



HAL
open science

Développement de sondes chimiogénétiques fluorogéniques par ingénierie concertée de la protéine HaloTag et de rotors moléculaires : application à l'imagerie de protéines

Justine Coïs

► **To cite this version:**

Justine Coïs. Développement de sondes chimiogénétiques fluorogéniques par ingénierie concertée de la protéine HaloTag et de rotors moléculaires : application à l'imagerie de protéines. Imagerie. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS115 . tel-04691788

HAL Id: tel-04691788

<https://theses.hal.science/tel-04691788v1>

Submitted on 9 Sep 2024

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale de Chimie Moléculaire de Paris Centre

*Laboratoire des biomolécules / Peptide glycoconjugués et métaux en biologie
Neurosciences Paris-Seine / Neurobiologie des maladies psychiatriques*

Développement de sondes chimiogénétiques fluorogéniques par ingénierie concertée de la protéine HaloTag et de rotors moléculaires

Application à l'imagerie de protéines

Par Justine Coïs

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Jean-Maurice Mallet et Vincent Vialou

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2024

Devant un jury composé de:

Dr. Claire Deo, Group Leader	Rapporteuse
Dr. Gilles Clavier, Directeur de Recherche	Rapporteur
Dr. Coralie Fassier, Chargée de Recherche	Examinatrice
Pr. Ludovic Jullien, Professeur des Universités	Président du jury
Dr. Jean-Maurice Mallet, Directeur de Recherche	Directeur de thèse
Dr. Vincent Vialou, Chargé de Recherche	Co-Directeur de thèse
Dr. Blaise Dumat, Chargé de Recherche	Membre invité



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Résumé

Au cours des deux dernières décennies, notre compréhension sur les protéines du système nerveux et de leur rôle dans le fonctionnement normal et pathologique des maladies psychiatriques a considérablement progressé grâce aux avancées majeures des techniques d'imagerie et de ciblage des protéines. L'imagerie de fluorescence, une méthode non-invasive et très résolutive, permet de visualiser en temps réel des mécanismes cellulaires associés au trafic de protéines comme par exemple leur sécrétion et leur régulation. Ces études ont été initialement réalisées grâce au développement de protéines fluorescentes, bien que de brillance modérée et peu photostables. Plus récemment, le développement de senseurs chimiogénétiques hybrides, bénéficiant à la fois de la sélectivité de l'encodage génétique et de la versatilité des fluorophores organiques, a permis d'accroître considérablement la diversité de rapporteurs fluorescents avec une brillance et une photostabilité accrues. La conception de nouveaux outils hybrides pour l'imagerie cellulaire est un enjeu afin d'obtenir des caractéristiques plus modulables, plus versatiles et permettre de répondre à la diversité des questionnements biologiques concernant le trafic de protéines cibles.

Au cours de ma thèse, j'ai initialement développé des sondes fluorescentes chimiogénétiques novatrices basées sur la combinaison de la protéine de marquage HaloTag et de rotors moléculaires qui n'émettent de la fluorescence qu'après liaison covalente avec elle. Nous avons élaboré une nouvelle méthode de synthèse divergente pour diversifier plus rapidement les propriétés spectrales de ces sondes fluorogéniques hybrides. De plus, nous avons créé de nouveaux variants de HaloTag afin d'améliorer leurs brillances pour l'imagerie. Ces nouvelles sondes, testées en cellules vivantes, ont montré une sensibilité prometteuse envers la protéine HaloTag avec une activation spécifique de la fluorescence, ce qui a permis de réaliser de l'imagerie sans nécessiter d'étapes de lavage. Associés à une protéine d'intérêt, ces nouveaux rapporteurs fluorescents offrent un contrôle précis de la localisation subcellulaire et du suivi en temps réel, avec un très bon contraste.

Dans la continuité de cette approche, j'ai développé des sondes pH reposant sur la combinaison de rotors moléculaires fluorescents contenant un groupement phénol sensible au pH et de la protéine HaloTag. Ces nouvelles sondes pH fluorogéniques

hybrides bénéficient d'une double condition d'activation de la fluorescence reposant à la fois sur leur blocage conformationnel dans la poche de la protéine HaloTag et sur la déprotonation du groupement phénol à pH neutre. De ce fait, nous avons exploité cette activation locale de la fluorescence en fonction du pH afin de suivre des processus cellulaires dynamiques tels que la sécrétion de protéines en cellules vivantes sans recours au lavage et avec un excellent contraste.

Dans la dernière étape de ma thèse, j'ai exploité ces nouveaux outils chimiogénétiques pour élucider le trafic de la protéine matricellulaire hevin. Cette protéine revêt un intérêt majeur pour la compréhension des maladies psychiatriques, en particulier l'addiction et les effets du stress, mais sa localisation subcellulaire et sa régulation demeurent peu clairs. Nous avons montré une colocalisation significative de hevin avec la protéine transmembranaire CD63, exprimée dans les exosomes. De plus, l'utilisation de la nouvelle sonde pH que j'ai développée a permis de confirmer la régulation de la sécrétion de hevin par l'activité cellulaire sur la lignée HeLa.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury, Dr. Claire Deo, Dr. Coralie Fassier, Dr. Gilles Clavier et Pr. Ludovic Jullien pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je souhaiterais également remercier chaleureusement Dr. Lou Rocard et Pr. Ludovic Jullien qui ont été les membres de mon comité de suivi de thèse durant ces trois années et qui m'ont apporté leur expertise scientifique ainsi que leur bienveillance pour assurer le bon déroulement de ce projet. Merci infiniment pour votre soutien.

Je voudrais remercier sincèrement mes directeurs et mon encadrant de thèse, Jean-Maurice, Vincent et Blaise qui m'ont accompagné durant ces trois années sur ce projet interdisciplinaire.

Jean-Maurice, merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe et de m'avoir apportée de précieux conseils dès que tu en avais l'occasion. Merci également pour ta bonne humeur quotidienne qui contribue grandement à la cohésion de toute l'équipe.

Blaise, merci pour ton aide précieuse durant ces trois années de thèse. Ton appui et tes conseils scientifiques m'ont toujours été bénéfiques et m'ont permis de progresser grandement sur ce projet.

Vincent, je suis arrivée dans ton équipe sans même savoir ce qu'était un plasmide...quel chemin parcouru ! Je voudrais te remercier infiniment pour ton encadrement qui m'a permis de mener à bien cette partie biologie de ma thèse malgré mon absence d'expertise au départ. Tu m'as appris énormément de choses et tu as contribué à mon épanouissement personnel et professionnel durant toute ma thèse. Merci pour ton optimisme, ton dynamisme et ta bienveillance. Je garderai à jamais un très bon souvenir de mon expérience parmi les biologistes.

Je voudrais également remercier tous les collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Merci notamment à Pr. Arnaud Gautier et à Dr. Kristina Mironova qui m'ont apportée énormément de connaissances sur ce projet. Je voudrais également remercier chaleureusement Dr. Philippe Bun, qui a été d'une aide remarquable pour la partie imagerie. Je n'oublie pas Mickael bien-sûr, sans qui nous n'aurions jamais pu finir ce projet. Merci à toi (PS : j'espère que ton médecin ne nous en veut pas trop pour tous ces chocolats...).

Durant cette thèse j'ai également eu l'opportunité de travailler dans différentes équipes et rencontrer des personnes formidables.

Merci notamment à Manon, Carolina et Archana. Merci pour votre bonne humeur et pour tous ces bons moments passés au bar (et au labo). Merci à toi aussi Yutong, you speak french very well now ! Merci également à Alex (*aka the drama queen*), Térésa,

Remerciements

Emile, Didine, Sophie, Jean, Caitlan, Namita, Ashmi, Léa, Célia, Yaqine, Nader et Mazarine.

Je voudrais également remercier Dr. Nicolas Delsuc, Dr. Helene Bertrand, Dr. Clotilde Policar, Dr. Maxime Vital et Dr. Laurence Grimaud avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger durant cette thèse et qui ont toujours su m'apporter leurs chaleureux conseils.

Merci infiniment aux membres de l'équipe de Pr. Arnaud Gautier qui m'ont aidée et épaulée dans ma démarche d'apprentie biologiste.

Merci en particulier à toi Lina, merci pour tout. Tu avais déjà rendu mes années de prépa inoubliables avec tes distributions de fruits secs le soir, avec nos magnifiques 4 en maths (en 4 heures !) et avec ton soutien infaillible. Aujourd'hui encore tu es là pour moi et j'en suis très reconnaissante. Je suis extrêmement fière de toi et je te souhaite la meilleure des réussites pour la suite..

Merci également à Louise, à Horgan et à Steph qui ont également été d'une grande aide pour la production de protéines.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans la collaboration avec une équipe de biologistes formidables. Je voudrais remercier toutes ces personnes qui m'ont accompagnée sur cette terre inconnue.

Merci à vous Camille, Gustavo, Séverine, Victor sans oublier Alice et Naomie. Mention spéciale pour Marie-Laure qui a été un vrai pilier pour moi sur ces derniers mois de thèse. Merci à toi pour ta patience, ta bienveillance et ta bonne humeur. Nous aurons vécu beaucoup de péripéties ensemble mais cela nous a valu de bons souvenirs. Bon courage pour la suite.

Merci à Carole et Franck pour leur aide sur ce projet. Je voudrais également remercier infiniment Dr. Sophie Gautron pour nos échanges très enrichissants et pour son aide précieuse sur ce projet. Encore merci à toi pour ta relecture approfondie de ce manuscrit.

