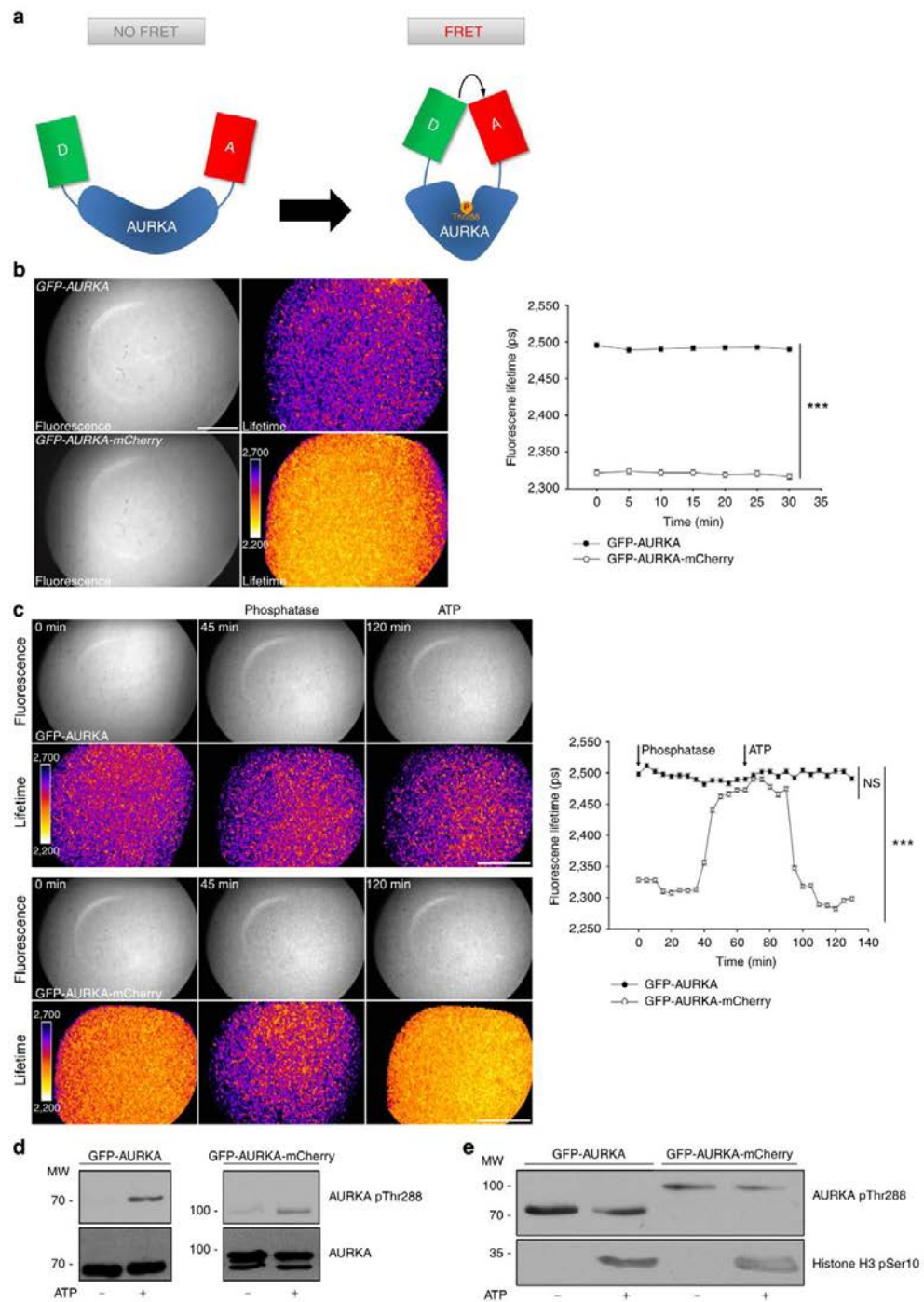
Results

***In vitro* validation of the AURKA FRET biosensor.** It is known that AURKA changes the conformation of its activation loop when it undergoes autophosphorylation on Thr288 (refs 7,15,23). We investigated whether this conformational change could be tracked in space and time by FRET microscopy. We fused a widely used donor–acceptor FRET pair to each terminus of AURKA: the enhanced green fluorescent protein (EGFP) donor fluorophore to the amino terminus and the mCherry acceptor fluorophore to the carboxy terminus (Fig. 1a)²⁴. As FRET between the two fluorophores occurs only if the donor and the acceptor are in close proximity (≤ 10 nm), changes in FRET efficiency provide information on fluorophore orientation and help to infer the conformation of the protein^{25,26}. We hypothesized that the modification of the ATP-binding pocket of AURKA brings the donor and the acceptor in proximity, allowing the measurement of FRET (Fig. 1a). We estimated the efficiency of FRET by using a fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) approach, in which a donor molecule in proximity of an acceptor molecule shows a reduced fluorescence lifetime compared with the donor alone, due to the FRET effect²⁷. We expressed and purified the GFP–AURKA–mCherry protein and the acceptor-devoid control GFP–AURKA from *Escherichia coli*, and we analysed their mean fluorescence lifetime by FLIM (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1a); these measurements appeared homogeneous in space, with a s.d. of ± 50 ps, which are intrinsic to the microscope system used for the measurement of FLIM. GFP–AURKA showed a mean lifetime comprised between 2,400 and 2,500 ps, which is compatible with the lifetime of the EGFP protein^{24,26}. GFP–AURKA–mCherry had a mean lifetime spanning between 2,300 and 2,350 ps, ~ 150 ps lower than the one of GFP–AURKA, indicative of FRET between EGFP and mCherry. Taking into account the dark species of mCherry and following previously published strategies to estimate FRET efficiency, we calculated that the ~ 150 ps difference between GFP–AURKA and GFP–AURKA–mCherry corresponds to a FRET efficiency of $\sim 16\%$ (ref. 24). To underline the relevance of FRET within the AURKA biosensor, it should be noted that a FRET-positive GFP–mCherry tandem probe in which the EGFP fluorophore is fused to mCherry, representing the condition of maximal FRET efficiency that can experimentally be obtained between the two fluorophores, shows a FRET efficiency of $\sim 22\%$ (ref. 28). This comparison therefore highlights the power of the AURKA biosensor for the analysis of the conformational changes of the kinase.

As previously described, protein kinases issued from *E. coli* can be phosphorylated during the expression phase, and these modifications are often maintained during the purification procedure as it is the case for AURKA²⁹. To gain insight on the correlation between FRET efficiency and phosphorylation, we dephosphorylated GFP–AURKA and GFP–AURKA–mCherry

with the generic Ser/Thr/Tyr phosphatase lambdaPP. We treated the proteins for 1 h at 30 °C to ensure the optimal enzymatic activity of the phosphatase, and we measured the mean lifetime of the proteins all along the treatment (Fig. 1c). While the lifetime of GFP-AURKA remained constant at ~2,500 ps, the

one of GFP-AURKA-mCherry started to increase after 35 min of treatment with lambdaPP, and it reached the lifetime of GFP-AURKA after 50 min indicating a progressive loss of FRET between EGFP and mCherry during the dephosphorylation phase. We then incubated the dephosphorylated proteins with ATP at 30 °C for



1 h to trigger their re-phosphorylation (Fig. 1c). While the lifetime of GFP-AURKA remained unaltered, the lifetime of GFP-AURKA-mCherry decreased from 2,500 to 2,300 ps after 25 min of treatment. We therefore concluded that the FRET observed within the AURKA biosensor is linked to the phosphorylation of the kinase. We also evaluated the effect of temperature on the efficiency of the dephosphorylation and re-phosphorylation reactions by treating GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry with λ PP and ATP at 37 °C, which is the standard temperature for ATP hydrolysis *in cellulo*. We measured the mean lifetime of the proteins throughout the treatments at 37 °C, and we observed that both reactions were completed faster than at 30 °C (Supplementary Fig. 1b). However, the dephosphorylation of GFP-AURKA-mCherry resulted less efficient at 37 °C, as the lifetime of the AURKA biosensor never reached the one of GFP-AURKA. This is due to the fact that λ PP requires a temperature of 30 °C for an optimal catalytic activity, and it is partially inactivated when the temperature rises, as indicated by the manufacturer.

We then explored whether FRET within the AURKA biosensor is linked to the autophosphorylation of AURKA on Thr288 and to its kinase activity. We first performed standard *in vitro* kinase assays to estimate the autophosphorylation on Thr288 (pThr288) in samples dephosphorylated and re-phosphorylated as for FLIM analysis. We observed that a pThr288-specific band was absent when GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry were treated with λ PP, whereas this band appeared after the addition of ATP (Fig. 1d). We then used the phosphorylation of histone H3 on Ser10 (pSer10) as an indicator of the kinase activity of AURKA³⁰. As expected, phosphorylation of histone H3 on Ser10 was detected only in the presence of ATP both for GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry, showing that the two proteins are enzymatically active (Fig. 1e). To verify whether the temperature could alter the catalytic activity of the biosensor, we evaluated the abundance of the pSer10-specific band in samples incubated at 30 and at 37 °C. We observed that histone H3 was phosphorylated in a comparable manner at both temperatures (Supplementary Fig. 1c). Of note, 30 min were sufficient for an *in vitro* kinase reaction at 37 °C, as previously shown (Supplementary Fig. 1b). Together, our findings suggest that FRET between the EGFP-mCherry donor-acceptor pair of the AURKA biosensor reflects the autophosphorylation of the protein on Thr288 and demonstrate that the AURKA biosensor is a functional version of AURKA *in vitro* assays.

Biosensor activation is abolished by AURKA inhibitors. To further evaluate the relationship between autophosphorylation on Thr288 and the kinase activity of AURKA, we specifically

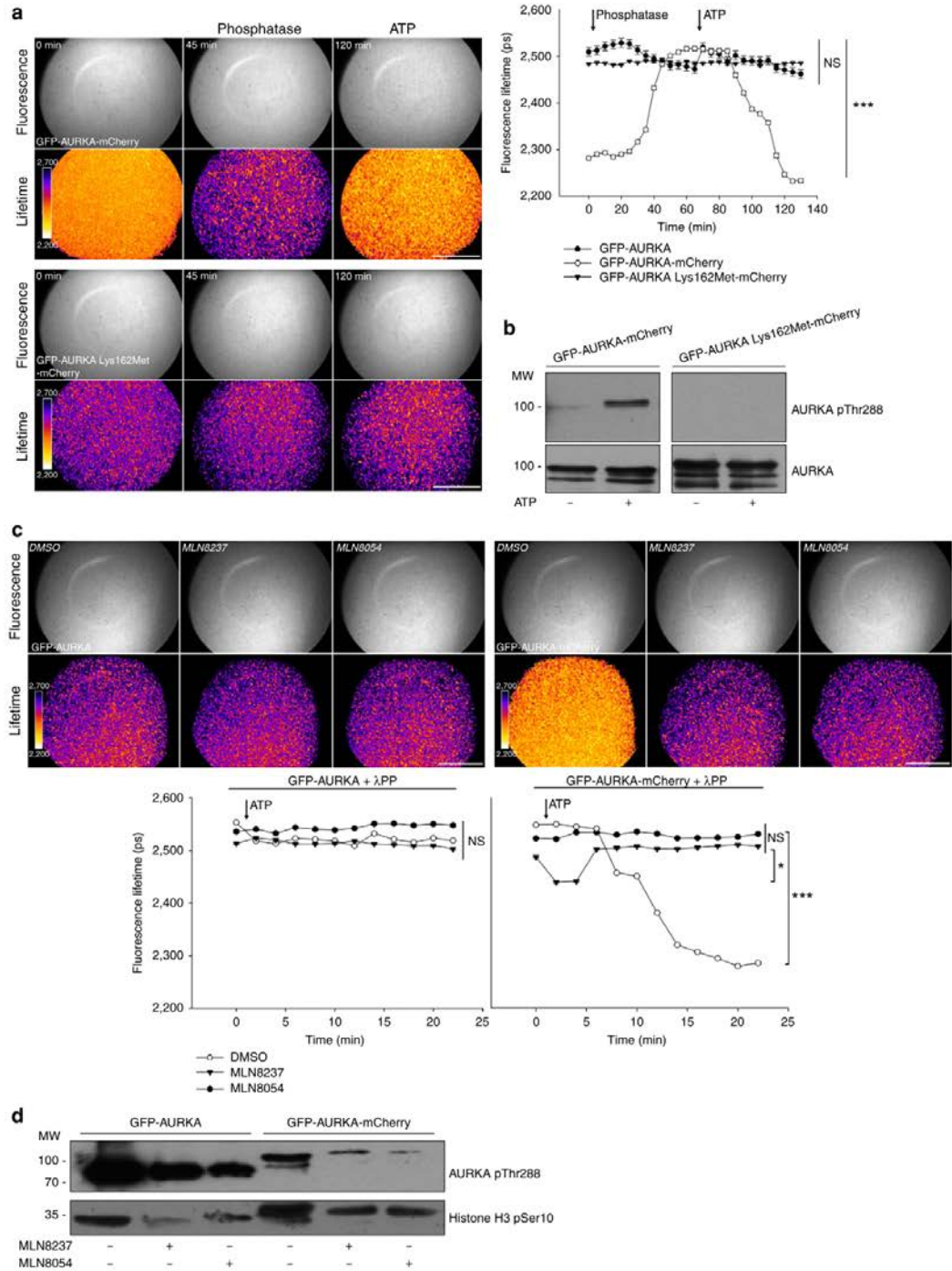
mutated the AURKA biosensor on Lys162 (Lys162Met) to obtain a kinase-dead variant of this protein previously shown to be incapable of performing substrate phosphorylation *in vitro*³¹. We then measured the mean lifetime of GFP-AURKA-mCherry and of the Lys162Met variant by FLIM. In contrast with GFP-AURKA-mCherry, the lifetime of the GFP-AURKA Lys162Met-mCherry variant was similar to the one of GFP-AURKA, showing lack of FRET between the EGFP-mCherry donor-acceptor pair throughout all the treatments (Fig. 2a). This was also confirmed by the absence of pThr288 on GFP-AURKA Lys162Met-mCherry in any condition (Fig. 2b). These data demonstrate that FRET within the AURKA biosensor shows a correlation with the autophosphorylation on Thr288 and to a catalytically active AURKA.

To gain further insight on how altering the catalytic activity of AURKA perturbs the conformational changes of the AURKA biosensor, we studied the effect of the pharmacological inhibitors MLN8237 and MLN8054 on FRET efficiency. Being small ATP competitors, these compounds specifically prevent autophosphorylation on Thr288 and abrogate the kinase activity of AURKA^{32,33}. We therefore hypothesized that MLN8237 and MLN8054 could abolish autophosphorylation-related FRET. We pre-treated GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry with λ PP, and we imaged the proteins while triggering the re-phosphorylation of the kinase with ATP in conjunction with dimethylsulfoxide, MLN8237 or MLN8054 (Fig. 2c). We carried out FLIM reactions at 37 °C to ensure the optimal rate of ATP hydrolysis together with the most effective binding rate of the inhibitors according to *in cellulo* studies^{32,33}. The mean lifetime of GFP-AURKA-mCherry treated with ATP and dimethylsulfoxide significantly decreased after 7 min, while no overall lifetime shift was observed in the presence of MLN8237 or MLN8054, or when using GFP-AURKA (Fig. 2c). Of note, a transient decrease in the lifetime of GFP-AURKA-mCherry was observed when the protein was treated with MLN8054, suggesting that the inhibitory effect of this compound is not immediate. We then analysed GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry through standard kinase assays to validate the efficacy of MLN8237 and MLN8054 on the abundance of the pSer10 and pThr288 bands (Fig. 2d). Compared with controls, the abundance of both bands were lower when each of the two inhibitors was used, validating the activity of these compounds on the activation of AURKA and on the phosphorylation of a canonical substrate of the kinase. Together, our results indicate that the AURKA biosensor responds to the pharmacological inhibition of the kinase activity of AURKA, and provide further evidence that the autophosphorylation on Thr288 correlates with the kinase activity of AURKA *in vitro*.

Figure 1 | The AURKA biosensor detects the autophosphorylation of AURKA on Thr288 *in vitro*. (a) Model illustrating the mode of action of the AURKA biosensor. The complete sequence of AURKA is located between the donor (D, EGFP) and the acceptor (A, mCherry) fluorophores. When AURKA is autophosphorylated on Thr288, the kinase undergoes a conformational change bringing the donor and the acceptor in proximity and allowing FRET detection. Of note, the real three-dimensional orientations of the two fluorescent proteins are not known. (b) (Left panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images from *in vitro* FLIM analysis of purified GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry proteins. (Right panel) The graph illustrates a time-lapse analysis of the fluorescence lifetime of EGFP for both proteins. Images were acquired every 5 min. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. (c) (Left panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images taken at selected time points, and (right panel) corresponding quantification of the *in vitro* FLIM analysis of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry following λ PP and ATP treatments. All treatments were performed at 30 °C and images were acquired every 5 min. The addition of λ PP and ATP is indicated by an arrow on the graph. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. The pseudocolour scale in **b,c** represents pixel-by-pixel lifetimes; conditions and/or time points are indicated in italics. Scale bar, 5 μ m. *** $P < 0.001$ against each time point in the corresponding 'GFP-AURKA' condition; NS, not significant. Statistical tests: two-way ANOVA. (d) Representative *in vitro* kinase assay and corresponding western blot analysis showing the proportion of AURKA undergoing autophosphorylation on Thr288 (AURKA pThr288) in samples incubated at 30 °C with λ PP for 1 h and then treated or not with ATP for 1 h at the same temperature. Loading control: total AURKA. (e) Representative *in vitro* kinase assay illustrating the presence of a Ser10-positive band on histone H3 after the incubation of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry with ATP for 30 min at 37 °C. Loading control: phosphoThr288 AURKA.

The biosensor reflects intramolecular FRET. To further explore the properties of the AURKA biosensor, we investigated whether its activation *in vitro* could be due to intermolecular FRET events occurring between adjacent GFP-AURKA-mCherry molecules. To this end, we compared the mean lifetime of

GFP-AURKA-mCherry with the one obtained by fusing the donor and acceptor fluorophores on distinct AURKA molecules, used in conjunction. These proteins were treated with λ PP and ATP to follow the autophosphorylation of AURKA on Thr288 by FLIM (Fig. 3a). GFP-AURKA in the presence of



AURKA-mCherry showed a mean lifetime comparable to the one of GFP-AURKA alone throughout the treatments, thus not indicative of intermolecular FRET between two distinct donor-acceptor molecules.

As the AURKA biosensor is phosphorylated when purified from *E.coli*, we evaluated whether the incubation of GFP-AURKA-mCherry with increasing quantities of untagged AURKA could decrease FRET between EGFP and mCherry, indicating intermolecular FRET between neighbouring proteins (Fig. 3b). The lifetime of the biosensor remained unaltered for all conditions tested, strengthening the observation that the FRET due to the autophosphorylation of the AURKA biosensor on Thr288 follows an intramolecular mechanism.

The biosensor functionally replaces endogenous AURKA. It is known that the depletion of AURKA from cells induces spindle pole defects, an event representing a possible cause for aneuploidy^{34–36}. We therefore asked whether the AURKA biosensor could functionally replace the endogenous protein by rescuing the centrosomal abnormalities detected after siRNA-mediated gene silencing of AURKA. Following a previously published strategy, silent mutations were inserted into the cDNA of GFP-AURKA and of GFP-AURKA-mCherry to become resistant to an AURKA-specific siRNA³⁷. To overcome the problems issued from the massive overproduction of AURKA and to express the kinase at physiological levels, we stably transfected the vectors encoding GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry under the control of the AURKA minimal transcriptional regulatory region in U2OS cells^{37–41}. Knockdown of AURKA for 24 h in non-transfected U2OS cells resulted in nearly 60% of cells displaying multiple or monopolar spindle poles at metaphase (Fig. 4a and Supplementary Fig. 2a), whereas these features were only rarely detected in cells stably expressing GFP-AURKA-mCherry or GFP-AURKA. These data demonstrate that the biosensor fully rescues all previously described phenotypes^{36,37}.

The biosensor activates according to its subcellular localization.

We then explored whether the AURKA biosensor could act as an efficient reporter of the activation of AURKA *in cellulo*. First, we explored the subcellular localization of the fluorescent proteins in the two cell lines at interphase and in mitotic cells and as expected, AURKA was found at centrosomes, in the cytosol and at the mitotic spindle (Fig. 4b and Supplementary Fig. 2b). Second, we evaluated the conformational changes of the biosensor in each of these subcellular compartments by comparing the lifetimes of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry. We measured a decrease of ~150 ps in the lifetime of EGFP at centrosomes and at the mitotic spindle, which was comparable to the difference observed *in vitro* between GFP-AURKA and

GFP-AURKA-mCherry (Fig. 1b). In interphase cells FRET could be detected in the cytosol as well, although at lower levels (Fig. 4b). To further correlate FRET and the activation of AURKA, we analysed the inhibitory effect of MLN8237 on mitotic cells, in which the kinase activity of AURKA is greater compared with other cell cycle phases⁴². No significant FRET was measured on the mitotic spindle of cells treated with MLN8237 compared with controls (Fig. 4c). We also analysed the conformational changes of AURKA in the presence of the Lys162Met kinase-dead variant. We stably expressed this construct in U2OS cells following the same experimental strategy described above and similarly to the results obtained *in vitro*, no FRET was detected at centrosomes of interphase cells and on the mitotic spindle under these conditions. This provides further evidence that the activation of the biosensor in cells correlates with the enzymatic activity of AURKA (Supplementary Fig. 2c). In addition, FRET at centrosomes or at the mitotic spindle remained unaltered in control cells or following siRNA-mediated AURKA silencing, demonstrating that the activation of the biosensor is not affected by the knockdown of the endogenous kinase (Fig. 4d and Supplementary Fig. 2d).

The biosensor differentially activates along the cell cycle. To pursue the *in cellulo* characterization of the AURKA biosensor, we evaluated its conformational changes and its molecular dynamics in the different phases of the cell cycle. First, we synchronized GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells in G1, S and at mitosis. The efficacy of the synchronization procedure was evaluated by flow cytometry (Supplementary Fig. 3a) and by the incorporation of the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI) probe (Supplementary Fig. 3b). The measurement of the fluorescence intensity of GFP in GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells after synchronization revealed that the expression of the biosensor is modulated during the cell cycle in both cell lines (Fig. 5a,b). FLIM analyses performed on cells synchronized at mitosis indicated that the biosensor is activated at the centrosome (Fig. 5c). We also detected a similar degree of activation at centrosomes of G1 cells, whereas no FRET was detected on the same structures during the S phase.

We then explored the relative motility of the biosensor at centrosomes of synchronized cells. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments showed that the recovery of the fluorescence of the biosensor was never complete in cells synchronized in G1 or at mitosis. This suggests the existence of a sub-population of GFP-AURKA-mCherry molecules not exchanging with the cytosol and therefore not renewed after the photobleaching procedure in these cell cycle phases (Fig. 5d). This was not observed on centrosomes of cells synchronized in the S phase, where the motility of the biosensor was already full after

Figure 2 | Autophosphorylation on Thr288 is sufficient for a catalytically active AURKA biosensor in the presence of ATP. (a) (Left panels)

Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images taken at the indicated time points and (right panel) corresponding quantification of EGFP lifetime images taken every 5 min from GFP-AURKA, GFP-AURKA-mCherry or GFP-AURKA Lys162Met-mCherry samples treated λ PP for 1 h at 30 °C, and then incubated with ATP for 1 h at 30 °C. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. (b) *In vitro* kinase assay and western blot analysis showing the abundance of AURKA pThr288 in samples containing GFP-AURKA-mCherry or the Lys162Met variant following treatment with λ PP for 1 h at 30 °C and then incubated or not with ATP for 1 h at the same temperature. (c) (Upper panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images, and (lower panels) corresponding quantification of EGFP lifetime from GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry samples treated with λ PP for 1 h at 30 °C, and imaged following the addition of ATP together with dimethylsulfoxide (DMSO), MLN8237 or MLN8054 for 20 min at 37 °C. Images were acquired every 2 min. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. (d) *In vitro* kinase assay and corresponding western blot illustrating the abundance of a Ser10-positive band on histone H3 and of autophosphorylated AURKA after the incubation of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry with ATP and DMSO, MLN8237 or MLN8054. Scale bar, 5 μ m. Arrows: addition of λ PP/ATP. Pseudocolour scale: pixel-by-pixel lifetime. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ against each time point in the corresponding 'GFP-AURKA' condition in a or in the corresponding 'Phosphatase + DMSO' condition in c. NS, not significant. Statistical tests: two-way ANOVA.

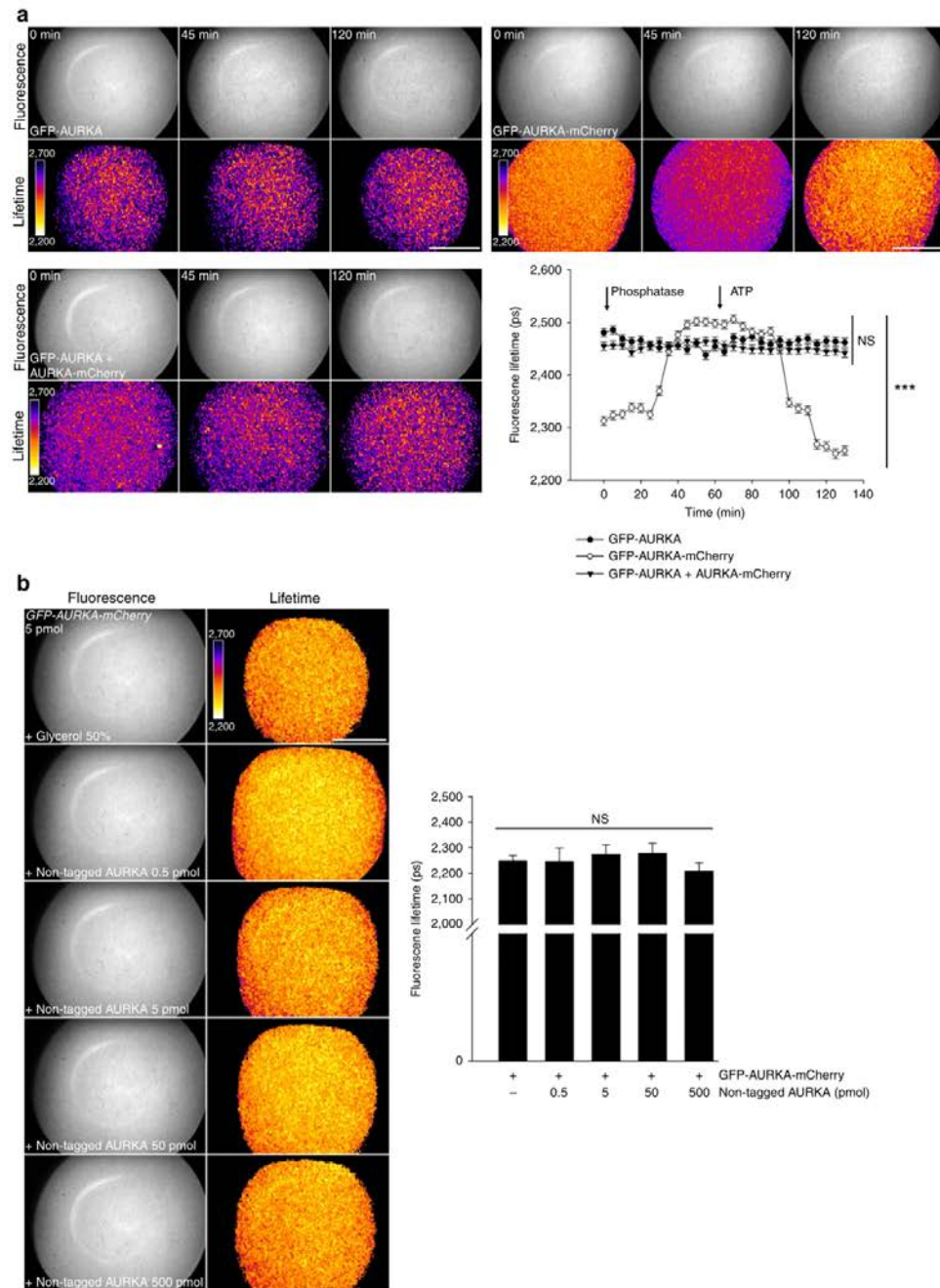
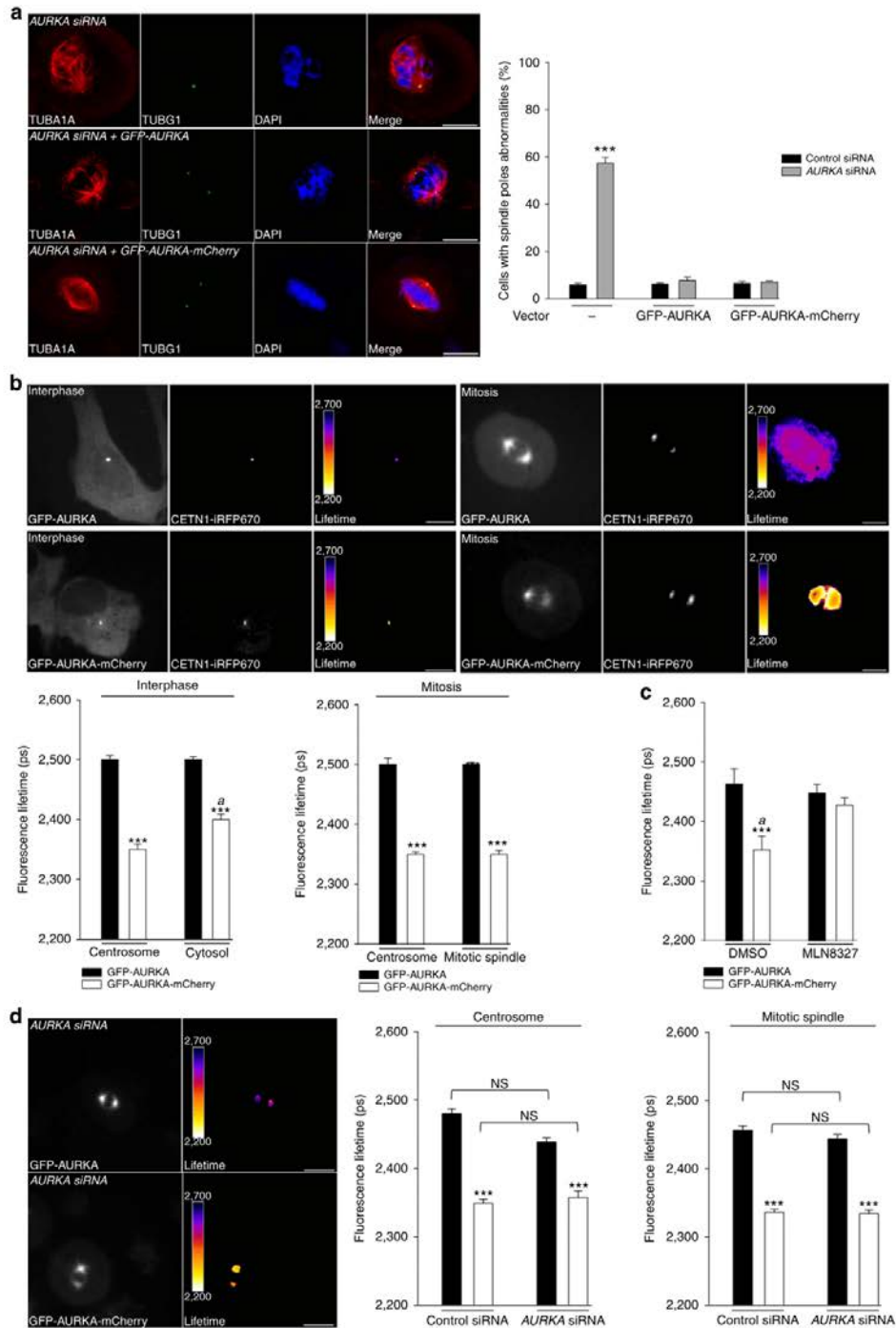


Figure 3 | The AURKA biosensor displays intramolecular FRET *in vitro*. (a) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images taken at selected time points, and corresponding quantification of the *in vitro* FLIM analysis of the lifetime of EGFP from GFP-AURKA, GFP-AURKA-mCherry or GFP-AURKA and AURKA-mCherry samples incubated at 30 °C with λ PP for 1 h, and then treated with ATP for 1 h. Images were acquired every 5 min. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. *** $P < 0.001$ against each time point in the corresponding 'GFP-AURKA' condition. Statistical test: two-way ANOVA. Arrows: addition of λ PP/ATP. (b) (Left panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images of GFP-AURKA-mCherry incubated with the indicated quantities of untagged AURKA. (Right panel) Histograms show the corresponding quantification of the lifetime of EGFP obtained from the GFP-AURKA-mCherry protein treated as in the left panels. Data represent means \pm s.e.m. of three independent experiments. Comparisons were made against the '+ glycerol 50%' condition. Pseudocolour scale: pixel-by-pixel lifetime. Scale bar, 5 μ m. NS, not significant. Statistical test: one-way ANOVA.

60 s of recovery (Fig. 5e). Of note, no differences in FRAP were detected when using GFP-AURKA-mCherry cells or GFP-AURKA cells (data not shown).

Our data indicate that the AURKA biosensor has a differential activation and motility according to the cell cycle phase.

Biosensor activation in G1 depends on TPX and CEP192. We sought to verify whether the fraction of AURKA retrieved in G1 was enzymatically active, and not a non-degraded pool of the protein left after mitotic exit. To this end, we treated GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized in G1



with the AURKA catalytic inhibitor MLN8237. Incubating cells with MLN8237 abolished FRET at centrosomes and indicated that the biosensor is enzymatically active in this cell cycle phase (Fig. 6a). This is also consistent with data obtained in mitotic cells under the same conditions (Fig. 4a).

To evaluate whether the biosensor at centrosomes could respond to perturbations in the AURKA signalling pathway, we silenced two well-characterized AURKA partners, TPX2 and CEP192. It is known that the downregulation of TPX2 or of CEP192 in mitotic cells induces abnormalities in centrosome maturation and in the formation of the mitotic spindle^{21,22}. We retrieved these defects following siRNA-mediated gene silencing of both AURKA partners in GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized at mitosis (Fig. 6b). FLIM measurements performed under these conditions showed that the lifetime of EGFP within the biosensor was higher at centrosomes of cells depleted for TPX2 or CEP192 compared with control cells (Fig. 6b). In addition, FRAP experiments were performed to explore the relative motility of the AURKA biosensor after the downregulation of TPX2 or CEP192 in mitotic cells. The fluorescence recovery of the biosensor was full after 30 s in cells depleted for TPX2 or CEP192, whereas we observed the existence of a sub-population of GFP-AURKA-mCherry molecules not exchanging with the cytosol in control cells synchronized at mitosis (Supplementary Fig. 4a). These results suggest that the presence of TPX2 and CEP192 is required to anchor AURKA at the centrosome of mitotic cells (Supplementary Fig. 4a). Together, these data also reinforce the dependence of AURKA on TPX2 and CEP192 for its activation at mitosis as previously published^{21,22}, and validate the ability of the AURKA biosensor to detect the activation of the kinase in mitotic cells.

We subsequently explored whether the activation of AURKA at mitosis and in G1 follows similar molecular mechanisms. It is known that TPX2 is present in G1 cells and that its abundance is proportional to the abundance of AURKA throughout the cell cycle²¹. In addition, recent reports provided evidence that centrosome assembly features share common molecular mechanisms in G1 and in mitosis, and rely on CEP192 as a molecular scaffold^{43,44}. We synchronized GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells in G1 and we analysed the lifetime of EGFP at the centrosome following depletion of TPX2 or CEP192 by siRNA. The downregulation of both proteins abolished FRET between EGFP and mCherry at the centrosomes of GFP-AURKA-mCherry cells (Fig. 6c). Comparatively to what observed in FRAP experiments performed on mitotic cells, the silencing of TPX2 and CEP192 increased the relative motility of AURKA at the centrosome in G1

(Supplementary Fig. 4b). These data reinforce the conclusion that the AURKA biosensor is activated at centrosomes of G1 cells and it relies on the presence of TPX2 and CEP192 for its activation and its motility, as observed at mitosis.

AURKA stabilizes microtubules in G1 together with TPX2 and CEP192. As we provided evidence that TPX2 and CEP192 are needed for AURKA activation during the G1 phase, we addressed the functional role of this interplay. First, we noticed a marked amplification of CETN1 (Centrin-1)-positive spots in cells depleted for TPX2 and, to a lower extent, for CEP192 (Fig. 7a). A relation between an increased number of centrioles and altered microtubule dynamics has already been observed in mitotic cells^{45,46}, and further evidence was provided for the role of AURKA and TPX2 in the control of microtubule length during anaphase^{47–49}. We therefore explored the role of TPX2 and of CEP192 in the stability of the microtubule network in GFP-AURKA-mCherry cells synchronized in G1. To this end, we evaluated the intensity of the TUBA1A staining in cells silenced for TPX2 or CEP192. Under these conditions, the microtubule network appeared more fragmented and the TUBA1A staining was less intense than in control cells (Fig. 7b). To gain a dynamic view on how the formation of the microtubule network is affected in the absence of TPX2 or CEP192, we performed microtubule depolymerization and regrowth assays on HeLa GFP-TUBA1A cells depleted for TPX2, CEP192 and AURKA and synchronized in G1 (Fig. 7c). By using time-lapse microscopy, we observed that microtubule regrowth remained incomplete in cells devoid of TPX2 and CEP192. Furthermore, the centrosomes of these cells were significantly bigger than control ones. Consistent with previous data obtained in mitotic cells^{47–49}, we found these alterations to be intrinsic to the AURKA signalling pathway in G1, as depletion of AURKA by siRNA gave similar results.

Altogether, our data provide compelling evidence for a role of an active pool of AURKA at centrosomes during the G1 phase, playing a role in the regulation of microtubule stability through the functional interaction with TPX2 and CEP192.

Discussion

We here provide evidence that the AURKA biosensor is a powerful tool to explore the activation of the kinase through the analysis of its conformational changes. We showed that these changes can be explored in real time and in specific spatial compartments by FRET microscopy, a sensitive technique widely used to detect transient protein–protein interactions and protein activity^{25,26}. To gain insight into cell cycle progression, FRET biosensors were used to monitor selected kinases implicated in

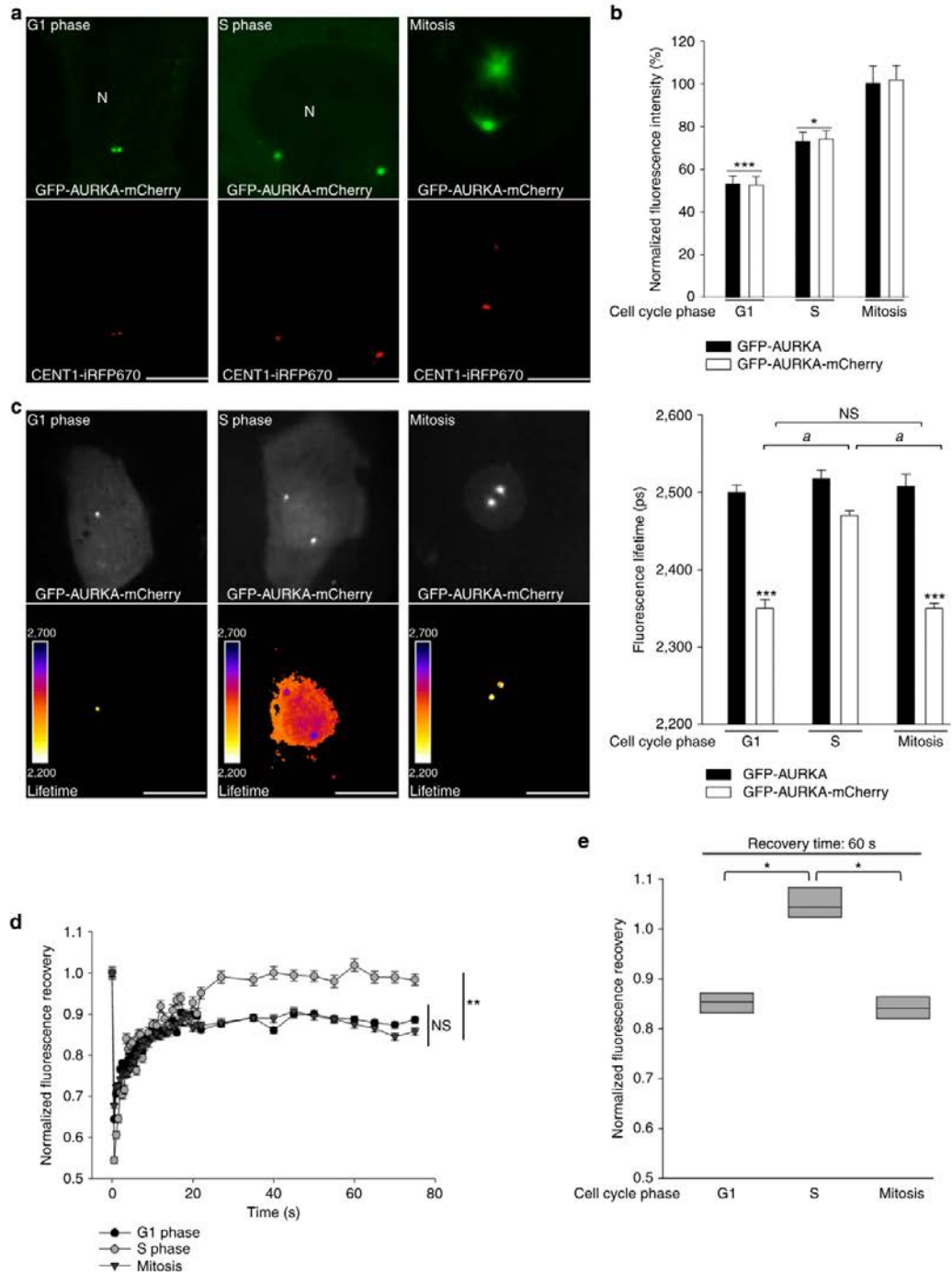
Figure 4 | The AURKA biosensor rescues the phenotype induced by AURKA deficiency and it is active at discrete subcellular locations.