Merci aux autres membres du B4, Catalina, Nicolas, Véronique B., Véronique F., Odile et Stéphanie. Je voudrais remercier chaleureusement Sylvie, qui illumine la journée de tout le monde lorsqu'elle est là. Merci pour ta bonne humeur et tes petites attentions (PS : Je crois que ton colis de « frozen brains » est toujours en Inde...).

Plus que des collègues, cette équipe m'a également apportée de véritables amies, Mazarine, Marine et Adèle.

Mazarine, même si ce n'est pas ton problème, sache que tu as été un vrai pilier pour moi pendant cette thèse. Je ne dénombre plus les bons moments que nous avons passé ensemble à rigoler et à boire des cafés (non payés). Il y a une formule de bon sens qui dit que les absents ont toujours tort, mais il y en a une autre qui dit que l'amitié améliore le bonheur et estompe la misère (de la thèse ?). Merci d'être toi et n'oublie jamais que tu es une très belle personne.

Marine, depuis que tu as deviné mon signe astrologique dans un bar, tout est devenu si évident entre nous. En tant qu'happiness manager chez BbyM, je peux assurer que tu es une personne (ou plutôt une business woman) incroyable. Merci pour ton soutien, tes attributs et ta folie. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite avec Eminem (et moi aussi).

Adèle, j'ai toujours su que nous étions liées par quelque chose depuis que nous avons porté ce bidon d'eau ensemble. Merci à toi pour ton soutien et pour toutes ces discussions enrichissantes. Tu es une amie sur qui je peux toujours compter (sauf le jeudi soir après oohoo). Je te souhaite pleins de belles choses pour la suite, et n'oublie pas de venir me voir dans un cours.

Cette thèse a également été pour moi l'occasion de collaborer avec une équipe d'enseignants formidables. Clément, Nicolas, Jean-Bernard et Manon, merci à vous pour votre confiance et pour votre bienveillance. J'ai adoré m'investir dans ma mission d'enseignement à vos côtés. Un grand merci également à Marlène, Emilie, Juliette, Frédéric et Lise qui ont toujours rendu mes passages à Montrouge très agréables. Merci également à Roba pour m'avoir laissé encadrer les TD de chimie organique, merci pour ta confiance.

Merci infiniment aux étudiants, à tous ces étudiants que j'ai eu la chance de suivre durant mes trois années de thèse. Vous avez tous été formidables et vous m'avez donné la plus belle des premières expériences en tant qu'enseignante. Merci à vous tous.

Je voudrais également remercier tous mes collègues des Olympiades Nationales et Internationales de la Chimie avec qui j'ai eu la chance de passer des moments très enrichissants depuis plusieurs années déjà.

Cette thèse est l'aboutissement de 9 (longues) années d'études qui n'aurait jamais été possible sans le soutien infailible de mes amis et de ma famille.

Merci à Elie, Briec, Laora, Damien, JX, Pierre et Aurélien pour les bons moments que nous avons partagé ensemble dès la licence.

Merci à toi Céline, mon encadrante de stage et maintenant mon amie. Merci pour ton soutien inébranlable, pour tous nos échanges constructifs et pour ta bienveillance.

Je voudrais remercier également les amis que j'ai rencontrés pendant mon année de master. Merci à toi Hugo, pour ta bonne humeur et pour les bières (trop nombreuses ?), merci à Georgina, à Nathan, à Max, à Juliette et à Cédric pour tous ces bons moments passés ensemble. Je ne l'oublierai jamais.

Mention spéciale pour Soraya, ma sœur de cœur. Je ne sais pas si j'aurais pu tenir jusqu'au bout sans toi. Tu es un soutien quotidien et je ne saurais comment te remercier pour tout cela. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, tu es juste incroyable, tu es juste inoubliable.

Merci à Fayza, ma bomba latina. Merci pour tous ces bons moments et même si tu m'as volé Tayc, tu resteras à jamais dans mon cœur.

Merci à toi Rémi, j'ai eu la chance de croiser ton chemin à Henri IV. Merci aussi à toi Odile. C'est toujours un plaisir de venir vous voir et d'échanger avec vous.

Merci à ma deuxième famille, ma famille de cœur.

Bechara, merci pour avoir été auprès de moi pendant toutes ces années. Merci pour avoir été beau, drôle et bienveillant. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Merci pour tout (Ana bahibbak).

Álvaro, on s'est rencontré en stage de Master et depuis on ne s'est plus jamais quittés. Le meilleur des binômes, le meilleur des clowns. Merci pour être l'ami qu'on rêve tous d'avoir. Merci pour m'avoir toujours épaulé, pour m'avoir donné du courage et surtout pour m'avoir fait rire. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite car tu le mérites tellement.

Perla, merci pour ta douceur, pour ton écoute et pour ta gentillesse. Ne change jamais. Merci Prisca et Cynthia pour votre soutien, merci pour tout.

Comment ne pas remercier mes amis de (très) longue date ?

Merci à Béranger et Elise, rien n'a changé depuis la prépa. Merci à vous pour tous ces bons moments que je n'oublierai jamais (et les prochains à venir !).

Merci à toi Céline, mon choukidi, la meilleure des amies qu'on puisse rêver d'avoir. Tu es certainement celle qui me connaît le mieux et qui a toujours su trouver les mots pour m'apaiser. Merci pour ta patience et pour tout l'amour que tu me donnes au quotidien. Toi et moi c'est « *hand-in-hand* » (et bientôt *bike with bike*) pour la vie.

Merci à mes amies que j'ai la chance d'avoir depuis le collège, Morgane et Sarah.

Morgane, promis on refera d'autres expériences culinaires (douteuses) ensemble. Merci pour m'avoir toujours épaulée depuis toutes ces années, même à distance. Tu es une personne formidable, merci pour tout. Sarah, merci d'avoir été présente dans ma vie depuis tout ce temps et de me soutenir comme tu le fais.

Merci à ma meilleure amie d'enfance, Lucine. On se connaît littéralement depuis 24 ans (c'est la classe des zig). Merci pour tout ce que tu m'as apportée depuis tant d'années, pour tous ces souvenirs que je n'oublierai littéralement jamais.

Bien-sûr merci à toi mon Amour, mon Boubou. Merci pour la personne que tu es avec moi au quotidien. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, je n'aurais jamais rêvé meilleure compagnie que la tienne. Merci pour tout.

Enfin, merci à vous. Merci à mes parents, sans qui je n'aurais jamais eu l'opportunité d'arriver jusqu'ici. Merci pour tout ce que vous m'avez permis de réaliser depuis toutes ces années. Et merci surtout à toi, Maman. Celle qui illumine m'a vie depuis 26 ans, qui m'a transmis les plus belles valeurs et qui a toujours cru en moi. J'espère que tu es fière de moi. Je te dédicace bien évidemment cette thèse. Merci pour tout.

À toi Maman

Table des matières

Liste des abréviations	14
Liste des figures	16
Liste des tables	19
Chapitre I	21
Introduction générale	21
Table des matières	22
I. Les enjeux du suivi de protéines en cellules vivantes	23
I.1. L'imagerie de fluorescence en cellules	25
I.1.1. Principe de la fluorescence à l'échelle moléculaire	25
I.1.2. La microscopie à fluorescence	29
I.1.3. Les marqueurs fluorescents	30
I.1.4. Les marqueurs fluorescents génétiquement encodés	33
I.2. Conditions optimales pour l'imagerie de fluorescence en cellules	38
II. Les protéines fluorescentes	39
II.1. La Green Fluorescent Protein (GFP)	39
II.1.1. Propriétés de structure de la GFP	39
II.1.2. Caractéristiques photophysiques de la GFP	41
II.2. Ingénierie de variants de la GFP	43
II.3. Biosenseurs basés sur les protéines fluorescentes	45
II.4. Limites des protéines fluorescentes pour l'imagerie cellulaire	47
III. "Locally-activated chemogenetic biosensors for bioimaging": a minireview	49
Abstract	49
III.1. Introduction	50
III.1.1. Définitions	50
III.1.2. Fluorescent sensors for bioimaging	50
III.1.3. Analyte detection mechanisms	54
III.2. Design of locally-activated semisynthetic biosensors	57
III.2.1. Early examples based on the biarsenical FLAsH/tetracysteine tag system	57
III.2.2. Fluorogenic semisynthetic biosensors based on rhodamines	58
III.2.3. Fluorogenic semisynthetic sensors based on fluorescent molecular rotors	63
III.3. Other example of locally-activated fluorogenic semisynthetic biosensor for pH	70
III.4. Conclusion	70
IV. Objectifs et organisation du manuscrit de thèse	72