(a) (Left panels) Immunofluorescent micrographs of non-transfected, GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry stable U2OS cells silenced for endogenous AURKA and synchronized in metaphase. The mitotic spindle and centrosomal defects in cells following AURKA depletion and the corresponding rescue by GFP-AURKA and by GFP-AURKA-mCherry were detected by labelling the mitotic spindle with TUBA1A and the centrosomes with TUBG1. DNA was stained with DAPI. (Right panel) Quantification of the proportion of cells with centrosomal defects in the three cell lines transfected with a control- or an AURKA-specific siRNA. $n = 100$ cells per condition scored in each of three independent experiments. (b) Representative fluorescence (GFP channel) and corresponding lifetime images of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry U2OS stable cell lines not synchronized (left panels) or synchronized in mitosis (right panels) and illustrating the presence of both proteins at the centrosome, in the cytosol and at mitotic spindles. Graphs: corresponding quantification of the lifetime of EGFP in the two cell lines and in the indicated subcellular compartments. Centrosomes were labelled with CETN1-iRFP670. $n = 30$ –40 cells per condition from three independent experiments. (c) Quantification of the lifetime of EGFP GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized at mitosis and treated with dimethylsulfoxide (DMSO) or with MLN8237. $n = 30$ –40 cells per condition from three independent experiments. (d) (Left panels) Fluorescence (GFP channel) and lifetime images of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells transfected with an AURKA-specific siRNA and synchronized at mitosis. (Right panel) Quantification of EGFP lifetime in GFP-AURKA or in GFP-AURKA-mCherry cells transfected with a control- or an AURKA-specific siRNA and synchronized at mitosis; $n = 30$ –40 cells per condition from three independent experiments. Data represent means \pm s.e.m. Pseudocolour scale: pixel-by-pixel lifetime. Scale bar, 10 μ m. *** $P < 0.001$ against the corresponding 'GFP-AURKA' condition in a–d. ^a $P < 0.01$ against the corresponding 'GFP-AURKA-mCherry' condition at the centrosome in b and the corresponding MLN8237 condition in c. NS, not significant. Statistical tests: two-way ANOVA in a, c and d; Student's *t*-test in b.

the mitotic commitment such as CCNB1/CDK1, AURKB and PLK1 (refs 50–53).

Classic FRET biosensors contain a specific amino-acidic sequence targeted for modification, for example, the

phosphorylation segment of a substrate protein, a ligand or a binding domain to favour the recognition and the folding of the target sequence, and the donor–acceptor FRET pair¹⁹. However, these tools present three major challenges: (i) the biosensor relies



on the endogenous kinase for its phosphorylation and thus for FRET detection, which is observed only when the kinase is particularly abundant or heavily stimulated; (ii) the sequence flanking the phosphorylation residue(s) targeted by the kinase must be known; and (iii) these biosensors only explore the catalytic activity of the kinase towards a specific substrate at once, and not the conformational changes on the kinase itself. To solve this last issue, we developed a FRET biosensor of AURKA containing the full sequence of the kinase inserted between the donor-acceptor FRET pair. Similar approaches have previously been used to follow PRKGC and MELK, but the conformational changes observed by FRET were not directly assigned to kinase activation^{54,55}. With the AURKA biosensor, we detected lifetime modifications in individual cells representing dynamic changes in the conformation of AURKA. In addition, we demonstrated that these changes correspond to the autophosphorylation of AURKA on Thr288, the hallmark of the molecular activation of the kinase. To date, the studies investigating the conformational changes of AURKA mainly rely on crystallography approaches. These reports indicate that only the ATP-binding pocket of the kinase modifies its conformation on autophosphorylation on Thr288, while the tertiary structure of the protein remains globally unaltered^{7,9-13}. However, these studies were essentially performed with a trunked version of the kinase constituted only by its catalytic domain, and no or few information concerning the structure of the N and C termini is available. Importantly, the crystallography structure of AURKA in the absence of ATP remains unresolved, and this does not allow the comparison of the structures of the N and C termini between inactive and activated AURKA. Therefore, our data provide complementary information and demonstrate that both ends of the kinase are brought in proximity when AURKA is autophosphorylated on Thr288. As a large number of the crystal structures available to date show activated AURKA already in complex with TPX2, our knowledge on the physiological role of the autophosphorylation *per se* and by what molecular mechanisms this modification can take place is still fragmentary^{7,10,23}. It is clear that this modification can occur independently of the presence of TPX2 (refs 6,10,15,56 and our own data). Remarkably, experiments performed in cultured cells showed that AURKA at the centrosome is not bound to TPX2 but it is phosphorylated on Thr288, whereas at the mitotic spindle the kinase binds to TPX2, but it shows poor or no autophosphorylation⁵⁷⁻⁵⁹. This underlines the importance of understanding the mechanisms controlling the autophosphorylation of AURKA and to this end, the AURKA biosensor is a sensitive tool to address this issue.

Furthermore, we provided strong evidence that cells regulate the expression of the AURKA biosensor as they would do for the endogenous protein^{18,36,37,60}. Remarkably, this study constitutes the first case in which a biosensor takes over the functions of the

kinase in case of depletion of the endogenous protein. We also showed that the biosensor responds to the silencing of *TPX2* and *CEP192* at mitosis as previously published for endogenous AURKA^{21,22}, corroborating the functional integration of the biosensor in cells. Although TPX2 and CEP192 are nowadays the most extensively studied molecular partners of AURKA, it would be interesting to use the biosensor to characterize new or transient interactors of the kinase in their capacity to modify the activation of the biosensor at selected subcellular locations. In perspective, this tool could help to build a functional interactome of AURKA.

Given that AURKA levels are low during the G1 phase, the role of AURKA in maintaining microtubule stability could only be discovered through the activation of the biosensor at centrosomes in this cell cycle phase. The observation that the biosensor responds to the pharmacological inhibition of AURKA and to the depletion of *TPX2* and *CEP192* strongly supports a role for AURKA in this phase of the cell cycle. As the cell model used in this study is known not to produce primary cilia, we excluded the activation of AURKA in G1 to be linked to this function of the kinase in G0/G1 cells^{61,62}. Interestingly, silencing of *TPX2* and, to a lesser extent, *CEP192* induces the apparition of multiple centrioles, a phenotype already described in mitotic cells when perturbing the AURKA-PLK4 signalling pathway and correlated with low microtubule dynamics^{45,46}. Indeed, this study points at a new role of TPX2 and CEP192 within the AURKA signalling pathway in a previously unexplored cell cycle phase, and it provides another piece of evidence for the correlation between supernumerary centrioles and aberrant microtubule dynamics. Although it has been reported that cells can deal with the excessive number of centrosomes by clustering them and performing cell divisions with normal bipolar spindles to remain viable, it is known that wrong centrosomal clustering generates aneuploidy, and it ultimately results in cell death by apoptosis due to chromosome missegregation⁶³. It cannot be excluded that AURKA plays a still unexplored role in the maintenance or in the efficiency of centrosome clustering through its functional interaction with TPX2, CEP192 and potentially other protein partners⁶⁴⁻⁶⁶. Targeting this interaction in G1 cells to perturb centrosome clustering in cancer-like conditions in which AURKA is overexpressed and it induces resistance to apoptosis could be a promising strategy to restore cell death¹. However, further studies will be required to explore the partners of AURKA specific to this role of the kinase, as well as to deepen our knowledge on the molecular mechanisms of this regulation.

Finally, we propose that the changes in AURKA conformation could be used as an innovative read-out to screen for potentially new inhibitors of the kinase both *in vitro* and in living cells. The AURKA biosensor could also become a tool to explore the activation of the kinase in more complex *in vivo* models, paving the way to novel experimental approaches to address the

Figure 5 | The AURKA biosensor activates during the G1 phase and at mitosis. (a) Representative immunocytochemical images of GFP-AURKA-mCherry U2OS cells synchronized in the indicated cell cycle phases. The fluorescence of EGFP was used to visualize AURKA, centrosomes were labelled with CETN1-irFP670. N, nucleus. (b) Quantification of the fluorescence intensity of EGFP in GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized in G1 phase, S phase and at mitosis. The fluorescence intensity of both proteins at mitosis was arbitrarily set at 100% and it was used to normalize the fluorescence intensities of EGFP in the other conditions. $n = 40-50$ cells per condition from three independent experiments. Data represent means \pm s.e.m. (c) (Left panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images of GFP-AURKA-mCherry cells and (right panel) corresponding quantification of the lifetime of EGFP in GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized as in a. $n = 30-40$ cells per condition from three independent experiments. Data represent means \pm s.e.m. (d) Quantification of the fluorescence recovery of EGFP in GFP-AURKA-mCherry cells synchronized as indicated and subjected to FRAP analysis. $n = 30$ cells per condition from three independent experiments. Data represent means \pm s.e.m. (e) Degree of fluorescence recovery of EGFP after 60 s from the photobleaching procedure. Scale bar, 10 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ against the corresponding 'mitosis' condition in b,d, the corresponding 'GFP-AURKA' condition in c and against the 'S' condition in e. ^a $P < 0.001$ against the corresponding 'S' condition within the GFP-AURKA-mCherry paradigm in c. NS, not significant. Statistical tests: one-way ANOVA in b,d and e; two-way ANOVA in c.

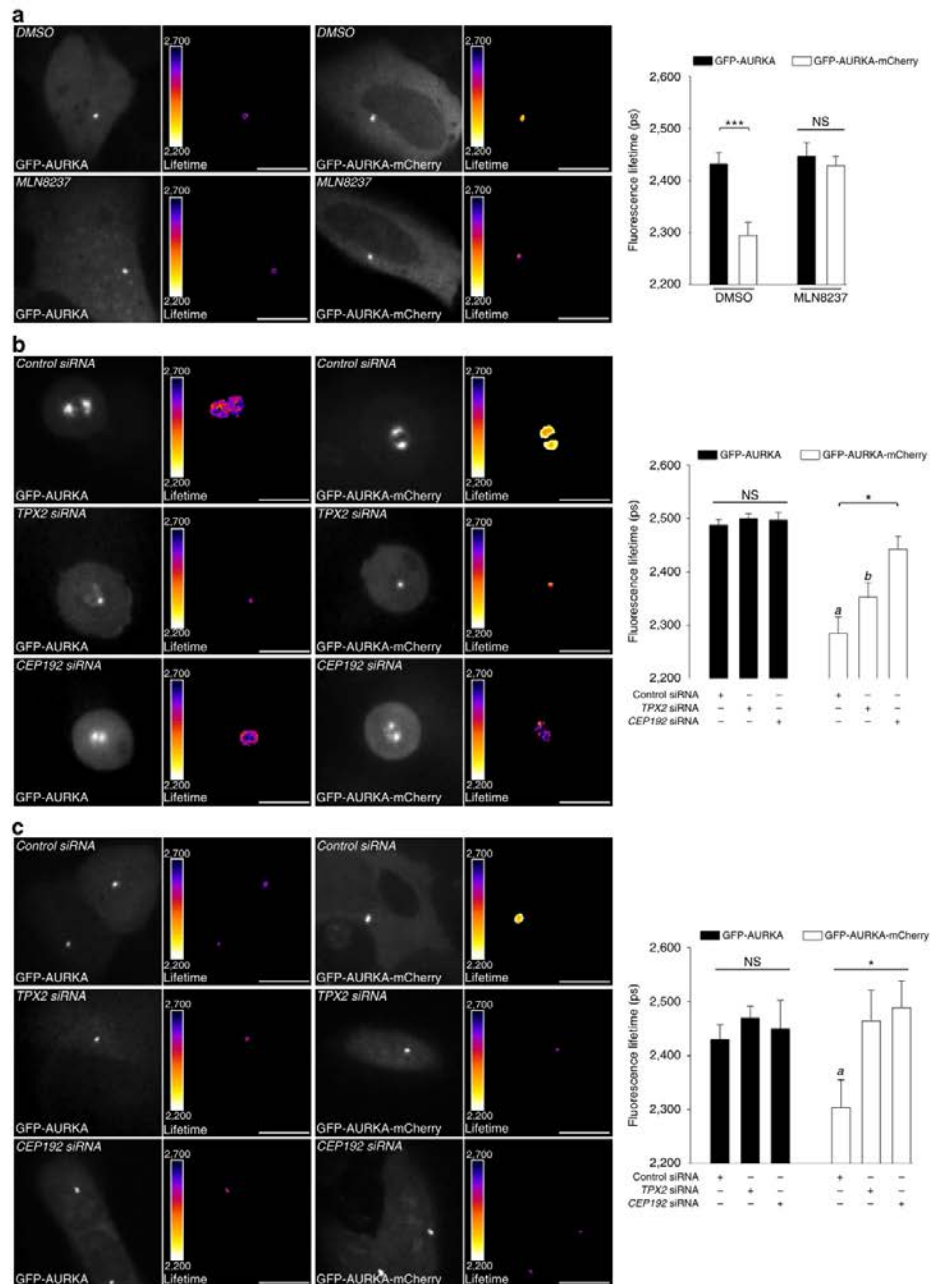


Figure 6 | TPX2 and CEP192 are required for the activation of the AURKA biosensor during the G1 phase. (a) (Left panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized in G1 and treated with dimethylsulfoxide (DMSO) or with MLN8237. (Right panel) Quantification of the lifetime of EGFP at the centrosomes of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells synchronized in G1 and treated as in the corresponding left panels. $n = 10$ – 15 cells per condition from one experiment representative of three. (b) (Left and middle panels) Representative fluorescence (GFP channel) and lifetime images of GFP-AURKA or of GFP-AURKA-mCherry cells transfected with a control, a *TPX2*- or a *CEP192*-specific siRNA and synchronized at mitosis. (Right panel) Corresponding lifetime quantification. $n = 10$ – 15 cells per condition from one experiment representative of three. (c) Images and quantification performed as in b, on cells synchronized in G1 and depleted for *TPX2* or *CEP192*. $n = 10$ – 15 cells per condition from one experiment representative of three. Data represent means \pm s.e.m. Pseudocolour scale: pixel-by-pixel lifetime. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. *** $P < 0.001$ against the corresponding 'GFP-AURKA' condition in a, * $P < 0.05$ against the 'CEP192 siRNA' condition within the GFP-AURKA-mCherry paradigm and ^a $P < 0.001$ and ^b $P < 0.01$ against the corresponding 'GFP-AURKA' condition in b,c. NS, not significant. Statistical tests: two-way ANOVA in a; one-way ANOVA in b,c.

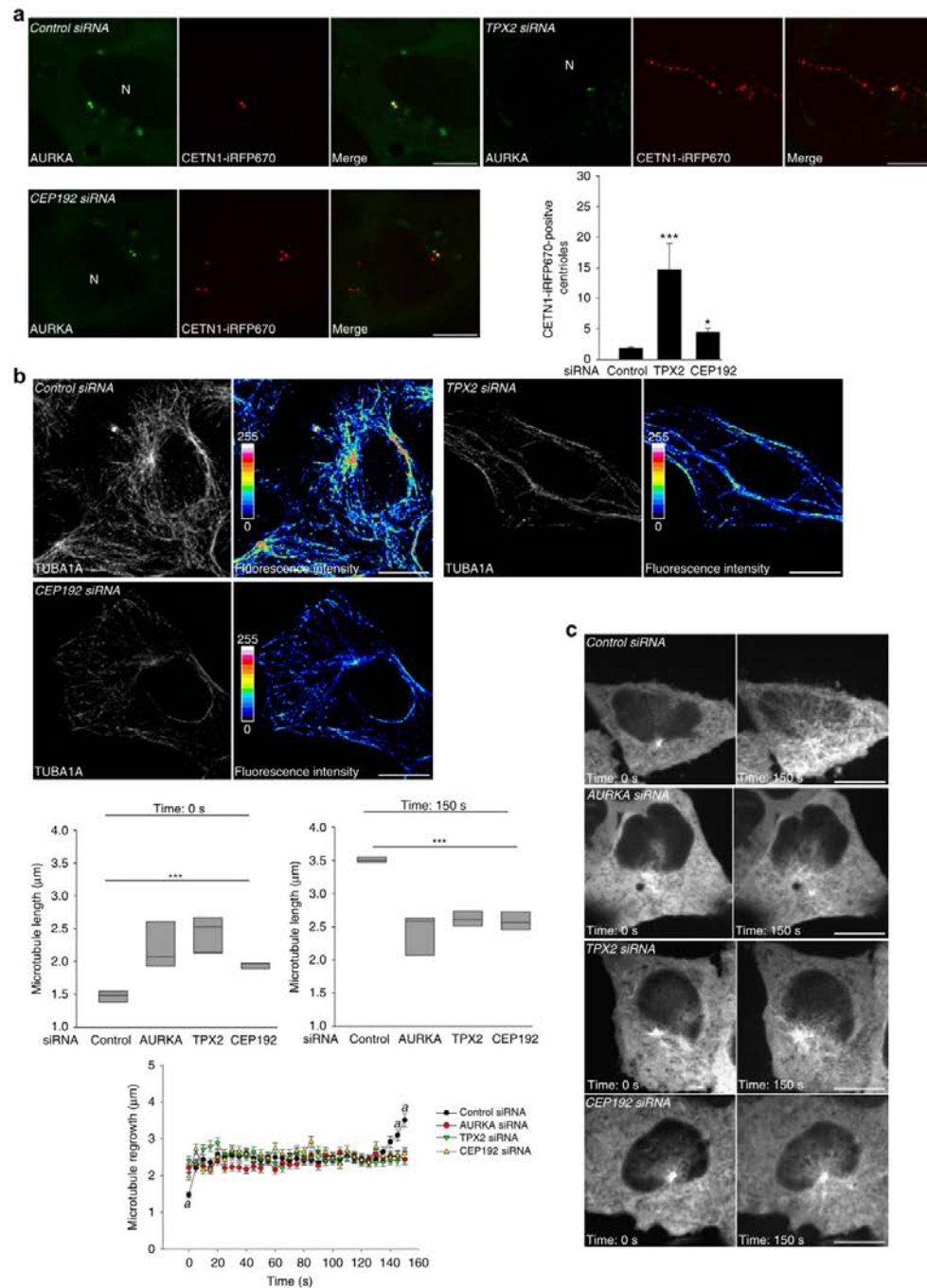


Figure 7 | Microtubule dynamics of G1 cells is altered in the absence of TPX2 or CEP192. (a) Representative immunofluorescence micrographs and corresponding quantification of centriole amplification in GFP-AURKA-mCherry cells depleted for TPX2 or CEP192, and synchronized in G1. Centrioles were labelled with CETN1-iRFP670. $n = 30$ cells per condition from three independent experiments. (b) Immunofluorescence images of the TUBA1A network in cells transfected and synchronized as in a. The pseudocolour scale represents the measure of the intensity of the TUBA1A staining. (c) Representative time-lapse images and corresponding boxplots of the regrowth of the microtubule network at 0 and 150 s after nocodazole-mediated depolymerization in HeLa GFP-TUBA1A cells transfected with the indicated siRNAs. Line graph: complete time-lapse analysis of the microtubule regrowth. $n = 30$ cells per condition from three independent experiments. N, nucleus. Scale bar, 10 μm in a,b, 5 μm in c. Data represent means \pm s.e.m. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ against the 'control siRNA' condition in a,c, $^{\circ}P < 0.01$ against the corresponding time-points in all other conditions. Statistical tests: one-way ANOVA.

functions of mitotic kinases both in physiological and in pathological conditions.

Methods

Expression vectors and molecular cloning procedures. To express GFP-AURKA in bacteria, the coding sequence of EGFP was inserted between the BamHI/EcoRI sites of pET21a (Merck Millipore) and human AURKA between the SacI/SalI sites. For GFP-AURKA-mCherry, mCherry was cloned into the HindIII/XhoI sites in addition to the fragments used to build GFP-AURKA. For expression in mammalian cells, GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry constructs were amplified by PCR from the corresponding pET21a vectors and subcloned into a pEGFP-C1 vector backbone (Clontech), where the CMV promoter was substituted by the AURKA minimal promoter sequence (CTTCCGG) into the AseI/BspEI restriction sites and the AURKA cDNA was mutated to become resistant to the AURKA-specific siRNA, following an already published strategy³⁷. The AURKA Lys162Met variant was produced from pET21a GFP-AURKA-mCherry or from pEGFP-AURKA-mCherry by QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene) with the following primers: 5'-CAAGTTTATCTGGCTCTTATGGTGTATTAAAGCTCAGCT-3' (sense) and 5'-AGCTGAGCTTTAAATAACACCATTAAGAGCCAGAAATAAACTTG-3' (anti-sense). The plasmid encoding iRFP670 was obtained from Vladislav Verkhusha via Addgene and it has been previously described⁶⁷. The cDNA of human CETN1 was a kind gift of J. Pécreaux (University of Rennes 1) and it was subcloned into the HindIII/BamHI sites of pIRFP670-N1 to obtain CETN1-iRFP670. All cloning reactions were performed with the Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) and verified on a 3130 XL sequencer (Applied Biosystems).

Protein purification. Recombinant AURKA proteins for *in vitro* FLIM analyses and kinase assays were obtained by transforming BL21(DE3) *E. coli* strains (New England Biolabs) with pET21a GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry vectors. For protein production, bacteria were induced with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 20 °C, centrifuged at 4 °C for 20 min at 4,000g and lysed in 1% Triton X-100, 500 μ g ml⁻¹ lysozyme, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors (Complete Cocktail, Roche). Bacterial lysates were then sonicated, centrifuged at 4 °C for 45 min at 13,000g and supernatants were incubated with Nickel-chelating resin (ProBond, Thermo Fisher Scientific) for 1 h at 4 °C under gentle rotation. Proteins bound to the resin were washed and eluted following the manufacturer's instructions for the purification of proteins under native conditions, and were then resuspended in 50% glycerol for storage at -20 °C. Histone H3 bound to glutathione-S-transferase was purified by the Protein Purification and Analysis Platform of the University of Rennes 1.

***In vitro* FLIM and biochemical kinase assays.** FLIM analyses on purified proteins and biochemical *in vitro* kinase tests were performed following a similar protocol. Briefly, 10 pmol of purified histone H3 and/or 5 pmol of purified GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol and 0.01% Triton X-100. Where indicated, AURKA was dephosphorylated with 200 units of Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs) for 1 h, following the manufacturer's instructions. A unit of 100 μ M ATP (Euromedex) was added and samples were incubated as follows: 1 h at 30 °C or 20 min at 37 °C for FLIM; and 20 min at 37 °C for biochemical kinase assays. MLN8237 and MLN8054 were purchased from Selleck Chemicals and used at final concentration of 50 and 30 nM. Total protein fractions were obtained from cells lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, phosphatase inhibitors (0.2 mM Na₃VO₄, 4 mg ml⁻¹ NaF and 5.4 mg ml⁻¹ β -glycerophosphate) and protease inhibitors.

Western blot analyses. Samples obtained from kinase tests or total protein fractions were boiled in Laemli sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare) and analysed by western blotting. The following primary antibodies were used: monoclonal mouse anti-AURKA clone 35C1, 1:20 (ref. 68) or rabbit anti-AURKA pThr288 1:2,000 (Thermo Fisher Scientific, MA5-14904); and anti-Histone H3 pSer10, 1:10,000 (Merck Millipore, 06-570) or rat anti-TUBA1A clone YL1/2, 1:5,000 (EMD Millipore, MAB1864). Secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies anti-mouse or -rabbit were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (315-035-045 and 111-035-144), while anti-rat were purchased from Bethyl Laboratories (A110-105P). Membranes were incubated with commercially available (Pierce) or home-made enhanced chemiluminescence substrate composed of 100 mM Tris (pH 8.6), 13 mg ml⁻¹ coumaric acid (Sigma), 44 mg ml⁻¹ luminol (Sigma) and 3% hydrogen peroxide (Sigma). Chemiluminescence signals were captured on a film (CP-BU new, Agfa Healthcare) with a CURIX 60 developer (Agfa Healthcare). Uncropped scans of western blots are shown in Supplementary Fig. 5.

Cell culture and synchronization procedures. Mycoplasma-free U2OS cells (HTB-96) were purchased from American Type Culture Collection and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich)

supplemented with 10% fetal bovine serum (GE Healthcare), 1% L-glutamine (GE Healthcare) and 1% penicillin-streptomycin (GE Healthcare). GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry cells were generated by transfecting U2OS cells with the corresponding mammalian expression vector and in the presence of the X-tremeGENE HP transfection reagent (Roche), following the manufacturer's indications. Stable clones were selected in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin and 500 μ g ml⁻¹ geneticin (PAA). HeLa GFP-TUBA1A cells were a kind gift of C. Benaud (University of Rennes 1) and they were obtained by transfecting HeLa Kyoto cells with a plasmid encoding TUBA1A fused to GFP and in the presence of the jetPRIME transfection reagent (PolyPlus), according to the manufacturer's instructions. Stable clones were selected in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin and 500 μ g ml⁻¹ geneticin. For live microscopy, cells were incubated in phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Validated siRNA against TPX2 (SI02665082), CEP192 (SI04164279) and AllStars negative control (SI03650318) siRNA were purchased from Qiagen; the siRNA against AURKA was synthesized as previously described³⁷ (sequence: 5'-AUGCCUGUCUUACUGUCA-3') and purchased from Eurogentec. siRNAs were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) for transfections with siRNA only, or with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) for co-transfections with cDNA and siRNA, according to the manufacturer's instructions. GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry U2OS cells were synchronized as follows: the synchronization at the G0/G1 transition was obtained by serum deprivation for 72 h. Cells were allowed to re-enter G1 phase for 2 h in normal growth medium before analysis. For synchronization in S phase, cells were synchronized with 5 μ g ml⁻¹ aphidicolin (Sigma-Aldrich) for 18 h, followed by a 2 h washout in normal growth medium to re-enter S phase. Mitotic cells were obtained after synchronization at the G2/M transition with 100 ng ml⁻¹ nocodazole (Sigma-Aldrich) for 16 h. Cells were washed twice and incubated with prewarmed growth medium for 30 min to reach metaphase; FLIM, FRAP or flow cytometry analyses were performed after this stage. For microtubule regrowth assays, HeLa GFP TUBA1A cells were first synchronized in G1 as described above, then incubated on ice with 400 ng ml⁻¹ nocodazole for 20 min to induce TUBA1A depolymerization, quickly rinsed and imaged. MLN8237 was purchased from Selleck Chemicals and used at final concentration of 250 μ M; cells were incubated with MLN8237 for 10 min before imaging. All live microscopy experiments were performed at 37 °C in Nunc Lab-Tek II Chamber slides (Thermo Fisher Scientific).

Immunocytochemistry. Cells were fixed 24 h after transfection with ice-cold methanol or with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) where indicated, stained with standard immunocytochemical procedures and mounted in ProLong Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific). The antibodies used were as follows: primary monoclonal mouse anti-TUBG1 clone GTU88, 1:1,000 (Sigma Aldrich T6557) or rat anti-TUBA1A clone YL1/2, 1:1,000 (EMD Millipore, MAB1864); and secondary anti-mouse or anti-rat antibodies conjugated to Alexa 555 or Alexa 488, 1:5,000 (Thermo Fisher Scientific, A21434 and A11029, respectively). Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate was purchased from Thermo Fisher Scientific and used at a concentration of 2 μ g ml⁻¹. FUCCI Cell Cycle Sensor (BacMam 2.0) was purchased from Thermo Fisher Scientific and GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry cells were transfected according to the manufacturer's instructions.

Widefield and confocal microscopy. FUCCI transduction efficiency and cells displaying spindle poles abnormalities were scored with a DMRXA2 microscope (Leica), equipped with a $\times 63$ oil immersion objective (numerical aperture (NA) 1.32) and driven by the MetaVue software (Molecular Devices). Multicolour images were taken with a Leica SP8 inverted confocal microscope (Leica) and a $\times 63$ oil immersion objective (NA 1.4), driven by the LAS software. CETN1-iRFP670 spots were quantified with the Analyse Particles plugin of the ImageJ software.

FLIM microscopy. FLIM analyses were performed with a time-gated custom-built system attached to a Leica DMI6000 microscope (Leica) with a CSU-X1 spinning disk module (Yokogawa) and a $\times 63$ oil immersion objective (NA 1.4), a picosecond pulsed supercontinuum white laser at 40 MHz frequency (Fianium), and a High-Rate Intensifier (LaVision) coupled to a CoolSNAP HQ2 charge-coupled device camera (Roper Scientific). Fluorescence excitation was selected at 480 ± 10 nm using a home-made wavelength selector. Fluorescence emission was selected with a band-pass filter (500–550 nm) (Semrock). To calculate fluorescence lifetime, five temporal gates with a step of 2 ns each allowed the sequential acquisition of five images covering a total delay time spanning from 0 to 10 ns (refs 24,69). The five images were used to calculate the pixel-by-pixel mean fluorescence lifetime according to the following equation: $\tau = \sum \Delta t_i \cdot I_i / \sum I_i$, where Δt_i corresponds to the delay time after a laser pulse of the i th image acquired and I_i indicates the pixel-by-pixel fluorescence intensity in each image^{24,69}. Lifetime measurements and calculations were performed with a custom-built programme running inside the MetaMorph software (Molecular Devices). Lifetime was calculated only when pixel-by-pixel fluorescence intensity in the first gate was above 3,000 grey levels.

Fluorescence recovery after photobleaching. FRAP analyses were performed on a Leica SP8 inverted confocal microscope with a $\times 63$ oil immersion objective (NA 1.4) and using the Leica Acquisition Suite (LAS) software. A region of interest was photobleached with a 488 nm argon laser for 20 ms at maximum power. Fluorescence intensity images were taken before and after photobleaching with the same excitation wavelength; fluorescence recovery in the region of interest was followed until it reached a plateau (75 s) and a total of 40 frames were recorded every 500 ms (15 frames), 1 s (15 frames) and 5 s (10 frames). The ImageJ software (NIH) was used to measure fluorescence intensities. At least 30 images per condition were acquired and normalized as previously described⁷⁰.

Microtubule regrowth assays. Images of HeLa GFP-TUBA1A cells were taken with a Nikon Ti-E inverted confocal spinning disk microscope (CSU-X1 spinning disk head), a $\times 60$ oil immersion objective (NA 1.4) and a sCMOS ORCA Flash 4.0 camera (Hamamatsu). Images of microtubules were acquired with a 491 nm laser and a 500–550 nm band-pass emission filter every 5 s, using the MetaMorph software. The quantification of the maximal length of microtubules at each time point and within each cell was performed applying an automatic threshold over the microtubule area and using the Skeletonize plugin of the ImageJ software.

Flow cytometry. After phase-specific synchronization, GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry U2OS cells were resuspended in 70% methanol and incubated at -20°C for 20 min. Pellets were washed twice with PBS supplemented with 2 mM EDTA and centrifuged at 4°C for 5 min at $2,500g$ after each washing. Cells were then resuspended in PBS-EDTA supplemented with 10 mg ml^{-1} RNase A (Euromedex) and 1 mg ml^{-1} propidium iodide (Sigma Aldrich), incubated at room temperature for 20 min and the percentage of cells in each cell cycle phase was calculated with a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter).

Statistical analyses. Two-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey method were used to compare the effects of the recombinant protein used and the duration of the treatment on fluorescence lifetime (Figs 1b,c, 2a and 3a, and Supplementary Fig. 1b). Two-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to compare the effects of the type of the inhibitor used and the duration of the treatment on fluorescence lifetime (Fig. 2c), the effect of AURKA-siRNA in cells stably expressing GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry (Fig. 4a), the type fluorescent protein used in cells and the presence or absence of MLN8237 (Fig. 4c), the effect of AURKA-siRNA and the presence or absence of siRNA-resistant fluorescent AURKA (Fig. 4d), the effect of the fluorescent protein and the cell cycle phase on fluorescence lifetime (Fig. 5c), or the effect of the fluorescent protein and the presence or absence of MLN8237 (Fig. 6a). One-way ANOVA and the Holm-Sidak method were used to compare the effect of the indicated siRNAs on fluorescence lifetime (Fig. 6b,c) and on microtubule regrowth (Fig. 7c). One-way ANOVA on ranks and the Kruskal-Wallis methods were used to compare the fluorescence lifetime of GFP-AURKA-mCherry in the presence of increasing quantities of non-fluorescent AURKA (Fig. 3b), the effect of the Lys162Met mutation on fluorescence lifetime (Supplementary Fig. 2c), fluorescence intensity of GFP-AURKA-mCherry in cells synchronized in the indicated cell cycle phases (Fig. 5b), the rate of fluorescence recovery after photobleaching in synchronized cells (Fig. 5d,e) or after depletion of TPX2 or CEP192 by siRNA (Supplementary Fig. 4a,b), and the number of CETN1-iRFP670 spots after depletion of TPX2 or CEP192 by siRNA (Fig. 7a). The Student's *t*-test was used to analyse the effect of the fluorescent protein in each subcellular compartment analysed (Fig. 4b). Alpha for statistical tests used in this study was equal to 0.05.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on request.

References

- Wang, G., Jiang, Q. & Zhang, C. The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* **127**, 4111–4122 (2014).
- Malumbres, M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol. Rev.* **91**, 973–1007 (2011).
- Nikonova, A. S., Satsurov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack, R. L. & Golemis, E. A. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 661–687 (2013).
- Bischoff, J. R. *et al.* A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* **17**, 3052–3065 (1998).
- Zhou, H. *et al.* Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* **20**, 189–193 (1998).
- Cheatham, G. M. T. Crystal structure of Aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 42419–42422 (2002).
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. & Conti, E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol. Cell* **12**, 851–862 (2003).
- Zhang, Y. *et al.* Identification of the auto-inhibitory domains of Aurora-A kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 347–352 (2007).
- Kufer, T. A. *et al.* Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* **158**, 617–623 (2002).
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G. & Maller, J. L. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr. Biol.* **13**, 691–697 (2003).
- Brunet, S. *et al.* Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in xenopus egg extracts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5318–5328 (2004).
- Satinover, D. L., Leach, C. A., Stukenberg, P. T. & Brautigan, D. L. Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 8625–8630 (2004).
- Nowakowski, J. *et al.* Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure* **10**, 1659–1667 (2002).
- Fukuda, T., Mishina, Y., Walker, M. P. & DiAugustine, R. P. Conditional transgenic system for mouse Aurora A kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5270–5281 (2005).
- Zorba, A. *et al.* Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. *Elife* **3**, e02667 (2014).
- Honda, K. *et al.* Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **19**, 2812–2819 (2000).
- Klotzbucher, A., Pascreau, G., Prigent, C. & Arlot-Bonnemains, Y. A method for analyzing the ubiquitination and degradation of Aurora-A. *Biol. Proced. Online* **4**, 62–69 (2002).
- Littlepage, L. E. & Ruderman, J. V. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* **16**, 2274–2285 (2002).
- Aoki, K., Kamioka, Y. & Matsuda, M. Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from *in vitro* to *in vivo*: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev. Growth Differ.* **55**, 515–522 (2013).
- Gheghiani, L. & Gavet, O. Deciphering the spatio-temporal regulation of entry and progression through mitosis. *Biotechnol. J.* **9**, 213–223 (2014).
- Giubertini, M. *et al.* Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J. Cell Sci.* **124**, 113–122 (2011).
- Joukov, V., Walter, J. C. & De Nicolo, A. The Cep192-organized Aurora A-Plk1 cascade is essential for centrosome cycle and bipolar spindle assembly. *Mol. Cell* **55**, 578–591 (2014).
- Bayliss, R., Fry, A., Haq, T. & Yeoh, S. On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol.* **2**, 120136 (2012).
- Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisans, 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).
- Padilla-Parra, S. & Tramier, M. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays* **34**, 369–376 (2012).
- Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J. & Brown, C. M. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* **8**, 265–281 (2013).
- Esposito, A. & Wouters, F. S. Fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **25**, 4.14.1–4.14.30 (2004).
- Padilla-Parra, S. *et al.* Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition. *Biophys. J.* **97**, 2368–2376 (2009).
- Haydon, C. E. *et al.* Identification of novel phosphorylation sites on Xenopus laevis Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1055–1067 (2003).
- Scrittore, L. *et al.* pEg2 Aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J. Biol. Chem.* **276**, 30002–30010 (2001).
- Katayama, H. *et al.* Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat. Genet.* **36**, 55–62 (2004).
- Manfredi, M. G. *et al.* Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 4106–4111 (2007).
- Görgün, G. *et al.* A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* **115**, 5202–5213 (2010).
- Marumoto, T. *et al.* Aurora-A Kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 51786–51795 (2003).
- De Luca, M. *et al.* Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene* **27**, 6539–6549 (2008).
- Asteriti, I. A., Giubertini, M., Lavia, P. & Guarguaglini, G. Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol. Cancer* **10**, 131 (2011).
- Reboutier, D. *et al.* Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J. Cell Biol.* **201**, 65–79 (2013).

38. Goepfert, T. M. *et al.* Centrosome amplification and overexpression of Aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **62**, 4115–4122 (2002).
39. Tanaka, M. *et al.* Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J. Biol. Chem.* **277**, 10719–10726 (2002).
40. Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. & Venkitaraman, A. R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51–62 (2003).
41. Dutertre, S. *et al.* Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2–M transition. *J. Cell Sci.* **117**, 2523–2531 (2004).
42. Marumoto, T. *et al.* Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* **7**, 1173–1182 (2002).
43. Lawo, S., Hasegan, M., Gupta, G. D. & Pelletier, L. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1148–1158 (2012).
44. Park, S.-Y. *et al.* Molecular basis for unidirectional scaffold switching of human Plk4 in centriole biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 696–703 (2014).
45. Karna, P. *et al.* A novel microtubule-modulating noscapinoid triggers apoptosis by inducing spindle multipolarity via centrosome amplification and declustering. *Cell Death Differ.* **18**, 632–644 (2011).
46. Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S. C., Guerrero, A. & Bettencourt-Dias, M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 433–452 (2014).
47. Bird, A. W. & Hyman, A. A. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J. Cell Biol.* **182**, 289–300 (2008).
48. Hégarat, N. *et al.* Aurora A and Aurora B jointly coordinate chromosome segregation and anaphase microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **195**, 1103–1113 (2011).
49. Ertych, N. *et al.* Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 779–791 (2014).
50. Fuller, B. G. *et al.* Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* **453**, 1132–1136 (2008).
51. Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J. M., Lampson, M. A. & Lens, S. M. A. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**, 1350–1353 (2009).
52. Gavet, O. & Pines, J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* **189**, 247–259 (2010).
53. Liu, D., Davydenko, O. & Lampson, M. A. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore–microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* **198**, 491–499 (2012).
54. Goedhart, J. & Gadella, T. W. J. Fluorescence resonance energy transfer imaging of PKC signalling in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *J. R. Soc. Interface* **6**, S27–S34 (2009).
55. Le Page, Y., Chartrain, I., Badouel, C. & Tassan, J.-P. A functional analysis of MELK in cell division reveals a transition in the mode of cytokinesis during *Xenopus* development. *J. Cell Sci.* **124**, 958–968 (2011).
56. Dodson, C. A., Yeoh, S., Haq, T. & Bayliss, R. A kinetic test characterizes kinase intramolecular and intermolecular autophosphorylation mechanisms. *Sci. Signal.* **6**, ra54–ra54 (2013).
57. Tyler, R. K., Shpiro, N., Marquez, R. & Evers, P. A. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. *Cell Cycle* **6**, 2846–2854 (2007).
58. Scutt, P. J. *et al.* Discovery and exploitation of inhibitor-resistant Aurora and Polo kinase mutants for the analysis of mitotic networks. *J. Biol. Chem.* **284**, 15880–15893 (2009).
59. Zeng, K., Bastos, R. N., Barr, F. A. & Gruneberg, U. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J. Cell Biol.* **191**, 1315–1332 (2010).
60. Marumoto, T., Zhang, D. & Saya, H. Aurora-A—a guardian of poles. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 42–50 (2005).
61. Pugacheva, E. N. & Golemis, E. A. The focal adhesion scaffolding protein HEP1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* **7**, 937–946 (2005).
62. Inoko, A. *et al.* Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* **197**, 391–405 (2012).
63. Lentini, L., Iovino, F., Amato, A. & Di Leonardo, A. Centrosome amplification induced by hydroxyurea leads to aneuploidy in pRB deficient human and mouse fibroblasts. *Cancer Lett.* **238**, 153–160 (2006).
64. Quintyne, N. J., Reing, J. E., Hoffelder, D. R., Gollin, S. M. & Saunders, W. S. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* **307**, 127–129 (2005).
65. Basto, R. *et al.* Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* **133**, 1032–1042 (2008).
66. Kwon, M. *et al.* Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev.* **22**, 2189–2203 (2008).
67. Shcherbakova, D. M. & Verkhusha, V. V. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods* **10**, 751–754 (2013).
68. Cremet, J. Y., Descamps, S., Vélite, F., Martin, A. & Prigent, C. Preparation and characterization of a human aurora-A kinase monoclonal antibody. *Mol. Cell. Biochem.* **243**, 123–131 (2003).
69. Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L. & Tramier, M. Spatio-temporal quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods [corrected]. *PLoS ONE* **8**, e69335 (2013).
70. Bancaud, A., Huet, S., Rabut, G. & Ellenberg, J. Fluorescence perturbation techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, photoactivation, photoconversion, and FLIP. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, 1303–1324 (2010).

Acknowledgements

We thank S. Huet and T. Lebeaupin for helpful advice on FRAP experiments and their analysis, N. Mohamed for technical assistance, C. Benaud for providing HeLa GFP-TUBA1A cells together with X. Pinson, S. Le Bras, G. Rabut, E. Watrin and R. Le Borgne for helpful discussions. We are grateful to S. Prigent for valuable help in the analysis of microtubule regrowth and in macro designing, all the members of the Microscopy-Rennes Imaging Center (Biologie, Santé, Innovation Technologique, BIOSIT, Rennes, France), and Gersende Lacombe and Laurent Deleurme from the Flow cytometry and Cell Sorting platform (BIOSIT, Rennes, France) for assistance. This work was supported by Comité Nationale de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-0023 KinBioFRET to C.P. and M.T.), by the Ligue Contre le Cancer Comité d'Ille et Vilaine, Comité du Maine et Loire et Comité de la Sarthe to M.T. and Equipe Labélisée 2014–2016 for D.R. and C.P., and by the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA) and Rennes Métropole for the development of the technology for rapid FLIM measurements. G.B. was supported by a fellowship from Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer.

Author contributions

G.B. designed, performed and analysed the experiments and wrote the manuscript; F.S. performed and analysed the experiments; G.H. created the AURKA biosensor and performed essential preliminary experiments; D.R. and C.P. shared vectors, compounds and protocols and provided advice; M.T. supervised and coordinated the work and provided funding.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://ngp.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Bertolin, G. *et al.* A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nat. Commun.* **7**:12674 doi: 10.1038/ncomms12674 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

II) Mise en place d'un système de criblage du biosenseur d'activité kinase d'Aurora A

La combinaison du biosenseur d'activité kinase d'Aurora A ainsi que du microscope fastFLIM permet de mesurer l'activité de la kinase in cellulo. Toutefois, cette méthodologie n'était adaptée qu'à une prise d'acquisitions « à la main » où l'utilisateur devait rechercher ses cellules et faire lui-même l'acquisition. Le développement d'une méthodologie automatisée est nécessaire en vue de pouvoir faire du criblage de l'activité kinase du biosenseur d'Aurora. Le but de ce projet est de pouvoir effectuer un criblage automatisé du biosenseur dans un format d'une plaque 96 puits.

1) Adaptation du protocole d'acquisition pour du criblage

Une première étape a consisté à ne plus utiliser de cellules vivantes au moment de l'acquisition. Chaque acquisition requiert la prise de cinq images, chacune correspondant à une porte temporelle, afin de calculer la durée de vie de fluorescence. En moyenne, la durée d'exposition d'une seule image est entre 700ms et 900ms, temps qu'il faut donc multiplier par cinq pour obtenir le temps d'une image de FLIM. A raison de plusieurs dizaines d'acquisitions par puit, et de 96 puits, on peut estimer la durée d'un criblage complet à un minimum de plusieurs heures. Cela pose une limitation à l'utilisation de cellules vivantes car l'étude de l'activité d'Aurora A se fait au cours de la mitose et sa durée dans les cellules U2OS est inférieure à 1h (Brito and Rieder, 2009). L'utilisation des cellules vivantes entrainerait une perte de l'efficacité de synchronisation en mitose ainsi que de la perte de l'homogénéité de cycle des cellules entre les puits. Pour remédier à cela, le recours à la fixation avec de la paraformaldéhyde (PFA) des cellules a été utilisé. La PFA permet de créer des liaisons covalentes entre les protéines et ainsi de maintenir la structure de l'ensemble des éléments. Une fois fixées, les cellules sont donc figées et ne sont plus vivantes. Il était important de vérifier que la fixation des cellules avec de la PFA n'empêchait pas la mesure de FRET du biosenseur Aurora A. Pour cela, la mesure de durée de vie de fluorescence de la GFP a été mesurée au sein du biosenseur GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry exprimé dans des cellules vivantes synchronisées en mitoses ou dans des cellules fixées après synchronisation en mitose (Fig 54).

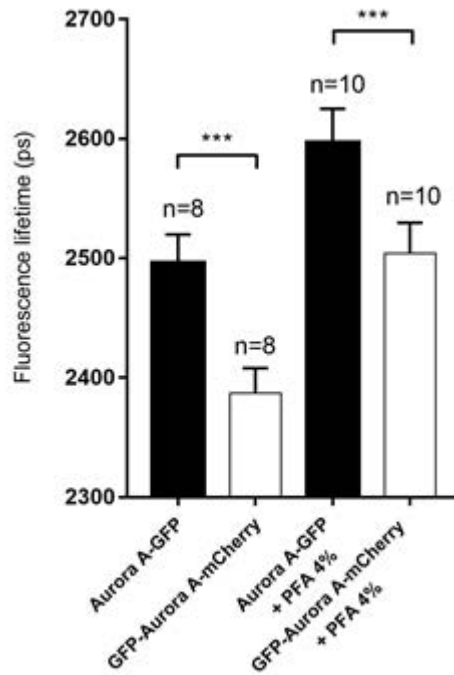


Fig 54. Effet de la fixation par PFA sur la mesure de FRET du biosenseur Aurora A

Le graphique montre les valeurs de durée de vie de fluorescence de lignées U2OS stables exprimant GFP-Aurora A ou GFP-Aurora A-mCherry après synchronisation en mitose et avec ou sans traitement par PFA 4%. Test statistique Mann-Whitney *** p-value<0.001

On peut constater que la fixation au PFA entraîne une augmentation d'environ 100ps de la durée de vie de fluorescence. Toutefois cette augmentation est la même pour GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-mCherry, et il est toujours possible de mesurer l'écart de 100 ps entre GFP-Aurora et GFP-Aurora A-mCherry. La fixation par PFA n'empêche pas de mesurer le FRET du biosenseur et peut être utilisée après la synchronisation en mitose ou bien après traitements par les molécules du crible.

Jusqu'à maintenant, les acquisitions étaient faites à l'aide d'un objectif 63x à immersion à huile. Comme le système dispose aussi d'une bague de grossissement 2x, le champ de vision d'une acquisition est relativement réduit, et dans la plupart des cas une seule cellule peut être visible pour une image de FLIM. Cette configuration convient pour l'acquisition de quelques cellules « à la main » mais devient une limitation dans le cadre d'un criblage automatisé car elle fait drastiquement augmenter le nombre d'images à acquérir afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules. L'utilisation d'un objectif 20x multi-immersions a été préférée et il a fallu une nouvelle fois vérifier que la mesure de FRET était toujours possible dans ces conditions (Fig 55).

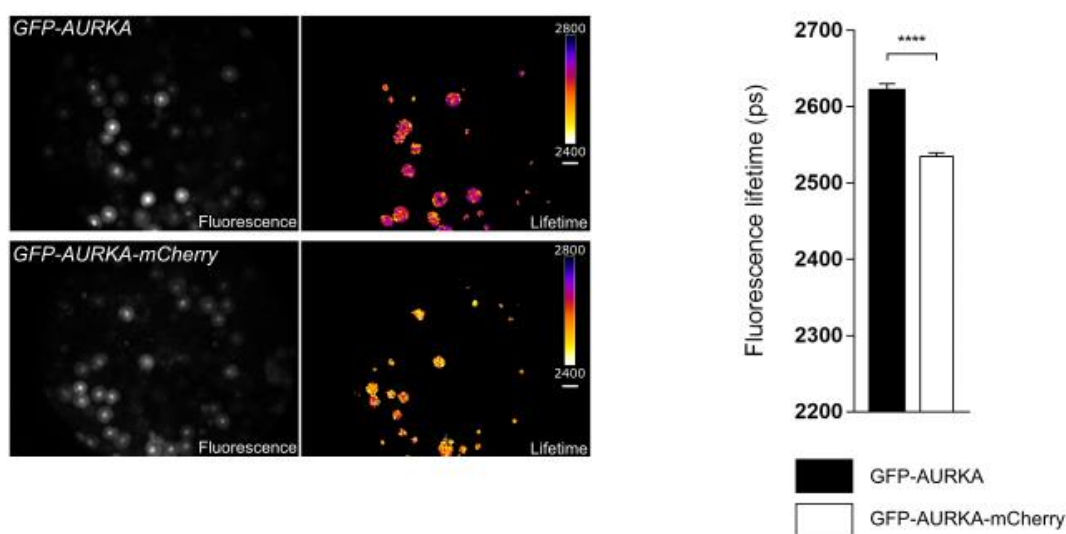


Fig 55. Mesure du FRET du biosenseur Aurora A avec un objectif 20x

(A gauche) Images montrant les mesures de durée de vie de fluorescence de cellules U2OS exprimant GFP-Aurora A ou GFP-Aurora A-mCherry avec un objectif 20x. (A droite) Graphique représentant les valeurs de durée de fluorescence correspondantes. Test statistique Mann-Whitney *** $p < 0.001$ $n = 20-30$ cellules

On peut voir que l'utilisation d'un objectif 20x permet d'acquérir plusieurs cellules, jusqu'à plus d'une dizaine, pour un seul champ de vision. De plus, malgré une perte en résolution, les mesures de durée de vie de fluorescence montrent qu'il est toujours possible de mesurer du FRET dans ces conditions. L'avantage de cet objectif est de pouvoir utiliser l'immersion à eau plutôt qu'à huile. Dans le cadre d'un criblage, de nombreux mouvements de la platine supportant la plaque 96 puits vont se produire. Ces déplacements entraînent le mouvement de l'huile située entre l'objectif et la plaque ce qui crée un front de changement d'indice. À cause de la viscosité de l'huile, ce front met plus de temps à disparaître que le temps pris par le déplacement de la platine entre deux acquisitions. Cela empêche une acquisition correcte car le front crée une aberration dans l'image. L'usage d'un objectif à immersion à eau résout ce problème mais requiert un apport d'eau continue sur l'objectif pour contrebalancer l'évaporation qui n'est pas négligeable sur plusieurs heures. Pour cela, il est possible d'utiliser un dispositif d'approvisionnement automatique d'eau (Fig 56). Celui-ci est constitué d'un couvercle qui se place au-dessus de l'objectif et relié par un tuyau au réservoir d'eau. Le réservoir est relié à un système de pompe qui permet de régler les paramètres de volume et de fréquence de distribution d'eau.



Fig 56. Image représentant le système d’approvisionnement automatique en eau.

2) Intégration de nouveaux modules pour une acquisition en 96 puits

La mise en place du criblage nécessite de pouvoir automatiser la prise d’acquisitions par le fast-FLIM. Celui-ci doit être capable 1) de se déplacer de positions en positions au sein d’un même puits sans en sortir, 2) de se déplacer dans le puits suivant et d’y effectuer à nouveaux plusieurs acquisitions à différentes positions. La première version du fastFLIM fonctionnait grâce au logiciel Flimager qui était codé sous Metamorph. Ce travail a été effectué en collaboration avec Gilles Le Marchand, assistant ingénieur dans l’équipe qui s’occupait de l’aspect programmation sous Metamorph en se basant sur le cahier des charges que j’avais établi.

Par la suite, l’ensemble de ces fonctionnalités a pu être intégré dans la nouvelle version développée par Inscoper (Fig 57).

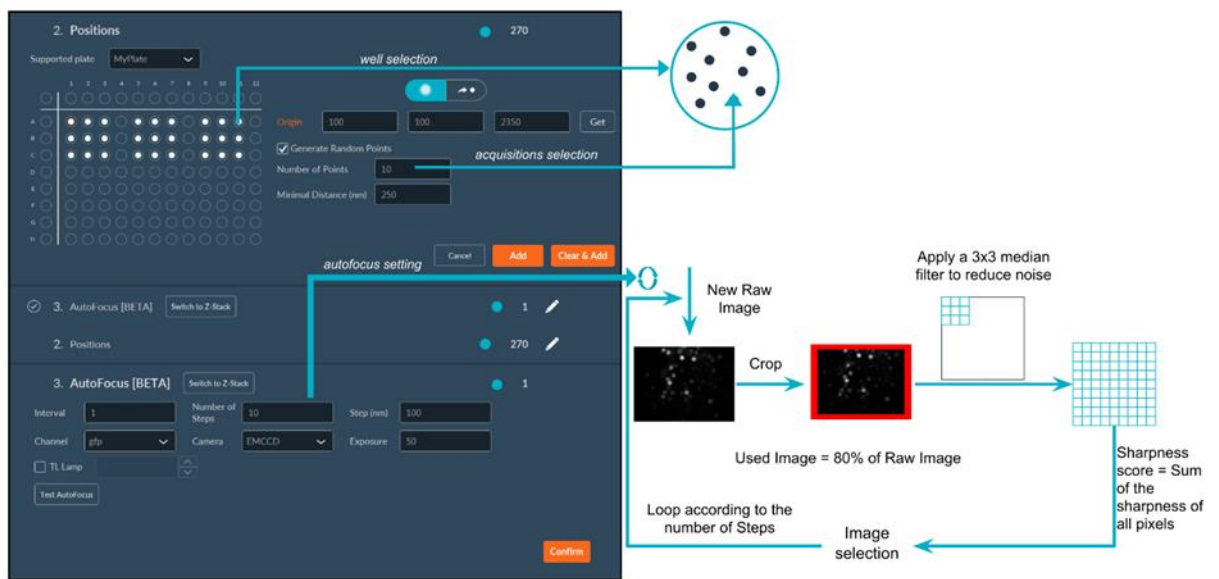


Fig 57. Schema représentant le principe de fonctionnement des modules d'acquisition multi-puit et d'autofocus du fastFLIM

Image du logiciel Inscoper permettant de choisir les paramètres de multi-puits et d'autofocus. L'utilisateur peut choisir les puits qu'il souhaite cribler et le nombre d'acquisitions dans chaque puit. Les positions de chaque puit seront ensuite aléatoirement générées. L'utilisateur peut aussi choisir les paramètres d'autofocus comme l'excitation, le temps d'exposition, le nombre de stacks et le pas entre chaque stack. Un score de netteté est attribué à chaque stack afin de trouver le meilleur focus pour faire l'acquisition d'image de FLIM.

Dans un premier temps, il a fallu déterminer les caractéristiques d'une plaque 96 puits telles que longueur, largeur, taille des puits et la distance entre le milieu de chaque puit. Au niveau du logiciel, chaque utilisateur peut choisir l'ensemble des puits ou bien définir le nombre et la position des puits qu'il souhaite parcourir. Au sein de chaque puit, il est possible de choisir un nombre d'acquisition. Les positions de ces acquisitions sont calculées de façon aléatoire à chaque puit. Chaque position est espacée de plus de $250\mu\text{m}$ afin d'éviter un chevauchement des champs de vision.

Dans un second temps, il a fallu implémenter un module d'autofocus. Cet outil est nécessaire dans la plupart des systèmes de criblage utilisant un microscope. Avec le modèle biologique de la kinase Aurora A, le focus souhaité pour les acquisitions est au niveau de la plaque métaphasique. La fenêtre spatiale de ce focus n'est que de quelques μm et en dehors de cette fenêtre, les images ne sont plus analysables. Les plaques 96 puits ne sont jamais parfaitement plates et un léger décalage peut aussi provenir du système de platine. En prenant en compte l'ensemble des mouvements au cours d'un criblage, il est peu probable que le focus soit toujours maintenu. Sur ce système, le simple déplacement de la platine d'un puit au puit suivant peut suffire à perdre le focus. L'autofocus est un système qui permet de rechercher le focus idéal

avant l'acquisition. Deux stratégies principales existent pour l'autofocus (Bathe-Peters et al., 2018). La première consiste à utiliser la réflexion du laser sur le fond de la lame ou de la plaque afin d'en déterminer la position en z. Il suffit ensuite d'ajouter une distance fixe entre cette position et celle du focus des échantillons observés. Toutefois, il faut être certain que cette distance soit toujours la même. La deuxième stratégie consiste à se positionner sur un z standard puis de prendre un certain nombre d'images au-dessus et en dessous de ce plan. L'étude de la variation d'intensité selon les plans permet de déterminer le focus idéal. Pour cela il existe plusieurs algorithmes de calcul qui changeront selon les échantillons observés (Qiu et al., 2013). Cette stratégie est plus lente car elle requiert de prendre plusieurs images mais elle sera plus robuste. L'autofocus du fastFLIM utilise la deuxième stratégie. Pour chaque image d'intensité prise en dessous et au-dessus du z de référence, un filtre médian est appliqué par 3x3 pixels afin de réduire le bruit de fond. Un score de netteté est ensuite calculé pour chaque image, l'image ayant le score le plus grand correspondra au focus recherché.

Le module d'autofocus donne la possibilité de choisir un laser d'excitation, un temps d'exposition et une DO différents de ce qui est utilisé pour l'acquisition. Dans un premier temps, l'idée était d'utiliser l'autofocus dans une longueur d'onde éloignée de la GFP et de la mCherry afin de ne pas perturber leurs propriétés et d'altérer la mesure de FRET. Des plasmides codant pour H2B-IRFP 670 ou centrin-IRFP 670 étaient disponibles. H2B est une histone située au niveau des chromosomes et la centrine est un composant des centrosomes. L'IRFP 670 est un fluorophore dont le spectre d'excitation pouvait être assez éloigné de celui de la GFP et de la mcherry (Fig 58).

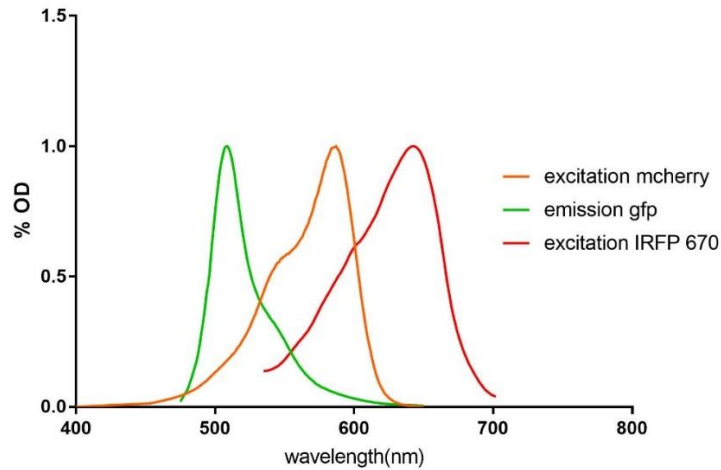


Fig 58. Schéma représentant le spectre d'émission de la GFP et les spectres d'excitation de la mCherry et de l'IRFP 670

Cependant, la transfection des lignées stables U2OS avec l'un de ces plasmides s'est avérée peu concluante. Le taux de transfection de ces lignées stables est très faible ce qui rend difficile leur utilisation pour l'autofocus. De plus la transfection transitoire de cellules U2OS sauvages fait parfois apparaître des artefacts visibles dans le canal vert qui est celui utilisé pour mesurer la durée de vie de fluorescence de la GFP (fig 59).

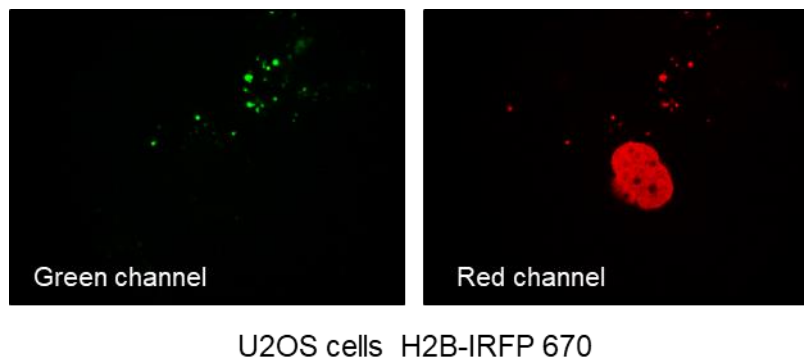


Fig 59. Image de cellules U2OS transfectées avec H2B-IRFP670

Pour ces raisons, l'autofocus utilisera le canal de la GFP. Pour cela, il faut vérifier que cette utilisation n'interfère pas avec la mesure de FRET. Le principal risque est celui de photoblanchiment qui consiste en la perte irréversible d'un fluorophore à être excité à nouveau, ce qui peut arriver si les niveaux d'excitation reçus sont trop élevés. Il est possible de déterminer

ce photoblanchiment en faisant un nombre élevé d'acquisitions à des temps d'exposition élevés, environ 3s pour une image de FLIM (fig 60).

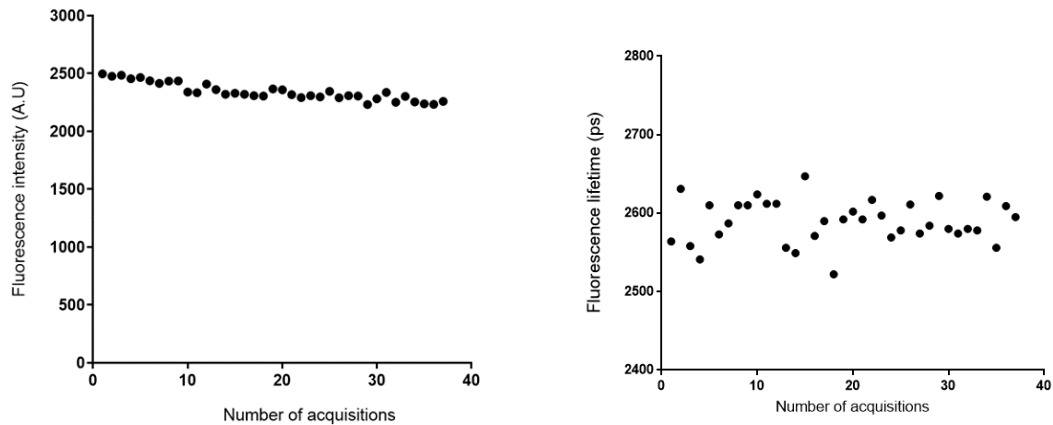


Fig 60. Estimation du photoblanchiment de la GFP au sein du biosenseur Aurora A

(A gauche) Graphique représentant l'intensité moyenne de l'image d'une cellule U2OS exprimant le biosenseur GFP-Aurora A au cours de plusieurs acquisitions à 700ms par porte temporelle. (A droite) Graphique représentant la durée de vie de fluorescence correspondante.

On voit ici que le photoblanchiment est de l'ordre de 10% avec une excitation élevée de la GFP ce qui est assez faible. De plus, les mesures de durée de vie de fluorescence ne varient pas significativement. Comme il est possible de choisir le temps d'exposition pour l'autofocus, une durée de 100ms par image est suffisante pour déterminer le bon focus dans la plupart des cas. Cette durée permet de penser raisonnablement que le photoblanchiment peut être négligé. Une dernière vérification peut être effectuée en comparant les valeurs de durée de vie de fluorescence avec ou sans utilisation de l'autofocus avec ces mêmes paramètres (Fig 61).

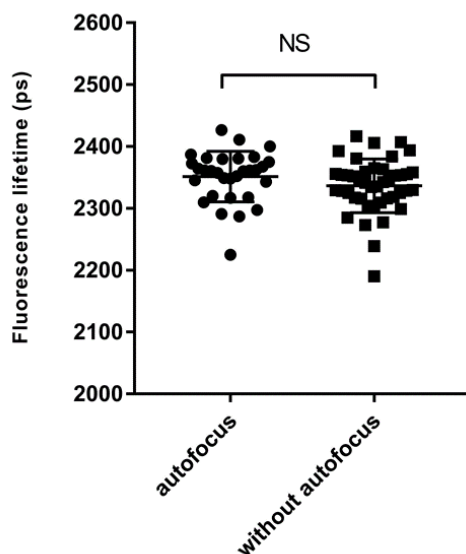


Fig 61. Effet de l'utilisation de l'autofocus avec la longueur d'onde d'excitation de la GFP.

Graphique représentant les mesures de durée de vie de fluorescence de cellules U2OS exprimant le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry après utilisation de l'autofocus dans le vert à faible exposition ou sans autofocus. Test statistique Mann-Whitney NS : non significatif.

On peut constater que l'utilisation de l'autofocus en utilisant la GFP n'altère pas sa durée de vie de fluorescence. C'est avec ces paramètres que l'autofocus sera utilisé pour le criblage automatisé.

3) Mise en place d'un pipe-line d'analyse des données

Lors d'acquisitions d'image de FLIM classique, c'est-à-dire l'acquisition d'une dizaine de cellule par condition, chaque image comprend les valeurs de durée de vie de fluorescence d'une seule cellule. Il est donc rapide d'extraire la moyenne de l'ensemble des valeurs pour chaque cellule. Toutefois, un criblage basé sur la microscopie génère des centaines voire des milliers d'images. Il est nécessaire de développer une stratégie d'analyse de ces images puisqu'il devient impossible de le faire « à la main ». Cette stratégie doit ainsi permettre l'automatisation de l'analyse de l'ensemble des images, ainsi que la possibilité de récupérer la moyenne de durée de vie de fluorescence pour chaque cellule. L'analyse des images se fait en utilisant le logiciel ImageJ/Fiji. Des macros peuvent être codées sous ce logiciel permettant d'accomplir automatiquement les tâches demandées. Une macro a été développée afin de répondre à ce besoin, son fonctionnement est expliqué en figure 62 et le code est consultable en Annexe. Sa première tâche est de calculer l'image de FLIM à partir du stack de cinq images correspondant

aux cinq portes temporelles qui a été acquis par le microscope. Cette tâche qui est un traitement post-acquisition peut être effectuée par le fastFLIM directement. Dans le cadre d'un criblage, il semblait intéressant de déporter cette fonctionnalité pour deux raisons. La première est que la possibilité de ne pas calculer le FLIM directement sur le microscope doit permettre au criblage de se faire plus rapidement. La deuxième raison est qu'elle permet de recalculer les images de FLIM en faisant varier des paramètres tels que le threshold, ou bien la taille des portes temporelles utilisées ou l'écart de temps entre chaque porte. La deuxième tâche consiste à pouvoir déterminer la valeur moyenne de durée de vie de fluorescence pour chaque cellule, avec des images qui peuvent contenir plusieurs cellules. Pour cela, la macro doit être en mesure de pouvoir segmenter les cellules. La segmentation se fait après un lissage de l'image d'intensité de fluorescence de la première porte temporelle en effectuant un flou gaussien puis en appliquant un threshold parmi plusieurs prédéfinis dans imageJ. Avec les cellules exprimant le biosenseur Aurora A et synchronisées en mitose, un flou gaussien comprenant une valeur de $\sigma=1$ et l'utilisation du threshold « Default » permettent une bonne segmentation des cellules. La segmentation crée des régions d'intérêts pour chaque cellule qui peuvent ensuite être appliqués sur les images de FLIM correspondantes. Cela permet ainsi pour chaque cellule de récupérer la moyenne de durée de vie de fluorescence de tous les pixels, ainsi que la déviation standard ou bien le nombre de pixels pris en compte.

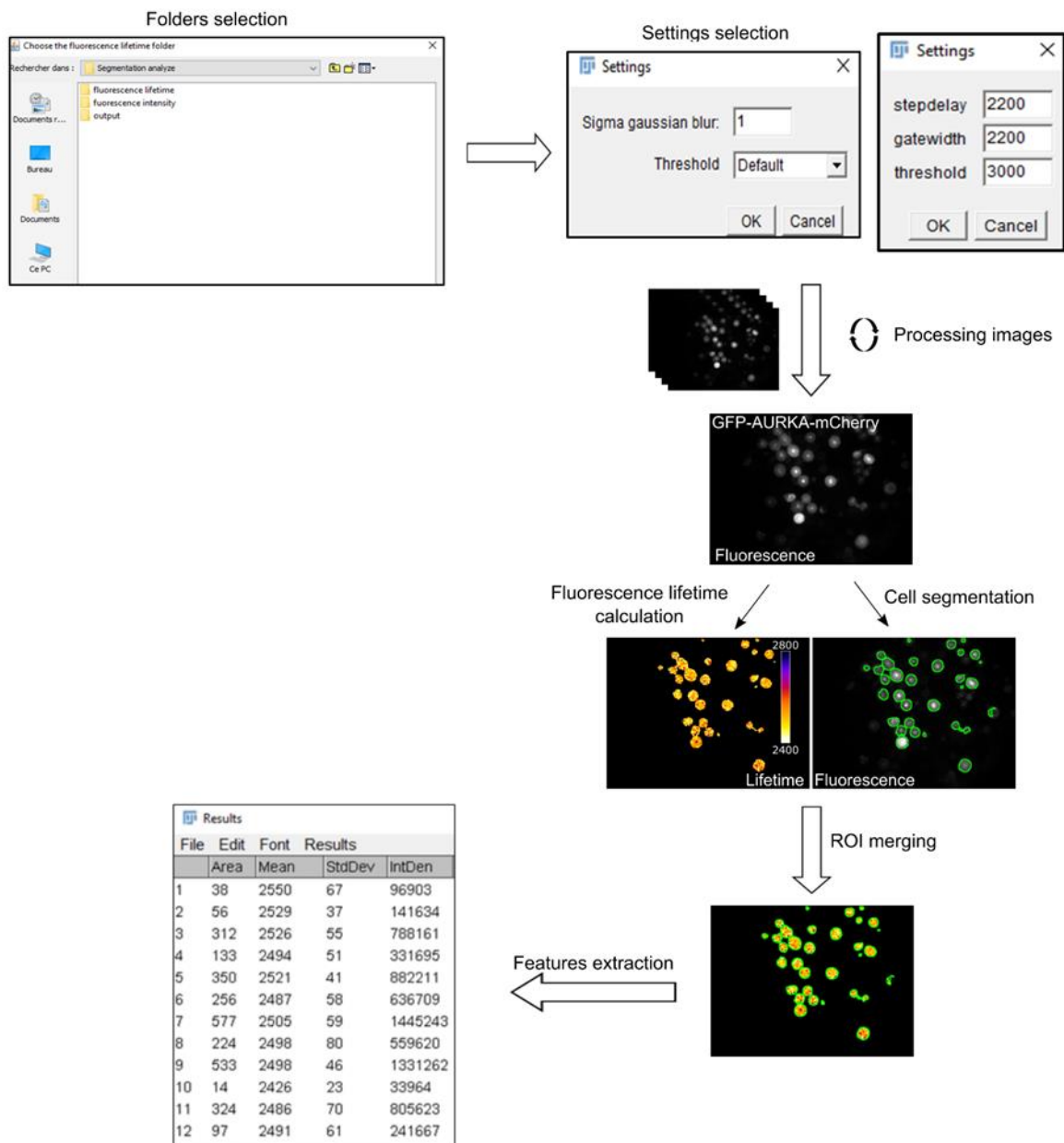


Fig 62. Mode de fonctionnement du pipe-line d’analyse automatisé des images du criblage.

L’utilisateur choisit le dossier contenant les images d’intensité de fluorescence puis le dossier où seront sauvegardées les images de FLIM et le dossier contenant les résultats de l’analyse. L’utilisateur choisit ensuite les paramètres pour la segmentation des cellules ainsi que les paramètres pour le calcul de l’image de FLIM. Pour chaque image d’intensité de fluorescence, une image de FLIM est calculée et les cellules sont segmentées. Les régions d’intérêts créées seront appliquées sur l’image de FLIM et ainsi pour chaque cellule il est possible de récupérer les informations telles que la moyenne de durée de vie de fluorescence, l’écart-type etc.

Lors du lancement de la macro, il est demandé à l’utilisateur d’indiquer le dossier contenant les images d’intensité de fluorescence, le dossier qui va contenir toutes les images de FLIM calculées et un dossier qui contiendra les images des cellules segmentées pour vérification ainsi

qu'un fichier de données utilisable sous Excel et contenant l'ensemble des données par cellule. Il est encore nécessaire de développer des macros sous Excel afin de pouvoir annoter chaque ligne correspondant à une cellule avec les puits mais aussi de pouvoir annoter selon les traitements ou molécules utilisés. A la fin, le fichier contient un nombre de lignes correspondant au nombre de cellules analysées avec pour chacune les valeurs des paramètres telles que moyenne de durée de vie de fluorescence, écart-type, nombre de pixels et les conditions telles que nature du biosenseur, numéro de puit, traitement.

4) Validation de la méthodologie de criblage

La présentation de l'ensemble de cette méthodologie ainsi que de sa validation fait l'objet de l'article intitulé : **Automated screening of AURKA activity based on a genetically encoded FRET biosensor using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy** (Sizaire et al) soumis dans le journal *Methods and Applications in Fluorescence*.

Cet article permet de présenter la méthodologie de criblage par FRET-FLIM en utilisant le biosenseur d'activité kinase d'Aurora A. Cette méthodologie s'appuie sur une collaboration avec la start-up Inscoper dont le boîtier qu'ils ont développé permet de contrôler l'ensemble des appareils et d'améliorer la vitesse globale des acquisitions et ainsi du criblage. La figure 5 de l'article donne un exemple de crible en utilisant des puits contenant des cellules exprimant le biosenseur GFP-Aurora A ou GFP-Aurora A-mCherry et montrant qu'il est possible de mesurer le FRET en utilisant un nombre important de données.

Automated screening of AURKA activity based on a genetically encoded FRET biosensor using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Florian Sizaire¹, Gilles Le Marchand¹, Jacques Pécréaux¹, Otmane Bouchareb² and Marc Tramier^{1, 3*}.

¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Genetics and Development Institute of Rennes), UMR 6290, F-35000 Rennes, France

² Inscoper F-35510 Cesson-Sévigné, France

³ Univ Rennes, BIOSIT, UMS CNRS 3480, US INSERM 018, F-35000 Rennes, France

* Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T. (Genetics and Development Institute of Rennes (IGDR), 2 avenue du Prof. Léon Bernard, 35043 Rennes, France; +33223235487; marc.tramier@univ-rennes1.fr)

Abstract

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) is a robust tool to measure Förster Resonance Energy Transfer (FRET) between two fluorescent proteins, mainly when using genetically-encoded FRET biosensors. It is then possible to monitor biological processes such as kinase activity with a good spatiotemporal resolution and accuracy. Therefore, it is of interest to improve this methodology for future high content screening purposes. We here implement a time-gated FLIM microscope that can image and quantify fluorescence lifetime with a higher speed than conventional techniques such as Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). We then improve our system to perform automatic screen analysis in a 96-well plate format. Moreover, we use a FRET biosensor of AURKA activity, a mitotic kinase involved in several epithelial cancers. Our results show that our system is suitable to measure FRET within our biosensor paving the way to the screening of novel compounds, potentially allowing to find new inhibitors of AURKA activity.

Keywords: fluorescence lifetime, FRET biosensor, screening, AURKA

Introduction

Since several years, FLIM has been widely used to measure the fluorescence lifetime of fluorescent proteins (Becker, 2012). It is an intrinsic parameter independent of concentration, which, however, depends on the environment of the fluorophore such as FRET, a non-radiative energy transfer from excited fluorescent donor dipole to a close acceptor dipole (<10nm). Given that, a decrease of the donor fluorescence lifetime is observed when FRET is present (Lakowicz, 2006) and lifetime is often used as a way to measure FRET. In this light, FRET-FLIM has been

widely used to investigate protein-protein interactions (Kenworthy, 2001; Padilla-Parra and Tramier, 2012), cleavage activity of proteases (Horton et al., 2007), protein oligomerization (Richert et al., 2015). Originally developed for calcium signalling (Miyawaki et al., 1997), genetically encoded-FRET biosensors have opened new perspectives in quantitative fluorescence microscopy. These biosensors are now powerful tools to investigate biological events in living cells (Hochreiter et al., 2015). In addition, the development of kinase FRET biosensors allowed to track the activity of kinases within living cells in time and space (Sizaire and Tramier, 2017; Zhang et al., 2001). High-content screening (HCS) is a widespread methodology to screen and design new inhibitors and it can be adapted to microscopy setups (Thomas, 2010). Its combination with FRET-FLIM seems to be a new promising methodology for pharmacological screenings (Guo et al., 2019). In this article, we present a novel pipeline, consisting of an automated FRET-FLIM microscope used to screen AURKA activity with a FRET biosensor. AURKA is a serine/threonine kinase and has been first described as a mitotic kinase in *Drosophila* (Glover et al., 1995). It plays several roles in cell division such as mitotic entry, maturation of centrosomes, assembly of the mitotic spindle and the midbody (Nikonova et al., 2013). AURKA is known to be an oncogene and is overexpressed in several epithelial cancers (Bischoff et al., 1998; Sen et al., 1997). Our team has developed a genetically encoded FRET biosensor of AURKA which consists of the whole kinase flanked by the GFP and mCherry fluorophores (Bertolin et al., 2016). We showed that the conformational change of the kinase, which is indicative of its activation, modifies the proximity between GFP and mCherry increasing FRET efficiency. This biosensor has been validated to be a suitable tool to find new non-mitotic roles of the kinase, particularly at mitochondria to control organelle dynamics and energy production (Bertolin et al., 2018). Thereby, in collaboration with Inscoper (www.inscoper.com), we have developed the control solution of our time-gated FLIM microscope (fastFLIM) (Leray et al. 2013). Finally, we present the optimization of this system to screen a 96-well plate with cells expressing the AURKA biosensor, together with the automated process to analyse data.

Material and Methods

Cell culture

U2OS cells free from mycoplasma were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, HTB-96) and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Thermo Fisher

Scientific), 1% L-glutamine (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin–streptomycin (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂. The generation of GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry stable cell lines were generated by transfecting U2OS cells with X-tremeGENE HP transfection reagent (Roche), following the manufacturer’s indications. Stable clones were selected in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin–streptomycin and 500 µg/ml Geneticin (Invivogen). Stable and transient transfections were performed with X-tremeGENE HP transfection reagent (Roche) according to the manufacturer’s instructions.

Cell preparation for microscopy

Mitotic cells were obtained after synchronisation at the G2/M transition with 100 ng/ml nocodazole (Sigma-Aldrich) for 16h at 37°C. Cells were washed twice with 1X PBS and incubated with prewarmed medium for 30 min to reach metaphase. Cells were washed with PBS 1 X and were fixed with paraformaldehyde 4% from paraformaldehyde 16% (Electron Microscopy Sciences) diluted in PBS for 15min. Cells were washed three times with 1X PBS and were kept in PBS at 4°C or directly used for microscopy. All microscopy experiments were performed in Nunc Lab-Tek II Chamber slides (Thermo Fisher Scientific) or in 96-well plate glass cover (Zell-kontak).

FLIM microscopy

The fastFLIM microscope is presented in details in Results section. Briefly, the time-gated FLIM system is constituted of a White light laser (Fianium sc400) and an home-made wavelength selector for excitation source, a spinning disk microscope with Yokogawa confocal head (CSU X1) and Leica microscope (DMI8) with 20x Leica water immersion (NA = 0.7), and a fast time-gated intensifier (Picostar Lavision using Kentech instrument HRI) optically coupled to a CCD camera (Coolsnap HQ Photometrics) for wide-field detection. The system is completely controlled by Inscoper hardware and software solution in order to provide HCS-FLIM protocols for screen acquisitions.

Data and statistical analysis

Home-made automated protocol was used for lifetime calculation and cell segmentation using ImageJ macro (see details in Results section). The Mann-Whitney test was used to compare the fluorescence lifetime between GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry (Fig 1.C, Fig 5.A).

Results and discussion

Time-gated FLIM microscopy for fast cellular measurements of the AURKA FRET biosensor in a large field of view

We previously described our microscope setup for rapid FLIM acquisition (the fastFLIM microscope) (Leray et al., 2013). This system can image and measure the fluorescence lifetime of any fluorescent protein with a high frame rate in comparison to conventional techniques such as TCSPC. Besides, based on a new method for controlling a plurality of functional modules (Roul et al., 2015), the Inscoper company has recently developed a control solution for microscopy systems used in life science. The solution includes an electronic device embedding a microcontroller to autonomously execute sequences of microscope driving commands and an application software offering the human-machine interface. The advantages of this solution are the user-friendly interface and significantly increased acquisition speeds. To further increase the speed capabilities of the fastFLIM microscope, we have developed an implementation of the Inscoper control system to be conjugated with the microscopy setup. The system is represented in Fig. 1A. Before the acquisition, the Inscoper device receives the commands sent by the user through the computer and will then drive autonomously and directly all the devices during acquisition. The microscopy setup works using the visible spectrum of a supercontinuum pulsed laser source with a frequency of 40 MHz (Fianium sc400) and filtered by a home-made wavelength selector to choose any band between 420 nm and 700 nm as light excitation. This latter goes through a spinning disk microscope (Yokogawa CSU X1 and Leica DMI8 microscope) that allows us to perform confocal microscopy in wide-field detection mode and then reaches the sample. The fluorescence emission light, after passing through the dichroic and the emission filter, goes through a fast time-gated intensifier (Picostar Lavision integrating an HRI Kentech Instrument). The intensifier temporal gates of 2.2 ns is triggered by the excitation pulse signal coming from the laser. A delay generator on the trigger signal is used to shift the gate. The time-gated wide-field fluorescence image is then captured by a CCD camera (Coolsnap HQ Photometrics) and further sent to the computer. During the acquisition process, on top of the spinning disk, the microscope status, and the CCD camera, the Inscoper box drives the delay generator to produce different time-gated images. When using GFP fluorescence, whose lifetime is around 2.5 ns, we performed five time-gated images of 2.2 ns with a consecutive shift of 2.2 ns to produce adjacent temporal gates (Fig. 1B). The stack of five time-gated images covers the whole fluorescence decay of the GFP. From the intensity of these images, using a discrete equation to compute the temporal mean, the computer gets the mean

fluorescence lifetime pixel by pixel, and ultimately the FLIM image. The strength of this approach lies in getting rid of fitting methods, allowing reduced photon budget (Leray et al., 2013). The application software then displays the FLIM image in real time for easy-to-use experiments.

We have recently designed a FRET-based biosensor for AURKA that allows us to track AURKA activation in living cells (Bertolin et al., 2016). This biosensor is composed of the whole kinase flanked by a GFP and a mCherry (hereby GFP-Aurka-mCherry) and is stably expressed at physiological levels in U2OS cells. In these cells, GFP-AURKA-mCherry shows a decrease in GFP lifetime of nearly 100 ps compared to the donor alone (GFP-AURKA). This decrease in lifetime is indicative of FRET, and we have shown that this 100 ps downshift corresponds to the difference between activated or inactivated kinase. The use of this biosensor has been validated in living cells using a 63x objective with oil immersion and high numerical aperture to image one single cell per image. However, this approach is not suitable for the screening of AURKA activation in 96-well plates, as mitosis in these cells occurs every 24h and it lasts for 1h30 only. Thus, we have decided to switch from live cells to fixed cells to overcome this issue. We synchronized these cells at mitosis, and we fixed them using paraformaldehyde. We then changed the objective from a 63x oil immersion to a 20x water immersion (NA = 0.7) in order to image several mitotic cells in every field of view (Fig. 1C). Concerning the biological sample, we verified that the fixation does not abolish FRET detection. On fixed cells, we measured a difference of 100 ps between GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry, which corresponds to the FRET previously observed in living cells. Together, we are able to use fast acquisition of FRET-FLIM images in a large field of view. This allows to increase the number of the mitotic cells detected per acquisition and without losing FRET efficiency.