Résultats	74
Chapitre II	75
Conception et caractérisations de sondes chimiogénétiques hybrides pour l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes	75
Table des matières	76
I. Contextualisation	78
I.1. Ingénierie de rotors moléculaires fluorogéniques	78
I.1.1. Structure et propriétés de fluorescence des rotors moléculaires	78
I.1.2. Stratégies de synthèse et diversification des propriétés optiques	82
I.2. Ingénierie de protéines par design rationnel	86
I.2.1. Mutagenèse dirigée	88
I.2.2. Permutations circulaires	91
II. « Design of bright chemogenetic reporters based on the combined engineering of fluorogenic molecular rotors and of the HaloTag protein »	94
Abstract	94
II.1. Introduction	95
II.2. Results and discussion	97
II.2.1. Design of the fluorogens	97
II.2.2. Characterization in HaloTag7	101
II.2.3. Characterization in a HaloTag mutant	104
II.3. Live cell microscopy	107
II.4. Conclusion and perspectives	110
III. Résultats complémentaires	111
III.1. Production de mutants de HaloTag par mutagenèse dirigée	111
III.1.1. Clonage de HaloTag7 et de ses variants	111
III.1.2. Production et purification de la protéine HaloTag7 et de ses variants	113
III.1.3. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les variants	116
III.2. Permutations circulaires dans HaloTag (cpHT)	119
III.2.1. Principe et présentation des protéines cpHT étudiées	119
III.2.2. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les cpHT	122
IV. Conclusion et perspectives	125
VI. Partie expérimentale	128
VII. Annexes	137
Chapitre III	153
Développement de sondes pH chimiogénétiques hybrides localement activées pour étudier l'exocytose de protéines en cellules vivantes	153
Table des matières	154

I. Contextualisation	156
I.1. Le phénomène d'exocytose	156
I.1.1. Principe général de l'exocytose	156
I.1.2. Les différents modes de sécrétion	158
I.2. Sondes pH pour étudier l'exocytose par imagerie de fluorescence	160
I.1.1. Les protéines fluorescentes sensibles au pH	161
I.1.2. Les systèmes hybrides sensibles au pH	164
I.3. Méthodes de détection de l'exocytose par microscopie à fluorescence	167
I.1.1. La Microscopie à Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM)	169
I.1.2. La microscopie confocale Spinning-Disk	171
I.4. Un modèle d'étude de l'exocytose : sécrétion de la protéine CD63 dans les cellules HeLa	174
II. "Locally-Activated Chemogenetic pH Probes for Protein Exocytosis Monitoring"	176
Abstract	176
II.1. Introduction	177
II.2. Results and discussion	179
II.2.1. Design of fluorogenic pH probes.	179
II.2.2. Characterization in 40 % glycerol buffers.	182
II.2.3. Characterization in HaloTag.	184
II.2.4. Évaluation of chemogenetic pHluo-Halo indicators in live cells.	186
II.2.5. Detection of single exocytosis events in HeLa cells.	188
II.3. Conclusions and perspectives	191
III. Résultats complémentaires	193
III.1. Études spectroscopiques des ligands pHluo-Halo dans mHT	193
III.2. Imagerie de fluorescence des ligands pHluo-Halo-1&2 dans mHT	197
IV. Conclusion et perspectives	198
VI. Partie expérimentale	203
VII. Annexes	216
<i>Chapitre IV</i>	229
Application des sondes fluorescentes chimiogénétiques hybrides à l'étude de la protéine hevin	229
Table des matières	230
I. Contextualisation	232
II. Résultats préliminaires	235
I.1. Quelles sont les voies de sécrétion de hevin ?	235
I.1.1. Construction de Hevin-HaloTag	235
I.1.2. Localisation subcellulaire de hevin	239

I.2. Mécanisme de sécrétion de hevin	244
III. Conclusion et perspectives	250
IV. Partie expérimentale	252
Conclusion générale et perspectives	257
Références	263

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

TIRFM: Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy

STED: Stimulated-Emission-Depletion

QD: Quantum Dots

IR: Infra-Rouge

NP: Nanoparticule

FP: Fluorescent Protein

P.O.I.: Protein Of Interest

GFP: Green Fluorescent Protein

UAA: Unnatural Amino Acid

ESPT: Excited-State Proton Transfer

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

SLP: Self-Labeling Protein tag

ROS: Reactive Oxygen Species

PeT: Photo-induced Electron Transfer

ICT: Intramolecular Charge Transfer

EWG: Electron-Withdrawing Group

EDG: Electron-Donating Group

TCtag: Tetracysteine tag

SiR: Silarhodamines

FMR: Fluorescent molecular rotor

HBR: Hydroxybenzylidene Rhodanine

DFHBI: 3,5-DiFluoro-4-Hydroxy-Benzylidene Imidazolinone

FAP: Fluorogen Activating Protein

UV: Ultra-Violet

NIR: Near Infra-Red

DFT: Density Functional Theory

RMF: Rotor Moléculaire Fluorescent

TICT: Twisted Intramolecular Charge Transfer

PCR: Polymerase Chain Reaction

MVB: Multivesicular Bodies

SEP: Superecliptic pHluorin

PM: Plasma Membrane

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine

Liste des figures

Figure 1. Les différents niveaux de complexité des structures composant le cerveau. _____	24
Figure 2. Diagramme de Perrin-Jablonski. _____	26
Figure 3. Allure générale des spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore. _____	27
Figure 4. Schémas illustratifs des différentes familles de marqueurs fluorescents. _____	32
Figure 5. Utilisation des protéines fluorescentes génétiquement encodées. _____	34
Figure 6. Utilisation des peptides pour visualiser une protéine d'intérêt. _____	34
Figure 7. Utilisation des protéines/enzymes génétiquement encodées pour visualiser une protéine d'intérêt. _____	35
Figure 8. Chronologie des différents peptides et protéines de marquage développés. _____	36
Figure 9. Incorporation d'acide aminé pour le suivi d'une protéine d'intérêt. _____	37
Figure 10. Structure cristallographique du dimère de la AvGFP. _____	40
Figure 11. Principe de modification du gène de la GFP pour le marquage d'une protéine d'intérêt et formation du chromophore de la AvGFP. _____	41
Figure 12. Spectre d'absorption et d'émission de la protéine AvGFP. _____	42
Figure 13. Spectres d'excitation et d'émission de la eGFP. _____	44
Figure 14. Palette de couleurs des protéines fluorescentes obtenues à partir de clonages. _____	44
Figure 15. Différents mécanismes de détection par des biosenseurs basés sur des protéines fluorescentes. _____	47
Figure 16. General principle of the different classes of sensors for bioimaging. _____	52
Figure 17. Comparison of HaloTag and SNAP-tag strategies for subcellular bioimaging. _____	53
Figure 18. Schematic illustration of the different chemosensors fluorescence mechanisms. _____	56
Figure 19. Structure of fluorogenic rhodamine derivatives. _____	59
Figure 20. Fluorogenic calcium probes targeted towards HaloTag. _____	60
Figure 21. TRaQ-G dual-input glutathione sensor. _____	62
Figure 22. General characteristics of FMRs based fluorogens. _____	64
Figure 23. Structure and properties of ratiometric pH sensors based on FAP labeling. _____	66
Figure 24. Structure and properties of the Ca-DIP sensor. _____	67
Figure 25. Fluorogenic chemogenetic pH sensor based on the de novo design of mFAPs. _____	69
Figure 26. Représentation schématique des objectifs de cette thèse. _____	73
Figure 27. Principe général du challenge de développement de nouveaux outils hybrides basés sur la combinaison de l'ingénierie de molécules et de protéines. _____	77
Figure 28. Diagramme simplifié de Jablonski relatif au mécanisme de fluorescence des rotors moléculaires de type push-pull. _____	79
Figure 29. Diversifications structurelle et spectrale de quelques RMFs. _____	81
Figure 30. Principe général de l'activation des RMFs par une biomolécule. _____	82
Figure 31. Stratégie de synthèse linéaire adoptée par l'équipe pour la diversification des propriétés photophysiques des rotors fluorescents de type push-pull. _____	85
Figure 32. Comparaison des différentes étapes intervenant dans les deux approches d'ingénierie de protéines : <i>design rationnel</i> et <i>évolution dirigée</i> . _____	88
Figure 33. Représentation schématique du principe d'extension par PCR. _____	89
Figure 34. Présentation des différentes étapes impliquées dans la production d'un plasmide mutée par technique de PCR. _____	90
Figure 35. Principe de réorganisation de la séquence ADN d'une protéine par permutation circulaire. _____	91
Figure 36. Design of the Halo probes. _____	99
Figure 37. Characterization of the Halo probes in HaloTag7. _____	101
Figure 38. Characterization of the Halo probes in mHT. _____	104