Inscoper: an embedded control software for fast acquisition in fluorescence microscopy

The Inscoper imaging suite was grounded on separating the microscope and associated devices control from the user interface (Fig.2). The Inscoper electronic unit performs the control of all the devices around the microscope during the image acquisition. Thus, for the fast FLIM system, the Inscoper box ensures bidirectional communication with all motorised devices. In contrast, the Inscoper interface, run on a PC, is only used to set up the acquisition, to retrieve the images from the camera and later to visualize them. The Inscoper box offers the advantage of running the driving sequence, customised to the very experiment, without an operating system and this avoids in particular reliability issue related, e.g. to OS update as often found

when using conventional acquisition software. Furthermore, since the driving code is embedded on a microcontroller, it performs in real time. Overall, it allows rapid and stable communication with the devices keeping full synchronisation of all the signals and ensures highly reproducible experiments. The Inscoper interface gives the user access to many settings for multidimensional experiments, such as timelapse, multi-channel, Z-series and multi-positions ones. Regarding the fastFLIM, when the user starts a FLIM acquisition, the Inscoper box controls the illumination system, the focus of the microscope, the delay generator to select the shift of the delay gate at 2.2 ns, and the stage for each new XY position. These parameters can be manually adjusted when the user starts a new FLIM acquisition. Among the parameters controlled by the Inscoper box, only the image data goes directly to the computer from the camera. Furthermore, the Inscoper box uses a bidirectional communication with the camera based on multiple trigger signals. Doing so, we tightly synchronize the camera frame grabbing and the configuration changes of the microscope and associated devices. In particular, before sending the trigger to the camera to grab a new image, the Inscoper box waits for a trigger ready signals from the camera and « new configuration reached » from the devices. A third signal called *exposure out* notify the other devices that the camera is in readout step.

Automatised screening coupled with autofocus to acquire mitotic cells expressing the AURKA FRET biosensor within a 96-well plate

We aim to perform an automated screening on a 96-well plate using the fastFLIM microscope. To do so, we have developed the necessary plugins within the Inscoper microscope-control application. They include a randomised multi-position mode for each independent well, and autofocus. The design of the software interface is presented in Fig. 3. Given that the fastFLIM microscope stage is motorized and controlled by the Inscoper box, the features of a 96-well plate such as the length, the width, the size of the well and the distance between the wells were uploaded to allow the stage to automatically browse the entire plate for the multi-position mode. The user can then choose to screen the entire plate or definite number of wells. In addition, the user can also choose to image multiple positions in each well. The positions within the different wells are randomly determined to up to hundreds of positions for each well. In order to avoid overlap of the different fields of view, a minimal distance between each position can be defined. For example, using the 20x objective, we determined a minimal distance of 250 μm between each position which corresponds to the size of the field of view, and we set this parameter directly in the interface. After defining the above-mentioned parameters, all the positions for every selected well of the 96-well plate are calculated to use the Inscoper solution as for

conventional multi-position imaging. Concerning autofocus, it addresses a major challenge when screening long distance multi-position in cellular microscopy. Although manufacturers develop the flattest plates possible, a slight variation of a few μm between wells exists and leads to a focus loss. Furthermore, depending on the application, the focus of interest (z position of the cell) can be different from well to well. To overcome this issue, several strategies exist (Qiu *et al.*, 2013). We adapted an autofocus method based on the analysis of sharpness on a z-stack of images. In further details, the user chooses the number and the size of the z-steps being analysed. For each step, an image of fluorescence intensity is acquired and a 3x3 median filter is applied. Then, a sharpness score is calculated for each pixel, and an additive sharpness score is determined for the image. This score is used to determine the z-position of the best focus. Different channels can be used for acquisition and autofocus so that any excitation lights and cell labelling can be used. This also enables the user to avoid photobleaching and phototoxic effect related to the labelling used for the FLIM. In the experiment presented here, we observed that with a minimum illumination of GFP, we were still able to find the best focal plane of cells expressing GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry and this without perturbing the GFP fluorescence lifetime. This is why we decided to use the GFP illumination for the autofocus procedure as well.

An automatized data analysis pipeline for screening: cell-by-cell fluorescence lifetime determination

Depending on the number of positions for each well, the number of images can vary from hundreds to thousands, calling for automatically analysing the data. Since a single frame contains multiple cells, we segmented the image to compute cell-wise measurements later. Our data analysis pipeline (Fig. 4) stores the time-gated stack of fluorescence images, the corresponding fluorescence lifetime images, and the cropped images of segmented cells together with a table summarizing the available measurements for this cell. At first, we compute the FLIM images in a post-acquisition step. The advantage is to adjust the parameters along the process and have the ability to recompute the mean lifetime posteriorly, an important feature to tweak, e.g. the pixel threshold value of the first time-gated image. Indeed, this latter value limits the extent of the fluorescence lifetime computing, as pixels below the threshold do not have sufficient photon count to let us compute a reliable lifetime. In our case, a threshold at 3000 grey levels appears suitable (Leray *et al.*, 2013). The computing is performed by an *ad hoc* ImageJ macro in which the user is asked to provide the size of the intensifier gate (gatewidth), the step between the different time-gated images (stepdelay) and the threshold value (grey

value). In a second step, we segment the cells using the first time-gated intensity image, which harbours the highest intensities. To do so, we performed a Gaussian blur, followed by an automatic threshold in ImageJ. The corresponding parameter and threshold-determining algorithm are set by the user prior to batch processing. In our case of cells expressing the AURKA biosensor and synchronized at mitosis, a Gaussian blur using a 1-pixel radius circular neighbourhood and the default threshold-determining algorithm offer the highest accuracy possible. Finally, the watershed algorithm separates adjacent cells. Different regions of interest are then determined. The lifetime image is then broken into cropped sub-frames containing each a single cell and saved in separated files together with a file indicating the mean fluorescence lifetime over the cell, the standard deviation and cell-area in pixels. It allows controlling the quality of the segmentation and further statistical analyses.

Validation of a 96-well plate screening using AURKA FRET biosensor

To validate our screening process, we investigated a 96-well plate containing U2OS stable cell lines expressing GFP-AURKA or GFP-AURKA-mcherry (Fig. 5). We seeded the same amount of cells in each well and synchronised them in mitosis using nocodazole. This is known to induce a peak of AURKA expression (Nikonova et al., 2013) and correspondingly a peak of signal from the biosensor. Then, cells were released in normal medium for 30 min and reach metaphase. The use of a multi-channel pipette allowed a homogenous synchronization throughout the 96 wells of the plate, and it ensured a rapid washout of the culture media in all the wells in less than one minute. We then used 4% paraformaldehyde to fix cells in metaphase as shown in Fig. 1. We screened the plate with a 20x water immersion objective, as oil objectives have front oil problems during stage motions preventing proper imaging. Furthermore, we also used a water dispenser (Leica) to overcome water evaporation and to ensure a perfect immersion throughout the screening. All acquired images were analysed as described previously (Fig. 4). The resulting fluorescence lifetimes are plotted as a heat map for each well (Fig. 5A, left panel). All cells within a well do not display the same number of pixels with photon count above the threshold (see analysis section). To avoid an imbalance, we weighted the lifetime from each cell by its area in pixels and the standard deviation for each cell before to calculate the mean lifetime for each well. Such a heat map showed a correct accuracy allowing to clearly distinguish between wells with GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry. When pooling the fluorescence lifetimes from both conditions (Fig. 5A, right panel), we found a significant difference of about 90 ps, similar to FRET measurement in single-cell

experiments (Fig. 5B). These results demonstrate the potentiality of our system as an automated tool to screen FRET within our biosensor.

Conclusion

We described a method to perform automated screening with FLIM using our time-gated fastFLIM microscope. This microscope uses temporal gates to selectively acquire sections of the fluorescence decay after each pulsed laser. Our system is controlled by the Inscoper imaging suite, which allows getting rid of the latency caused by the operating system. Taking advantage of its speed, we improved it to automatically screen 96-well plates. Furthermore, we implemented multi-well randomized acquisitions modules with an autofocus module. We also developed a pipeline to automatically analyse thousands of images and obtain fluorescence lifetime data for each cell. Importantly, the software can rapidly generate an image of fluorescence lifetime without any fitting. We validated this methodology by screening the FRET efficiency using our AURKA biosensor. We now aim to screen for novel compounds and find new and potentially more potent drugs. Furthermore, this methodology can also be used to characterize these drugs and the cellular phenotype they induce, through the fluorescence images obtained. To date, few High Content Analysis (HCA)-FLIM systems have arisen. These generate time-gated windows with a pulsed laser, but fitting to determine fluorescence lifetime is necessary (Görlitz et al., 2017) which does not permit to automate the analysis. These tools were recently used to investigate protein-protein interactions in an HCA mode (Guo et al., 2019). We here demonstrated that using biosensors and specially kinase activity biosensor increases the information that can be obtained from screening procedures. Combined to our recent multiplex systems (Demeautis et al., 2017) it will allow to track the activity of several biosensors at the same time and broaden the impact of HCA-FLIM to provide more insight into kinase activity.

Acknowledgments

We acknowledge Giulia Bertolin for advice and comments during the execution of this project and for careful reading of the manuscript. We also acknowledge Sébastien Huet for fruitful discussions. We thank Stéphanie Dutertre, Clément Chavalier and Xavier Pinson of the Microscopy-Rennes Imaging Centre (Biologie, Santé, Innovation Technologique, BIOSIT, Rennes, France) for assistance. We warmly acknowledge Olivier Chanteux, Jeremy Pont and

Baptiste Giroux from Inscoper providing all the necessary help in this project. We also thank Sylvain Prigent for assistance with ImageJ macros and Yann Le Cunf for sharing his expertise in data analysis. This work was supported by the Centre Nationale de la Recherche Scientifique and the Université de Rennes 1, by the Comité d'Ille et Vilaine, Comité du Maine et Loire et Comité de la Sarthe to MT, by the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), région Bretagne and Rennes Métropole for the development of the fastFLIM prototype, and by Région Bretagne for a tech-transfer grant to MT and Inscoper. FS was supported by a PhD fellowship from Région Bretagne and the University of Rennes1, together with an additional fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer. O.B. is the CTO of Inscoper Company, a spin-off of the IGDR. J.P. and M.T. are scientific advisors of Inscoper.

Author contributions

F.S. designed, performed and analysed the experiments; G.L., J.P. and O.B developed tools and methods and; M.T. conceptualised the study, coordinated the work and provided funding. F.S. and M.T. wrote the paper with the input of all authors.

References

- Becker, W. (2012). Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy* 247, 119–136.
- Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Rebutier, D., Prigent, C., and Tramier, M. (2016). A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nature Communications* 7, 12674.
- Bertolin, G., Bulteau, A.-L., Alves-Guerra, M.-C., Burel, A., Lavault, M.-T., Gavard, O., Le Bras, S., Gagné, J.-P., Poirier, G.G., Le Borgne, R., et al. (2018). Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. *ELife* 7, e38111.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal* 17, 3052–3065.
- Demeautis, C., Sipieter, F., Roul, J., Chapuis, C., Padilla-Parra, S., Riquet, F.B., and Tramier, M. (2017). Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM. *Scientific Reports* 7, 41026.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95–105.

- Görlitz, F., Kelly, D.J., Warren, S.C., Alibhai, D., West, L., Kumar, S., Alexandrov, Y., Munro, I., Garcia, E., McGinty, J., et al. (2017). Open Source High Content Analysis Utilizing Automated Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *JoVE* 55119.
- Guo, W., Kumar, S., Görlitz, F., Garcia, E., Alexandrov, Y., Munro, I., Kelly, D.J., Warren, S., Thorpe, P., Dunsby, C., et al. (2019). Automated Fluorescence Lifetime Imaging High-Content Analysis of Förster Resonance Energy Transfer between Endogenously Labeled Kinetochores Proteins in Live Budding Yeast Cells. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 247263031881924.
- Hochreiter, B., Garcia, A., and Schmid, J. (2015). Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors* 15, 26281–26314.
- Horton, R.A., Strachan, E.A., Vogel, K.W., and Riddle, S.M. (2007). A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Analytical Biochemistry* 360, 138–143.
- Kenworthy, A.K. (2001). Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods* 24, 289–296.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer US).
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Hélot, L., and Tramier, M. (2013). Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS ONE* 8, e69335.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., and others (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882.
- Nikonova, A.S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., and Golemis, E.A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 661–687.
- Padilla-Parra, S., and Tramier, M. (2012). FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays* 34, 369–376.
- Qiu, Y., Chen, X., Li, Y., Chen, W.R., Zheng, B., Li, S., and Liu, H. (2013). Evaluations of Auto-Focusing Methods under a Microscopic Imaging Modality for Metaphase Chromosome Image Analysis. *Analytical Cellular Pathology* 36, 37–44.
- Richert, L., Didier, P., de Rocquigny, H., and Mély, Y. (2015). Monitoring HIV-1 Protein Oligomerization by FLIM FRET Microscopy. In *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, W. Becker, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 277–307.
- Roul, J., Tramier, M., and Pecreaux, J. (2015). Method for controlling a plurality of functional modules including a multi-wavelength imaging device, and corresponding control system. Patent FR3019324B1/EP3123149A1/WO2015144650A1/US20170139196A1
- Sen, S., Zhou, H., and White, R.A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14, 2195–2200.

Sizaire, F., and Tramier, M. (2017). FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells. IntechOpen *Protein Phosphorylation*.

Thomas, N. (2010). High-Content Screening: A Decade of Evolution. *Journal of Biomolecular Screening* 15, 1–9.

Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 14997–15002.

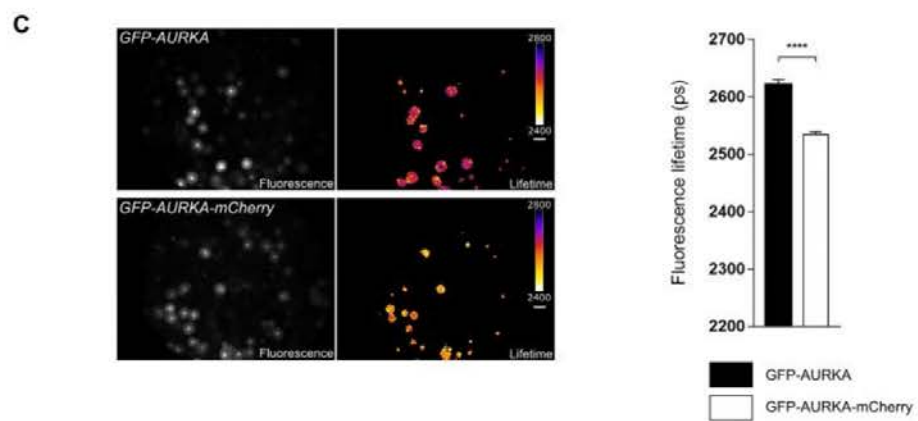
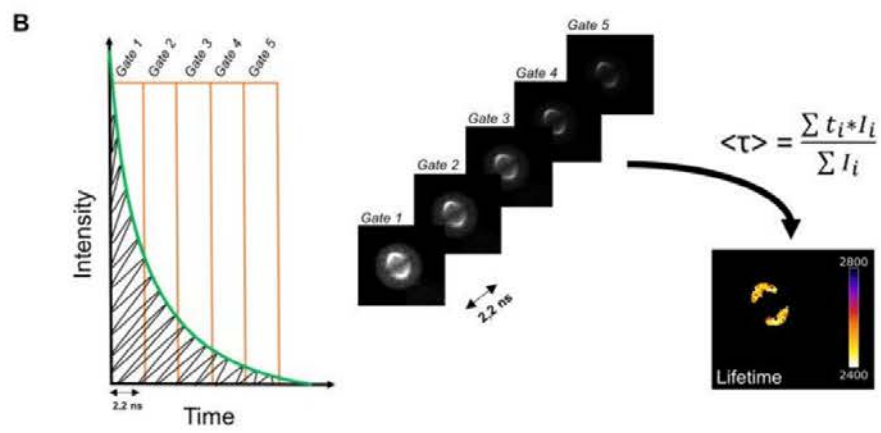
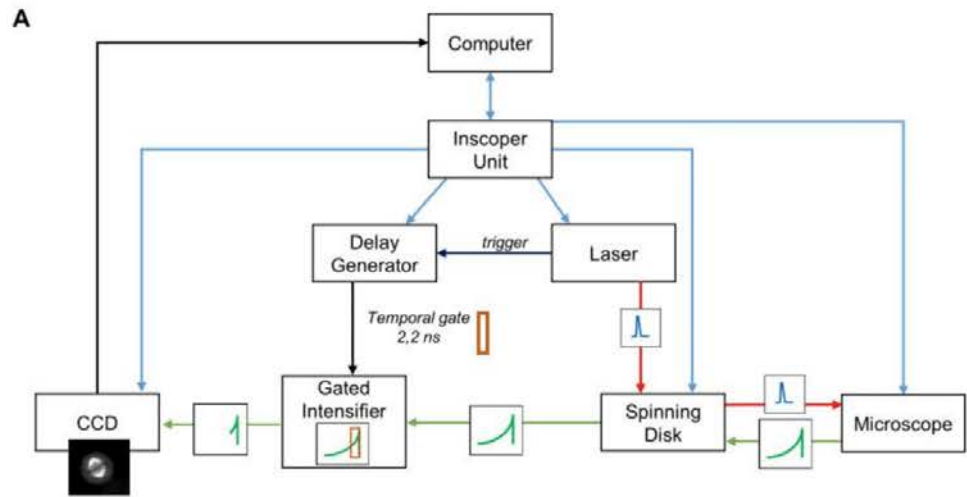


Fig. 1. The fast-FLIM microscope can measure FRET efficiency of the AURKA biosensor in fixed cell lines. **A.** Model illustrating the mode of action of the fast-FLIM. The computer sends commands to the Inscoper electronic unit, which in turn communicates with the other devices. For each laser pulse, a trigger from the laser is sent to the, intensifier generating a gate of 2.2 ns during which the fluorescence emission is captured. The delay generator is used to position the gate at the desired timing during the fluorescence decay. After intensifying the fluorescence signal of the selected temporal gate, a CCD camera is used to acquire the time-gated image and is sent to the computer. **B.** Model illustrating the generation of one fluorescence lifetime image using the AURKA biosensor in U2OS cells. A stack of five time-gated images are acquired sequentially after controlling the delay generator to position the gate. Each image corresponds to a juxtaposed gate of 2.2 ns to cover the whole fluorescence decay. From the intensity of the five images, the pixel by pixel mean fluorescence lifetime is calculated using a discrete temporal mean of the decay to form the fluorescence lifetime image. **C.** The fast-FLIM is suitable to measure FRET efficiency of the AURKA biosensor in fixed cells. (Left panel) On the left, representative fluorescence (GFP channel) of U2OS cells expressing GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry, synchronized at mitosis, fixed with 4% paraformaldehyde and imaged with a 20x objective (NA = 0.7). On the right, the corresponding fluorescence lifetime images. Pseudocolour scale correspond to the mean lifetime. Scale bar, 30 μ m. (Right panel) Corresponding quantification of the fluorescence lifetime; n=20-30 cells per condition from three independent experiments. Data represent means \pm s.e.m. ***P<0.0001 against the 'GFP-AURKA' condition. Statistical test: Wilcoxon-Mann-Whitney test.

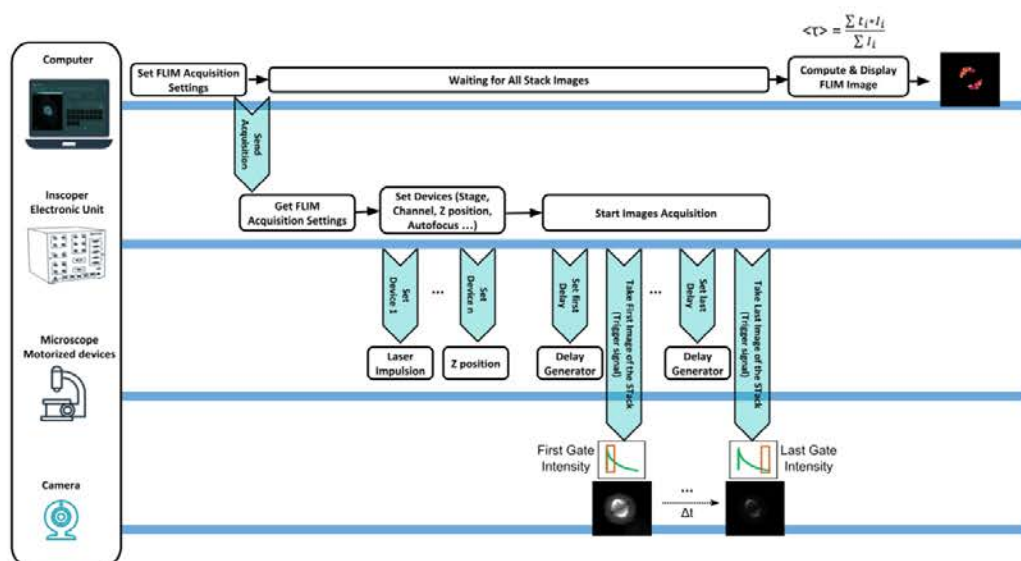


Fig. 2. Hardware and Software features for the acquisition of a FLIM image. From right to left and from top to bottom: from the Inscoper graphical user interface on the computer, the user set FLIM acquisition sequence which is sent to the Inscoper electronic unit. While computer wait for the acquired images, the Inscoper unit analyses the sequence parameters and set the different devices by communicating to the different microscope devices. Then the electronic unit starts the acquisition of the stack of time-gated images by alternatively setting the delay generator and triggering the camera. All the camera images were then transferred to the computer and when the stack is completed, the computer calculate and display the FLIM image. In the same time, the Inscoper electronic unit re-start a new FLIM acquisition after setting the different devices if necessary as it was previously planned by the user at the beginning of the acquisition sequence. The process is reproduced as many times as necessary to complete the full sequence.

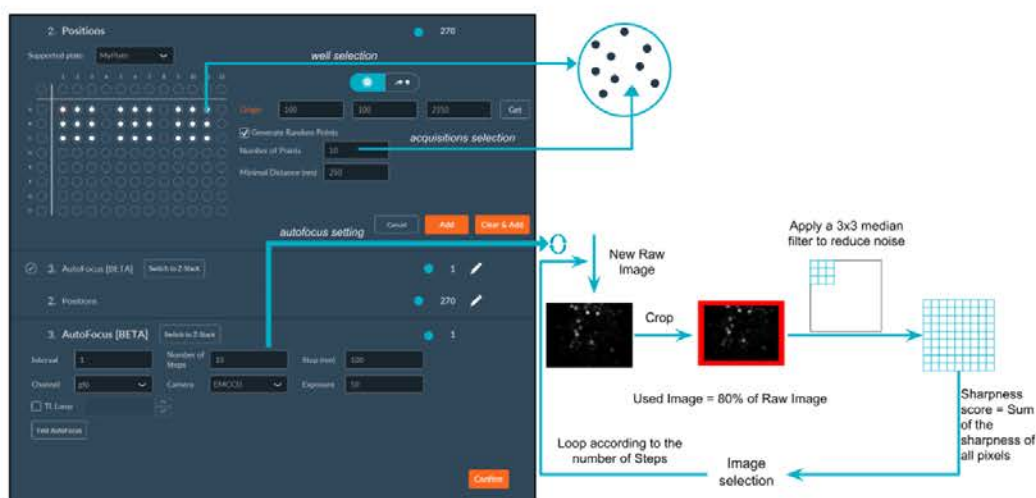


Fig3. Multi-well and autofocus modules of the Inscoper user interface for screening applications. At the top left of the windows is presented the scheme of the 96 multi-well plates. The user determines the wells of interest (where the acquisition will be carried out) by individual well, by line or by column. Then the user determines the number of random points for each well and the minimum distance between each position (as presented in the scheme at the top right). With these information, the interface calculates the coordinates of each point based on the initial calibration of the stage. At the bottom of the windows is presented the autofocus panel which permits to determine the optimal z plane for each xy position. The user determines the interval, the number of steps, the step size and the color channel used for autofocus. The algorithm then calculates the best focus by calculating a sharpness score for each acquired image (see Results section for details). The plan with the highest score is selected. To speed up the execution of the autofocus, it is possible to define a dedicated exposure time different to the FLIM images.

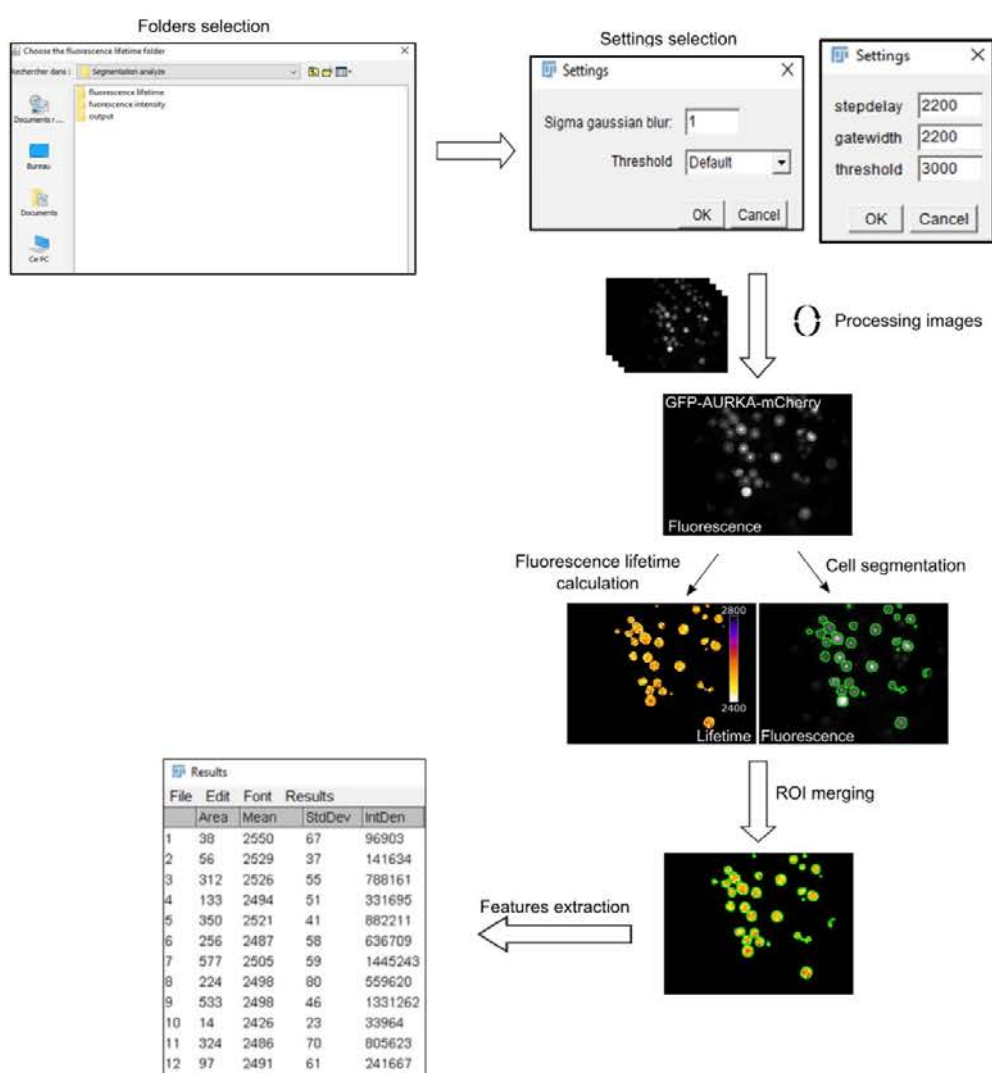


Fig. 4. Batch mode analysis by cell segmentation. Analysis of fluorescence images of U2OS expressing GFP-AURKA-mCherry using an ImageJ home-made macro. From top to bottom: the user first chooses the folder containing fluorescence images, and the two destination folders for the calculated lifetime image and for the segmented intensity images with a file containing all the values of the features for each ROI. From the stack of time-gated images, the fluorescence lifetime image is generated using the threshold, size of the gate and step values settled by the user. From the first time-gated fluorescence image, the cells are segmented according to the settings defined by the user. This segmentation is applied on the fluorescence lifetime image and for each ROI (cell) is calculated the mean fluorescence lifetime, the number

of pixel (area of the ROI) and the standard deviation between the pixel values. This analysis is automatically applied for all the images coming from the chosen folder.

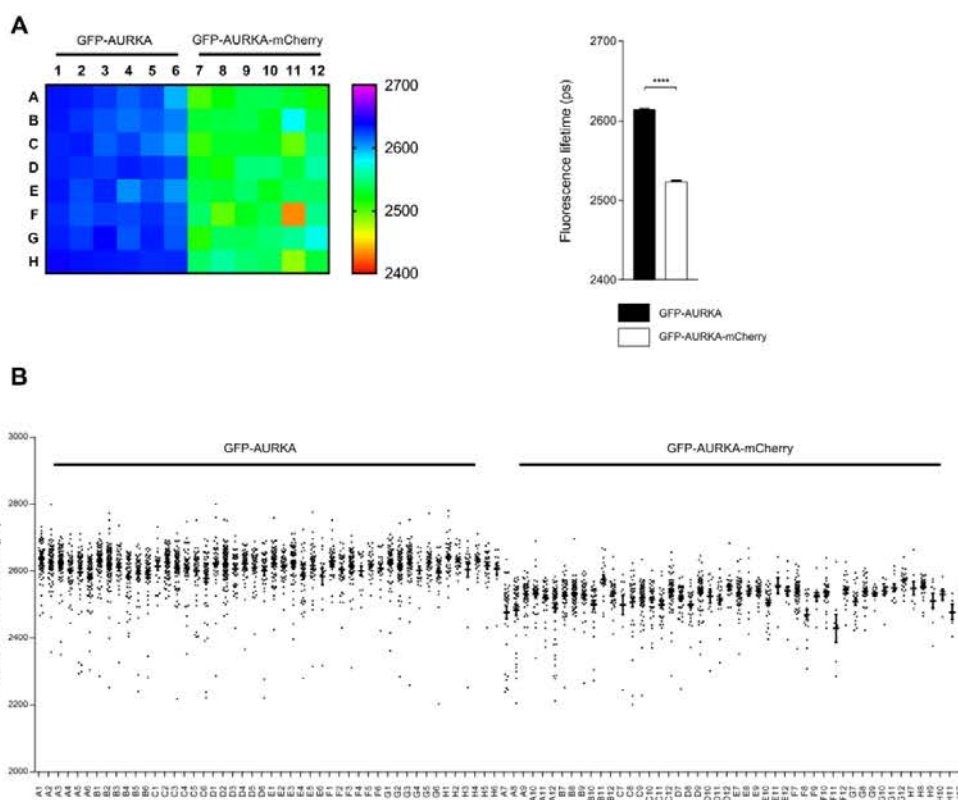


Fig 5. Multiwell plate screening of AURKA biosensor. A. (Left panel) Heatmap of the mean fluorescence lifetime values weighted by the area and the standard deviation in each well of a 96-well plate seeded with U2OS cells expressing GFP-AURKA and GFP-AURKA-mCherry. Cells have been synchronized at mitosis and fixed with PFA before being screened with the HCS-FLIM. Pseudocolour scale: lifetime values in ps. (Right panel) Lifetime quantification of the values from all the cells coming from all the well expressing GFP-AURKA or GFP-AURKA-mCherry. Data represent means \pm s.e.m. **** $P < 0.0001$ against the GFP-AURKA condition. Statistical test: Wilcoxon-Mann-Whitney test. **B.** Scatter plot of fluorescence lifetime values of each cell sorted by well (from A1 to H12). Each individual point represents a single cell. Bars represent \pm s.e.m.

5) Criblage de molécules

Cette méthodologie de criblage peut à présent être utilisée afin d'identifier de potentiels nouveaux inhibiteurs de l'activité kinase Aurora A. Pour cela, nous disposons d'une banque de 47 molécules dont au moins un inhibiteur commercial d'Aurora A. Cette banque est issue de la collaboration avec Sandrine Ruchaud de la plateforme de criblage Kissf. Ces molécules ont été précédemment testées sur l'activité kinase d'Aurora B. Pour ce crible, les cellules U2OS exprimant le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry sont ensemencées en même quantité dans les puits et synchronisées en G2/M au nocodazole. Le changement de milieu permet ensuite aux cellules de rentrer en mitose. Les 47 molécules seront testées en aveugle, c'est-à-dire sans connaître leur nature au préalable. Pour chaque molécule, deux puits sont attribués, les deux derniers restants étant attribués au DMSO pour le contrôle négatif. L'incubation avec les molécules se fait grâce à une pipette de 8 canaux. Cela permet d'incuber les 12 colonnes de la plaque avec une différence de temps inférieure à 1 minute entre la première colonne et la dernière colonne. Les cellules sont incubées avec des molécules à une concentration de $1\mu\text{M}$ pendant 20 minutes et sont ensuite fixées à la PFA (Fig 63).

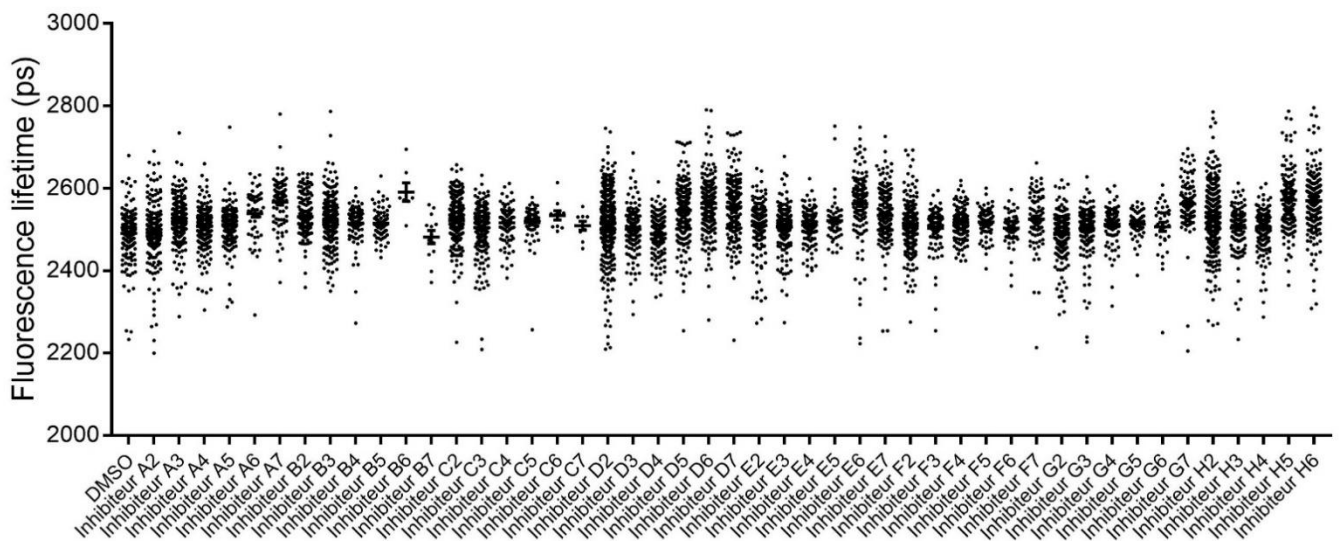


Fig 63. Crible de l'effet de 47 molécules sur l'activité kinase du biosenseur Aurora A

Graphique représentant les valeurs de durée de vie de fluorescence de cellules U2OS exprimant le biosenseur GFP-Aurora A-mcherry synchronisées en mitose puis traitées avec l'une des 47 molécules à $1\mu\text{M}$ pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite fixées à la PFA 4% et la plaque 96-puits est criblée au fastFLIM. Chaque point représente une cellule.

Ce crible permet de voir que plusieurs molécules ont pour effet d'augmenter significativement à la durée de vie de fluorescence du biosenseur comparé à la condition traitée au DMSO. Ces molécules sont A7, B6, D6, E6, G7, H5, H6 avec respectivement des remontées de durée de vie de 76ps, 100ps, 73ps, 72ps, 72ps, 81ps, 79ps. Cet écart de valeur de FLIM se rapproche de l'ordre de grandeur d'environ 100ps observé lorsque le FRET est aboli. Ces molécules sont ainsi des inhibiteurs potentiels de l'activité kinase d'Aurora A.

Un crible de test kinase in vitro a été fait afin de comparer les effets des molécules sur l'activité kinase d'Aurora A avec le test in cellulo. Le principe de ces tests est d'utiliser de l'ATP radiomarqué, [γ - ^{32}P] ATP. Il est alors possible de suivre l'autophosphorylation d'Aurora A en mesurant la consommation d'ATP après un certain temps. En comparant avec la condition DMSO, on peut établir un % d'activité restant de la kinase après traitement avec les molécules (Fig 64).

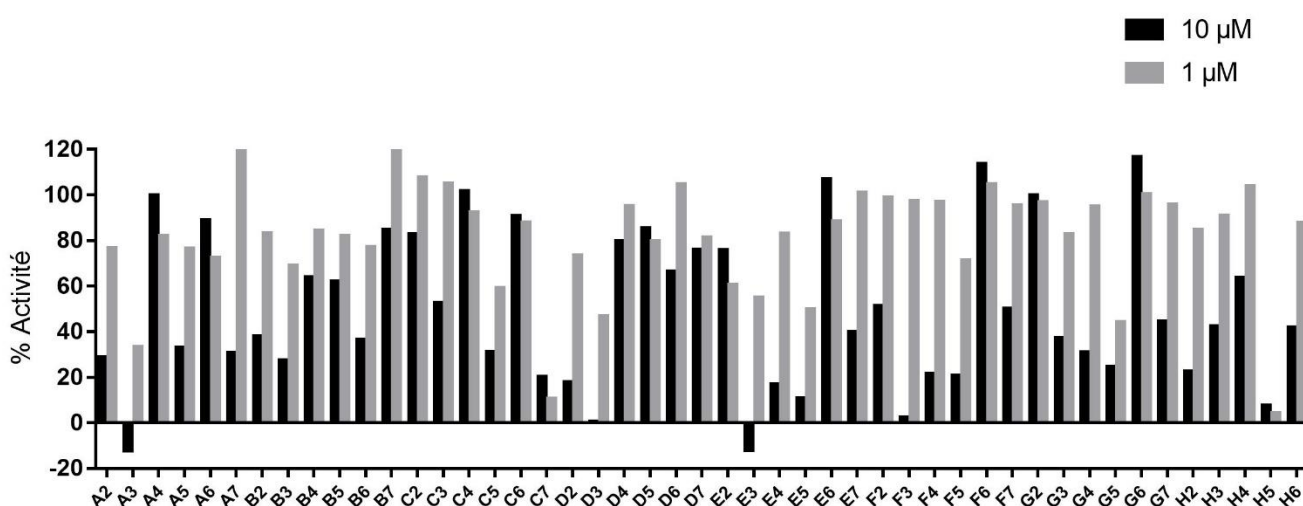


Fig 64. Résultat du criblage de l'activité kinase d'Aurora A in vitro

Test kinase par consommation d'ATP radiomarqué [γ - ^{32}P] de la protéine Aurora A. Les 47 molécules ont été utilisées à 1 μM ou 10 μM et le % d'activité kinase restant a été calculé par rapport à la condition avec DMSO.

En regardant les effets des molécules à 1 μM , on voit que les molécules A3, C7, G5 et H5 ont un effet inhibiteur significativement important avec un % d'activité restant d'Aurora A inférieur à 40%. En particulier la molécule H5 montre l'effet inhibiteur le plus important à 1 μM .

En comparant avec le crible in cellulo, on constate que seule la molécule H5 se retrouve dans les deux cribles. De plus la molécule H5 correspond à l'inhibiteur commercial de l'activité kinase d'Aurora A. Cela montre que la méthodologie de criblage basé sur le biosenseur Aurora

A et le FRET-FLIM automatisé permet de retrouver un inhibiteur connu et caractérisé d'Aurora A. Cela permet de valider ce criblage comme une nouvelle méthodologie pour trouver de potentiels inhibiteurs de l'activité kinase d'Aurora A.

Toutefois il est important de discuter des molécules qui ont un effet important dans un seul des deux cribles. Les molécules A7, B6, D6, E6, G7, H6 semblent abolir le FRET du biosenseur in cellulo mais n'apparaissent pas comme des inhibiteurs de l'activité kinase d'Aurora A in vitro. Une hypothèse possible pourrait être que ces molécules n'ont pas d'effet direct sur l'activité kinase d'Aurora A mais pourraient cibler d'autres protéines (« off-target ») qui elles-mêmes pourraient être des activateurs d'Aurora A. Il existe d'autres protéines kinases comme PAK2 et PAK3 qui sont capable d'interagir et d'induire la phosphorylation d'Aurora A sur le résidu T288. Les molécules A3, C7, G5 ont un effet d'inhibition important sur l'activation d'Aurora A dans le crible in vitro mais ont un effet faible très faible sur la remontée de durée de vie de fluorescence dans le crible in cellulo, de 20 à 30ps ce qui est en dessous du bruit. Il convient de constater que la condition traitée avec la molécule C7 ne compte que 9 cellules comparées aux dizaines des autres conditions ce qui réduit la possibilité de voir un effet. Une des possibilités est qu'une molécule pour agir in cellulo doit pouvoir traverser la membrane plasmique, diffuser et atteindre sa cible potentielle. Ce sont des obstacles possibles et il faudrait alors vérifier les effets de ces molécules sur des temps d'incubation plus longs.

Ainsi, cette méthodologie de crible cellulo a permis de retrouver un inhibiteur commercial d'Aurora A, le MLN 8237. Mais certains « hits » potentiels ne semblent pas être des inhibiteurs directs de l'activité kinase d'Aurora A. De plus, certaines molécules semblent être considérées comme de faux négatifs puisqu'elles apparaissent comme inhibitrices de l'activité kinase d'Aurora A in vitro.

III) Nouvelles méthodologies pour suivre l'activité FRET du biosenseur

Aurora A

Dans cette troisième partie, le but a été d'optimiser l'utilisation du biosenseur FRET de l'activité kinase d'Aurora A. Dans un premier temps, j'ai participé au développement d'un biosenseur de type homoFRET ayant pour objectif d'être utilisé en multiplex. Dans un second, j'ai utilisé la technique de 2c-FCCS pour mesurer l'activité du biosenseur dans le cytosol de la cellule où Aurora A est faiblement exprimée.

1) Homo-FRET par mesure d'anisotropie (FAIM)

L'homo-FRET est le transfert d'énergie FRET entre deux fluorophores identiques. En théorie, le transfert d'énergie d'un fluorophore à un autre identique est possible si son spectre d'excitation et d'émission se recouvrent. C'est par exemple le cas de la GFP (Fig 65).

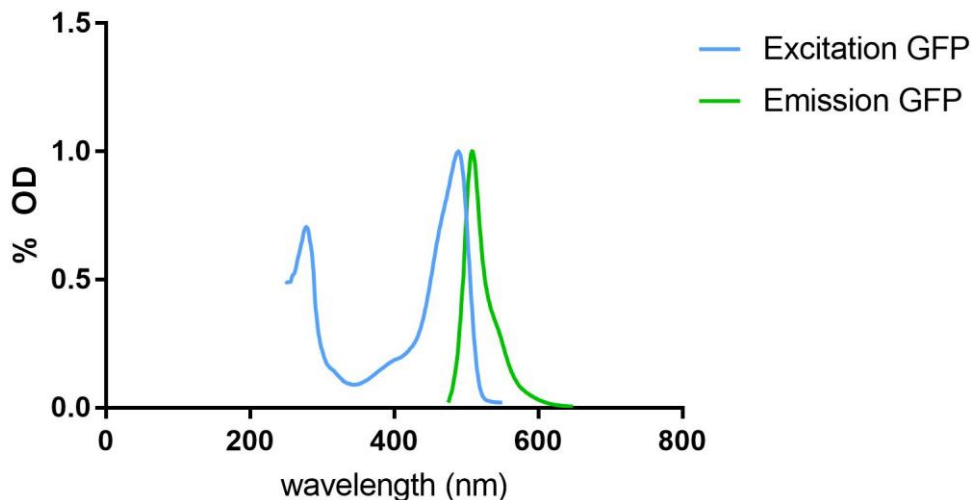


Fig 65. Spectre d'excitation et d'émission de la GFP

Cependant, le fluorophore donneur est le même que le fluorophore accepteur ce qui rend impossible l'utilisation de FLIM ou de mesures ratiométriques pour quantifier le FRET.

La mesure de FRET se fait en mesurant l'anisotropie. On parle d'anisotropie lorsqu'une propriété dépend de la direction. Dans le domaine de la fluorescence on parle aussi de polarisation de fluorescence. Le principe est d'utiliser une lumière d'excitation polarisée qui va

uniquement exciter les fluorophores dont les dipôles se trouvent dans la même orientation, il s'agit de photosélection (Chan et al., 2011). Si des phénomènes physiques ont lieu entre l'excitation et l'émission tels que du FRET, ou la rotation du fluorophore, alors la lumière émise sera dépolarisée et l'anisotropie diminue. On peut mesurer l'intensité de fluorescence émise dans la direction parallèle et perpendiculaire à la lumière d'excitation. La mesure d'anisotropie r est donnée par la formule suivante

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

I_{\parallel} est l'intensité d'émission parallèle et I_{\perp} l'intensité d'émission perpendiculaire

Ces mesures peuvent se faire avec un microscope confocal qui a la capacité d'envoyer une lumière polarisée et qui dispose de filtres capable de sélectionner l'orientation de l'émission mesurée (Fig 66).

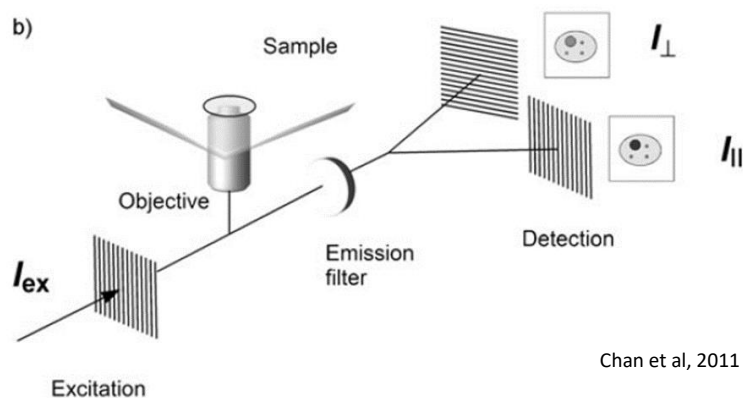


Fig 66. Principe de fonctionnement de mesure d'anisotropie par un microscope confocal

La formule d'anisotropie permet de comprendre que si les deux fluorophores ne sont pas dans des directions parallèles, l'anisotropie va diminuer s'il y a homo-FRET. La rotation des fluorophores peut aussi intervenir dans la diminution d'anisotropie. Toutefois, dans le cas de la GFP qui est une molécule de taille importante, on peut considérer que le temps de rotation est

très long en comparaison au phénomène de FRET. On peut ainsi mesurer l'homo-FRET en mesurant une diminution de l'anisotropie.

Dans un premier temps, il a fallu vérifier qu'il était possible de mesurer l'homo-FRET entre deux molécules de GFP dans des cellules U2OS au microscope SP8. Nous disposons du plasmide codant pour la GFP et du plasmide codant pour le tandem GFP-GFP qui doit correspondre au maximum de FRET observable. Les cellules U2OS sont transitoirement transfectées avec le plasmide codant pour la GFP ou le tandem GFP-GFP, puis on acquiert séquentiellement la fluorescence émise en orientation parallèle ou perpendiculaire à la lumière d'excitation afin de calculer l'anisotropie (Fig 67).

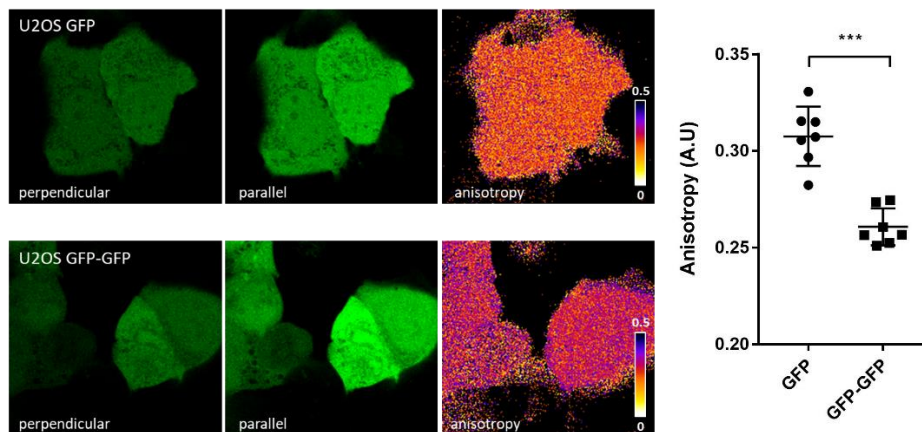


Fig 67. Mesure d'homo-FRET par anisotropie du tandem GFP-GFP.

(A gauche) Images de microscopie de cellules U2OS exprimant GFP ou le tandem GFP-GFP. En vert, les images d'intensité d'émission parallèle ou perpendiculaire et en fausses couleurs l'anisotropie calculée. (A droite) Graphique représentant les valeurs d'anisotropie correspondantes. Test statistique Mann-Whitney. *** $p < 0.001$

On observe bien une diminution significative de l'anisotropie entre le tandem GFP-GFP et GFP seul, qui correspond à l'homo-FRET du tandem.

Dans un second temps, un nouveau biosenseur homo-FRET d'Aurora A a été généré (Fig 68).

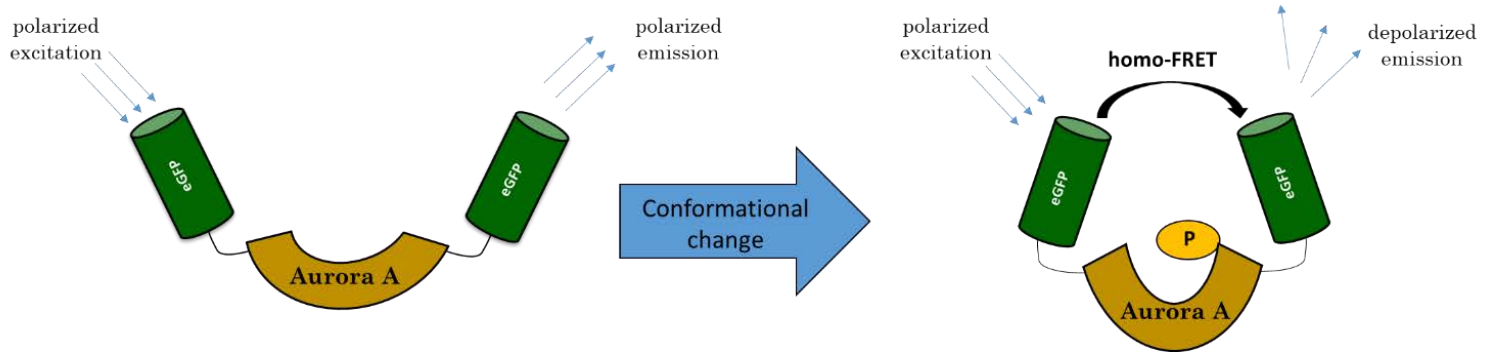


Fig 68. Principe de fonctionnement du biosenseur homo-FRET d'Aurora A

Celui-ci a été obtenu par construction plasmidique en ajoutant la séquence de la GFP au plasmide contenant le biosenseur GFP-Aurora A pour obtenir GFP-Aurora A-GFP. De la même façon que pour les lignes exprimant le biosenseur hétéro-FRET, des lignées stables U2OS exprimant le biosenseur homo-FRET et ses dérivés à des niveaux endogènes grâce au promoteur Aurora A ont été générées. Les cellules sont synchronisées en mitose par traitement au nocodazole puis on acquiert séquentiellement la fluorescence émise en orientation parallèle ou perpendiculaire à la lumière d'excitation afin de calculer l'anisotropie (Fig 69).

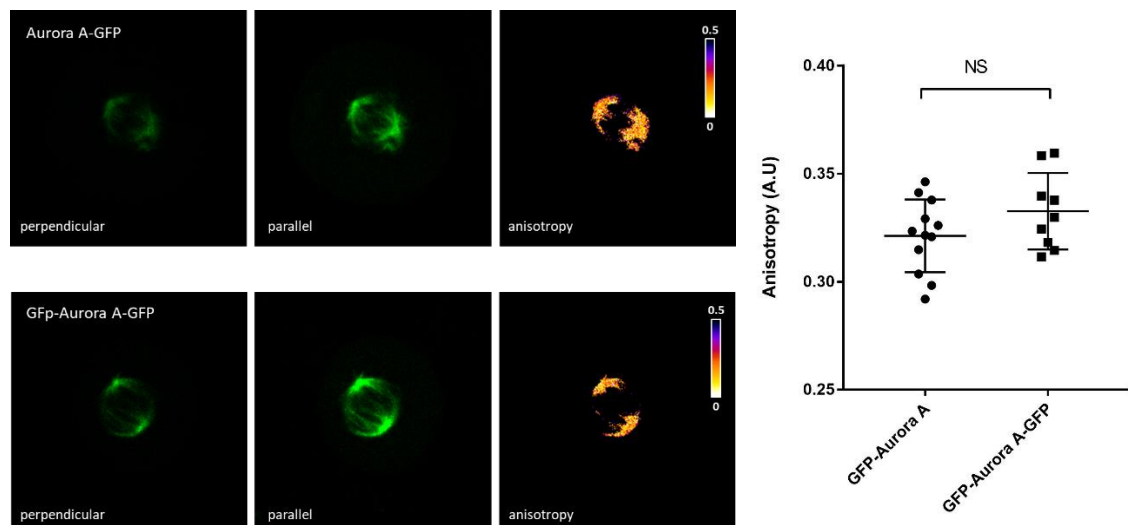


Fig 69. Mesure d'anisotropie du biosenseur homoFRET d'Aurora A

(A gauche) Images de microscopie de l'émission parallèle et perpendiculaire des biosenseurs GFP-Aurora A, GFP-Aurora A-GFP et l'image d'anisotropie calculée. (A droite) Graphique représentant les mesures d'anisotropie correspondantes. NS : non significatif

On constate que l'anisotropie ne varie pas entre les conditions GFP-Aurora A et GFP-Aurora A-GFP. Il n'est donc pas possible avec ce biosenseur de pouvoir mesurer l'homoFRET. On peut faire l'hypothèse que les deux GFP soient dans des conformations parallèles empêchant toute mesure d'homo-FRET. Il peut y avoir du FRET entre les deux GFP sans avoir de variation

d'anisotropie. Cela montre aussi que les mesures d'hétéroFRET ou d'homoFRET au sein de tandems de fluorophores ne permettent pas de prédire l'efficacité finale au sein des biosenseurs.

2) Mesure d'hétéroFRET par 2c-FCCS

L'utilisation du FLIM pour mesurer l'hétéro-FRET du biosenseur Aurora A permet de suivre son activité aux centrosomes et sur le fuseau mitotique où Aurora A est en abondance. Cependant cette technique connaît une limitation puisqu'elle nécessite un certain nombre de photons afin d'avoir un bon rapport signal/bruit (Leray et al., 2013). Avec le fastFLIM, cela se traduit par l'utilisation d'un seuil, le plus souvent à 3000 niveau de gris, lorsque l'image de FLIM est calculée. Ce seuil exclut les mesures de durée de vie du biosenseur dans le cytosol où la protéine Aurora A est présente mais à de faibles niveaux. Une nouvelle méthodologie est nécessaire pour essayer de mesurer l'activité d'Aurora A à de bas niveaux de concentration. La 2c-FCCS a été utilisée pour mesurer les variations de FRET du biosenseur. La FCS consiste à mesurer les fluctuations d'intensité dans un volume confocal (Fig 70).

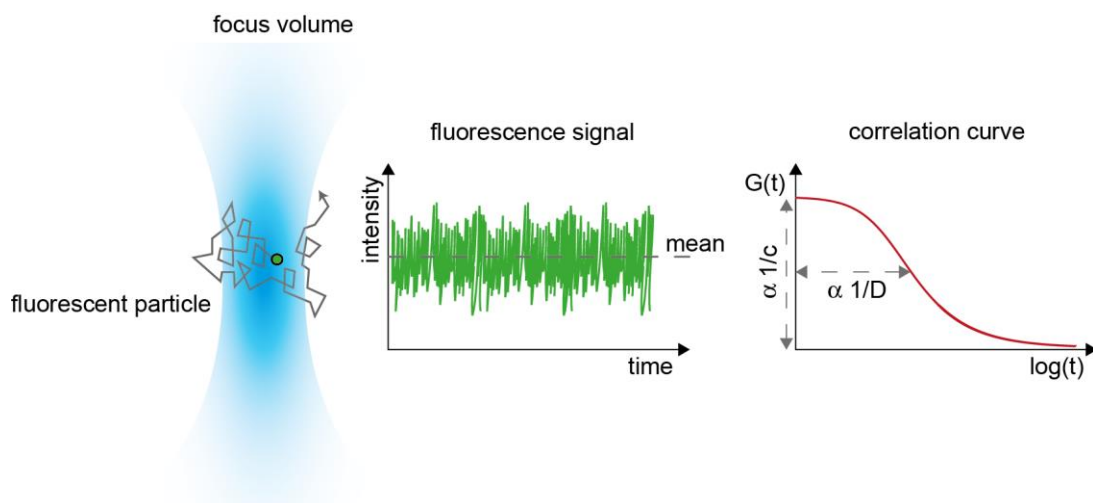


Fig 70. Principe de la spectroscopie à corrélation de fluorescence

Ces fluctuations sont dues à l'entrée et la sortie du fluorophore qui diffuse dans le volume confocal. Cette technique permet de mesurer la diffusion d'une protéine. Elle est sensible au nombre de fluorophores qui diffusent dans le volume confocal. En effet, si trop de fluorophores diffusent, il sera difficile de mesurer les fluctuations. C'est pourquoi cette technique est adaptée à de faibles concentrations en fluorophore. En 2c-FCCS, les fluctuations sont mesurées dans un

même volume confocal avec deux canaux. Il est possible de mesurer l'auto-corrélation dans chaque canal, ainsi que la corrélation croisée. Cette technique est utilisée pour mesurer la co-diffusion de deux fluorophores et permet d'avoir accès à l'information sur l'interaction protéine-protéine (Bacia and Schwille, 2007). Il a été montré que le FRET modifie l'amplitude des courbes d'auto-corrélation et de corrélation croisée (Eggeling et al., 2005). C'est pourquoi cette technique semble adaptée pour mesurer le FRET dans des zones cellulaires où le biosenseur est en faible quantité.

Cependant, la 2c-FCCS est très sensible à la fuite spectrale, notamment entre la GFP et la mCherry. Pour y remédier, il est possible d'utiliser la technique de comptage de photons (TCSPC) en parallèle, on parle de FLCS. Le principe de cette technique est de pouvoir distinguer la contribution de l'émission du fluorophore vert dans le canal rouge.. Pour la FLCS, deux lasers sont utilisés en simultanée, un laser pulsé à 470nm pour exciter la GFP, et un laser continu à 561nm pour exciter la mCherry. L'utilisation d'un laser pulsé permet de faire du comptage de photon corrélé en temps et de mesurer leur délai d'arrivée au détecteur. Ainsi, s'il n'y avait pas de fuite spectrale, on devrait observer dans le canal vert la décroissance de fluorescence de la GFP et dans le canal rouge uniquement les fluctuations de l'émission de mCherry après excitation au laser continu. S'il y a contribution de l'émission de GFP dans le canal rouge, alors celle-ci est observable avec une décroissance de fluorescence (Fig 71) (Padilla-Parra et al., 2011b).

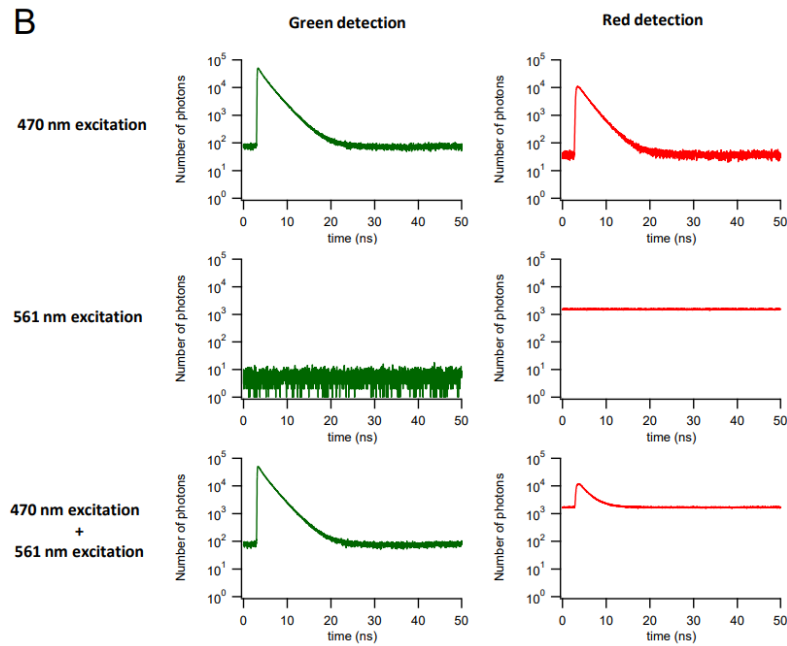


Fig 71. Principe de fonctionnement de FLCS

(En haut) La GFP est excitée grâce à un laser pulsé à 470 permettant d’observer un déclin dans le canal vert et un déclin dans le canal rouge correspondant à la fuite spectrale. (Au milieu) La mCherry est excitée par un laser continu à 561 nm. (En bas) Combinaison de l’émission dans chaque canal avec les deux excitations. Par filtre, il est possible d’enlever la contribution de la GFP dans le canal rouge.

Il est ainsi possible d’utiliser des filtres statistiques afin d’éliminer la contribution de la GFP dans le canal rouge. Après cela, les fluctuations peuvent être analysées et l’auto-corrélation ainsi que la corrélation croisée sont calculées. Un exemple de comparaison entre diffusion séparée de GFP et mCherry et diffusion de tandem GFP-mCherry est représenté en figure 72.

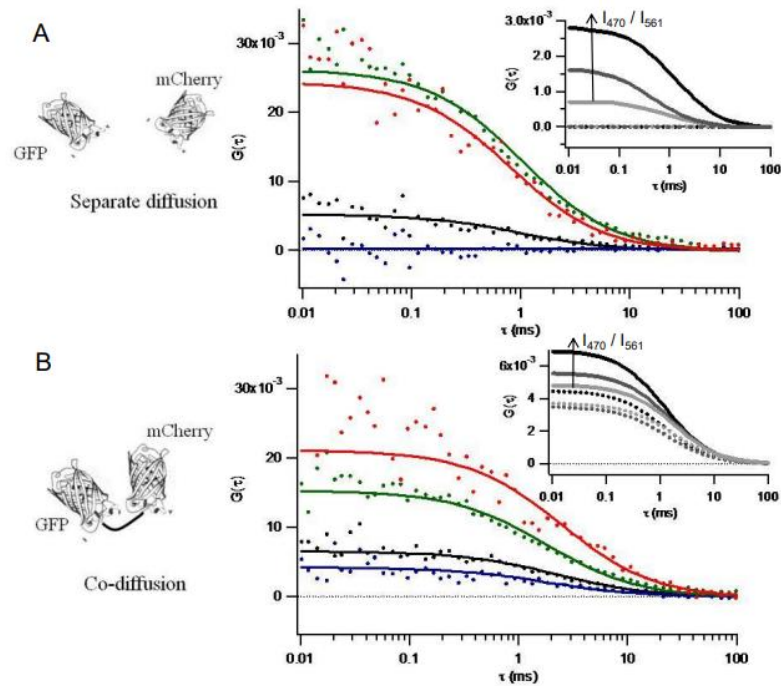


Fig 72. Principe de la 2C-FCCS pour mesurer la co-diffusion

Graphique représentant les courbes d'auto-corrélation, en vert pour la GFP et en rouge pour la mCherry, et de la cross-corrélation en noir. Les courbes sont des « fit » des données expérimentales en utilisant un modèle de diffusion classique. L'amplitude des courbes d'auto-corrélation diminue et on observe une courbe d'auto-corrélation lorsqu'il y a co-diffusion.

Lorsqu'il y a co-diffusion entre les deux fluorophores, alors on observe une courbe de corrélation croisée. S'il y a du FRET entre les deux fluorophores qui co-diffusent, alors on observe une diminution de l'amplitude de la corrélation croisée ainsi qu'une augmentation de l'amplitude de l'auto-corrélation du donneur (Eggeling et al., 2005). Dans le cadre du biosenseur GFP-Aurora A-mCherry, on a bien une co-diffusion des fluorophores et du FRET lorsque la kinase Aurora A est activée.

Pour suivre le FRET, on utilise le ratio $\frac{G_{0,cc}}{G_{0,v}}$ avec $G_{0,cc}$ l'amplitude de la courbe de corrélation croisée et $G_{0,v}$ et $G_{0,r}$ respectivement l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation dans le vert. Ainsi, si ce ratio augmente alors cela signifie que le FRET diminue, la co-diffusion étant inchangée au sein du biosenseur.

Des premières expériences de 2c-FCCS avaient été effectuées *in vitro* par Claire Déméautis en utilisant le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry et le biosenseur muté « kinase-dead » GFP-Aurora A K162M-mCherry (Fig 73).

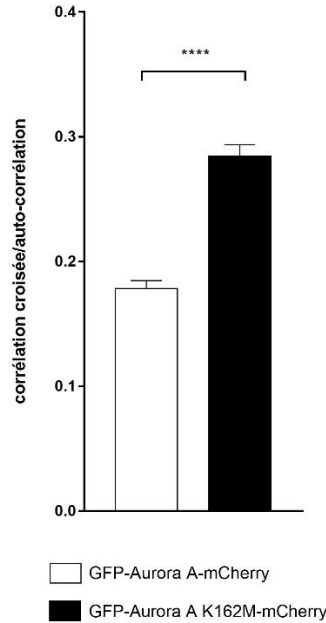


Fig 73. 2c-FCCS du biosenseur Aurora A in vitro

Graphique représentant le ratio de l'amplitude de la courbe de corrélation croisée sur l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation de la GFP dans des cellules U2OS exprimant le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry ou GFP-Aurora A K162M-mCherry. Test statistique de Student. **** $p < 0.0001$

Ces résultats montrent une augmentation significative du ratio de la corrélation croisée sur l'amplitude de l'auto-corrélation dans le vert avec le biosenseur « kinase –dead » en comparaison avec le biosenseur sauvage. Il est donc possible de suivre le FRET in vitro du biosenseur Aurora A par 2C-FCCS.

Pour vérifier si ces résultats sont reproductibles in cellulo, les lignées stables U2OS exprimant le biosenseur sauvage et le biosenseur « kinase-dead » ont été utilisées. Ces cellules ont été synchronisées en mitose. Pour chaque cellule, trois acquisitions sont faites dans le cytosol pendant 30 secondes. Le choix des cellules est très important puisqu'il faut choisir des cellules qui expriment le biosenseur à de faibles concentrations. Les résultats sont résumés dans la figure 74.

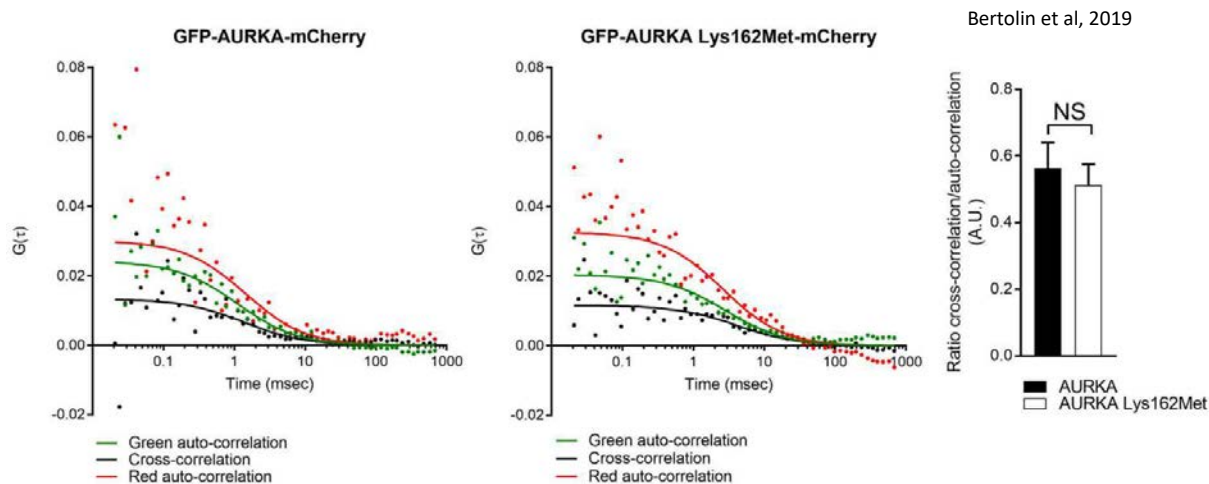


Fig 74. 2C-FCCS du biosenseur GFP-Aurora A-mcherry

Courbes d'auto-corrélation dans le vert et dans le rouge et courbe de corrélation croisée des cellules exprimant GFP-Aurora A-mCherry et GFP-Aurora A K162M-mCherry. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et les courbes sont modélisées avec un modèle classique de diffusion. Le rapport de la corrélation croisée sur l'auto-corrélation dans le vert est représenté dans le graphique à droite. Test statistique Mann-Withney. NS : non significatif.

On peut d'abord constater que l'amplitude de la courbe pour la mCherry est toujours au-dessus de celle de la GFP, ce qui selon le modèle indique qu'il y a moins de molécules de mCherry comparée à la GFP. Cela peut s'expliquer par le fait que la mCherry dispose d'une vitesse de maturation plus longue que la GFP. De plus on observe que le ratio de corrélation croisée sur l'auto-corrélation dans le vert n'est pas significativement différent entre le biosenseur sauvage et le biosenseur mutant. Il n'est donc pas possible de mesurer le FRET en 2c-FCCS avec ce biosenseur et ce couple de fluorophore. Une hypothèse est que la mCherry est moins brillante que la GFP est que le temps caractéristique d'état noir, dû par exemple à l'état triplet, est aussi plus long comparé à la GFP (Dean et al., 2011). Il existe donc une proportion de biosenseur GFP-Aurora A-mCherry avec une GFP brillante mais une mCherry « dark ». Ainsi les variations d'amplitude de FRET ne seraient pas assez importantes pour être observées en 2c-FCCS. Afin de remédier à ce problème, il a été décidé de changer la paire de fluorophore, particulièrement en changeant l'accepteur FRET mCherry en superYFP. Le donneur GFP est remplacé par un fluorophore cyan, la mTurquoise2. La superYFP est un dimère du fluorophore dLanYFP développé par l'équipe de Fabienne Mérola. La superYFP dispose d'une brillance importante de 112.5. Un nouveau biosenseur Aurora et ses dérivés, donneur seul et mutant, ont été générés en utilisant le couple mTurquoise2/superYFP. Ce biosenseur s'est révélé efficace

pour mesurer le FRET par FLIM dans des cellules U2OS synchronisées en mitose avec une différence de durée de vie de fluorescence d'environ 100ps. Les cellules U2OS ont été transitoirement transfectées avec le biosenseur sauvage ou mutant et les cellules sont synchronisées en mitoses. Les acquisitions se font selon les mêmes paramètres que pour le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry, en utilisant un laser pulsé à 440nm et un laser continu à 514nm. (Fig 75).

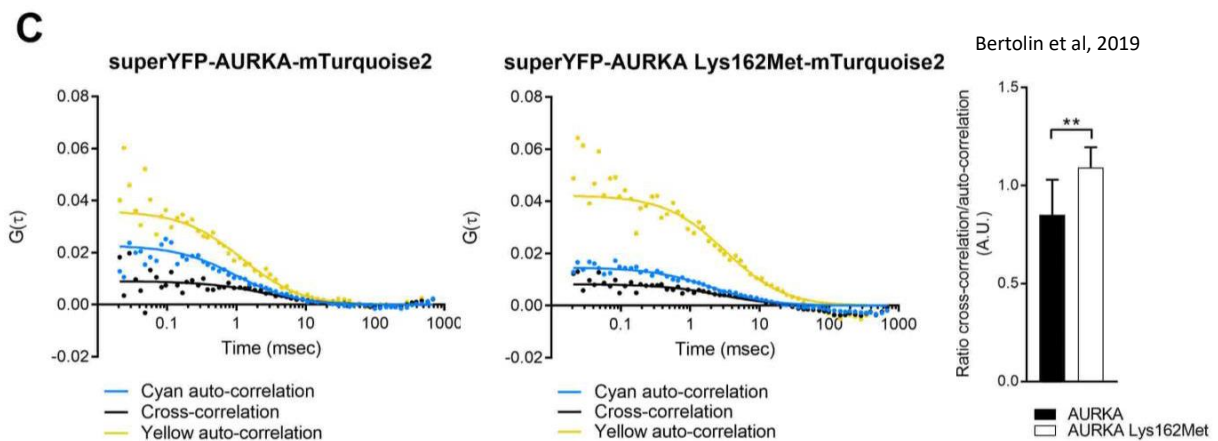


Fig 75. 2C-FCCS du biosenseur mTurquoise2-Aurora A-superYFP

Courbes d'auto-corrélation dans le cyan et dans le jaune et courbe de corrélation croisée des cellules exprimant mTurquoise2-Aurora A-superYFP et mTurquoise2-Aurora A K162M-superYFP. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et les courbes sont modélisées avec un modèle classique de diffusion. Le rapport de la corrélation croisée sur l'auto-corrélation dans le cyan sur est représenté dans le graphique à droite. Test statistique Mann-Withney. ** $p < 0.01$

On constate le ratio de la corrélation croisée sur l'auto-corrélation dans le cyan diminue pour le biosenseur sauvage comparé au biosenseur mutant. Cela montre qu'il est possible de mesurer le FRET en 2c-FCCS en utilisant le biosenseur et la paire mTurquoise2/superYFP. On peut voir aussi que l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation de la superYFP est toujours au-dessus de celle de la mTurquoise2. Afin de vérifier que cela n'était pas dû à des propriétés photophysiques de la superYFP, telle que l'état triplet, l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation de la superYFP a été mesurée en faisant varier la puissance du laser (Fig 76).

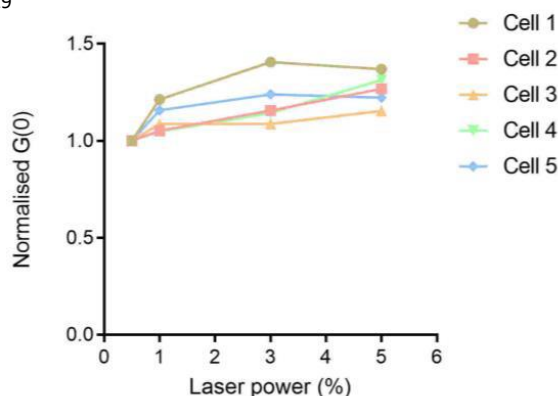


Fig 76. Effet de la puissance du laser sur l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation de la superYFP

Le graphique représente l'amplitude normalisée de la courbe d'auto-corrélation de la superYFP de cellules U2OS exprimant le biosenseur mTurquoise2-Aurora A-superYFP synchronisées en mitose, selon différentes puissances du laser à 514nm.

Cette expérience montre que l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation de la superYFP varie peu, en moyenne de 20 à 30% ce qui n'explique pas la nette différence observable entre l'amplitude de l'auto-corrélation de la mTurquoise2 et de la superYFP. Une autre hypothèse pourrait être que la vitesse de maturation de la superYFP est plus lente en comparaison de la mTurquoise2. Des résultats préliminaires effectués par l'équipe de Fabienne Mérola iraient dans ce sens.

L'ensemble de ces résultats montre que la mesure de FRET par d'autres méthodologies n'est pas toujours possible même si ce FRET est mesurable par FLIM. C'est le cas de l'anisotropie lorsqu'on utilise la paire GFP/mCherry, il pourrait être pertinent de refaire cette expérience en utilisant une autre paire telle que mTurquoise2/superYFP. La 2C-FCCS s'est montrée efficace pour mesurer l'activation du biosenseur Aurora A en utilisant la paire mTurquoise2/superYFP. Cette méthodologie est particulièrement adaptée pour mesurer l'activité du biosenseur dans des localisations où Aurora A est peu exprimée et où le FLIM est limitant.

Ces résultats font partie de l'article : **Optimised FRET pairs and quantification approaches to detect the activation of Aurora kinase A at mitosis** (Giulia Bertolin, Florian Sizaire, Claire Demeautis, Catherine Chapuis, Fabienne Merola, Marie Erard, Marc Tramier) publié dans le journal ACS Sensors (Bertolin et al., 2019).

Optimised FRET pairs and quantification approaches to detect the activation of Aurora kinase A at mitosis.

Giulia Bertolin¹, Florian Sizaire¹, Claire Déméautis^{1,§}, Catherine Chapuis¹, Fabienne Mérola², Marie Erard² and Marc Tramier^{1,3*}.

¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Genetics and Development Institute of Rennes), UMR 6290, F-35000 Rennes, France

² Univ Paris Sud, CNRS, LCP (Laboratoire de Chimie Physique), UMR 800 F-91400 Orsay, France.

³ Univ Rennes, BIOSIT, UMS CNRS 3480, US INSERM 018, F-35000 Rennes, France

[§] Present address: Leica Microsystems SAS, rue du 1er Mai, Nanterre, France

* Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T. (Genetics and Development Institute of Rennes (IGDR), 2, Avenue du Prof. Léon Bernard, 35043 Rennes, France; +33223235487; marc.tramier@univ-rennes1.fr)

Declaration of interests: none

Abstract

Genetically-encoded Förster's Resonance Energy Transfer (FRET) biosensors are indispensable tools to sense the spatiotemporal dynamics of signal transduction pathways. Investigating the crosstalk between different signalling pathways is becoming increasingly important to follow cell development and fate programs. To this end, FRET biosensors must be optimised to monitor multiple biochemical activities simultaneously and in single cells. In addition, their sensitivity must be increased to follow their activation even when the abundance of the biosensor is low.

We describe here the development of a second generation of Aurora kinase A/AURKA biosensors. First, we adapt the original AURKA biosensor –GFP-AURKA-mCherry– to multiplex FRET by using dark acceptors as ShadowG or ShadowY. Then, we use the novel superYFP acceptor protein to measure FRET by 2-colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, in cytosolic regions where the abundance of AURKA is extremely low and undetectable with the original AURKA biosensor.

These results pave the way to the use of FRET biosensors to follow AURKA activation in conjunction with substrate-based activity biosensors. In addition, they open up the possibility of tracking the activation of small pools of AURKA and its interaction with novel substrates, which would otherwise remain undetectable with classical biochemical approaches.

Keywords: Aurora kinase A/AURKA, mitosis, fluorescence anisotropy, multiplex FRET, superYFP, 2-color FCCS.

Introduction

Genetically-encoded Förster's Resonance Energy Transfer (FRET) biosensors have revolutionised our knowledge of signal transduction pathways in the cell. The capability of sensing the activation of kinases, the activity of caspases, or the transport of second messengers as Ca²⁺ or cAMP opened up the possibility of following biochemical reactions in real time and with a spatiotemporal resolution (Sizaire and Tramier, 2017; Greenwald et al., 2018; Palmer et al., 2011). The novel frontier of these probes consists in combining two or more FRET biosensors at a time to unravel the interdependence of signal transduction pathways, an approach known as multiplex FRET (Piljic and Schultz, 2008; Carlson and Campbell, 2009; Ai et al., 2008; Ding et al., 2011; Su et al., 2013; Demeautis et al., 2017; Ross et al., 2018).

AURKA is a serine/threonine kinase with multiple functions in the cell. AURKA was first described to be a mitotic protein with multiple partners and playing key roles in centrosome maturation, in the regulation of mitotic timing, and in building and stabilising the mitotic spindle (Nikonova et al., 2013). Nonetheless, it is now becoming increasingly clear that AURKA has several roles outside of mitosis, such as favouring neurite outgrowth (Mori et al., 2009), transcriptional activity through the *MYC* promoter (Zheng et al., 2016), and mitochondrial homeostasis (Bertolin et al., 2018; Grant et al., 2018). In this light, it is still unknown whether mitotic and non-mitotic functions of AURKA are made possible by a single, recycling pool of the kinase or by different pools at specific subcellular locations. Given the fact that the abundance of AURKA is regulated throughout the cell cycle, sensitive techniques are required to decipher the role of AURKA

Bertolin et al., 13/05/2019 – preprint copy - BioRxiv

at selected compartments and especially when the abundance of the protein is low as in G1 phase.

We previously engineered an AURKA FRET biosensor where the donor-acceptor FRET pair flanks the entire AURKA sequence. This new strategy for FRET biosensors allowed us to replace the endogenous kinase in mammalian cells, and to report on its activation at centrosomes both at mitosis and during G1 phase (Bertolin et al., 2016). We here develop two independent strategies to ameliorate this probe: first, a single-colour AURKA biosensor for multiplex FRET and second, a method to estimate FRET efficiency in regions where the abundance of AURKA is low. We show that FRET donor-acceptor pairs with dark acceptors are preferable for engineering multiplex FRET approaches with the AURKA biosensor, rather than fluorescence anisotropy. We also optimise 2-colour Fluorescence Correlation Spectroscopy (2c-FCCS), together with an improved donor-acceptor FRET pair, to detect AURKA activation in cytoplasmic regions with low AURKA abundance.

Results and discussion

Homo-FRET within the AURKA biosensor is undetectable by fluorescence polarisation microscopy.

We previously generated an AURKA FRET biosensor (GFP-AURKA-mCherry) reporting on the autophosphorylation of the protein kinase AURKA on Thr288 (Bertolin et al., 2016). Biochemical studies reported that this post-translational modification primes the kinase for activation towards a given substrate (Bayliss et al., 2003; Cheetham, 2002; Zhang et al., 2007). In the perspective of using our FRET biosensor in a multiplex FRET context, we modified the GFP-AURKA-mCherry biosensor to create a single-colour FRET sensor to detect homo-FRET. We replaced the mCherry acceptor protein located at the carboxy terminus of the original AURKA biosensor with an Enhanced Green Fluorescent Protein (mEGFP), thereby creating a GFP-AURKA-GFP biosensor (Fig. 1A). Changes in the conformation of GFP-AURKA-GFP were analysed by following the fluorescence anisotropy of the biosensor, obtained by fluorescence polarization microscopy (Tramier and Coppey-Moisan, 2008). With this approach, decreased anisotropy would correspond to FRET within the biosensor.

We synchronised U2OS cells at mitosis to benefit from a cell cycle phase in which AURKA is active and highly abundant at the mitotic spindle (Nikonova et al., 2013), and where the GFP-AURKA-mCherry biosensor displays significant hetero-FRET (Bertolin et al., 2016). To establish the maximum decrease in anisotropy detectable with our fluorophore pair, we compared a GFP monomer and a tandem dimer. For both constructs, we imaged the parallel and perpendicular components of the emitted fluorescence. This was performed by exciting the sample with a polarised laser, followed by the detection through an analyser in a confocal microscope setup. Similarly to what previously described, the dimer displays a decreased anisotropy (mean anisotropy: 0.22) compared to the GFP monomer (mean anisotropy: 0.30) in mitotic cells, thus indicating the homotransfer

between the two GFP fluorophores harbouring different orientations (Fig. 1B) (Tramier and Coppey-Moisan, 2008). This is consistent with the fact that the rotation period of the GFP fluorophore is slower than fluorescence lifetime (Gautier et al., 2001; Swaminathan et al., 1997). We then evaluated the anisotropy of GFP-AURKA, of the biosensor GFP-AURKA-GFP and of the kinase-dead version of the biosensor, GFP-AURKA Lys162Met-GFP (Bertolin et al., 2016), on the mitotic spindle. As previously described (Bertolin et al., 2016), the Lys162Met variant of AURKA induces mitotic spindle abnormalities such as monopolar or multipolar spindles. The anisotropy of GFP-AURKA was not different from the one of the GFP monomer, indicating that the presence of the kinase does not perturb the anisotropy of GFP *per se* (Fig. 1C). However, we did not detect any significant difference between the anisotropy of GFP-AURKA and of the biosensor, both in the activated and in the kinase-dead version (Fig. 1C).