Figure 39. Molecular dynamics of HaloTag7 and mHT complexed with Red-Halo3. _____	106
Figure 40. Properties of the Halo probes in live-cell imaging. _____	108
Figure 41. Sélection du meilleur variant de HaloTag7 par design rationnel. _____	112
Figure 42. Principe de la construction du plasmide pET28_his_HaloTag à partir du plasmide pET28_his_pFAST. _____	114
Figure 43. Principe de production des variants de HaloTag7 par mutagenèse dirigée. _____	115
Figure 44. Intensité de fluorescence normalisée par rapport à HaloTag7 (<i>ligne en pointillés rouge</i>) des différents RMFs dans chaque variant de HaloTag7. _____	116
Figure 45. Caractérisations <i>in vitro</i> des RMFs Orange-Halo2, Red-Halo2 et Red-Halo5 dans la protéine HaloTag7 et la protéine HaloTag M175Y. _____	117
Figure 46. Principe général de l'obtention des protéines cpHT par le Dr. Mironova. _____	119
Figure 47. Images de microscopie confocale des cpHT marqués avec le ligand TMR (5 µM). _____	120
Figure 48. Cinétiques des réactions sur gel de chaque cpHT avec TMR. _____	121
Figure 49. Intensité de fluorescence des différents RMFs dans les protéines permutées cpHT. _____	122
Figure 50. Étude des RMFs sélectionnés dans les protéines HaloTag7 et cpHT4. _____	124
Figure 51. Principe général de l'utilisation de la plateforme des sondes pH chimiogénétiques hybrides obtenues pour étudier l'exocytose de protéines en cellules vivantes. _____	155
Figure 52. Principe de l'acidification des vésicules de sécrétion par l'enzyme ATPase dans une cellule eucaryote. _____	158
Figure 53. Deux catégories de fusion membranaire intervenant durant le phénomène d'exocytose. _____	159
Figure 54. Principe de l'utilisation des protéines fluorescentes sensibles au pH (ici la SEP) pour suivre l'exocytose d'une protéine d'intérêt depuis une vésicule acide vers le milieu extracellulaire à pH neutre. _____	162
Figure 55. Spectres d'absorption et d'émission de quelques protéines fluorescentes pH sensibles et spectres de leur titration pH. _____	163
Figure 56. Principe de l'étude de l'exocytose avec l'utilisation d'un système chimiogénétique hybride pH sensible. _____	164
Figure 57. Principe du marquage de l'exocytose de VAMP2 avec la sonde pH hybride hRhP-EF. _____	166
Figure 58. Principe de détection du phénomène d'exocytose en utilisant les systèmes hybrides SNAP-tag/VO et SNAP-tag/CFL. _____	167
Figure 59. Présentation des différentes échelles spatiotemporelles du vivant accessibles par les techniques de microscopie. _____	169
Figure 60. Comparaison entre la microscopie épifluorescence et la microscopie TIRF. _____	171
Figure 61. Principe de fonctionnement d'un microscope confocal Spinning-Disk. _____	173
Figure 62. Modèle pour la visualisation de la sécrétion de la protéine CD63. _____	175
Figure 63. Design and working principles of the pHluo-Halo reporters to monitor protein exocytosis. _____	181
Figure 64. Characterization of chemogenetic fluorogenic pH probes in tris buffers with 40 %w/v of glycerol. _____	183
Figure 65. Reaction of the pHluo-Halo probes with HaloTag and characterization of the resulting chemogenetic pH sensors. _____	186
Figure 66. Selectivity of the pHluo-Halo probes in live HeLa cells. _____	187
Figure 67. Detection of single CD63 exocytosis in HeLa cells. _____	190
Figure 68. Caractérisations spectroscopiques des sondes pHluo-Halo-1 et pHluo-Halo-2 dans la protéine mutée mHT. _____	195
Figure 69. Evaluation <i>in vivo</i> des sondes pHluo-Halo-1&2 dans mHT. _____	198

Figure 70. Structures moléculaires de type dipolaires push-pull envisagées pour la conception de sondes pH « inverses ».	200
Figure 71. Schéma générale du principe de l'étude de la protéine hevin avec des sondes chimiogénétiques hybrides.	231
Figure 72. Principe générale de la sécrétion de la protéine Hevin par les astrocytes et de son interaction en tant que facteur synaptogénique avec les neurones.	233
Figure 73. Construction du plasmide Hevin-HaloTag7 en biologie moléculaire par digestion enzymatique et PCR.	236
Figure 74. Western-blots d'extraits de milieux extracellulaires de cellules U251 et BON en culture exprimant des protéines de fusion contenant hevin.	237
Figure 75. Immunofluorescence après transfection de différentes constructions contenant la protéine hevin.	238
Figure 76. Représentation des différentes familles de vésicules existantes et de quelques marqueurs associés (VAMP2, NPY, LAMP1 et CD63).	239
Figure 77. Images de microscopie confocale de fluorescence des colocalisations de hevin.	241
Figure 78. Images de microscopie confocale de fluorescence de colocalisation de Hevin-HaloTag + Red-Halo3 (<i>magenta</i>) et Hevin-GFP (<i>vert</i>) en cellules fixées.	242
Figure 79. Coefficients de Pearson obtenus pour les différentes colocalisations de hevin.	242
Figure 80. Images de microscopie TIRF de cellules HeLa transfectées par Hevin-SEP (2 cellules, <i>gauche</i>) et Hevin-HaloTag + pHluo-Halo-1 (1 cellule, <i>droite</i>).	244
Figure 81. Profil d'intensité d'un événement détecté dans une cellule HeLa exprimant la protéine de fusion Hevin-HaloTag et incubée avec 1 μ M de la sonde pHluo-Halo-1.	245
Figure 82. Analyse du processus de sécrétion de hevin dans les cellules HeLa avec la sonde hybride HaloTag/pHluo-Halo-1.	247
Figure 83. Profile d'intensité d'un événement détecté dans une cellule HeLa exprimant la protéine de fusion Hevin-SEP.	248
Figure 84. Analyses du processus de sécrétion de hevin dans les cellules HeLa avec la protéine fluorescente SEP.	248

Liste des tables

Table 1. Brillances de quelques classes de fluorophores. _____	28
Table 2. Comparaison des différents marqueurs fluorescents pour l'imagerie de protéines en cellules. _____	37
Table 3. Propriétés photophysiques de quelques protéines fluorescentes. _____	45
Table 4. Photophysical properties of the probes in PBS (pH 7.3) and after reaction with HaloTag7 or mHT. _____	103
Table 5. Construction des plasmides des protéines HT M175Y, HT V245A et HT M175Y+V245A. _____	113
Table 6. Comparaison des propriétés spectroscopiques des RMFs dans HaloTag7 et cpHT4. _____	123
Table 7. Photophysical properties of pHluo-Halo probes in glycerol and in presence of HaloTag protein in PBS (pH = 7.4). _____	183
Table 8. Caractérisations spectroscopiques de pHluo-Halo-1 et pHluo-Halo-2 dans la protéine mutée mHT dans le PBS (pH = 7.4). _____	194

Chapitre I

Introduction générale

Table des matières

I. Les enjeux du suivi de protéines en cellules vivantes	23
I.1. L'imagerie de fluorescence en cellules	25
I.1.1. Principe de la fluorescence à l'échelle moléculaire	25
I.1.2. La microscopie à fluorescence	29
I.1.3. Les marqueurs fluorescents	30
I.1.4. Les marqueurs fluorescents génétiquement encodés	33
I.2. Conditions optimales pour l'imagerie de fluorescence en cellules	38
II. Les protéines fluorescentes	39
II.1. La Green Fluorescent Protein (GFP)	39
II.1.1. Propriétés de structure de la GFP	39
II.1.2. Caractéristiques photophysiques de la GFP	41
II.2. Ingénierie de variants de la GFP	43
II.3. Biosenseurs basés sur les protéines fluorescentes	45
II.4. Limites des protéines fluorescentes pour l'imagerie cellulaire	47
III. "Locally-activated chemogenetic biosensors for bioimaging": a minireview	49
Abstract	49
III.1. Introduction	50
III.1.1. Définitions	50
III.1.2. Fluorescent sensors for bioimaging	50
III.1.3. Analyte detection mechanisms	54
III.2. Design of locally-activated semisynthetic biosensors	57
III.2.1. Early examples based on the biarsenical FLAsH/tetracysteine tag system	57
III.2.2. Fluorogenic semisynthetic biosensors based on rhodamines	58
III.2.3. Fluorogenic semisynthetic sensors based on fluorescent molecular rotors	63
III.3. Other example of locally-activated fluorogenic semisynthetic biosensor for pH	70
III.4. Conclusion	70
IV. Objectifs et organisation du manuscrit de thèse	72

I. Les enjeux du suivi de protéines en cellules vivantes

La cellule, comme unité structurale des organismes vivants, possède une organisation complexe mettant en jeu une multitude d'acteurs à différentes échelles spatiotemporelles comme les lipides qui sont les principaux constituants des membranes cellulaires, les glucides qui sont une source d'énergie pour les cellules, les nucléotides qui sont les éléments constitutifs de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) qui stockent l'information génétique et qui servent de matrice pour la synthèse des protéines. Les protéines participent pratiquement à toutes les fonctions biologiques. Elles servent de composants structurels de la cellule, comme l'actine, de transporteurs facilitant le passage de molécules à travers la membrane, d'enzymes qui participent aux réactions biochimiques essentielles au fonctionnement de la cellule, ou de médiateurs de la signalisation intra- et inter-cellulaire. Dans le cas du système nerveux central, il existe une diversité de types cellulaires comme les neurones et les cellules gliales dont les astrocytes.^[1] En neuroscience, un enjeu crucial consiste à observer et à suivre le comportement de protéines d'intérêt pendant divers processus physiologiques, afin de mieux comprendre les mécanismes régulant leur fonction. Cependant cette action pose deux problématiques majeures:

- La détermination du niveau de résolution requis pour observer avec précision la localisation et la dynamique de la protéine au sein de la cellule (Figure 1).
- La sélection de la méthode la plus appropriée pour visualiser ou détecter la protéine dans son environnement cellulaire.

Par exemple, la spécialisation des différents domaines du neurone se traduit par une spécification de sa composition protéique qui change en fonction de l'expérience et permet au cerveau de s'adapter. Des approches de protéomique et de microscopie à super-résolution ont permis de montrer que la composition protéique des synapses changeait dramatiquement au cours du processus de plasticité synaptique.^[2] De même, l'activité et la structure des astrocytes changent suite à des modifications de l'activité neuronale.^[3] Étudier la localisation et la dynamique de ces protéines est donc crucial pour comprendre les mécanismes sous-tendant le fonctionnement normal et pathologique du cerveau.