Although fluorescence anisotropy was recently shown to be a suitable approach for FRET biosensors (Ross et al., 2018), relative differences in anisotropy between active and inactive biosensors are often very low. In the case of the AURKA biosensor, the difference between the active and the inactive forms of the biosensor was not significant, with the GFP-AURKA-GFP showing a slightly increased anisotropy rather than a decreased one. This could be due to the clustering of the GFP-AURKA-GFP biosensor at the spindle. Indeed, the high mechanical tension taking place at this compartment at mitosis could keep the fluorophores in a stable conformation, altering the rotational motility of GFP. Alternatively, GFP rotation could also be perturbed by the presence of selected interactors of AURKA at the spindle, which could maintain the biosensor in a fixed conformation. Last, our results could also indicate that the two GFP fluorophores are in a parallel conformation, making differences in anisotropy undetectable and preventing the use of this approach for multiplex FRET in our biosensor setup.

The dark acceptors ShadowG and ShadowY allow for single-colour FRET/FLIM measurements.

In the perspective of optimising a multiplex FRET strategy for the AURKA biosensor, we then explored whether dark acceptors as ShadowG (Murakoshi et al., 2015) or ShadowY (Murakoshi and Shibata, 2017) could be used as efficient alternatives to fluorescence anisotropy to this end. These proteins were previously demonstrated to be non-fluorescent variants of the Yellow Fluorescent Protein (YFP) preventing spectral bleedthrough of the first acceptor in the second donor channel, thereby resulting in a suitable strategy for multiplex FRET design. As shown in the original reports, they also behave as good acceptors in FRET/FLIM pairs for mGFP or mClover, respectively. These properties of ShadowG and ShadowY allow for multi-colour imaging and FRET/FLIM studies with other fluorescent proteins, and we previously took advantage of these properties of ShadowG for the setup of multiplex FRET analyses. In particular, ShadowG turned out to be an efficient acceptor for

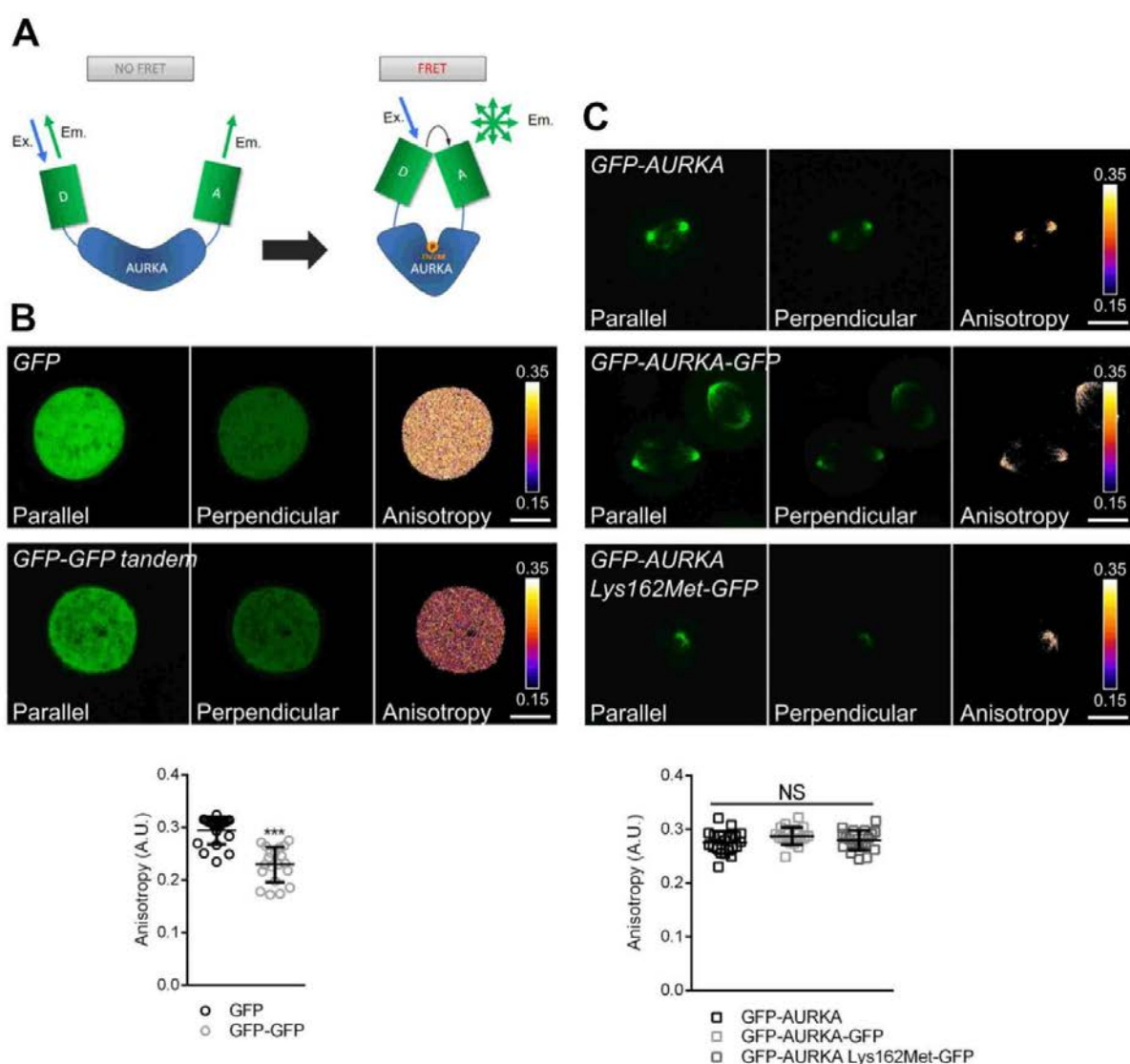


Fig. 1. The GFP-AURKA-GFP biosensor does not allow the detection of homo-FRET. **A.** Model illustrating the mode of action of the GFP-AURKA-GFP biosensor. This biosensor switches from an open-to-close conformation upon autophosphorylation of AURKA on Thr288. While no depolarisation is observed in the open conformation, the closed conformation of the biosensor induces a partial depolarisation of the acceptor, due to the FRET phenomenon. Of note, the real three-dimensional orientation of the two GFPs is unknown. **B.** Representative parallel and perpendicular polarised images, and corresponding anisotropy quantification of U2OS cells synchronised at mitosis and expressing a GFP monomer (upper panels) or a GFP tandem dimer (lower panels). **C.** Representative parallel and perpendicular polarised images, and corresponding anisotropy quantification of U2OS cells synchronised at mitosis and expressing GFP-AURKA, GFP-AURKA-GFP or GFP-AURKA Lys162Met-GFP localised at the mitotic spindle. The pseudocolor scale in **B.** and **C.** represents pixel-by-pixel anisotropy. Transfection conditions are indicated in italics. Anisotropy values for individual cells are represented as circles in **B.**, and as squares in **C.** Data represent means \pm s.d. of one representative experiment of three. $n=30$ cells per condition. Scale bar: 10 nm. *** $P<0.001$ against the 'GFP' condition; NS: not significant.

the cyan fluorescent protein mTFP1 as well (Demeautis et al., 2017), and we used the mTFP1-ShadowG donor-acceptor pair in conjunction with a second one constituted by the Large Stoke

Shift fluorescent protein mOrange (LSSmOrange) and mKate2. This combination of fluorophores used in FRET biosensors

Bertolin et al., 13/05/2019 – preprint copy - BioRxiv

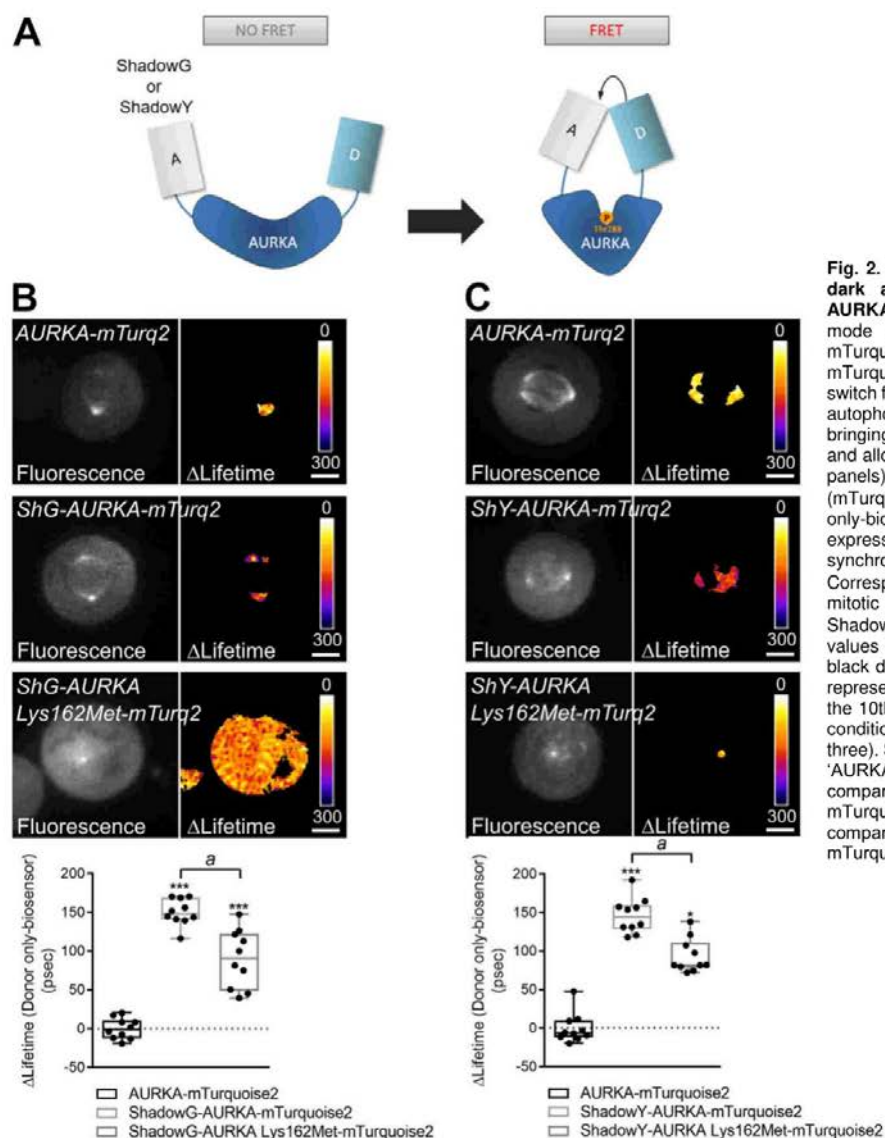


Fig. 2. ShadowG and ShadowY are efficient dark acceptors for mTurquoise2 in the AURKA biosensor. **A.** Model illustrating the mode of action of the ShadowG-AURKA-mTurquoise2 or the ShadowY-AURKA-mTurquoise2 biosensors. These biosensors switch from an open-to-close conformation upon autophosphorylation of AURKA on Thr288, bringing the donor and the acceptor in vicinity and allowing FRET detection. **B. and C.** (Upper panels) Representative fluorescence (mTurquoise2 channel) and Δ Lifetime (donor only-biosensor) images of U2OS cells expressing the indicated constructs and synchronised at mitosis. (Lower panel) Corresponding Δ Lifetime quantification at the mitotic spindle. ShG: ShadowG; ShY: ShadowY; mTurq2: mTurquoise2. Δ Lifetime values for individual cells are represented as black dots in each boxplot. The bar in boxplots represents the median; whiskers extend from the 10th to the 90th percentiles. $n=10$ cells per condition of one representative experiment (of three). Scale bar: 10 nm. *** $P<0.001$ against the 'AURKA-mTurquoise2' condition; $^aP<0.001$ compared to the 'ShadowG-AURKA-mTurquoise2' condition in **B.** or $^aP<0.05$ compared to the 'ShadowY-AURKA-mTurquoise2' condition in **C.**

allowed us to record two biochemical activities simultaneously (Demeautis et al., 2017; Ringer et al., 2017).

In light of these previous data, we first monitored the effect of using ShadowG and ShadowY as dark acceptors for the cyan donor protein mTurquoise2. We observed a decrease in the lifetime of the donor of ~500 psec when ShadowG was present in a tandem construct, and of ~800 psec when ShadowY was used (Supplementary Fig. 1A), demonstrating that both fluorophores are excellent acceptors for mTurquoise2. We then replaced the GFP-mCherry donor-acceptor pair of the original AURKA biosensor with mTurquoise2 and ShadowG or ShadowY, thereby creating ShadowG-AURKA-mTurquoise2 or ShadowY-

AURKA-mTurquoise2 (Fig. 2B). We then tested the conformational changes of these two biosensors by FRET/FLIM in U2OS cells synchronised at mitosis, by calculating the net difference in the lifetime (Δ Lifetime) between the donor-only construct (AURKA-mTurquoise2) and ShadowG-AURKA-mTurquoise2 or ShadowY-AURKA-mTurquoise2 at the mitotic spindle. Δ Lifetime was used to standardise the decrease in lifetime due to FRET, as lifetime variation is the measured parameter directly dependent on the standard deviation of the experimental setup used (50 psec with our setup (Bertolin et al., 2016)). We measured a mean Δ Lifetime of ~150 psec for both biosensors (Fig. 2B-C), which was similar to the decrease observed for the

original GFP-AURKA-mCherry one (Bertolin et al., 2016). With the same approach, we also tested the impact of kinase-dead AURKA on FRET efficiencies. Δ Lifetime values for both biosensors carrying the Lys162Met mutation were half than their wild-type counterparts, indicating lower FRET efficiencies when AURKA is catalytically inactive. However, it must be noted that the difference in lifetime between normal and kinase-dead AURKA biosensors with dark acceptors (~50 psec) was less remarkable than what observed with the GFP/mCherry AURKA biosensor (~120 psec), where the GFP-AURKA Lys162Met-mCherry lifetime was comparable to the one of the donor alone (Bertolin et al., 2016).

Our results show that the replacement of the donor-acceptor pair from GFP-mCherry to mTurquoise2-ShadowG or ShadowY maintains FRET efficiency. In addition, both dark biosensors show a lowered FRET efficiency when the kinase is catalytically dead, although this difference is less pronounced than in the original GFP-AURKA-mCherry biosensor. It should also be noted that the performance of a FRET biosensor cannot be predicted from tandem constructs. In spite of the significantly better performance of the ShadowY-mTurquoise2 tandem

fluorescence anisotropy for the design of multiplex FRET experiments with the AURKA kinase biosensor. In this light, cumulating a biosensor of AURKA containing a dark acceptor with a substrate-based biosensor of the kinase flanked by the LSSmOrange/mKate2 donor-acceptor pair could allow the simultaneous monitoring of AURKA activation by auto-phosphorylation on Thr288 and its activity towards a substrate, on the same cell and with a spatiotemporal resolution.

The GFP-AURKA-mCherry biosensor is not suitable to estimate FRET by two-colour FCCS.

It is known that AURKA is a multifunctional kinase with several subcellular locations, with both mitotic and non-mitotic functions. While mitotic AURKA is highly abundant in cells (Nikonova et al., 2013), the low abundance of non-mitotic pools of AURKA often represent a limitation in exploring their function. Our current approach based on FRET/FLIM allows to analyse the activation of the kinase only where it is particularly abundant (i.e. the centrosome, the mitotic spindle or mitochondria) (Bertolin et

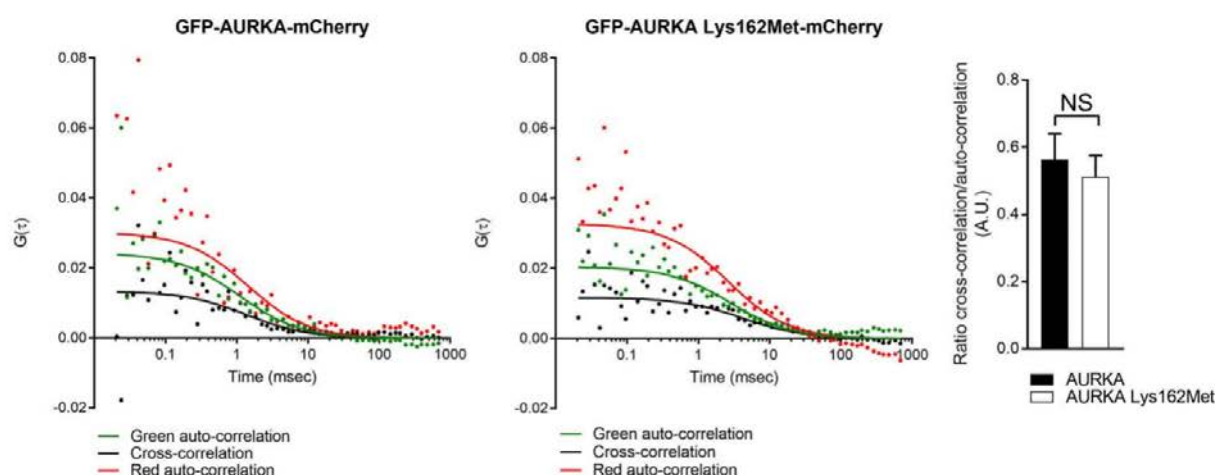


Fig. 3. The GFP-AURKA-mCherry biosensor does allow FRET detection by 2c-FCCS. Green and red auto-correlation curves, together with the respective cross-correlation curves issued from one representative U2OS cell expressing GFP-AURKA-mCherry (left panel) or GFP-AURKA Lys162Met-mCherry (middle panel) and synchronised at mitosis. Measurements were taken in the cytosol; one independent point per condition is shown. Experimental values obtained for each curve are represented as dots. Time is expressed in msec. (Right panel) Ratio of the cross-correlation/green auto-correlation values for GFP-AURKA-mCherry (black bar) and GFP-AURKA Lys162Met-mCherry (white bar). Each n represents the average of three independent points per cell at 0.01 msec; $n=10$ cells per condition of one representative experiment (of three). NS: not significant.

compared to the ShadowG-mTurquoise2 one (Supplementary Fig. 1A), the corresponding AURKA biosensors show an identical response (Fig. 2B and C). Therefore, two additional parameters should be kept into consideration. First, the nature of the protein probed within the biosensor and second, the possibility that the conformational changes of this protein fall within the Förster's radius of the donor-acceptor pair or not.

However, the use of biosensors containing dark acceptors should be considered as a suitable alternative to

al., 2016, 2018), possibly excluding from the analysis other cytosolic pools of AURKA too scarce to be analysed with this microscopy technique. Therefore, we turned to two-colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (2c-FCCS) to estimate FRET in regions of the cytoplasm where the abundance of AURKA is low and the number of photons is insufficient to estimate the activation of AURKA by fluorescence lifetime.

Bertolin et al., 13/05/2019 – preprint copy - BioRxiv

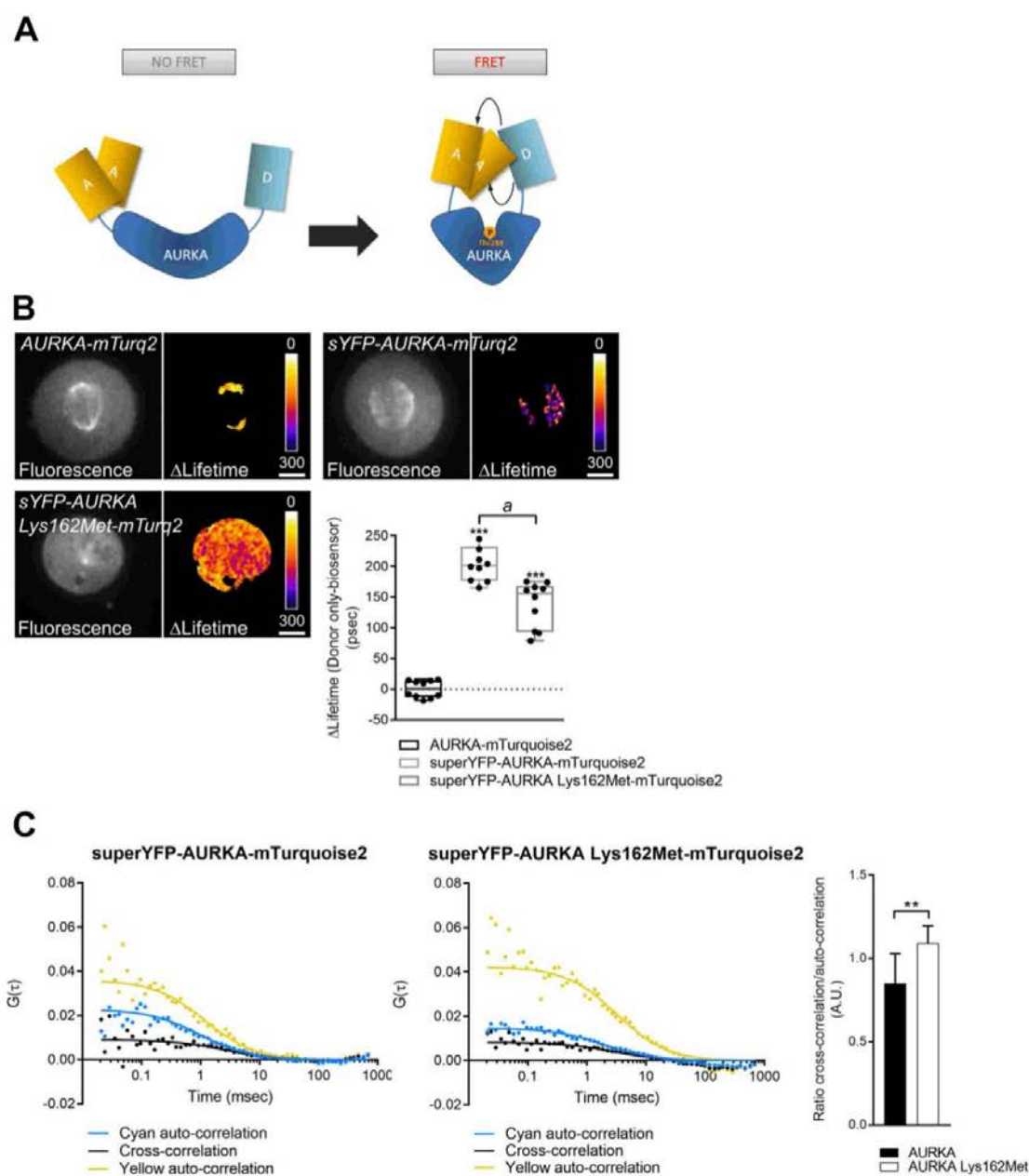


Fig. 4. superYFP coupled to mTurquoise2 ameliorates FRET/FLIM detection and allows FRET detection by 2c-FCCS **A.** Model illustrating the mode of action of the superYFP-AURKA-mTurquoise2 biosensor. It switches from an open-to-close conformation upon autophosphorylation of AURKA on Thr288, and allowing FRET measurements. Of note, superYFP is a dimeric acceptor. **B.** Representative fluorescence (mTurquoise2 channel) and Δ Lifetime (donor only-biosensor) images of U2OS cells expressing the indicated constructs and synchronised at mitosis, together with the corresponding Δ Lifetime quantification at the mitotic spindle. sYFP: superYFP; mTurq2: mTurquoise2. Δ Lifetime values for individual cells are represented as black dots in each boxplot. The bar in boxplots represents the median; whiskers extend from the 10th to the 90th percentiles. $n=10$ cells per condition of one representative experiment (of three). Scale bar: 10 μ m. **C.** Cyan and yellow auto-correlation curves, together with the respective cross-correlation curves issued from one representative U2OS cell expressing superYFP-AURKA-mTurquoise2 (left panel) or superYFP-AURKA Lys162Met-mTurquoise2 (middle panel) and synchronised at mitosis. Measurements were taken in the cytosol; one independent point per condition is shown. Time is expressed in msec. Experimental values obtained for each curve are represented as dots. (Right panel) Ratio of the cross-correlation/cyan auto-correlation values for superYFP-AURKA-mTurquoise2 (black bar) and superYFP-AURKA Lys162Met-mTurquoise2 (white bar). Each n represents the average of three independent points per cell at 0.01 msec; $n=10$ cells per condition of one representative experiment (of three) *** $P<0.001$ against the 'AURKA-mTurquoise2' condition (B.), ** $P<0.01$ against the 'AURKA' condition (C.); $^{\#}P<0.001$ compared to the 'superYFP-AURKA-mTurquoise2' condition (B.)

In 2c-FCCS, the fluctuating signal intensities of the red and the green channels in and out of a confocal volume are monitored in real time, and their auto-correlation function is computed together with a cross-correlation function between the two channels. Besides these measurements, we used the temporal correlation of each fluorophore excited by different lasers (pulsed or continuous) to remove the spectral bleed-through of GFP into the mCherry channel. This was done following a previously published strategy (Padilla-Parra et al., 2014, 2011) based on Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (FLCS) (Böhmer et al., 2002). We excited GFP with a pulsed laser and mCherry with a continuous laser. We then gave a specific weight to each photon in the green and in the red channel using pulsed or continuous calculated lifetime filters. In order to eliminate cross-talk effects between GFP and mCherry, these weights were used to build the auto-correlation curves for each fluorophore, and the cross-correlation curve. Applying this strategy to two separate molecules of GFP and mCherry gives a null cross-correlation, thereby eliminating potential artefacts in 2c-FCCS experiments due to spectral bleed-through (Padilla-Parra et al., 2014, 2011). In 2c-FCCS, the presence of FRET is indicated by a simultaneous decrease of the amplitude of the cross-correlation curve and the increased amplitude of the green auto-correlation curve (Foo et al., 2012; Kohl et al., 2002). This allows to use 2c-FCCS to estimate FRET in co-diffusing molecules, as it is the case for FRET biosensors.

With this approach, we estimated the green and red auto-correlation curves of the original AURKA biosensor (GFP-AURKA-mCherry) and of the kinase-dead GFP-AURKA Lys 162Met-mCherry variant in cells synchronised at mitosis. For each cell analysed, we measured three randomly-chosen points in the cytosol to estimate FRET efficiency in this compartment. We did not detect any significant difference between active and kinase-dead AURKA when we compared the ratio of the amplitudes of the red or green auto-correlation curves with the amplitude of the cross-correlation curve (Fig. 3). This was in apparent contradiction with previous data acquired in cells where the cytosol was strong enough to perform FRET/FLIM analyses (Bertolin et al., 2016), and where we detected FRET with the GFP-AURKA-mCherry biosensor. Therefore, we concluded that the ratio between the cross-correlation and the green auto-correlation is not sufficiently robust to detect changes due to FRET in the original AURKA biosensor.

As FRET cannot be estimated by 2c-FCCS using the original AURKA biosensor, it is possible that mCherry represents a limiting factor for the measurement of FRET via 2c-FCCS, due to its longer dark state compared to the one of EGFP-like proteins (Dean et al., 2011), and its lower brightness (15.84 for mCherry vs 33.6 for mEGFP; www.fpbases.org). Changes in the donor-acceptor fluorescent pair should then be envisaged to adapt the AURKA biosensor to 2c-FCCS, choosing an acceptor with a higher brightness to ameliorate the robustness of the amplitude of the different correlation curves.

Replacing the donor-acceptor pair is mandatory to adapt the AURKA biosensor to two-colour FCCS.

To find a suitable donor-acceptor pair to adapt the AURKA biosensor to 2c-FCCS, we first searched for a bright acceptor. We decided to replace the usual acceptors of cyan fluorescent proteins Citrine/Venus (brightness of approximately 69; www.fpbases.org), by superYFP, a novel dimeric yellow fluorescent protein with high brightness and based on dLanYFP (the dLanYFP brightness is 112.5; www.fpbases.org); the full characterisation of the physicochemical properties of superYFP will be described elsewhere. We coupled superYFP to mTurquoise2, as this appeared to be an efficient donor fluorophore in the dark versions of the AURKA biosensor (Fig. 2). We then tested the capacity of mTurquoise2 to act as a donor of energy for superYFP in a tandem construct. mTurquoise2 displayed a Δ Lifetime of ~600 psec when superYFP was present in U2OS cells synchronised at mitosis (Supplementary Fig. 1B), indicating that this donor-acceptor couple is suitable for FRET/FLIM analyses.

In light of these data, we then engineered the superYFP-AURKA-mTurquoise2 biosensor (Fig. 4A). To validate this new biosensor, we evaluated its conformational changes at the mitotic spindle by FRET/FLIM. Again, we compared the Δ Lifetime between the donor-only construct AURKA-mTurquoise2 and superYFP-AURKA-mTurquoise2, and we observed a mean Δ Lifetime of ~210 psec in the presence of the acceptor (Fig. 4B). Unlike the GFP-AURKA-mCherry original biosensor, the presence of the AURKA Lys162Met mutation did not abolish FRET efficiency, as observed for the variants of the AURKA biosensor containing dark acceptors. The differences in Förster's radius (R_0) for the mTurquoise/superYFP pair (59 Å) compared to GFP/mCherry (51 Å; (Albertazzi et al., 2009)) could explain the behaviour of the two biosensors. Applying the FRET equation with the usual value $\kappa^2=2/3$, the estimated distance between donor and acceptor is of 83 Å for the normal, active AURKA, and more than 97 Å for the kinase-dead. Using the same distances for the superYFP-AURKA-mTurquoise2 active and dead biosensors, we calculated lifetime values (2.97 ns for the active form; 3.18 ns for the kinase-dead) compatible with what we measured experimentally (3.15 ns for the active; 3.25 ns for the kinase-dead), taking 3.35 ns as lifetime of the donor alone. It should be noted that the time-gated detection of our system does not yield an unequivocal absolute lifetime value for mTurquoise2 (Theoretical lifetime of mTurquoise2: 4 ns (Goedhart et al., 2012); lifetime measured with our system: 3.35 ns). Nevertheless, we recently provided evidence that net differences between donor-only and biosensors constructs are maintained (Demeautis et al., 2017). Taken together, the difference between active and kinase-dead form is the main parameter to be taken into account to estimate the quality of any AURKA biosensor. In this light, the difference in the mTurquoise/superYFP biosensors is of 100 psec, whereas the one observed using the GFP/mCherry biosensors is of 130 psec (Bertolin et al., 2016). This indicates that when FRET is calculated by FLIM, this new biosensor does not show a better performance.

However, we used this version of the AURKA biosensor for 2c-FCCS, potentially benefiting from the greater brightness of superYFP in the computing of the cross-correlation curve. We calculated the cyan and yellow auto-correlation curves of superYFP-AURKA-mTurquoise2 and of superYFP-AURKA Lys162Met-mTurquoise2 in U2OS cells synchronised at mitosis (Fig. 4C). As done previously for the GFP-AURKA-mCherry biosensor, we measured 3 independent points per cell, chosen in a random manner in the cytosol. We observed a simultaneous increase of the cyan auto-correlation curve and a decrease of the cross-correlation curve in cells expressing the superYFP-AURKA-mTurquoise2 biosensor when compared to the kinase-dead one. The ratio between the cross-correlation and the cyan auto-correlation was lower in cells expressing the active biosensor than in cells expressing the kinase-dead one (Fig. 4C, right panel).

We also noticed that the amplitude of the auto-correlation curve of superYFP is higher than the one of mTurquoise2. We reasoned that this could be linked to some photophysical properties of superYFP, induced by the laser power used for monitoring its diffusion. We thus monitored the amplitude of the auto-correlation curve of superYFP after modifying the power of the 514 nm laser. Given that the 2c-FCCS measurements were done with a laser power of ~ 1% (Fig. 4C), we chose four different laser powers for comparison: 0.5%, 1%, 3% and 5%. We didn't observe any significant alteration in the yellow amplitude, which undergoes a 20% increase at most when switching the 514 nm laser from 0.5% to 1% and then remains constant between 1%, 3% and 5% (Supplementary Fig. 2). The fact that there is no significant change in the amplitude of the yellow auto-correlation curve when changing the laser power suggests that a modification of the photophysical behaviour of superYFP may not be the responsible of the observed higher amplitude. Another possibility is that the high amplitude of the yellow auto-correlation curve in 2c-FCCS analyses reflects a lower concentration of the yellow moiety in comparison to the cyan one. Given that the superYFP derives from dLanYFP, this could be due to the slower maturation of superYFP compared to mTurquoise2.

Taken together, the variations in amplitude of the cyan auto-correlation and of the cross-correlation curves meet the requirements for FRET within the superYFP-AURKA-mTurquoise2 biosensor. Although correlation analyses were proven to be a useful approach to characterise single-molecule FRET (Nguyen et al., 2012; Nettels et al., 2015), we here report for the first time the use of 2c-FCCS to monitor FRET within a genetically-encoded biosensor. Last, this new version of the AURKA biosensor containing an mTurquoise/superYFP donor-acceptor FRET pair is a suitable tool to investigate the activation of discrete pools of AURKA with low abundance and with high spatiotemporal resolution.

Conclusions

Here we propose several improvements to the original AURKA FRET biosensor, both in terms of changing the donor-acceptor FRET pair for multiplex analyses, or in exploring new approaches

to estimate FRET efficiency. It might be useful to point out that although fluorescence anisotropy was successfully used to follow multiplex FRET among PKA, ERK and cAMP (Ross et al., 2018), this is clearly not a suitable approach for the AURKA biosensor. The results here described indicate that there is no “golden rule” for FRET biosensors, and that the capacity of every biosensor to give a satisfactory response with a particular methodology approaches must be carefully evaluated.

Changing the donor-acceptor FRET pairs was mandatory to cumulate the analysis of the conformational changes of AURKA and of its enzymatic activity towards a particular substrate. Given the fact that AURKA is a multifunctional kinase involved in several biochemical pathways (Nikonova et al., 2013), designing a strategy for multiplex FRET is a first, mandatory step to start understanding how AURKA auto-activates and interacts with its wide range of substrates. The spatiotemporal resolution AURKA activation and its concomitant interaction with a substrate, or more at a time, is a crucial aspect in the future development of therapeutic strategies in epithelial cancers showing an overexpression of AURKA.

Changes in the way FRET efficiency is calculated, together with improvements in the donor-acceptor FRET pair, were also required to evaluate the activation of AURKA when its abundance is low. 2c-FCCS with the mTurquoise/superYFP pair efficiently responds to this need, allowing to monitor the activation of AURKA in the cytosol. We previously described that AURKA is activated at mitochondria (Bertolin et al., 2018), a compartment where the kinase is abundant enough to perform FRET/FLIM analyses. The mTurquoise/superYFP AURKA FRET biosensor used in conjunction with fluorescent markers for other subcellular compartments could potentially shed light in the activation of AURKA at other locations, where the kinase is less abundant. Such activation could lead to the identification of novel roles of AURKA, together with novel substrates.

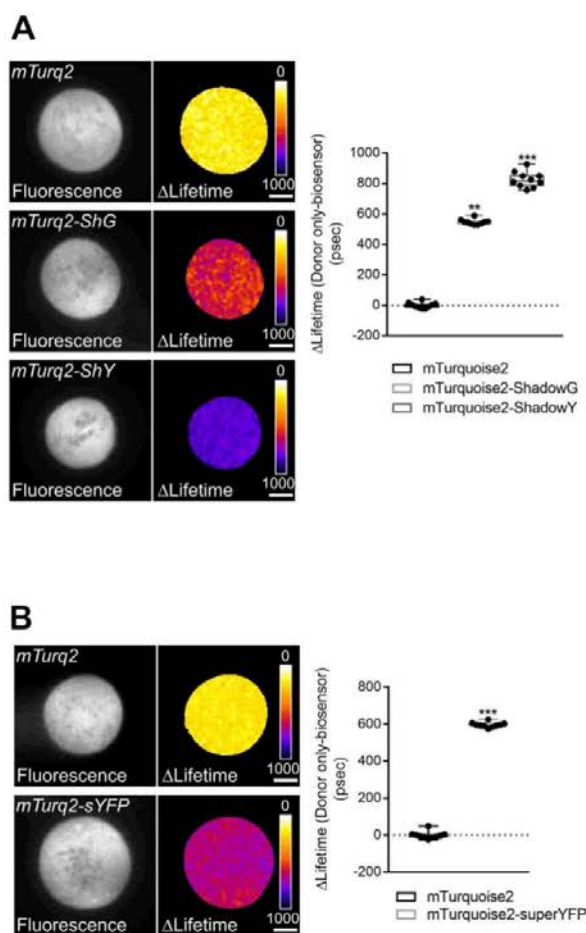
Materials and Methods

Expression vectors and molecular cloning procedures

The GFP-AURKA, GFP-AURKA-mCherry and the GFP-AURKA Lys162Met-mCherry vectors suitable for expression in mammalian cells were previously described (Bertolin et al., 2016). To obtain GFP-AURKA-GFP, GFP-AURKA under the AURKA minimal promoter sequence (CTTCCGG) was subcloned into a pCDNA6 vector (Thermo Fisher Scientific) into the Eam1105I/NheI restriction sites, and a second EGFP was inserted into the NheI/NotI sites. The GFP monomer and tandem dimer were previously described (Tramier and Coppey-Moisand, 2008). A plasmid containing the mTurquoise2 was obtained from Doris Gadella, together with the plasmids encoding ShadowG and ShadowY, which were obtained from Hideji Murakoshi. These plasmids were obtained via Addgene and have been previously described (Murakoshi et al., 2015; Murakoshi and Shibata, 2017; Mastop et al., 2017). To obtain AURKA-mTurquoise2, AURKA was subcloned into a pEGFP-N1 vector into the NotI/BamHI cloning site, while EGFP was replaced by mTurquoise2. To

obtain ShadowG-AURKA-mTurquoise2, ShadowY-AURKA-mTurquoise2 and superYFP-AURKA-mTurquoise2, ShadowG, ShadowY or superYFP were inserted into the XhoI/HindIII restriction sites of AURKA-mTurquoise2, respectively. To obtain

mTurquoise2-ShadowY tandem, a pEGFP-N1 backbone vector containing mTurquoise2 was digested with BglII/BamHI to insert ShadowY. To create the mTurquoise2-superYFP tandem, a pEGFP-N1 backbone vector containing a tandem of Aquamarine and superYFP was digested with AgeI/BglII to replace Aquamarine with mTurquoise2. To obtain a vector mTurquoise2 alone, the mTurquoise2-superYFP tandem was digested with BamHI to eliminate the superYFP fluorophore. Cloning reactions were performed with the NEBuilder HiFi DNA Assembly Mix (New England Biolabs) or by T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific). All cloning reactions were verified on a 3130 XL sequencer (Applied Biosystems). All restriction enzymes were purchased from Thermo Fisher Scientific. The Lys162Met variant for all AURKA biosensors analysed in the study were obtained from the corresponding wild-type constructs by QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene) with the following primers: 5'-CAAGTTTATTCTGGCTCTTATGGTGTTATTTAAAGCTCA GCT-3' (sense) and 5'-AGCTGAGCTTTAAATAACACCATAAGAGCCAGAATAA ACTTG-3' (anti-sense).



Supplementary Fig. 1. mTurquoise2-ShadowG, ShadowY or superYFP are efficient donor-acceptor FRET pairs. A. and B. (Left panels) Representative fluorescence (mTurquoise2 channel) and Δ Lifetime (donor only-biosensor) images of U2OS cells expressing the indicated constructs and synchronised at mitosis. ShG: ShadowG; ShY: ShadowY; sYFP: superYFP; mTurq2: mTurquoise2. (Right panel). Δ Lifetime values for individual cells represented as black dots in each boxplot. The bar in boxplots represents the median; whiskers extend from the 10th to the 90th percentiles. $n=10$ cells per condition of one representative experiment (of three). Scale bar: 10 nm. ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ against the 'mTurquoise2' condition.

the mTurquoise2-ShadowG tandem, a tandem containing mTFP1 and ShadowG (Demeautis et al., 2017) was digested with BglII/AgeI to replace mTFP1 with mTurquoise2. To obtain the

Cell culture and synchronisation procedures

U2OS cells free from mycoplasma were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, HTB-96) and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), 1% L-glutamine (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). The generation of GFP-AURKA, GFP-AURKA-mCherry and GFP-AURKA Lys 162Met-mCherry stable cell lines was previously described (Bertolin et al., 2016). GFP-AURKA-GFP and GFP-AURKA Lys162Met-GFP stable clones cells were generated by transfecting U2OS cells with X-tremeGENE HP transfection reagent (Roche), following the manufacturer's indications. Stable clones were selected in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin and 500 μ g/ml Geneticin (Invivogen). Stable and transient transfections were performed with X-tremeGENE HP transfection reagent (Roche) or with Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. For live microscopy, cells were incubated in phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Mitotic cells were obtained after synchronisation at the G2/M transition with 100 ng/ml nocodazole (Sigma-Aldrich) for 16 h. Cells were washed twice with 1X PBS and incubated with prewarmed imaging medium for 30 min to reach metaphase before performing fluorescence anisotropy, FRET/FLIM or 2c-FCCS analyses. All live microscopy experiments were performed at 37°C in Nunc Lab-Tek II Chamber slides (Thermo Fisher Scientific).

Fluorescence polarisation microscopy

Fluorescence polarisation analyses were performed on a SP8 (Leica) inverted confocal microscope with a 63X oil immersion objective (NA 1.4), and using the Leica Acquisition Suite (LAS)-AF software. As the excitation light coming out of the laser is naturally polarized, an analyser integrated in the Leica emission filter wheel was placed in the emission pathway before the pinhole. The analyser rotates from a parallel to a perpendicular orientation to perform a sequential acquisition of the two corresponding polarised images. Images of GFP polarisation were acquired using a 488 nm argon laser and emission was selected between 500 and 550 nm. Image analysis was performed using the Fiji (ImageJ) software and fluorescence anisotropy was calculated as in (Tramier and Coppey-Moisan, 2008), using the following equation: $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$, where r is the fluorescence anisotropy, I_{\parallel} and I_{\perp} are the parallel and the perpendicular polarisations and $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ is the total polarisation-independent emission.

FLIM microscopy

FLIM analyses were performed in the time domain with a time-gated custom-built setup as described in (Bertolin et al., 2016) and driven by the Inscoper hardware (Inscoper). Briefly, cells were excited at 440±10 nm and at 480±10 nm using a white light laser and emission was selected using a band pass filter of 483/35 nm and of 525/50 nm for mTurquoise2 and GFP, respectively. Fluorescence lifetime was calculated with five sequential temporal gates of 2.2 nsec each. Mean pixel-by-pixel lifetime was calculated using the following equation: $\langle \tau \rangle = \sum \Delta t_i \cdot I_i / \sum I_i$ where Δt_i is the delay time of the i th image acquired following a laser pulse, and I_i is the pixel-by-pixel fluorescence intensity in each image. Lifetime measurements and online calculations were performed with the Inscoper software (Inscoper). Pixel-by-pixel lifetime was calculated only when fluorescence intensity was above 3000 grey levels. To calculate Δ lifetime, the mean lifetime of the cells expressing the donor alone (AURKA-mTurquoise2) was calculated for each independent experiment. This mean lifetime value was then used to normalise data in all the analysed conditions.