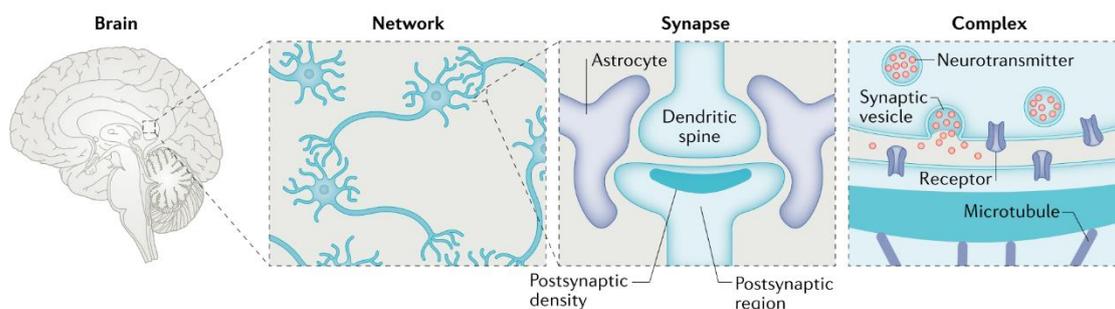


Figure 1. Les différents niveaux de complexité des structures composant le cerveau.

Échelles: cerveau entier, réseau neuronal, synapse et molécules. Adapté de Choquet et *al.*[4]

La compréhension du rôle et des fonctions cellulaires de ces diverses protéines est un enjeu car ces dernières sont intrinsèquement invisibles. De quel(s) moyen(s) dispose-t-on pour les observer ?

Deux objectifs différents sont généralement considérés dans le champ de l'imagerie cellulaire. On peut distinguer la détermination de la localisation subcellulaire qui requiert une observation des protéines à l'état statique, potentiellement fixées, et la caractérisation de processus dynamiques de signalisation et de trafic, qui nécessite une acquisition en temps réel. Pour répondre à ces deux objectifs, la stratégie la plus répandue repose sur l'utilisation de l'imagerie de fluorescence.

L'imagerie de fluorescence est une des techniques les plus utilisées pour déterminer la localisation subcellulaire et caractériser des processus cellulaires car il s'agit d'une méthode optique avec une haute résolution spatio-temporelle, non-invasive, multicolore et simple à mettre en œuvre.[5] Ainsi, le marquage d'une protéine d'intérêt par fluorescence est une stratégie de choix permettant de visualiser et d'étudier l'ensemble des mécanismes cellulaires associés avec une grande précision et résolution à l'échelle subcellulaire.[4]

Dans cette introduction seront développées les caractéristiques de l'imagerie de fluorescence des protéines en cellules vivantes. Plus précisément, il s'agit de mettre en lumière les méthodes, enjeux et contraintes relatifs à l'exploration cellulaire pour observer, analyser et comprendre les mécanismes cellulaires fondamentaux.

I.1. L'imagerie de fluorescence en cellules

Les dernières avancées et innovations associées aux techniques d'imagerie de fluorescence permettent d'étudier des processus biologiques complexes avec une résolution spatio-temporelle inégalée. D'une part, le développement technologique de l'instrumentation en microscopie et même en techniques d'analyse a permis d'obtenir des résolutions nanométriques pour étudier les protéines cibles. D'autre part, les progrès actuels en termes d'ingénierie de sondes fluorescentes et de stratégies de ciblage ont permis de générer des outils puissants pour la localisation et le suivi des protéines au sein des divers organites cellulaires. La conjonction entre le marquage par fluorescence et le microscope permet de répondre à des questions biologiques à l'échelle moléculaire.

I.1.1. Principe de la fluorescence à l'échelle moléculaire

Quelles sont les caractéristiques et propriétés des molécules fluorescentes ?

Ces molécules présentant au moins un électron délocalisé ont la faculté d'absorber un photon d'énergie $E = h\nu$. Ce phénomène leur permet alors de changer de niveau d'énergie électronique passant de l'état fondamental à un état énergétique supérieur. Le phénomène de fluorescence se caractérise alors par l'émission radiative d'un photon d'énergie plus faible - $E = h\nu'$ - lorsque la molécule revient à son état fondamental. En 1935, le physicien Alexandre Jabłoński a proposé une représentation des différents niveaux d'énergie et des transitions entre les niveaux associés au phénomène de fluorescence donnant ainsi lieu au diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 2).^[6] Ce diagramme schématise l'ensemble des configurations électroniques d'une molécule et les diverses transitions (radiatives, non-radiatives ou intersystèmes) susceptibles de se produire suite à l'excitation d'une molécule par absorption d'un photon. Le diagramme comporte donc le niveau électronique fondamental (S_0) suivi des états de plus haute énergie nommés états excités singulets (S_1 et S_2) ou triplet (T_1) (Figure 2). Chaque état électronique est subdivisé en plusieurs niveaux vibrationnels. Les diverses transitions possibles entre ces états ne conduisant à aucune émission de photon sont dites non-radiatives ou vibrationnelles. C'est le cas des transitions internes, des transitions intersystèmes et des processus de relaxation d'un état excité

vers l'état fondamental. Les transitions qui impliquent l'émission d'un photon correspondent à la fluorescence pour le cas du passage d'un état singulet (S) à S_0 et à de la phosphorescence pour le cas du passage d'un état triplet (T) à S_0 . Contrairement à la fluorescence qui est caractérisée par un retour très rapide ($\sim 10^{-9}$ s) à l'état fondamental, la phosphorescence est un processus de désexcitation beaucoup plus lent (\sim s) car il s'agit d'une transition partiellement interdite. L'ensemble de ces processus électroniques (radiatifs et non-radiatifs) est entièrement dépendant de la configuration électronique et donc de la structure de chaque espèce moléculaire. On appelle alors fluorophores les molécules dont la structure permet d'observer une émission de fluorescence.

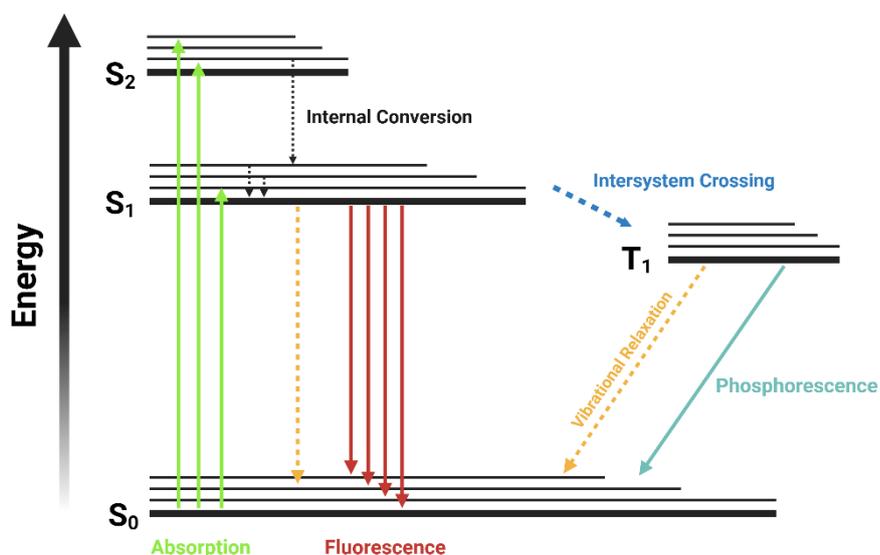


Figure 2. Diagramme de Perrin-Jablonski.

À chaque transition énergétique faisant passer la molécule de son état fondamental S_0 aux différents niveaux vibrationnels des états singulets S_1 et S_2 correspond une longueur d'onde associée à l'énergie du photon d'excitation (loi de Planck-Einstein, $E = hc/\lambda$). L'efficacité d'absorption de ces photons par le fluorophore et elle-même reliée au coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda)$ qui varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, il en résulte la notion de spectre d'absorption qui rend compte de la variation spectrale de l'efficacité d'absorption (Figure 3). On peut accéder à cette variation par mesure de l'absorbance obéissant à la loi de Beer-Lambert

ou par mesure du spectre d'excitation. L'énergie des photons émis dépend du niveau vibrationnel de l'état fondamental dans lequel se trouve le fluorophore après sa désexcitation. Le spectre d'émission rend donc compte des propriétés spectrales de la lumière émise (Figure 3). En raison des dissipations énergétiques non radiatives à l'état excité, l'énergie du photon émis est inférieure à l'énergie du photon absorbé et la longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'absorption. On caractérise cette différence entre le maximum d'excitation et d'émission sous le nom de déplacement de Stokes. Ce paramètre est également propre à chaque fluorophore et à son environnement.

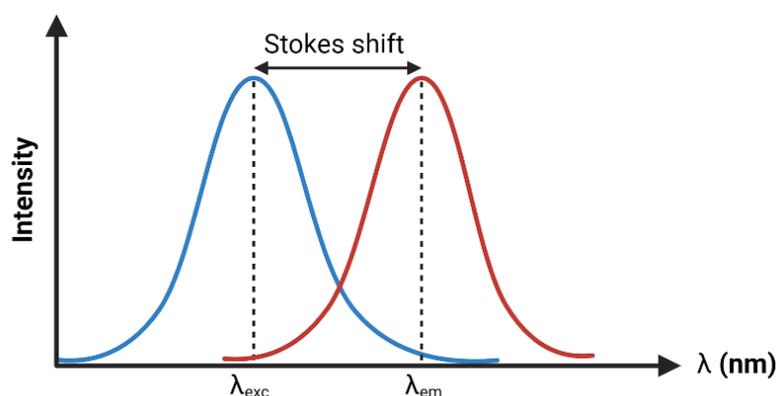


Figure 3. Allure générale des spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore.

Dans le contexte de l'imagerie cellulaire par fluorescence, on cherche souvent à obtenir des molécules dont la fluorescence émise est élevée afin de maximiser le rapport signal/bruit. Le paramètre traduisant l'efficacité de l'émission de fluorescence d'une molécule est le rendement quantique (Φ_F). Il s'agit du rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par unité de temps. Ce dernier est caractérisé par les valeurs de constantes de vitesses de désexcitation radiative et non radiative selon l'équation suivante:

$$\Phi_F = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Avec k_r et k_{nr} les constantes de vitesses de désexcitation radiative et non radiative respectivement.

Ce rendement quantique peut avoir des valeurs proches de 1 dans le cas où $k_{nr} \ll k_r$, c'est-à-dire lorsque les processus de désexcitation non-radiatifs sont minimisés par rapport à l'émission de fluorescence. Cette valeur dépend également de la nature électronique et structurale du fluorophore mais aussi d'autres facteurs externes comme la concentration, la température ou la nature du solvant. Enfin, un autre paramètre utilisé pour traduire la viabilité d'une sonde fluorescente pour l'imagerie est la brillance (B) définie comme le produit du rendement quantique (Φ_F) et de la quantité de photons absorbés (ε).

$$B = \Phi_F \times \varepsilon$$

La valeur de cette brillance est variable en fonction de la structure des molécules considérées. Le tableau ci-dessous représente différentes classes de molécules et les brillances associées allant de valeurs très modestes pour le cas des tryptophanes à des valeurs très élevées pour les quantum Dots (QDs) (Table 1).^[7]

Fluorophores	Brillance
Tryptophane	600
eYFP	51000
Fluorescéine	72000
Cyanine5	90000
Quantumdot 605	550 000
Quantumdot 655	1 800 000

Table 1. Brillances de quelques classes de fluorophores.

Ce phénomène de fluorescence est à la base du fonctionnement de l'ensemble des outils qui seront présentés dans la suite de ce manuscrit. La détection optique de la fluorescence peut se faire à l'œil nu mais la résolution spatio-temporelle exigée pour le suivi de protéines cibles (~ 100 nm) requiert des techniques de microscopie résolutive et très sensibles.

I.1.2. La microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est l'approche la plus courante pour observer des cellules vivantes et avoir accès à la localisation subcellulaire, aux fonctions et activités biologiques relatives à une protéine d'intérêt. Cette technique se démarque notamment par son caractère non-invasif et sa résolution spatio-temporelle élevée (~ 200 nm et ~ms) qui permettent de suivre des processus cellulaires à très petite échelle et en temps réel avec une grande sensibilité de détection.^[5,8] Cette méthode repose sur l'irradiation de protéines ou autres molécules marquées par des agents fluorescents avec une longueur d'onde définie permettant de collecter un signal fluorescent de longueur d'onde plus élevée. Les principales caractéristiques recherchées pour l'étude des systèmes biologiques par microscopie à fluorescence sont la résolution spatio-temporelle, la sensibilité et la faible phototoxicité.^[5] La résolution est majoritairement influencée par le choix du microscope utilisé. On différencie plusieurs classes de microscopes à fluorescence permettant d'imager à différentes échelles et avec différentes résolutions spatio-temporelles :

- La microscopie **épi-fluorescence**^[9] à champ large. Cette microscopie permet d'illuminer simultanément toutes les parties de l'échantillon par un faisceau de lumière offrant ainsi une acquisition simple et rapide pour visualiser la localisation des protéines marquées. Toutefois, cette microscopie ne permet pas d'obtenir des images avec un bon contraste et une bonne résolution spatiale car l'intégralité des molécules fluorescentes est excitée à tous les plans même ceux adjacents au plan focal ce qui induit des parties non résolues sur l'image.^[10]
- La microscopie **confocale**.^[11] Ce type de microscope permet d'imager les cellules avec une très faible profondeur de champ (~ 400 nm) en utilisant le principe du balayage laser qui repose sur une illumination sélective de l'échantillon par plans focaux (plans confocaux) de l'objectif. De cette manière, seuls les photons présents dans le plan confocal au moment du balayage sont excités et participent à la formation de l'image offrant ainsi des images beaucoup plus nettes et avec un fort contraste.^[12] La microscopie confocale est couramment utilisée pour les études portant sur la localisation subcellulaire nécessitant une grande résolution.^[13]

- La microscopie à **fluorescence par réflexion totale interne (TIRF)**.^[14] Aussi appelée microscopie par onde évanescente, cette technique permet d'observer les cellules sur une tranche d'épaisseur très fine (~ 200 nm d'épaisseur). Pour cela, un faisceau laser est envoyé sur l'échantillon biologique avec un angle particulier permettant d'exciter uniquement les protéines marquées à proximité de la lame et avec une faible intensité. Cette microscopie et ses caractéristiques seront détaillées plus amplement au cours du **Chapitre III** dans le cadre de l'étude de la sécrétion d'une protéine d'intérêt.
- Les microscopies à **super-résolution**. Les récents progrès techniques sur les méthodes optiques ont permis de développer une nouvelle classe de microscopes à super-résolution afin d'améliorer considérablement la résolution spatiale des acquisitions, même à des échelles très faibles (~ 5 nm). Dans cette catégorie, on retrouve par exemple la microscopie de déplétion par émission stimulée (STED) qui permet de dépasser les limites de la diffraction optique en utilisant deux lasers pour balayer l'échantillon biologique: un laser d'excitation et un laser dit de « déplétion ».^[15]

Cette liste non-exhaustive de diverses classes de microscopes à fluorescence illustre le développement d'outils de plus en plus performants pour contourner les limites de la fluorescence (diffraction, résolution et sensibilité) et permettre de réaliser des acquisitions satisfaisantes pour étudier les processus biologiques avec précision. Toutefois, outre les moyens optiques mis en œuvre, la nature du marqueur fluorescent utilisé pour localiser les protéines et observer des processus physiologiques en temps réel est primordial.

1.1.3. Les marqueurs fluorescents

Il existe différents types de marqueurs fluorescents comme des particules, des sondes organiques ou encore des protéines fluorescentes^[16-18], qui sont utilisés pour visualiser les biomolécules endogènes comme les protéines, les sucres, les lipides ou les acides nucléiques et qui ont permis de répondre à diverses problématiques biologiques en cellules vivantes.^[19] Les familles de marqueurs biocompatibles sont en constante

expansion. On retrouve parmi ces différents marqueurs fluorescents les familles suivantes:

- Les **particules** fluorescentes: nanoparticules ou microparticules, ces marqueurs fluorescents font partie des premiers marqueurs à avoir été utilisés pour localiser des biomolécules en cellules, en particulier pour l'immunohistochimie par microscopie électronique ou pour les études sur la dynamique de la surface des protéines.^[20] Des nouvelles classes de particules fluorescentes comme les quantum dots (QD)^[21], nanodiamants^[22] et ADN « labélisés » fluorescents^[23] sont de plus en plus utilisés pour le marquage de biomolécules en raison de leur forte brillance et de leur grande résistance au photoblanchiment (Figure 4).^[24] Néanmoins, les particules sont bien souvent limitées par des problèmes de biocompatibilités et de pénétration cellulaire en raison de leur taille nanométrique et de leur surface fonctionnalisée sensible qui rend leur réaction complexe pour le couplage avec les biomolécules. Le développement de nouveaux quantum dots de plus petite taille comme les sQDs a été élaboré pour contourner cette limitation.^[25] De même, le développement de nanotubes de carbones avec une grande résonance optique dans le proche infra-rouge (IR), une brillance élevée et une grande photostabilité constitue un axe prometteur pour l'obtention de nouveaux outils pour l'imagerie de fluorescence des systèmes vivants.^[26]
- Les **sondes organiques**: Initialement développées pour être conjuguées à des anticorps ciblant des protéines d'intérêt^[27], les molécules organiques fluorescentes sont très utilisées pour l'imagerie de fluorescence en cellules en raison de leur petite taille et de leurs propriétés photophysiques très modulables (Figure 4).^[28,29] Leur production par synthèse organique permet d'accéder à un large choix de modifications de leur couleur, de leur propriété biochimique ou de leur brillance mettant ainsi en évidence leur attractivité pour le marquage intracellulaire de biomolécules cibles.^[30] Les sondes organiques les plus couramment utilisées pour l'imagerie de fluorescence cellulaire sont: les rhodamines^[31], les fluorescéines^[32], les cyanines^[33], les coumarines^[34] ou plus récemment les BODIPY^[35] dont les brillances et les photostabilités sont très élevées et donc intéressantes pour l'imagerie en cellules. Bien que la fonction première des sondes organiques soit de permettre la localisation de

biomolécules à l'échelle subcellulaire en imagerie de fluorescence, leur utilisation s'étend également à la création de senseurs pour la détection d'analytes dans l'étude des processus cellulaires dynamiques en temps réel.^[36] Cette dernière application fera l'objet du **Chapitre III**.

- Les **protéines fluorescentes**: L'utilisation des protéines fluorescentes est une stratégie encore couramment utilisée pour suivre des protéines d'intérêt.^[37,38] L'avantage principal de ces protéines fluorescentes est de pouvoir bénéficier de l'encodage génétique *via* la construction de protéines de fusion et pouvoir observer des processus moléculaires dynamiques en temps réel (Figure 4). Cette famille de marqueurs sera détaillée dans la section suivante (partie **II**).