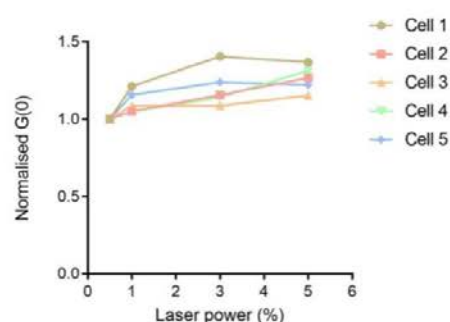
Two-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy

2c-FCCS analyses were carried out on a Leica SP8 (Leica) inverted confocal microscope with a 63X water objective with correcting ring (NA 1.2), combined with a PicoQuant time-correlated single photon counting (TCSPC) module and a Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (FLCS) integration (PicoHarp, PicoQuant). For the GFP/mCherry donor-acceptor pair the following laser sources were used: a pulsed one at 470 nm and a continuous one at 561 nm, while for the mTurquoise2/superYFP pair we used a pulsed laser source at 440 nm and a continuous one at 514 nm. Fluorescence emission was collected simultaneously using two avalanche photodiode detectors (APD and Tau-SPAD, PicoQuant). The two emission channels used were, 500-550 nm and 581-654 nm for GFP/mCherry and 467-499 nm and 525-565 nm for

mTurquoise2/superYFP. 2c-FCCS measurements were carried out with the Symphotime software (PicoQuant), integrated into the LAS-AF software (Leica). For each cell, the fluctuation of the fluorescence intensity for both donor-acceptor pairs (green/red or cyan/yellow) in the confocal volume was analysed by monitoring three independent points in the cytosol. These points were analysed sequentially and in non-photobleaching conditions for 30 sec each. Auto-correlation and cross-correlation curves were reconstructed from the fluorescence decay with the Symphotime software and the lifetime integration as previously reported (Padilla-Parra et al., 2014, 2011), with the Symphotime software. Data were fit using the 3D diffusion model, with one diffusing species (Padilla-Parra et al., 2014, 2011). The ratio between cross-correlation and green (for GFP/mCherry) or cyan (for mTurquoise2/superYFP) auto-correlation was used to estimate FRET efficiency.

Statistical analyses

One-way ANOVA and the Dunnet's method were used to compare the effects of the transfected AURKA plasmids on GFP fluorescence anisotropy (Fig. 1C). One-way ANOVA and the Tukey's method were used to compare the effect of the transfected vectors on fluorescence lifetime (Fig. 2B; Supplementary Fig. 1A). One-way ANOVA on ranks and the Kruskal-Wallis method were used to compare the effect of the transfected vectors on fluorescence lifetime (Fig. 2C, 4B). The Student's t-test was used to compare the effect of a GFP monomer and a tandem dimer on fluorescence anisotropy (Fig. 1B) or to compare the effects of superYFP on the lifetime of mTurquoise2 (Supplementary Fig. 1B); the Mann-Whitney test was used to compare the cross-correlation/auto-correlation ratio between normal and Lys162Met AURKA (Fig. 3 and 4C).



Supplementary Fig. 2. The amplitude of superYFP is not altered by increasing the 514 nm laser power. Normalised $G(0)$ values obtained from five independent U2OS cells expressing the superYFP-AURKA-mTurquoise2 FRET biosensor and synchronised at mitosis. Cells were illuminated with the 514 nm laser only at increasing powers, i.e. 0.5%, 1%, 3% and 5%. Measurements were taken in the cytosol; each point represents the average of three independent points per cell at 0.01 msec.

Author contributions

G.B. designed, performed and analysed the experiments, wrote the manuscript and provided funding; F.S. and C.D. performed and analysed the experiments, CC provided technical help; M.E. and F.M. provided the superYFP coding sequence and relative vectors, shared unpublished data and provided advice; M.T. conceptualised the study, coordinated the work and provided funding.

Acknowledgements

We thank all the members of the Microscopy-Rennes Imaging Center (Biologie, Santé, Innovation Technologique, BIOSIT, Rennes, France) for assistance and in particular X. Pinson for providing an ImageJ macro for the analysis of fluorescence anisotropy. We also thank Laurent Deleurme from the Flow cytometry and Cell Sorting platform (BIOSIT, Rennes, France) for assistance, together with A. Webb and S. Ku for technical help. This work was supported by the Comité Nationale de la Recherche Scientifique, by the Ligue Contre le Cancer Comité d'Ille et Vilaine et Comité des Côtes d'Armor to G.B. and by the Comité d'Ille et Vilaine, Comité du Maine et Loire et Comité de la Sarthe to MT, and by the *Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie* (IBISA), région Bretagne and Rennes Métropole for the development of the technology for rapid FLIM measurements. FS was supported by a fellowship from Région Bretagne and the University of Rennes1, together with an additional fellowship from the *Ligue Nationale Contre le Cancer*.

References

Ai, H., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., Campbell, R.E., 2008. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature Methods* 5, 401–403. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1207>

Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., Beltram, F., 2009. Quantitative FRET Analysis With the E⁰ GFP-mCherry Fluorescent Protein Pair. *Photochemistry and Photobiology* 85, 287–297. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00435.x>

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., Conti, E., 2003. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular cell* 12, 851–862.

Bertolin, G., Bulteau, A.-L., Alves-Guerra, M.-C., Burel, A., Lavault, M.-T., Gavard, O., Le Bras, S., Gagné, J.-P., Poirier, G.G., Le Borgne, R., Prigent, C., Tramier, M., 2018. Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. *eLife* 7, <https://doi.org/10.7554/eLife.38111>

Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Reboutier, D., Prigent, C., Tramier, M., 2016. A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nature Communications* 7, 12674. <https://doi.org/10.1038/ncomms12674>

Böhmer, M., Wahl, M., Rahn, H.-J., Erdmann, R., Enderlein, J., 2002. Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy.

Chemical Physics Letters 353, 439–445. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00044-1)

Carlson, H.J., Campbell, R.E., 2009. Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Current Opinion in Biotechnology, Analytical biotechnology* 20, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.003>

Cheetham, G.M.T., 2002. Crystal Structure of Aurora-2, an Oncogenic Serine/Threonine Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42419–42422. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200426200>

Dean, K.M., Lubbeck, J.L., Binder, J.K., Schwall, L.R., Jimenez, R., Palmer, A.E., 2011. Analysis of Red-Fluorescent Proteins Provides Insight into Dark-State Conversion and Photodegradation. *Biophys J* 101, 961–969. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.055>

Demeautis, C., Sipieter, F., Roul, J., Chapuis, C., Padilla-Parra, S., Riquet, F.B., Tramier, M., 2017. Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM. *Scientific Reports* 7, 41026. <https://doi.org/10.1038/srep41026>

Ding, Y., Ai, H., Hoi, H., Campbell, R.E., 2011. 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. <https://doi.org/10.1021/ac202595g>

Foo, Y.H., Naredi-Rainer, N., Lamb, D.C., Ahmed, S., Wohland, T., 2012. Factors Affecting the Quantification of Biomolecular Interactions by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Biophys J* 102, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.040>

Gautier, I., Tramier, M., Durieux, C., Coppey, J., Pansu, R.B., Nicolas, J.C., Kemnitz, K., Coppey-Moisan, M., 2001. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys. J.* 80, 3000–3008. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76265-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76265-0)

Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella, T.W.J., Royant, A., 2012. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications* 3. <https://doi.org/10.1038/ncomms1738>

Grant, R., Abdelbaki, A., Bertoldi, A., Gavilan, M.P., Mansfeld, J., Glover, D.M., Lindon, C., 2018. Constitutive regulation of mitochondrial morphology by Aurora A kinase depends on a predicted cryptic targeting sequence at the N-terminus. *Open Biology* 8, 170272. <https://doi.org/10.1098/rsob.170272>

Greenwald, E.C., Mehta, S., Zhang, J., 2018. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks. *Chem. Rev.* 118, 11707–11794. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00333>

Kohl, T., Heinze, K.G., Kuhlemann, R., Koltermann, A., Schwill, P., 2002. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 12161–12166. <https://doi.org/10.1073/pnas.192433499>

Mastop, M., Bindels, D.S., Shaner, N.C., Postma, M., Gadella, T.W.J., Goedhart, J., 2017. Characterization of a spectrally diverse set of fluorescent proteins as FRET acceptors for mTurquoise2. *Sci Rep* 7, 11999. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12212-x>

Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A., Hirotsune, S., 2009. An essential role of the aPKC–Aurora A–NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics.

Bertolin et al., 13/05/2019 – preprint copy - BioRxiv

- Nature Cell Biology 11, 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/ncb1919>
- Murakoshi, H., Shibata, A.C.E., 2017. ShadowY: a dark yellow fluorescent protein for FLIM-based FRET measurement. Scientific Reports 7, 6791. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07002-4>
- Murakoshi, H., Shibata, A.C.E., Nakahata, Y., Nabekura, J., 2015. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer. Scientific Reports 5, 15334. <https://doi.org/10.1038/srep15334>
- Nettels, D., Haenni, D., Maillot, S., Gueye, M., Barth, A., Hirschfeld, V., Hübner, C.G., Léonard, J., Schuler, B., 2015. Excited-state annihilation reduces power dependence of single-molecule FRET experiments. Phys. Chem. Chem. Phys. 17, 32304–32315. <https://doi.org/10.1039/C5CP05321H>
- Nguyen, T.A., Sarkar, P., Veetil, J.V., Koushik, S.V., Vogel, S.S., 2012. Fluorescence polarization and fluctuation analysis monitors subunit proximity, stoichiometry, and protein complex hydrodynamics. PLoS ONE 7, e38209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038209>
- Nikonova, A.S., Astasurov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., Golemis, E.A., 2013. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. Cellular and Molecular Life Sciences 70, 661–687. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1073-7>
- Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisán, M., Tramier, M., 2014. Quantitative Study of Protein–Protein Interactions in Live Cell by Dual-Color Fluorescence Correlation Spectroscopy, in: Engelborghs, Y., Visser, A.J.W.G. (Eds.), Fluorescence Spectroscopy and Microscopy. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 683–698. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_31
- Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisán, M., Tramier, M., 2011. Dual-color fluorescence lifetime correlation spectroscopy to quantify protein-protein interactions in live cell. Microscopy Research and Technique 74, 788–793. <https://doi.org/10.1002/jemt.21015>
- Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G., McCombs, J.E., 2011. Design and application of genetically encoded biosensors. Trends in Biotechnology 29, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.004>
- Piljic, A., Schultz, C., 2008. Simultaneous Recording of Multiple Cellular Events by FRET. ACS Chem. Biol. 3, 156–160. <https://doi.org/10.1021/cb700247q>
- Ringer, P., Weiß, A., Cost, A.-L., Freikamp, A., Sabass, B., Mehlich, A., Tramier, M., Rief, M., Grashoff, C., 2017. Multiplexing molecular tension sensors reveals piconewton force gradient across talin-1. Nature Methods 14, 1090–1096. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4431>
- Ross, B.L., Tenner, B., Markwardt, M.L., Zviman, A., Shi, G., Kerr, J.P., Snell, N.E., McFarland, J.J., Mauban, J.R., Ward, C.W., Rizzo, M.A., Zhang, J., 2018. Single-color, ratiometric biosensors for detecting signaling activities in live cells. eLife 7, e35458. <https://doi.org/10.7554/eLife.35458>
- Sizaire, F., Tramier, M., 2017. FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells. Protein Phosphorylation. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71005>
- Su, T., Pan, S., Luo, Q., Zhang, Z., 2013. Monitoring of dual biomolecular events using FRET biosensors based on mTagBFP/sfGFP and mVenus/mKOk fluorescent protein pairs. Biosensors and Bioelectronics 46, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.024>
- Swaminathan, R., Hoang, C.P., Verkman, A.S., 1997. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. Biophysical Journal 72, 1900–1907. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78835-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78835-0)
- Tramier, M., Coppey-Moisán, M., 2008. Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy for Homo-FRET in Living Cells, in: Methods in Cell Biology. Elsevier, pp. 395–414. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85017-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85017-0)
- Zhang, Y., Ni, J., Huang, Q., Ren, W., Yu, L., Zhao, S., 2007. Identification of the auto-inhibitory domains of Aurora-A kinase. Biochemical and Biophysical Research Communications 357, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.129>
- Zheng, F., Yue, C., Li, G., He, B., Cheng, W., Wang, X., Yan, M., Long, Z., Qiu, W., Yuan, Z., Xu, J., Liu, B., Shi, Q., Lam, E.W.-F., Hung, M.-C., Liu, Q., 2016. Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. Nature Communications 7, 10180. <https://doi.org/10.1038/ncomms10180>

Discussion et perspectives

Le projet principal de ma thèse a été de mettre en place une méthodologie de criblage de l'activité kinase d'Aurora A. Pour cela, j'ai utilisé le microscope fastFLIM, un microscope qui permet de mesurer la durée de vie de fluorescence rapidement, et le biosenseur FRET, qui permet de suivre l'activité d'Aurora A dans des cellules. Ces deux outils ont été développés au sein de l'équipe. Une partie de mon travail a consisté à développer l'automatisation du fastFLIM qui n'était alors utilisable qu'en mode manuel. Il est maintenant possible de parcourir automatiquement une plaque 96 puits et d'acquérir plusieurs images au sein de chaque puit. Une étape importante, post-acquisition, a concerné l'analyse d'un grand nombre d'images composées parfois de plusieurs cellules exprimant le biosenseur. J'ai pu développer l'automatisation de cette analyse, notamment en utilisant de la segmentation, permettant ainsi d'apporter des données plus robustes à l'analyse statistique. L'ensemble de cette méthodologie a été validée en montrant qu'il était possible de mesurer correctement le FRET entre le biosenseur GFP-Aurora A-mCherry et GFP-Aurora A après criblage d'une plaque 96 puits. Suite à cela, j'ai commencé le criblage de l'activité kinase d'Aurora A en utilisant une petite banque de molécules fournis par nos collaborateurs Sandrine Ruchaud et Thomas Robert de la plate-forme Kissf (Roscoff) et j'ai pu comparer ces résultats avec un crible effectué *in vitro*. Cependant, il faut noter que ce crible s'est fait à concentration d'inhibiteur unique et avec le même temps d'incubation. La prochaine étape de ce projet est de dupliquer les criblages en utilisant différentes conditions ce qui permettrait une meilleure validation des hits. Il faudrait aussi pouvoir valider par Western Blot l'effet de ces hits sur la phosphorylation du résidu T288 d'Aurora A dans des cellules. Une fois validés, ces hits pourraient être caractérisés par l'étude phénotypique des cellules. L'enjeu est de trouver des inhibiteurs, qui en inhibant l'activité kinase d'Aurora A, pourraient agir en tant qu'agent anti-tumoral. Une expérience classique dans le domaine de la découverte de molécules anti-tumorales est le test de prolifération cellulaire. Ce test est souvent effectué en se basant sur l'utilisation de methyl-[3H]-thymidine qui est un produit radiomarqué qui sera incorporé par les cellules au cours de la duplication du génome (phase S) qui précède la mitose (Griffiths and Sundaram, 2011). De la même façon, le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) peut être utilisé et incorporé à la place de la thymidine puis révélé par immunohistochimie (Romar et al., 2016). On pourrait ainsi utiliser une des lignées cellulaires U2OS préalablement générée pour exprimer le biosenseur Aurora A sous un promoteur fort de

type CMV et étudier l'effet des hits sur la prolifération cellulaire. Plus particulièrement, cet effet est caractérisé en utilisant l'IC50. De façon générale, l'IC50 en test de prolifération cellulaire correspond à la concentration de molécule nécessaire pour diminuer de moitié l'incorporation de l'agent marquant l'ADN, donc de la prolifération cellulaire. Pour mesurer l'IC50, il faut donc mesurer l'incorporation de l'agent marquant après traitement à plusieurs concentrations d'inhibiteur et reporter les valeurs en fonction de la gamme de concentration. On pourrait ainsi comparer ces valeurs avec celles des inhibiteurs MLN8237 et MLN8054 qui ont un IC50 de l'ordre du nanomolaire dans des cellules (Hoar et al., 2007; Sells et al., 2008). Une autre caractérisation phénotypique pourrait être celle de l'effet des potentiels inhibiteurs sur le nombre de cellules présentant des défauts dans le fuseau mitotique. En effet, on sait qu'une diminution des niveaux d'Aurora A ou une diminution de son activité induit des défauts dans le fuseau mitotique et notamment une perte de la bipolarité du fuseau (Bertolin et al., 2018; Nikonova et al., 2013).

La limitation actuelle majeure de la méthodologie de criblage par FLIM est probablement le temps d'acquisition total pour un criblage et est due à plusieurs paramètres :

_ le premier concerne le nombre important d'acquisitions par puit. Le criblage des inhibiteurs d'Aurora A en cellules vivantes implique une synchronisation en mitose. Or le nombre de cellules par puit peut être très hétérogènes, certaines régions dans un puit contenant de nombreuses mitoses tandis que d'autres aucune. Il est donc nécessaire de faire de nombreuses acquisitions par puit afin d'être sûr d'imager un nombre suffisant de cellules. Un des moyens pour éviter cette hétérogénéité pourrait être d'utiliser des outils robotiques dès l'étape d'ensemencement et de synchronisation en mitose afin d'éliminer les biais humains.

_ le deuxième concerne l'utilisation des portes temporelles. Actuellement nous utilisons 5 portes temporelles de 2,2ns pour mesurer la durée de vie de fluorescence de la GFP. Cela signifie qu'il faut multiplier par 5 le temps d'exposition de la caméra pour faire une image de FLIM. De plus, les cellules expriment le biosenseur à des niveaux endogènes ce qui implique un signal relativement faible et donc un temps d'exposition plus important. Pour dépasser cette limitation, j'ai commencé à utiliser un système fastFLIM avec un intensificateur dont on peut augmenter la taille des portes temporelles. J'ai montré que l'utilisation de 3 images à 3ns était suffisante pour mesurer le FRET et cela permettrait de diminuer drastiquement le temps total pour acquérir une seule image de FLIM (Fig 77).

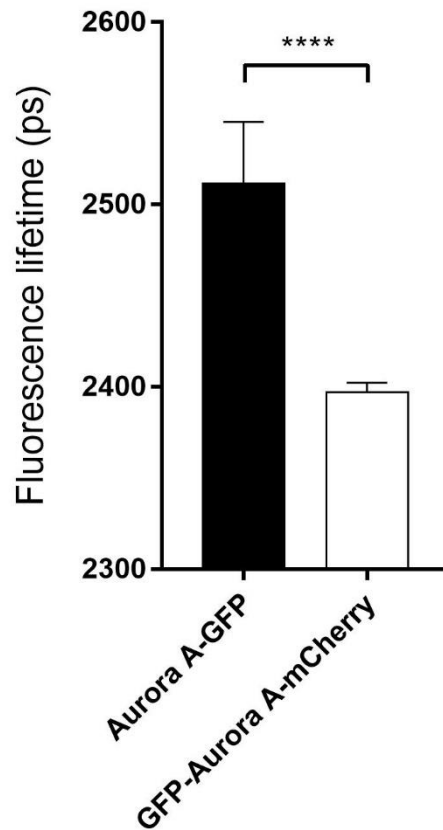


Fig 77. Mesure de FRET en utilisant 3 portes temporelles de 3ns

Le graphique montre les valeurs de durée de vie de fluorescence de lignées U2OS exprimant GFP-Aurora A ou GFP-Aurora A-mCherry après synchronisation en mitose. La durée de vie de fluorescence a été mesurée en utilisant 3 portes temporelles d'une taille de 3 ns. Test statistique Mann-Whitney *** p-value<0.001

Dans ce même cadre, il serait intéressant d'étudier l'utilisation de différents temps d'exposition pour chaque porte temporelle et vérifier si le FRET est toujours mesurable. Actuellement, un temps d'exposition unique est utilisé pour chaque porte temporelle et donc pour acquérir les cinq images qui permettent le calcul de l'image de FLIM. Dû au déclin de fluorescence, la première image présente un rapport signal/bruit plus important que la dernière image. Il serait alors pertinent d'avoir la possibilité de répartir ce temps d'acquisition en le diminuant pour les premières portes temporelles, et en l'augmentant pour les dernières portes temporelles. On pourrait ainsi optimiser le temps d'acquisition global requis pour faire une image de FLIM.

Le criblage automatisé est une méthodologie très puissante dans la recherche d'inhibiteurs. Outre le gain de temps, elle permet de gagner en robustesse et en reproductibilité en minimisant les biais humains. On parle de HCS (High Content Screening) lorsque le criblage apporte une ou plusieurs informations phénotypiques pour chaque cellule (Mattiazzi Usaj et al.,

2016). Lorsque les banques d'inhibiteurs sont assez grandes, plusieurs centaines ou milliers de molécules, on peut aussi se référer à du HTS (High Throughput Screening) où on ne regarde qu'un seul aspect phénotypique souvent *in vitro*. Cela permet ainsi d'établir des criblages dits primaires mais requiert le plus souvent d'utiliser des robots pour cribler des dizaines ou centaines de plaques multi-puits. Dans le cadre de la recherche de nouveaux inhibiteurs, le paramètre appelé Z-factor est couramment utilisé afin de caractériser la qualité d'un criblage (Zhang et al., 1999). Il est défini par $Z = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$

avec σ la déviation standard du contrôle positif (p) ou négatif (n) et μ la moyenne du contrôle positif (p) ou négatif (n).

Dans les plateformes de criblage, on considère qu'un criblage est de bonne qualité lorsque le $Z > 0.8$ (il ne peut être supérieur à 1). Si on cherche à appliquer ce Z-factor au criblage par FLIM, on constate qu'il est impossible en théorie d'obtenir un score acceptable. En effet la gamme dynamique (la différence des moyennes) entre l'échantillon positif, par exemple le GFP-Aurora A-mCherry avec FRET, et l'échantillon négatif, GFP-Aurora A sans FRET, est de l'ordre de 100 ps tandis que la déviation standard sera autour de 20 à 30 ps. Dans le meilleur des cas, le Z factor obtenu sera inférieur à 0, loin des standards de criblage en haut débit. On peut cependant noter que notre approche se fait dans un cadre fondamental et qu'aucun système de criblage par FLIM actuel n'utilise le Z-factor pour une validation du criblage. Ainsi, la méthodologie que l'on propose ici pourrait plutôt être utilisée dans un cadre de criblage secondaire.

Actuellement, il existe d'autres systèmes qui ont été développés afin de faire du criblage par FLIM. L'équipe de Paul French dispose d'un système à portes temporelles assez proche du fastFLIM et capable de faire du crible automatisé (Görlitz et al., 2017). Toutefois, ils n'utilisent pas la moyenne de durée de vie de fluorescence et doivent donc faire un « fitting » de leurs données. Ils ont ainsi développé une solution FLIMfit sous MATHLAB permettant de faire le « fitting » de centaines d'images plus rapidement et de segmenter les cellules (Warren et al., 2013). Grâce à ces développements, ils ont récemment utilisé cette méthodologie pour cribler des interactions protéine-protéines de différentes protéines du kinétochore dans des cellules de levure (Guo et al., 2019). Récemment, l'entreprise Leica a développé un nouveau module appelé FALCON qui vient compléter son microscope confocal SP8. Il consiste en une amélioration du temps d'acquisition par TCSPC, notamment grâce à un échantillonnage de l'ordre de 10GHz permettant ainsi de détecter le temps d'arrivée d'un photon après chaque pulse laser (plusieurs pulses étant nécessaires pour détecter un seul photon en TCSPC

classique). Cette technologie a été utilisée avec un biosenseur de la concentration en AMPc de type Epac, et a permis de mesurer les variations des niveaux d'AMPc dans des cellules à l'ordre de la seconde (Broertjes et al., 2019).

Une autre partie de mon travail a été de participer à la validation du biosenseur FRET d'activité kinase d'Aurora A (Bertolin et al., 2016). Ce biosenseur est avant tout un biosenseur de changement de conformation de la kinase qui est corrélé à son état d'activation et à sa phosphorylation sur le résidu T288. Un aspect majeur dans son utilisation est qu'il est fonctionnel et exprimé à des niveaux endogènes dans des cellules vivantes. Ce biosenseur d'activité kinase est donc différent des biosenseurs plus classiques qui existent et qui se basent sur le substrat (Sizaïre and Tramier, 2017). Avec ces derniers, on a plutôt accès au statut d'activité de la kinase envers un substrat. Ils ont pour limitation d'avoir des variations de FRET qui vont dépendre des niveaux endogènes de la kinase étudiée et requièrent de bien connaître la séquence du substrat phosphorylé. A ce jour, il existe encore peu de biosenseurs de conformation FRET pour les kinases. Il existe un tel biosenseur pour l'activité kinase de PKC γ (Verbeek et al., 2008) Ce biosenseur contient toute la séquence de la PKC γ ainsi qu'un sous-domaine régulateur et la paire de fluorophore GFP/RFP. En mesurant le FRET, ils ont pu étudier des mutations qui touchent ce sous-domaine. De façon similaire, il existe un biosenseur de l'activité kinase de FAK (Focal Adhesion Kinase (Cai et al., 2008). Dans celui-ci, la kinase est fusionnée à un domaine FERM et à la paire de fluorophores CFP/YFP. Lorsque la kinase est activée, le domaine FERM inhibiteur n'interagit plus avec le domaine catalytique de la kinase ce qui change la conformation du biosenseur. Il existe aussi des biosenseurs FRET de conformation pour des protéines autres que des kinases. Un biosenseur FRET de la conformation de la protéine Tau a été développé (Di Primio et al., 2017). Il est constitué uniquement de la protéine flanquée de la paire CFP/YFP et a été utilisé pour étudier l'impact de mutations sur le repliement de la protéine Tau. Au sein de mon équipe, de nouveaux biosenseurs FRET de conformation sont en cours de développement comme un biosenseur de conformation de LC3, un marqueur de l'autophagie. Le changement de conformation des protéines est souvent associé à leur fonction ou bien à des interactions protéine-protéine. Les biosenseurs FRET pouvant être génétiquement encodés sont donc de puissants outils pour observer cette dynamique dans des modèles vivants. Il est à noter qu'à notre connaissance, le biosenseur d'activité kinase d'Aurora A est le seul biosenseur de conformation dont les variations de FRET ont été clairement reliées à une variation de son état d'activité en étudiant la phosphorylation du résidu T288.

L'optimisation des biosenseurs FRET se base en partie sur la recherche de la meilleure paire de fluorophores. Un critère majeur concerne le rendement quantique des fluorophores, puisque plus celui-ci sera important, plus la différence de FRET mesurée sera grande. Des dérivés de CFP ont été développés tels que la mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012) ou l'aquamarine (Mérola et al., 2014) présentant des rendements quantique proche de 90% ce qui en fait de bons donneurs FRET. Une autre approche d'amélioration concerne le « linker », qui est constitué de plusieurs acides aminés séparant la partie du biosenseur contenant le donneur avec la partie contenant l'accepteur. En utilisant des « linkers » dits flexibles et de taille assez grande, il est possible de mesurer une différence de FRET plus importante, notamment en éliminant la contribution de l'orientation dans l'efficacité de FRET. Le biosenseur de l'activité ERK, appelé EKAR, a pu être amélioré selon cette stratégie permettant de porter jusqu'à 80% le gain en FRET (Komatsu et al., 2011).

Au cours, de mes travaux, j'ai été amené à participer au développement de nouvelles méthodologies pour mesurer le FRET. La première est la mesure d'anisotropie pour mesurer l'homoFRET, pour un enjeu futur d'utilisation en multiplex. Nos résultats montrent qu'il est possible de mesurer l'homoFRET entre GFP seule et le tandem GFP-GFP mais pas au sein du biosenseur homoFRET d'Aurora A (Bertolin et al., 2019). L'homoFRET étant indétectable lorsque les fluorophores sont en conformation parallèle, cela montre qu'il est difficile de prévoir à l'avance si un biosenseur fonctionnant en heteroFRET fonctionnera tout autant en homoFRET. Pour essayer de répondre à cette problématique de fluorophores parallèles, on pourrait utiliser une GFP modifié appelé cpGFP pour circularly permuted GFP (Topell and Glockshuber, 2002). Cette GFP a été modifié en reliant par un linker la partie N-ter et C-ter qui sont proches dans sa structure tridimensionnelle et en clivant la séquence dans un autre domaine. Il a été montré que cette GFP conservait ses propriétés de fluorescence. On pourrait ainsi fusionner cette cpGFP en un autre site d'accroche avec Aurora A et obtenir une orientation différente par rapport à une GFP classique. Cette stratégie a été adoptée pour améliorer le biosenseur Epac, l'utilisation d'une version circularly permuted de Venus, cp¹⁷³Venus étant un meilleur accepteur heteroFRET que la venus classique (Klarenbeek et al., 2015). La limitation de l'heteroFRET pour le multiplex est qu'elle utilise deux fluorophore différents couvrant ainsi une grande partie du spectre. L'homoFRET est une méthodologie qui pourrait répondre à cette limitation (Warren et al., 2015). On peut aussi évoquer l'utilisation de fluorophores accepteurs pour l'heteroFRET dits « dark » car émettant une fluorescence très faible. Le fluorophore sREACH et son dérivé ShadowG ont des rendements quantiques très faibles (respectivement

0.07 et 0.005) (Murakoshi et al., 2015) et ont par exemple été utilisés en multiplex dans notre équipe afin de faire du suivi simultané du biosenseur AKAR (pour la kinase PKA) et EKAR (pour la kinase ERK) (Demeautis et al., 2017). L'enjeu futur serait ainsi de combiner une méthodologie de criblage en combinaison avec un système multiplex.

La deuxième méthodologie est la 2C-FCCS et mes résultats montrent que l'utilisation de la paire mTurquoise 2/superYFP permet de suivre l'activité du biosenseur Aurora A en 2c-FCCS (Bertolin et al., 2019). L'utilisation de la 2C-FCCS permet de mesurer le FRET dans des régions où le biosenseur est très faiblement exprimés, par exemple dans le cytosol pour le biosenseur Aurora A. Toutefois, l'utilisation de la 2C-FCCS n'est actuellement pas adaptée à un cadre de criblage. En effet, la méthode d'acquisition est longue, il faut quelques dizaines de secondes pour une seule mesure, et l'analyse est complexe car elle requiert d'utiliser des filtres FLCS et un « fitting » des courbes d'auto-corrélation et de corrélation croisée.

Ainsi, l'ensemble de mes résultats s'inscrit dans un enjeu de criblage d'activité kinase en utilisant des biosenseurs FRET et dans un cadre futur de multiplex. On pourrait ainsi suivre et cribler plusieurs kinases simultanément, ou cribler une kinase en combinaison avec une interaction avec des substrats, des co-activateurs ou des inhibiteurs. Par exemple on pourrait faire des expériences de double FRET, en mesurant à la fois le FRET intramoléculaire du biosenseur Aurora, indicateur de son état d'activation, tout en mesurant dans le même système un FRET intermoléculaire avec un co-activateur ou un substrat. Dans ce but, j'ai commencé à générer un TPX2-IF670, TPX2 étant le co-activateur principal d'Aurora A et l'IRFP670 étant un fluorophore qui émet près de l'infra-rouge et qui est en théorie un bon accepteur FRET de la mCherry. En mesurant la durée de vie de fluorescence de la GFP puis de la mCherry, on pourrait mettre suivre presque directement la corrélation entre interaction kinase/co-activateur et activation de la kinase. Cette méthodologie de double FRET pourrait répondre à certaines questions encore posées sur le mode d'activation d'Aurora A. En effet, il a été proposé que la phosphorylation du résidu T288 et l'interaction TPX2 pourraient être deux mécanismes distincts dans l'activation d'Aurora A (Zorba et al., 2014). De même, le suivi du biosenseur d'Aurora A est un indicateur de son état d'activation mais pas de son activité envers un substrat. Par double FRET, on pourrait corréler l'activation de la kinase avec son interaction avec l'un de ses substrats.

Au sein de l'équipe et en partenariat avec Inscoper, le projet Roboscope vise à développer une microscopie « intelligente » et automatisée. L'idée est d'utiliser l'intelligence artificielle ou le deep learning afin de permettre une automatisation encore plus importante des microscopes.

L'utilisation de deep learning doit permettre au microscope de pouvoir différencier des cellules en mitose par rapport à des cellules dans un autre cycle après une étape d'apprentissage. Ainsi, on disposerait d'un microscope capable en temps réel de parcourir les puits et de trouver les cellules correspondantes au cycle que l'on souhaite étudié. Le microscope ne ferait alors l'acquisition que de champs contenant ces cellules plutôt que de prendre un nombre fixe d'acquisitions aux positions aléatoires. Par exemple, la recherche de cellules en mitose serait alors une étape automatisée et permettrait un gain important dans la vitesse d'acquisition globale d'un criblage de molécules inhibitrices d'Aurora A. Cette méthodologie pourrait aussi être adapté en microscopie 2C-FCCS qui souffre actuellement de temps d'acquisition trop longs pour être compatible avec du criblage.

Mes travaux ont permis de mettre en place une méthodologie de criblage par FLIM dans des cellules. Ils s'inscrivent dans la tendance à développer une microscopie quantitative et autonome avec comme enjeu d'apporter un grand nombre de données phénotypiques. Ces travaux devraient contribuer aux projets au sein de mon équipe de développement de criblage dans un contexte de multiplex. La possibilité de suivre et de cribler des biosenseurs d'activité en cellules vivantes en combinaison avec du HCS ouvre la voie à de nouvelles perspectives dans la recherche médicale contre le cancer.

Matériel et méthodes

Plasmides

La génération des plasmides GFP-Aurora et GFP-Aurora A-mCherry pour expression dans des bactéries ou cellules humaines a été décrite dans Bertolin et al, 2016. Le plasmide contenant le mutant « kinase dead » a été obtenu par mutagenèse dirigée en utilisant les amorces 5'-CAAGTTTATTCTGGCTCTTATGGTGTTATTTAAAGCTCAGCT-3' et 5'-AGCTGAGCTTTAAATAACACCATAAGAGCCAGAATAAACTTG-3' en utilisant la PFU II Ultra (Agilent) et en suivant le protocole du fournisseur. La génération des plasmides mTurquoise2-Aurora-superYFP et mTurquoise2-Aurora K162M-superYFPa été décrite dans Bertolin et al, 2019. Les plasmides contenant le monomère GFP ou le dimère GFP-GFP ont été précédemment décrits (Tramier and Coppey-Moisan, 2008). Le plasmide GFP-Aurora A-GFP a été obtenu en clonant GFP-Aurora A (contenant le promoteur d'Aurora A) dans un vecteur pCDNA6 (Thermo Fisher Scientific) entre les sites de restriction Eam1105I/NheI et la seconde GFP a été insérée entre les sites NheI/NotI.

Purification de protéine

Les protéines recombinantes GFP-AuroraA, GFP-Aurora A-mCherry et GFP-Aurora A K162M-mCherry utilisées pour les tests kinase ont été obtenues en transformant des bactéries *E.coli* BL21 (DE3) provenant de New England Biolabs. Les bactéries sont incubées en présence du plasmide pendant 30min à 4°C, puis un choc thermique de 30 secondes à 42°C est effectué et les bactéries sont replacées à 4°C pendant 5 minutes avant d'êtreensemencées sur boîte de Petri. L'induction de la production des protéines est obtenue en incubant les bactéries transformées avec 0.5mM d'isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside pendant 16h à 20°C. Les bactéries sont ensuite lysées dans un milieu à 1% Triton X-100, 500 µg/mL lysozyme, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride et en inhibiteur de protease (Complete Cocktail, Roche) pendant 1h sur glace. Une sonication est effectuée et le lysat est centrifugée at 4°C pendant 45 min à 13,000g. Le surnageant est récupéré et incubée avec une résine échangeuse d'ion en Nickel (ProBond, Thermo FisherScientifique) pendant 1 h à 4 ° C sous rotation. Les protéines fixées à la résine sont ensuite lavées en suivant le protocole du fabricant et éluées dans un milieu à 1.5

mol/L puis suspendues dans 50% de glycérol et stockées à -20°C. L'histone H3 a été purifiée par la plate-forme de purification et d'analyse des protéines de l'université de Rennes 1.

Tests kinase

Les tests kinases ont été effectués sur la protéine purifiée GFP-Aurora A, GFP-Aurora A-mCherry et GFP-Aurora A K162M-mCherry en utilisant un tampon kinase 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 25mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol et 0.01% Triton X-100. Pour la déphosphorylation, les protéines purifiées sont incubées avec 200 unités de Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs) pendant 1h à 37°C. Pour la rephosphorylation, les protéines sont incubées avec 100µM d'ATP (Euromedex) pendant 20min à 37°C. Les inhibiteurs MLN8237 et 8054 (Selleck Chemicals) sont utilisés à 50nM et 30nM pendant 30min à 37°C.

Western Blot

Les échantillons des tests kinases sont incubés dans du tampon Laemli pendant 5min à 95°C puis séparés par SDS-PAGE (gel 12%) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Pour la révélation, les anticorps suivants sont utilisés : monoclonal souris anti-AURKA clone 35C1, 1:20 ou lapin anti-AURKA pThr288 1:2,000 (Thermo Fisher Scientific, MA5-14904), anti-Histone H3 pSer10, 1:10,000 (Merck Millipore, 06-570). Les membranes ont été incubées avec un substrat de chimioluminescence fait maison composé de tris 100 mM (pH 8,6), 13mg/ml d'acide coumarique (Sigma), 44 mg/ml de luminol (Sigma) et 3% de peroxyde d'hydrogène (Sigma). Les signaux de chimioluminescence sont capturés sur des films (CP-BU new, Agfa Healthcare) avec un développeur CURIX 60 (Agfa Healthcare).

Culture cellulaire, transfection et lignées stables

Les cellules U2OS ont été achetées auprès de American Type Culture Collection (ATCC, HTB-96) et sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), à 1% en L-glutamine (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) et 1% en pénicilline-streptomycine (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Les cellules sont

cultivées en incubateur à 37°C et à 5% en CO₂. Les lignées stables U2OS GFP-Aurora A, GFP-Aurora A-mCherry, GFP-Aurora A K162M-mCherry, GFP-Aurora A-GFP, GFP-Aurora AK162M-GFP ont été générées par transfection avec les plasmides correspondant en utilisant le réactif de transfection X-tremeGENE HP (Roche) et en suivant les indications de protocole fournies. Les clones stables sont sélectionnés dans un milieu DMEM, supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal, à 1% en L-glutamine, 1% en pénicilline-streptomycine et en géneticine à 500µg/mL. Les cellules U2OS mTurquoise2-Aurora A-superYFP et U2OS mTurquoise2-Aurora A K162M-superYFP ont été transfectées transitoirement en utilisant le réactif de transfection X-tremeGENE HP (Roche) et en suivant les indications de protocole fournies.

Préparation pour la microscopie

Les cellules U2OS sontensemencées dans des chambres de culture sur lame de type Nunc Lab-Tek II (Thermo Fisher Scientific) ou dans des plaques 96 puits à fond en verre (Zell-kontakt). Elles sont synchronisées en G2/M par incubation dans du milieu de culture à 100ng/mL de nocodazole pendant 16h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS et incubées avec du milieu de culture pendant 30 min pour entrer en mitose. Les expériences d'anisotropie et de 2c-FCSS sont effectuées juste après cette étape dans du milieu d'imagerie Leibovitz's L-15 (Thermo Fisher Scientific) supplémenté à 20% en sérum de veau fœtal, 1% L-glutamine et 1% pénicilline-streptomycine. Pour les expériences en plaque 96 puits, les cellules sont traitées avec les molécules fournies par la plate-forme Kissf ou du DMSO pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS et fixées avec de la PFA 4% obtenue à partir de PFA 16% (Electron Microscopy Sciences) diluée dans du PBS pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois au PBS et peuvent être conservées à 4°C dans du PBS.

FLIM

Les expériences de FLIM sont effectuées avec le système à porte temporelle décrit dans l'article Automated screening of AURKA activity based on a genetically encoded FRET biosensor using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Sizaire et al). Le système utilise un microscope Leica DMI6000 avec un module de spinning disk CSU-X1 (Yokogawa), un objectif 63x immersion à huile (O.N=1,4) ou un objectif 20x (O.N=0,7), un laser blanc supercontinu pulsé à une fréquence de 40MHz (Fianium) et un HRI à porte temporelle (Picostar LaVision) couplé

à une caméra CCD (Coolsnap HQ Photometrics). La sélection spectrale à l'excitation se fait grâce à un sélecteur d'onde fait maison et la fluorescence à l'émission est sélectionnée avec un filtre passe-bande (Semrock). L'ensemble du système est contrôlé par le boîtier et la solution logicielle Inscoper. Les images de FLIM sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ. Les images de cribles sont analysées en utilisant une macro rédigée sous ImageJ dont le fonctionnement est décrit figure 62 et dont le code est consultable en Annexe.

Microscopie de mesure d'anisotropie

La mesure d'anisotropie est effectuée sur un microscope confocal SP8 (Leica) avec un objectif 63x à immersion à huile (O.N=1,4) contrôlé par le logiciel Leica Acquisition Suite. La lumière d'excitation est polarisée et un analyseur situé en amont du pinhole et en rotation permet de sélectionner l'émission parallèle ou perpendiculaire à la lumière d'excitation. Les images de polarisation sont prises séquentiellement avec un laser 488nm pour la GFP et l'émission est sélectionnée entre 500 et 550nm. La mesure d'anisotropie r est calculée sous ImageJ en utilisant la formule $r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$ avec I_{\parallel} l'intensité d'émission parallèle et I_{\perp} l'intensité d'émission perpendiculaire.

Microscopie 2c-FCCS

Les expériences de 2c-FCCS ont été faites au microscope SP8 (Leica) en utilisant un objectif immerison à eau (O.N=1.2). Le module de TCSPC de PicoQuant pour la FCCS a été utilisé. Un laser pulsé à 470nm et un laser continu à 561nm ont été utilisées pour le biosenseur Aurora A avec la paire GFP/mCherry. Un laser pulsé à 440nm et un laser continu à 514nm ont été utilisés pour la paire mTurquoise2/superYFP. L'émission de fluorescence a été collectée par des détecteurs Tau-Spad (PicoQuant) pour la GFP et la mTurquoise2 et APD (PicoQuant) pour la mCherry et la superYFP. Les filtres d'émission utilisés sont 500-550nm pour la GFP, 581-654 nm pour la mCherry, 467-499 nm pour la mTurquoise2 et 525-565 nm pour la superYFP. Les acquisitions se font grâce au logiciel SymphoTime (PicoQuant) en combinaison avec le logiciel Leica Acquisition Suite. Pour chaque cellule, les fluctuations d'intensités sont mesurées dans un volume confocal dans le cytosol pendant 30 secondes (3 mesures par cellule). Les fluctuations sont ensuite analysées sous le logiciel SymphoTime en utilisant les filtres FLCS et les courbes d'auto-corrélation du donneur ainsi que la courbe de corrélation croisée sont

reconstruites. Pour le « fitting » des courbes, on utilise un modèle de diffusion 3D. On récupère ensuite la valeur de l'amplitude de chacune des courbes et on calcule le ratio entre la corrélation croisée et l'auto-corrélation du donneur.

Tests statistiques

Les tests statistiques sont indiqués dans la légende des figures. Pour la comparaison de moyenne le test non paramétrique de Mann-Whitney ou le test paramétrique de Student est utilisé sous R ou directement sous Prism8 (GraphPad).

Annexe

```
macro "Analyse criblage" {  
  
    var m_stepdelay;  
  
    var m_gatewidth;  
  
    var m_threshold;  
  
        run("Set Measurements...", "mean min integrated redirect=None decimal=0");  
  
        Dialog.create("Analyse");  
  
        Dialog.addString("Voulez-vous analyser ensuite?", "non")  
  
        Dialog.show();  
  
        reponse=Dialog.getString()  
  
        if (reponse=="non") {  
  
            Dialog.create("Settings");  
  
            Dialog.addNumber("stepdelay", 2200);  
  
            Dialog.addNumber("gatewidth", 2200);  
  
            Dialog.addNumber("threshold", 3000);  
  
            Dialog.show()  
  
            m_stepdelay = Dialog.getNumber();  
  
            m_gatewidth = Dialog.getNumber();  
  
            m_threshold = Dialog.getNumber();  
  
            fluoDir = getDirectory("Choose the fluo directory");
```



```

outputDir = getDirectory("Choose the flim directory");
outputTrie = getDirectory("Choose the fluo trie directory");

fluoFilesInit = getFileList(fluoDir);
fluoFiles = Array.sort(fluoFilesInit) ;

// main loop to process images
for(f=0 ; f < fluoFiles.length ; f++){

    fluoFile = fluoDir + fluoFiles[f];
    outputfluo = outputTrie + fluoFiles[f] ;
    outputImage = outputDir + replace(fluoFiles[f], ".stk", "") + ".tif";
    open(fluoFile);
    run("Measure");
    max=getResult("Max",0) ;
    close() ;
    run("Clear Results");
    if (max>=m_threshold) {
        calculFlim(fluoFile,
outputImage,outputfluo,m_stepdelay,m_gatewidth,m_threshold);
    }
}

} else if (reponse=="oui") {

```

```
Dialog.create("Threshold");

Dialog.addNumber("Nombre de threshold", 1);

Dialog.show()

t_thresh=Dialog.getNumber() ;

methods = getList("threshold.methods");

Dialog.create("Settings");

Dialog.addNumber("Sigma gaussian blur:", 1);

Dialog.addChoice("Threshold", methods, "Default");

Dialog.show();

m_sigma = Dialog.getNumber();

c_threshold = Dialog.getChoice();

Dialog.create("Settings");

Dialog.addNumber("stepdelay", 2200);

Dialog.addNumber("gatewidth", 2200);

Dialog.addNumber("threshold", 3000);

Dialog.show()

m_stepdelay = Dialog.getNumber();
```

```

m_gatewidth = Dialog.getNumber();

m_threshold = Dialog.getNumber();

fluoDir = getDirectory("Choose the fluo directory");

outputDir = getDirectory("Choose the flim directory");

outputTrie = getDirectory("Choose the fluo trie directory");

outputDir2 = getDirectory("Choose the output directory");

fluoFilesInit = getFileList(fluoDir);

fluoFiles = Array.sort(fluoFilesInit) ;

// main loop to process images

for(f=0 ; f < fluoFiles.length ; f++){

    fluoFile = fluoDir + fluoFiles[f];

    outputfluo = outputTrie + fluoFiles[f] ;

    outputImage = outputDir + replace(fluoFiles[f], ".stk", "") + ".tif";

    open(fluoFile);

    run("Measure");

```

```

max=getResult("Max",0) ;
close() ;
run("Clear Results");
if (max>=m_threshold) {
    calculFlim(fluoFile,
outputImage,outputfluo,m_stepdelay,m_gatewidth,m_threshold);
}
}

```

```

fluoFilesInit = getFileList(outputTrie);
fluoFiles = Array.sort(fluoFilesInit) ;

```

```

flimDirInit = getFileList(outputDir);
flimFiles = Array.sort(flimDirInit) ;

```

```

outputFile = outputDir2 + "measures.csv";
File.append("image \t roi idx \t Mean flim", outputFile);

```

```

for(f=0 ; f < fluoFiles.length ; f++){

```

```

    fluoFile = outputTrie + fluoFiles[f];

```

```

    flimFile = outputDir + flimFiles[f];

```

```

    outputImage = outputDir2 + fluoFiles[f] + ".png";

```

```

    ProcessFile(fluoFile, flimFile, fluoFiles[f], outputFile, outputImage);

```

```

    }

}

}

function                                calculFlim(fluoFile,
outputImage,outputfluo,m_stepdelay,m_gatewidth,m_threshold){

    open(fluoFile);

    saveAs("TIF", outputfluo);

    run("Flim",          "stepdelay="+m_stepdelay+"          gatewidth="+m_gatewidth+"
threshold="+m_threshold);

    saveAs("TIF", outputImage);

    run("Close All");

    run("Clear Results");

}

function ProcessFile(fluoFile, flimFile, fluoImageName, outputFile, outputImage){

```

```

// init output file

File.append(fluoImageName + "\t \t ", outputFile);

// Segment cells in original image

open(fluoFile);

run("Duplicate...", " ");

run("Gaussian Blur...", "sigma="+m_sigma);

setAutoThreshold(c_threshold + " dark");

setOption("BlackBackground", true);

run("Convert to Mask");

run("Watershed");

run("Set Measurements...", "mean integrated redirect=None decimal=0");

run("Analyze Particles...", " show=Outlines display clear include add");

// Measure Flim inside cells

open(flimFile);

flimImageTitle = getTitle();

// set background to NaN

run("32-bit");

setThreshold(500.0000, 4000.0000);

run("NaN Background");

cellCount = roiManager("count");

for(i=0;i<cellCount;i++){

```

```
run("Clear Results");

roiManager("Select", i);

roiManager("Measure");

val = getResult("Mean", 0);

if(val > 0){

    pos = i+1;

    File.append("\t" + pos + "\t" + val, outputFile);

}

}

// save overlay image

selectWindow(flimImageTitle);

roiManager("Show All");

run("Flatten");

saveAs("PNG", outputFile);

run("Close All");

run("Clear Results");

}
```

Références

- Akrap, N., Seidel, T., and Barisas, B.G. (2010). Förster distances for fluorescence resonant energy transfer between mCherry and other visible fluorescent proteins. *Analytical Biochemistry* **402**, 105–106.
- Alenghat, F.J., Fabry, B., Tsai, K.Y., Goldmann, W.H., and Ingber, D.E. (2000). Analysis of Cell Mechanics in Single Vinculin-Deficient Cells Using a Magnetic Tweezer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**, 93–99.
- Asteriti, I.A., Giubettini, M., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2011). Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol Cancer* **10**, 131.
- Asteriti, I.A., Daidone, F., Colotti, G., Rinaldo, S., Lavia, P., Guarguaglini, G., and Paiardini, A. (2017). Identification of small molecule inhibitors of the Aurora-A/TPX2 complex. *Oncotarget* **8**, 32117–32133.
- Bacia, K., and Schwille, P. (2007). Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Protoc* **2**, 2842–2856.
- Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., Lin, M.Z., and Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)* **16**.
- Baldini, E., D'Armiento, M., and Ulisse, S. (2014). A new aurora in anaplastic thyroid cancer therapy. *Int J Endocrinol* **2014**, 816430.
- Balleza, E., Kim, J.M., and Cluzel, P. (2018). Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat Methods* **15**, 47–51.
- Barretta, M.L., Spano, D., D'Ambrosio, C., Cervigni, R.I., Scaloni, A., Corda, D., and Colanzi, A. (2016). Aurora-A recruitment and centrosomal maturation are regulated by a Golgi-activated pool of Src during G2. *Nature Communications* **7**, 11727.
- Bathe-Peters, M., Annibale, P., and Lohse, M.J. (2018). All-optical microscope autofocus based on an electrically tunable lens and a totally internally reflected IR laser. *Opt Express* **26**, 2359–2368.
- Bavetsias, V., and Linardopoulos, S. (2015). Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology* **5**.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular Cell* **12**, 851–862.
- Becker, W., and Bergmann, A. (2006). Multidimensional time-correlated single photon counting. W. Becker, ed. (Boston, MA), p. 637201.
- Beltran, H., Oromendia, C., Danila, D.C., Montgomery, B., Hoimes, C., Szmulewitz, R.Z., Vaishampayan, U., Armstrong, A.J., Stein, M., Pinski, J., et al. (2019). A Phase II Trial of the Aurora

Kinase A Inhibitor Alisertib for Patients with Castration-resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer: Efficacy and Biomarkers. *Clin Cancer Res* 25, 43–51.

Berezin, M.Y., and Achilefu, S. (2010). Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem Rev* 110, 2641–2684.

Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Rebutier, D., Prigent, C., and Tramier, M. (2016). A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nature Communications* 7, 12674.

Bertolin, G., Bulteau, A.-L., Alves-Guerra, M.-C., Burel, A., Lavault, M.-T., Gavard, O., Le Bras, S., Gagné, J.-P., Poirier, G.G., Le Borgne, R., et al. (2018). Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. *ELife* 7, e38111.

Bertolin, G., Sizaire, F., Demeautis, C., Chapuis, C., Merola, F., Erard, M., and Tramier, M. (2019). Optimised FRET pairs and quantification approaches to detect the activation of Aurora kinase A at mitosis. *ACS Sens.*

Bird, A.W., and Hyman, A.A. (2008). Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *The Journal of Cell Biology* 182, 289–300.

Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal* 17, 3052–3065.

Blajeski, A.L., Phan, V.A., Kottke, T.J., and Kaufmann, S.H. (2002). G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J Clin Invest* 110, 91–99.

Borghgi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (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* 109, 12568–12573.

Boyle, W.S., and Smith, G.E. (1970). Charge coupled semiconductor devices. *The Bell System Technical Journal* 49, 587–593.

Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2009). The Ability to Survive Mitosis in the Presence of Microtubule Poisons Differs Significantly Between Human Nontransformed (RPE-1) and Cancer (U2OS, HeLa) Cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 437–447.

Broertjes, J., Klarenbeek, J., Habani, Y., Langeslag, M., and Jalink, K. (2019). TRPM7 residue S1269 mediates cAMP dependence of Ca²⁺ influx. *PLoS One* 14.

Brunner, A.M., Blonquist, T.M., DeAngelo, D.J., McMasters, M., Winer, E.S., Hobbs, G.S., Amrein, P.C., Hock, H., Steensma, D.P., Garcia, J.S., et al. (2018). Phase II Clinical Trial of Alisertib, an Aurora a Kinase Inhibitor, in Combination with Induction Chemotherapy in High-Risk, Untreated Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 132, 766–766.

Bunzli, J.-C.G. (2013). Lighting up cells with lanthanide self-assembled helicates. *Interface Focus* 3, 20130032–20130032.

- Buranachai, C., Kamiyama, D., Chiba, A., Williams, B.D., and Clegg, R.M. (2008). Rapid Frequency-Domain FLIM Spinning Disk Confocal Microscope: Lifetime Resolution, Image Improvement and Wavelet Analysis. *J Fluoresc* **18**, 929–942.
- Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D.F., Karginov, A.V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K.M., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2008). Spatial and Temporal Regulation of Focal Adhesion Kinase Activity in Living Cells. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 201–214.
- Campbell, T.N. (2001). The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review. p.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 7877–7882.
- Castellanos, E., Dominguez, P., and Gonzalez, C. (2008). Centrosome Dysfunction in Drosophila Neural Stem Cells Causes Tumors that Are Not Due to Genome Instability. *Current Biology* **18**, 1209–1214.
- Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbé, J.-C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* **3**, 457–462.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805.
- Chan, F.T.S., Kaminski, C.F., and Kaminski Schierle, G.S. (2011). HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells. *ChemPhysChem* **12**, 500–509.
- Claxton, N.S., Fellers, T.J., and Davidson, M.W. (2006). LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY. *CONFOCAL MICROSCOPY* **37**.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218.
- Cole, M.J., Siegel, J., Webb, S.E.D., Jones, R., Dowling, K., Dayel, M.J., Parsons-Karavassilis, D., French, P.M.W., Lever, M.J., Sucharov, L.O.D., et al. (2001). Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning. *J Microsc* **203**, 246–257.
- Courtheoux, T., Diallo, A., Damodaran, A.P., Reboutier, D., Watrin, E., and Prigent, C. (2018). Aurora A kinase activity is required to maintain an active spindle assembly checkpoint during prometaphase. *J. Cell. Sci.* **131**.
- Cui, Y., Zhang, X., Yu, M., Zhu, Y., Xing, J., and Lin, J. (2019). Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: principles, limitations, and recent progress. *Sci China Life Sci* **62**, 619–632.
- Damodaran, A.P., Vaufrey, L., Gavard, O., and Prigent, C. (2017). Aurora A Kinase Is a Priority Pharmaceutical Target for the Treatment of Cancers. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 687–700.
- Dean, K.M., Lubbeck, J.L., Binder, J.K., Schwall, L.R., Jimenez, R., and Palmer, A.E. (2011). Analysis of red-fluorescent proteins provides insight into dark-state conversion and photodegradation. *Biophys. J.* **101**, 961–969.

- Demeautis, C., Sipieter, F., Roul, J., Chapuis, C., Padilla-Parra, S., Riquet, F.B., and Tramier, M. (2017). Multiplexing PKA and ERK1&2 kinases FRET biosensors in living cells using single excitation wavelength dual colour FLIM. *Scientific Reports* 7, 41026.
- Depry, C., Allen, M.D., and Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol. BioSyst.* 7, 52–58.
- Di Primio, C., Quercioli, V., Siano, G., Rovere, M., Kovacech, B., Novak, M., and Cattaneo, A. (2017). The Distance between N and C Termini of Tau and of FTDP-17 Mutants Is Modulated by Microtubule Interactions in Living Cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10.
- Durlacher, C.T., Li, Z.-L., Chen, X.-W., He, Z.-X., and Zhou, S.-F. (2016). An update on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alisertib, a selective Aurora kinase A inhibitor. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43, 585–601.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.-P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2–M transition. *Journal of Cell Science* 117, 2523–2531.
- Eggeling, C., Kask, P., Winkler, D., and Jäger, S. (2005). Rapid Analysis of Förster Resonance Energy Transfer by Two-Color Global Fluorescence Correlation Spectroscopy: Trypsin Proteinase Reaction. *Biophys J* 89, 605–618.
- Einstein, A. (1905a). Sur un point de vue heuristique concernant la production et la transformation de la lumière.
- Einstein, A. (1905b). De l'électrodynamique des corps en mouvement.
- Eyers, P.A., Erikson, E., Chen, L.G., and Maller, J.L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Current Biology* 13, 691–697.
- Floyd, S., Pines, J., and Lindon, C. (2008). APC/CCdh1 Targets Aurora Kinase to Control Reorganization of the Mitotic Spindle at Anaphase. *Current Biology* 18, 1649–1658.
- Forster, Th. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* 33, 166–175.
- Fresnel, A. (1815). La diffraction de la lumière.
- Fritz, R.D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., Ritsma, L., Ponsioen, B., Fluri, E., Schulte-Merker, S., Rheenen, J. van, et al. (2013). A Versatile Toolkit to Produce Sensitive FRET Biosensors to Visualize Signaling in Time and Space. *Sci. Signal.* 6, rs12–rs12.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* 159, 695–705.
- Giubettini, M., Asteriti, I.A., Scrofani, J., De Luca, M., Lindon, C., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2011). Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J Cell Sci* 124, 113–122.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95–105.

- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella Jr, T.W.J., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications* 3, 751.
- Golmohammadi, R., Namazi, M.J., Going, J.J., and Derakhshan, M.H. (2017). A single nucleotide polymorphism in codon F31I and V57I of the AURKA gene in invasive ductal breast carcinoma in Middle East. *Medicine (Baltimore)* 96.
- Gordon, G.W., Berry, G., Liang, X.H., Levine, B., and Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74, 2702–2713.
- Görlitz, F., Kelly, D.J., Warren, S.C., Alibhai, D., West, L., Kumar, S., Alexandrov, Y., Munro, I., Garcia, E., McGinty, J., et al. (2017). Open Source High Content Analysis Utilizing Automated Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *JoVE* 55119.
- Graff, J.N., Higano, C.S., Hahn, N.M., Taylor, M.H., Zhang, B., Zhou, X., Venkatakrishnan, K., Leonard, E.J., and Sarantopoulos, J. (2016). Open-label, multicenter, phase 1 study of alisertib (MLN8237), an aurora A kinase inhibitor, with docetaxel in patients with solid tumors. *Cancer* 122, 2524–2533.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263–266.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: MECHANISM AND APPLICATIONS. *J. Biol. Chem.* 276, 29188–29194.
- Griffiths, M., and Sundaram, H. (2011). Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay. *Methods Mol. Biol.* 731, 451–465.
- Gritsko, T.M., Coppola, D., Paciga, J.E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S.A., Fiorica, J.V., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 1420–1426.
- Guo, M., Lu, S., Huang, H., Wang, Y., Yang, M.Q., Yang, Y., Fan, Z., Jiang, B., and Deng, Y. (2018). Increased AURKA promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in bladder cancer. *BMC Syst Biol* 12.
- Guo, W., Kumar, S., Görlitz, F., Garcia, E., Alexandrov, Y., Munro, I., Kelly, D.J., Warren, S., Thorpe, P., Dunsby, C., et al. (2019). Automated Fluorescence Lifetime Imaging High-Content Analysis of Förster Resonance Energy Transfer between Endogenously Labeled Kinetochores in Live Budding Yeast Cells. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 24, 308–320.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 155, 1109–1116.
- Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 6, 178–182.

- Herbomel, G., Hatte, G., Roul, J., Padilla-Parra, S., Tassan, J.-P., and Tramier, M. (2017). Actomyosin-generated tension on cadherin is similar between dividing and non-dividing epithelial cells in early *Xenopus laevis* embryos. *Scientific Reports* 7, 45058.
- Hertz, H. (1887). Ueber sehr schnelle elektrische Schwingungen. *Ann. Phys. Chem.* 267, 421–448.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells. *Cell* 114, 585–598.
- Hoar, K., Chakravarty, A., Rabino, C., Wysong, D., Bowman, D., Roy, N., and Ecsedy, J.A. (2007). MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4513–4525.
- Hoelder, S., Clarke, P.A., and Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology* 6, 155–176.
- Horton, R.A., Strachan, E.A., Vogel, K.W., and Riddle, S.M. (2007). A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Analytical Biochemistry* 360, 138–143.
- Huygens, C. (1690). *Treatise on light*.
- Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., and Bax, A. (1992). Solution Structure of a Calmodulin-Target Peptide Complex by Multidimensional NMR. *Science, New Series* 256, 632–638.
- Jablonski, A. (1933). Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* 131, 839–840.
- Janeček, M., Rossmann, M., Sharma, P., Emery, A., Huggins, D.J., Stockwell, S.R., Stokes, J.E., Tan, Y.S., Almeida, E.G., Hardwick, B., et al. (2016). Allosteric modulation of AURKA kinase activity by a small-molecule inhibitor of its protein-protein interaction with TPX2. *Scientific Reports* 6.
- Jiang, L., Xiong, Z., Song, Y., Lu, Y., Chen, Y., Schultz, J.S., Li, J., and Liao, J. (2019). Protein–Protein Affinity Determination by Quantitative FRET Quenching. *Sci Rep* 9, 2050.
- Jonkman, J., and Brown, C.M. (2015). Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. *J Biomol Tech* jbt.15-2602-003.
- Joukov, V., De Nicolo, A., Rodriguez, A., Walter, J.C., and Livingston, D.M. (2010). Centrosomal protein of 192 kDa (Cep192) promotes centrosome-driven spindle assembly by engaging in organelle-specific Aurora A activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21022–21027.
- Joukov, V., Walter, J.C., and De Nicolo, A. (2014). The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. *Molecular Cell* 55, 578–591.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.-M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R.B., Czerniak, B.A., and Sen, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat. Genet.* 36, 55–62.
- Katayama, H., Sasai, K., Kloc, M., Brinkley, B.R., and Sen, S. (2008). Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle* 7, 2691–2704.

- Kelly, K.R., Friedberg, J.W., Park, S.I., McDonagh, K., Hayslip, J., Persky, D., Ruan, J., Puvvada, S., Rosen, P., Iyer, S.P., et al. (2018). Phase I Study of the Investigational Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib plus Rituximab or Rituximab/Vincristine in Relapsed/Refractory Aggressive B-cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 6150–6159.
- Kim, Y., Holland, A.J., Lan, W., and Cleveland, D.W. (2010). Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell* **142**, 444–455.
- Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Pelletier, L., Mechtler, K., Drechsel, D.N., Schwager, A., Lee, M., Raff, J.W., and Hyman, A.A. (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *The Journal of Cell Biology* **170**, 1047–1055.
- Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Tatsuka, M., Kawai, H., Pagano, M., and Takata, T. (2007). Constitutive Phosphorylation of Aurora-A on Ser51 Induces Its Stabilization and Consequent Overexpression in Cancer. *PLOS ONE* **2**, e944.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., and Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS ONE* **10**, e0122513.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 4647–4656.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer US).
- Lee, C.-Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., and Doe, C.Q. (2006). Drosophila Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* **20**, 3464–3474.
- Lenard, P. (1902). Ueber die lichtelektrische Wirkung. *Ann. Phys.* **313**, 149–198.
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., and Tramier, M. (2013). Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods. *PLoS ONE* **8**, e69335.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**, 193–202.
- Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274–2285.
- Loura, L.M.S. (2012). Simple Estimation of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Orientation Factor Distribution in Membranes. *Int J Mol Sci* **13**, 15252–15270.
- Lu, L.Y., Wood, J.L., Ye, L., Minter-Dykhouse, K., Saunders, T.L., Yu, X., and Chen, J. (2008). Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression. *J Biol Chem* **283**, 31785–31790.

Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* *455*, 119–123.

Manfredi, M.G., Ecsedy, J.A., Meetze, K.A., Balani, S.K., Burenkova, O., Chen, W., Galvin, K.M., Hoar, K.M., Huck, J.J., LeRoy, P.J., et al. (2007). Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4106–4111.

Manfredi, M.G., Ecsedy, J.A., Chakravarty, A., Silverman, L., Zhang, M., Hoar, K.M., Stroud, S.G., Chen, W., Shinde, V., Huck, J.J., et al. (2011). Characterization of Alisertib (MLN8237), an Investigational Small-Molecule Inhibitor of Aurora A Kinase Using Novel In Vivo Pharmacodynamic Assays. *Clinical Cancer Research* *17*, 7614–7624.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 51786–51795.

Mattiazzi Usaj, M., Styles, E.B., Verster, A.J., Friesen, H., Boone, C., and Andrews, B.J. (2016). High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends in Cell Biology* *26*, 598–611.

Maxwell, J.C. (1864). *A Treatise on Electricity and Magnetism*.

McCombs, J.E., and Palmer, A.E. (2008). Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods* *46*, 152–159.

Mennella, V., Agard, D.A., Bo, H., and Pelletier, L. (2014). Amorphous no more: subdiffraction view of the Pericentriolar Material architecture. *Trends Cell Biol* *24*, 188–197.

Mérola, F., Fredj, A., Betolngar, D.-B., Ziegler, C., Erard, M., and Pasquier, H. (2014). Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnol J* *9*, 180–191.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., and others (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* *388*, 882.

Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G., and Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *The Lancet Oncology* *6*, 229–239.

Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, Y.Y., Kinoshita, K., et al. (2007). NDEL1 Phosphorylation by Aurora-A Kinase Is Essential for Centrosomal Maturation, Separation, and TACC3 Recruitment. *Molecular and Cellular Biology* *27*, 352–367.

Morris, M.C. (2009). Fluorescent Biosensors of Intracellular Targets from Genetically Encoded Reporters to Modular Polypeptide Probes. *Cell Biochem Biophys* *56*, 19.

Murakoshi, H., Shibata, A.C.E., Nakahata, Y., and Nabekura, J. (2015). A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer. *Sci Rep* *5*.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* *20*, 87.

Nakabayashi, T., Oshita, S., Sumikawa, R., Sun, F., Kinjo, M., and Ohta, N. (2012). pH dependence of the fluorescence lifetime of enhanced yellow fluorescent protein in solution and cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **235**, 65–71.

Newton, I. (1704). *Opticks : or a Treatise of the Reflexions, Refractions Inflexions and Colours of Light. Also Two Treatises of the Species and magnitude of Curvilinear Figures.*

Nguyen, A.W., and Daugherty, P.S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* **23**, 355–360.

Nikonova, A.S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., and Golemis, E.A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 661–687.

O'Connor, O.A., Özcan, M., Jacobsen, E.D., Vidal, J.M.R., Trotman, J., Demeter, J., Masszi, T., Pereira, J., Ramchandren, R., d'Amore, F.A., et al. (2015). First Multicenter, Randomized Phase 3 Study in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory (R/R) Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL): Alisertib (MLN8237) Versus Investigator's Choice (Lumiere trial; NCT01482962). *Blood* **126**, 341–341.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* **273**, 1392–1395.

Otto, T., Horn, S., Brockmann, M., Eilers, U., Schüttrumpf, L., Popov, N., Kenney, A.M., Schulte, J.H., Beijersbergen, R., Christiansen, H., et al. (2009). Stabilization of N-Myc Is a Critical Function of Aurora A in Human Neuroblastoma. *Cancer Cell* **15**, 67–78.

Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisán, M., and Tramier, M. (2008). Quantitative FRET Analysis by Fast Acquisition Time Domain FLIM at High Spatial Resolution in Living Cells. *Biophysical Journal* **95**, 2976–2988.

Padilla-Parra, S., Auduge, N., Coppey-Moisán, M., and Tramier, M. (2011a). Non fitting based FRET-FLIM analysis approaches applied to quantify protein-protein interactions in live cells. *Biophys Rev* **3**, 63–70.

Padilla-Parra, S., Audugé, N., Coppey-Moisán, M., and Tramier, M. (2011b). Dual-color fluorescence lifetime correlation spectroscopy to quantify protein-protein interactions in live cell. *Microsc. Res. Tech.* **74**, 788–793.

Pankajakshan, P., Blanc-Feraud, L., Kam, Z., and Zerubia, J. (2009). Point-Spread Function retrieval for fluorescence microscopy. In *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, pp. 1095–1098.

Paris, J., and Philippe, M. (1990). Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early *Xenopus* development. *Dev. Biol.* **140**, 221–224.

Patting, M., Reisch, P., Sackrow, M., Dowler, R., Koenig, M., and Wahl, M. (2018). Fluorescence decay data analysis correcting for detector pulse pile-up at very high count rates. *OE* **57**, 031305.

Peronio, P., Acconcia, G., Rech, I., and Ghioni, M. (2015). Improving the counting efficiency in time-correlated single photon counting experiments by dead-time optimization. *Review of Scientific Instruments* **86**, 113101.

Petry, S. (2016). Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 659–683.

- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655–665.
- Phizicky, E.M., and Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59, 94–123.
- Planck, M. (1901). Über das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum.
- Potapova, T., and Gorbsky, G.J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)* 6.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229–233.
- Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* 7, 937–946.
- Putkey, F.R., Cramer, T., Morphew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R., and Cleveland, D.W. (2002). Unstable Kinetochore-Microtubule Capture and Chromosomal Instability Following Deletion of CENP-E. *Developmental Cell* 3, 351–365.
- Qiu, Y., Chen, X., Li, Y., Chen, W.R., Zheng, B., Li, S., and Liu, H. (2013). Evaluations of Auto-Focusing Methods under a Microscopic Imaging Modality for Metaphase Chromosome Image Analysis. *Analytical Cellular Pathology* 36, 37–44.
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Fukasawa, K., and Prigent, C. (2012). Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol* 197, 19–26.
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P., and Prigent, C. (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J. Cell Biol.* 201, 65–79.
- Reits, E.A.J., and Neefjes, J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 3, E145–E147.
- Rino, J., Braga, J., Henriques, R., and Carmo-Fonseca, M. (2009). Frontiers in fluorescence microscopy. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1569–1579.
- Romar, G.A., Kupper, T.S., and Divito, S.J. (2016). Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *Journal of Investigative Dermatology* 136, e1–e7.
- Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research* 144, 19–50.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Shimomura, K., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T., et al. (2001). Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br. J. Cancer* 84, 824–831.
- Schleifenbaum, F., Elgass, K., Sackrow, M., Caesar, K., Berendzen, K., Meixner, A., and Harter, K. (2010). Fluorescence Intensity Decay Shape Analysis Microscopy (FIDSAM) for Quantitative and

Sensitive Live-Cell Imaging: A Novel Technique for Fluorescence Microscopy of Endogenously Expressed Fusion-Proteins. *Molecular Plant* 3, 555–562.

Sells, T., Ecsedy, J., Stroud, S., Janowick, D., Hoar, K., LeRoy, P., Wysong, D., Zhang, M., Huck, J., Silverman, L., et al. (2008). MLN8237: an orally active small molecule inhibitor of Aurora A kinase in phase I clinical trials. *Cancer Res* 68, 237–237.

Sen, S., Zhou, H., and White, R.A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14, 2195–2200.

Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567–1572.

Shaw, P.J., and Rawlins, D.J. (1991). The point-spread function of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *Journal of Microscopy* 163, 151–165.

Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–239.

Shimomura, T., Hasako, S., Nakatsuru, Y., Mita, T., Ichikawa, K., Kodera, T., Sakai, T., Nambu, T., Miyamoto, M., Takahashi, I., et al. (2010). MK-5108, a Highly Selective Aurora-A Kinase Inhibitor, Shows Antitumor Activity Alone and in Combination with Docetaxel. *Mol Cancer Ther* 9, 157–166.

Shimozawa, T., Yamagata, K., Kondo, T., Hayashi, S., Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., Takayama, J., Onami, S., Nakayama, H., et al. (2013). Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *PNAS* 110, 3399–3404.

Sizaire, F., and Tramier, M. (2017). FRET-Based Biosensors: Genetically Encoded Tools to Track Kinase Activity in Living Cells.

Sizaire, F., Le Marchand, G., Pécréaux, J., Bouchareb, O., and Tramier, M. (unpublished). Automated screening of AURKA activity based on a genetically encoded FRET biosensor using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy.

Song, S.J., Song, M.S., Kim, S.J., Kim, S.Y., Kwon, S.H., Kim, J.G., Calvisi, D.F., Kang, D., and Lim, D.-S. (2009). Aurora A Regulates Prometaphase Progression by Inhibiting the Ability of RASSF1A to Suppress APC-Cdc20 Activity. *Cancer Res* 69, 2314–2323.

Sparks, H., Görlitz, F., Kelly, D.J., Warren, S.C., Kellett, P.A., Garcia, E., Dymoke-Bradshaw, A.K.L., Hares, J.D., Neil, M. a. A., Dunsby, C., et al. (2017). Characterisation of new gated optical image intensifiers for fluorescence lifetime imaging. *Review of Scientific Instruments* 88, 013707.

Spiering, D., Bravo-Cordero, J.J., Moshfegh, Y., Miskolci, V., and Hodgson, L. (2013). Quantitative Ratiometric Imaging of FRET-Biosensors in Living Cells. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 593–609.

Stokes George Gabriel (1853). XVI. On the change of refrangibility of light.—No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 143, 385–396.

- Tanaka, E., Hashimoto, Y., Ito, T., Kondo, K., Higashiyama, M., Tsunoda, S., Ortiz, C., Sakai, Y., Inazawa, J., and Shimada, Y. (2007). The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1331–1340.
- Topell, S., and Glockshuber, R. (2002). Circular Permutation of the Green Fluorescent Protein. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **183**, 31–48.
- Toseland, C.P. (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol* **6**, 85–95.
- Tramier, M., and Coppey-Moisán, M. (2008). Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy for Homo-FRET in Living Cells. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 395–414.
- Trekitkarnmongkol, W., Katayama, H., Kai, K., Sasai, K., Jones, J.C., Wang, J., Shen, L., Sahin, A.A., Gagea, M., Ueno, N.T., et al. (2016). Aurora kinase-A overexpression in mouse mammary epithelium induces mammary adenocarcinomas harboring genetic alterations shared with human breast cancer. *Carcinogenesis* **37**, 1180–1189.
- Tsai, M.-Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., and Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nature Cell Biology* **5**, 242–248.
- Tsien, R.Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509–544.
- Umscheid, C.A., Margolis, D.J., and Grossman, C.E. (2011). Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review. *Postgrad Med* **123**, 194–204.
- Uzbekova, S., Arlot-Bonnemains, Y., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Papillier, P., Pannetier, S., Thélie, A., Perreau, C., Mermillod, P., Prigent, C., et al. (2008). Spatio-Temporal Expression Patterns of Aurora Kinases A, B, and C and Cytoplasmic Polyadenylation-Element-Binding Protein in Bovine Oocytes During Meiotic Maturation¹. *Biology of Reproduction* **78**, 218–233.
- Vandame, P., Spriet, C., Riquet, F., Trinel, D., Cailliau-Maggio, K., and Bodart, J.-F. (2014). Optimization of ERK Activity Biosensors for both Ratiometric and Lifetime FRET Measurements. *Sensors* **14**, 1140–1154.
- Vaufrey, L. (2017). Étude du rôle de la kinase Aurora-A dans le développement de la larve et du cerveau de *Drosophila melanogaster*.
- Verbeek, D.S., Goedhart, J., Bruinsma, L., Sinke, R.J., and Reits, E.A. (2008). PKC mutations in spinocerebellar ataxia type 14 affect C1 domain accessibility and kinase activity leading to aberrant MAPK signaling. *Journal of Cell Science* **121**, 2339–2349.
- van Vugt, M.A.T.M., Brás, A., and Medema, R.H. (2004). Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells. *Molecular Cell* **15**, 799–811.
- Wahl, M. (2014). Time-Correlated Single Photon Counting. **14**.
- Walczak, C.E., and Heald, R. (2007). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *International Review of Cytology* **265**, 111–158.
- Wall, M.A., Socolich, M., and Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Structural Biology* **7**, 6.

- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* *19*, 4906.
- Wang, G., Jiang, Q., and Zhang, C. (2014). The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J. Cell. Sci.* *127*, 4111–4122.
- Wang-Bishop, L., Chen, Z., Gomaa, A., Lockhart, A.C., Salaria, S., Wang, J., Lewis, K.B., Ecsedy, J., Washington, K., Beauchamp, R.D., et al. (2019). Inhibition of AURKA Reduces Proliferation and Survival of Gastrointestinal Cancer Cells With Activated KRAS by Preventing Activation of RPS6KB1. *Gastroenterology* *156*, 662-675.e7.
- Warren, S., Margineanu, A., Katan, M., Dunsby, C., and French, P. (2015). Homo-FRET Based Biosensors and Their Application to Multiplexed Imaging of Signalling Events in Live Cells. *International Journal of Molecular Sciences* *16*, 14695–14716.
- Warren, S.C., Margineanu, A., Alibhai, D., Kelly, D.J., Talbot, C., Alexandrov, Y., Munro, I., Katan, M., Dunsby, C., and French, P.M.W. (2013). Rapid Global Fitting of Large Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Datasets. *PLOS ONE* *8*, e70687.
- Waters, J.C. (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* *185*, 1135–1148.
- Webb, S.E.D., Gu, Y., Lévêque-Fort, S., Siegel, J., Cole, M.J., Dowling, K., Jones, R., French, P.M.W., Neil, M.A.A., Juškaitis, R., et al. (2002). A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning. *Review of Scientific Instruments* *73*, 1898–1907.
- Wike, C.L., Graves, H.K., Hawkins, R., Gibson, M.D., Ferdinand, M.B., Zhang, T., Chen, Z., Hudson, D.F., Ottesen, J.J., Poirier, M.G., et al. (2016). Aurora-A mediated histone H3 phosphorylation of threonine 118 controls condensin I and cohesin occupancy in mitosis. *Elife* *5*, e11402.
- Wong, J., Lerrigo, R., Jang, C.-Y., and Fang, G. (2008). Aurora A Regulates the Activity of HURP by Controlling the Accessibility of Its Microtubule-binding Domain. *MBoC* *19*, 2083–2091.
- Young, T. (1801). *Sur la théorie de la lumière et des couleurs*.
- Young, I.T., Garini, Y., Dietrich, H.R.C., van Oel, W., and Liqui Lung, G. (2004). LEDs for fluorescence microscopy. J.-A. Conchello, C.J. Cogswell, and T. Wilson, eds. (San Jose, CA), p. 208.
- Yu, F., Jiang, Y., Lu, L., Cao, M., Qiao, Y., Liu, X., Liu, D., Van Dyke, T., Wang, F., Yao, X., et al. (2017). Aurora-A promotes the establishment of spindle assembly checkpoint by priming the Haspin-Aurora-B feedback loop in late G2 phase. *Cell Discovery* *3*, 16049.
- Zhang, null, Chung, null, and Oldenburg, null (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* *4*, 67–73.
- Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S.R. (1996). An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *227*, 707–711.
- Zheng, F., Yue, C., Li, G., He, B., Cheng, W., Wang, X., Yan, M., Long, Z., Qiu, W., Yuan, Z., et al. (2016). Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. *Nature Communications* *7*, 10180.

Zhong, N., Zhong, N., Shi, S., Shi, S., Wang, H., Wang, H., Wu, G., Wu, G., Wang, Y., Wang, Y., et al. (2016). Silencing Aurora-A with siRNA inhibits cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology* 49, 1028–1038.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W., Gray, J., Sahin, A., Brinkley, B., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20, 189–193.

Zorba, A., Buosi, V., Kutter, S., Kern, N., Pontiggia, F., Cho, Y.-J., and Kern, D. (2014). Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. *Elife* 3, e02667.

Zou, J., Huang, R.-Y., Jiang, F.-N., Chen, D.-X., Wang, C., Han, Z.-D., Liang, Y.-X., and Zhong, W.-D. (2018). Overexpression of TPX2 is associated with progression and prognosis of prostate cancer. *Oncol Lett* 16, 2823–2832.

Titre : Développement d'un criblage automatisé de l'activité kinase d'un biosenseur Aurora A par FLIM

Mots clés : Aurora A, FRET, FLIM, biosenseur, criblage

Résumé : La surexpression d'Aurora A est un marqueur majeur de certains cancers épithéliaux. Ce gène code pour la kinase multifonctionnelle Aurora A et son activation est requise pour l'entrée et la progression vers la mitose. Jusqu'à présent, aucun inhibiteur de cet oncogène n'a été approuvé par la FDA et il est donc primordial d'identifier de nouvelles molécules. Notre équipe a développé un biosenseur FRET (Forster Resonance Energy Transfer) pour l'activité kinase d'Aurora A, constitué de la kinase entière flanquée de deux fluorophores, une GFP et une mCherry. Le changement de conformation d'Aurora A lorsqu'elle est activée rapproche les fluorophores et augmente l'efficacité du FRET. Il est ainsi possible de suivre l'activation d'Aurora A dans les cellules vivantes exprimant le biosenseur à des niveaux endogènes.

Nous pouvons mesurer le FRET en utilisant la technique de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) grâce à un microscope développé dans l'équipe et appelé fastFLIM. De plus, j'ai participé à l'élaboration de nouvelles techniques de microscopie pour suivre l'activité du biosenseur. Pour cela, j'ai utilisé un biosenseur de type homoFRET avec l'enjeu de pouvoir utiliser plusieurs biosenseurs dans un contexte multiplex. J'ai aussi utilisé la technique de 2c-FCCS (2-colors Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) sur le biosenseur Aurora A afin de pouvoir mesurer le FRET dans des régions où celui-ci est faiblement exprimant et dont la mesure de durée de vie de fluorescence n'est pas possible par le FLIM.

Title : Development of an automated screening of the kinase activity of an Aurora A biosensor by FLIM

Keywords : Aurora A, FRET, FLIM, biosensor, screening

Abstract : Overexpression of Aurora A is a major marker of some epithelial cancers. This gene encodes the multifunctional Aurora A kinase and its activation is required for entry and progression to mitosis. So far, no inhibitor of this oncogene has been approved by the FDA and it is therefore essential to identify new molecules. Our team developed a Forster Resonance Energy Transfer (FRET) biosensor for Aurora A kinase activity, consisting of the entire kinase flanked by two fluorophores, a GFP and a mCherry. The conformational change of Aurora A when it is activated brings the fluorophores closer and increases FRET efficiency. It is thus possible to follow the activation of Aurora A in living cells expressing the biosensor at endogenous levels. We can measure FRET using FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) technique using a microscope developed in the team called fastFLIM.

My thesis work consisted of developing a robust and automated screening strategy by combining the capabilities of fastFLIM and the Aurora A activity biosensor. This strategy based on automation of acquisitions and data analysis allowed to screen a library of 96-well plate molecules for potential inhibitors of Aurora A kinase activity. Besides, I participated in the development of new microscopy techniques to monitor the activity of the biosensor. For that, I used a homoFRET biosensor with the challenge of being able to use several biosensors in a multiplex context. I also used the 2c-FCCS (2-color Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) technique on the Aurora A biosensor to measure FRET in regions where it is weakly expressing and whose lifetime measurement of Fluorescence is not possible by FLIM.