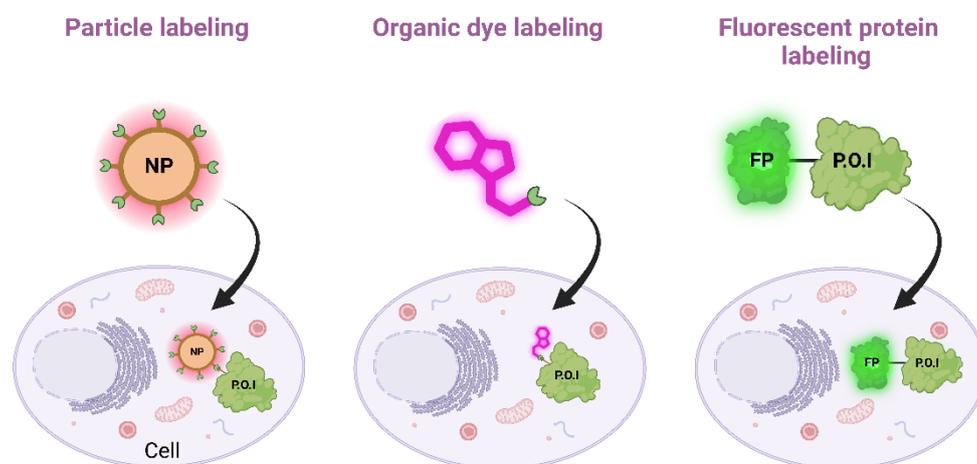


Figure 4. Schémas illustratifs des différentes familles de marqueurs fluorescents. Particule (ici nanoparticule NP) (*gauche*), sondes organiques (*milieu*) et protéines fluorescentes (FP) (*droite*). P.O.I.: protéine d'intérêt.

Ces 3 familles de marqueurs fluorescents sont largement utilisées pour l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes et en particulier dans le cadre du suivi spécifique de protéines cibles. On distingue principalement deux approches pour le marquage d'une protéine d'intérêt en culture: le **marquage endogène**, dans lequel la protéine est marquée dans son état natif par le biais d'un fluorophore et l'**encodage génétique** qui nécessite une modification du gène de la protéine pour y fusionner un marqueur fluorescent.^[4,39] La première méthode de marquage endogène est idéale car elle permet d'étudier la protéine dans son état natif. Néanmoins, les marqueurs fluorescents

utilisés pour cette approche ne sont adaptés que pour des études de localisation subcellulaire non dynamique. En revanche, l'utilisation de marqueurs fluorescents génétiquement encodés offre la possibilité de suivre l'activité dynamique de n'importe quelle protéine d'intérêt avec une bonne résolution spatio-temporelle. C'est cette approche qui a été développée dans le cadre de cette thèse et qui sera appliquée dans la suite de ce manuscrit.

1.1.4. Les marqueurs fluorescents génétiquement encodés

En raison de l'abondance et de la variété de protéines présentes dans divers compartiments cellulaires, il est difficile de marquer ces dernières rapidement et de manière spécifique. Le suivi et la visualisation de processus biologiques dynamiques *in vivo* par microscopie à fluorescence nécessitent ainsi des méthodes permettant le marquage sélectif de protéines cibles. Depuis plusieurs décennies, le développement de marqueurs fluorescents biocompatibles et génétiquement encodés est un axe de recherche majeur. On distingue actuellement 4 familles principales de marqueurs fluorescents encodés génétiquement qui sont:

- Les **protéines fluorescentes**: Établie il y a plus de 20 ans, la fusion génétique d'une protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente comme la Green Fluorescent Protein (GFP) a révolutionné l'imagerie des protéines en cellules vivantes (Figure 5).^[40] Ces protéines fluorescentes possèdent un chromophore capable d'émettre de la lumière par fluorescence. À l'heure actuelle, il s'agit encore des marqueurs fluorescents génétiquement encodés les plus courants pour le suivi et la localisation de protéines cibles.^[41-43] Cette famille de marqueurs fluorescents et ses limites seront détaillées dans la suite de ce chapitre (partie **II**).

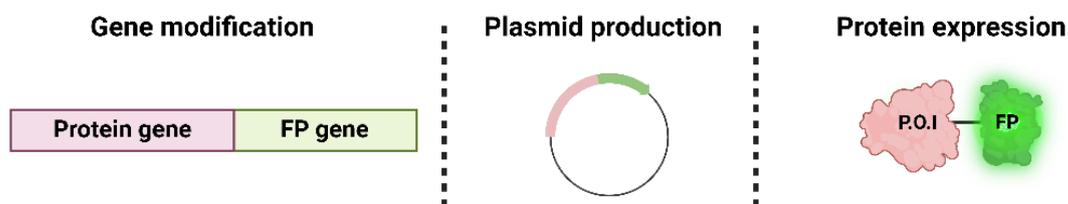


Figure 5. Utilisation des protéines fluorescentes génétiquement encodées.

Adapté de Saimi et al.^[44]

- Les étiquettes **peptidiques**: Ces marqueurs fluorescents font partie des précurseurs des systèmes chimiogénétiques hybrides reposant sur la combinaison d'une biomolécule (ici un peptide) et d'un fluorophore organique (F) pour marquer une protéine d'intérêt par fluorescence. Cette stratégie a été initiée par le groupe de Tsien au début des années 2000 avec la molécule FLAsH capable de se lier à une protéine par le biais de l'incorporation d'un motif tetracystéine au sein du gène de cette dernière (Figure 8).^[45] Depuis, cette approche a été utilisée pour le couplage de divers autres peptides au sein d'une protéine d'intérêt afin de caractériser leur activité dynamique *in vivo* (Figure 6).^[46] L'avantage majeur de ces marqueurs peptidiques est leur petite taille (0,6 – 6 kDa) qui minimise les perturbations du fonctionnement de la protéine cible contrairement aux protéines fluorescentes. De plus, ces systèmes chimiogénétiques hybrides utilisent des fluorophores organiques (F) qui présentent généralement une meilleure brillance et photostabilité que les protéines fluorescentes. Toutefois, le choix des structures moléculaires adaptées et compatibles au couplage avec un peptide reste limité et des étapes de lavage sont souvent nécessaires pour éliminer l'excès de fluorophores non liés afin de réduire le signal non spécifique.

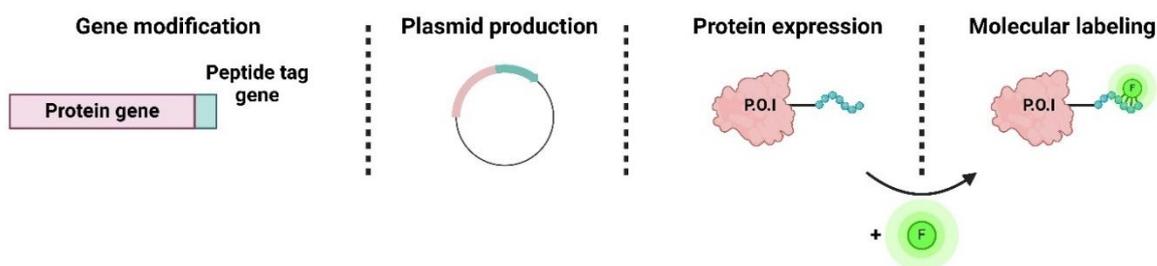


Figure 6. Utilisation des peptides pour visualiser une protéine d'intérêt.

Adapté de Saimi et al.^[44]

- Les **protéines/enzymes** étiquettes de marquage: Développées à la suite des premiers travaux sur les marqueurs peptidiques, les étiquettes enzymatiques de marquage ont été élaborées pour pouvoir être introduites au sein de la séquence d'une protéine d'intérêt et se lier spécifiquement à des fluorophores organiques de façon covalente ou non (Figure 7).^[44,47,48] De nombreux travaux ont permis de générer une diversité de ces marqueurs protéiques avec des spécificités différentes: taille, sites de liaison, vitesse de marquage, etc. (Figure 8). À l'heure actuelle, les deux protéines de marquage les plus utilisées sont SNAP-tag^[49] et HaloTag^[50]. Contrairement aux marqueurs peptidiques, ces protéines bénéficient d'un large choix structurel de fluorophores compatibles ce qui rend ces systèmes chimiogénétiques hybrides très attractifs pour l'imagerie en cellules vivantes. Cependant, leur taille plus importante (18 – 33 kDa) peut perturber la structure et/ou la fonction de la protéine cible. De plus, de façon analogue aux peptides, ces systèmes hybrides requièrent généralement des étapes de lavage pour éliminer l'excès de fluorophores. Néanmoins, une nouvelle famille de systèmes chimiogénétiques hybrides permettant le marquage de protéines cibles avec une activation de fluorescence localisée ne nécessitant aucun lavage a été développée et sera introduite dans la suite de ce chapitre (partie **III**).

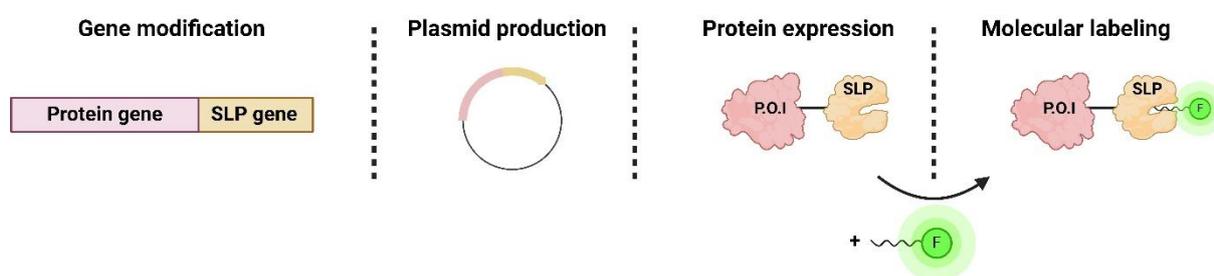


Figure 7. Utilisation des protéines/enzymes génétiquement encodées pour visualiser une protéine d'intérêt.

Adapté de Saimi et al.^[44]

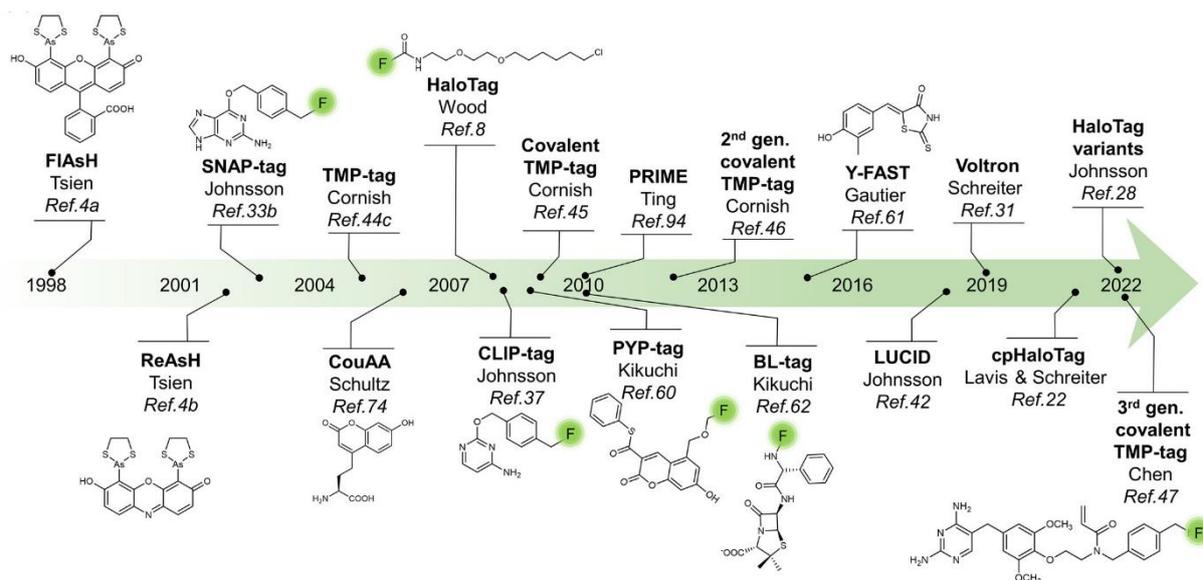


Figure 8. Chronologie des différents peptides et protéines de marquage développés.

Adapté de Saimi et al.^[44]

- Les **acides aminés non-naturels** (UAAs): Cette stratégie est la plus récente et repose sur l'incorporation d'acides aminés non naturels dans le gène de la protéine cible. En tenant compte des tailles relatives des marqueurs évoqués précédemment, il s'agit ici de la famille des plus petits marqueurs génétiquement encodés capables de se lier à un fluorophore organique (Figure 9).^[51] La stratégie de modification génétique consiste à substituer des acides aminés du gène de la protéine cible par des UAA par le biais d'une paire d'acides aminées amino-acyl-ARNt synthétases (aaRS) et acide ribonucléique de transfert (ARNt), orthogonaux.^[52–54] Les avancées dans les réactions de chimie bioorthogonale telles que la chimie Click, ont renforcé l'attractivité de cette famille de petits marqueurs qui bénéficie désormais de la versatilité de la chimie et d'un marquage rapide en 2 étapes.^[55] Une alternative à cette stratégie repose sur l'incorporation directe d'acides aminés intrinsèquement fluorescents comme par exemple le CouAA, acide aminé dérivé de la coumarine.^[56] Cependant, l'incorporation de ces UAAs dans les cellules mammifères reste encore difficile et requiert une connaissance exacte du site de liaison et du ligand pour assurer la spécificité du marquage.

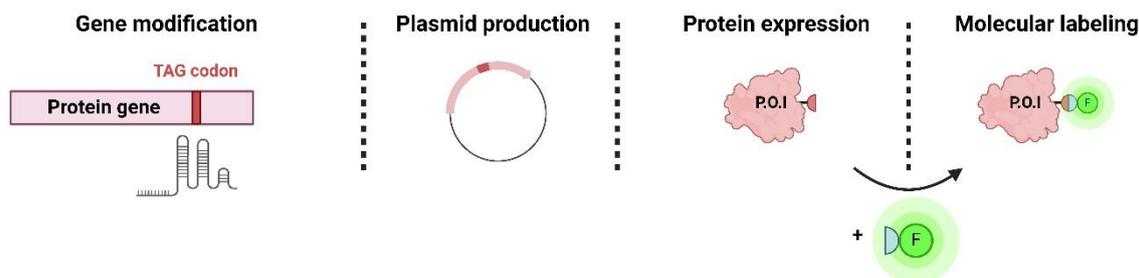


Figure 9. Incorporation d'acide aminé pour le suivi d'une protéine d'intérêt.

Adapté de Saimi et al.^[44]

Ces grandes familles de marqueurs fluorescents génétiquement encodés présentent donc chacune des caractéristiques propres et des limitations qui sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Table 2).

Table 2. Comparaison des différents marqueurs fluorescents pour l'imagerie de protéines en cellules.

Marqueur fluorescent	Avantages	Limitations
Protéines fluorescentes	Biocompatibilité ++	Taille importante/gène stérique Faible versatilité Brillance et photostabilité modérées
Marqueur peptidique	Petite taille (perturbation minimale des fonctions de la P.O.I.)	Choix limité de fluorophores organiques Nécessité de retirer l'excès de fluorophores
Marqueur protéique	Marquage covalent ou non covalent Accès à une grande variété de fluorophores organiques	Taille importante/gène stérique Nécessité de retirer l'excès de fluorophores
UAA	Très petite taille (perturbation minimale des fonctions de la P.O.I.)	Faible rendement d'incorporation de UAA dans le gène de la P.O.I. Coexpression nécessaire de tARN et aaRS en présence de UAA

I.2. Conditions optimales pour l'imagerie de fluorescence en cellules

Pour résumer, les points essentiels à considérer pour réaliser de l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes dans le but de comprendre des processus cellulaires associés à une protéine d'intérêt peuvent être divisés en deux catégories:

- Le **marqueur fluorescent**: Il faut sélectionner une sonde fluorescente adaptée à l'application spécifique et aux caractéristiques de la cellule à étudier. En particulier, il est important de considérer des facteurs clés tels que la photostabilité, la phototoxicité, la biocompatibilité cellulaire et la brillance des marqueurs fluorescents. De plus, dans le cas d'un processus dynamique, le marqueur fluorescent doit présenter une bonne sensibilité et un temps de réponse rapide pour assurer la détection de l'événement en temps réel.
- **Microscope**: Il faut utiliser des longueurs d'onde d'excitation et d'émission appropriées pour la sonde fluorescente choisie afin de minimiser l'auto-fluorescence, augmenter le rapport signal/bruit et le contraste de l'image. De plus, la résolution spatio-temporelle de l'acquisition peut être améliorée par l'utilisation de la microscopie confocale ou microscopie TIRF. La phototoxicité peut être réduite en minimisant l'exposition des cellules à la lumière excitatrice, en choisissant des intensités lumineuses faibles et en limitant le nombre d'images acquises si possible.

En combinant ces différentes conditions et en ajustant les paramètres expérimentaux en fonction des besoins spécifiques de l'expérience, il est possible d'obtenir des images de fluorescence de haute qualité en cellules vivantes, permettant ainsi une analyse précise des processus biologiques à l'échelle subcellulaire.

II. Les protéines fluorescentes

Cette partie porte sur les protéines fluorescentes comme marqueurs fluorescents génétiquement encodés pour le suivi d'une protéine d'intérêt par microscopie à fluorescence en cellules vivantes. En particulier, il s'agit de montrer l'évolution des protéines fluorescentes, de leurs propriétés et de leur intérêt dans la quête de l'exploration cellulaire.

II.1. La Green Fluorescent Protein (GFP)

II.1.1. Propriétés de structure de la GFP

Découverte en 1962, la *AvGFP* a été isolée à partir de la méduse *Aequora Victoria* (*Av*).^[57] Ce n'est que plus tard en 1994 que cette protéine fluorescente a commencé à révolutionner le domaine de l'imagerie cellulaire grâce aux travaux du groupe de Tsien ayant permis son utilisation en tant que marqueur fluorescent génétiquement encodé.^[58] Les études cristallographiques réalisées par le groupe de Yang en 1996 ont permis de connaître la structure de *AvGFP*.^[59] Il s'agit d'un dimère ($K_D \sim 100 \mu M$) dont chaque monomère est formé d'un feuillet β composé de 11 brins anti-parallèle et d'une hélice α qui possède un chromophore en son centre (Figure 10). Ce chromophore est ainsi conservé dans un environnement rigide le protégeant des interactions avec le solvant et favorisant son émission de fluorescence. Les terminaisons N- et C- forment toutes deux des régions souples/désordonnées dans le solvant, offrant ainsi la possibilité de fusionner des gènes de protéines cibles à ces deux positions (Figure 11).

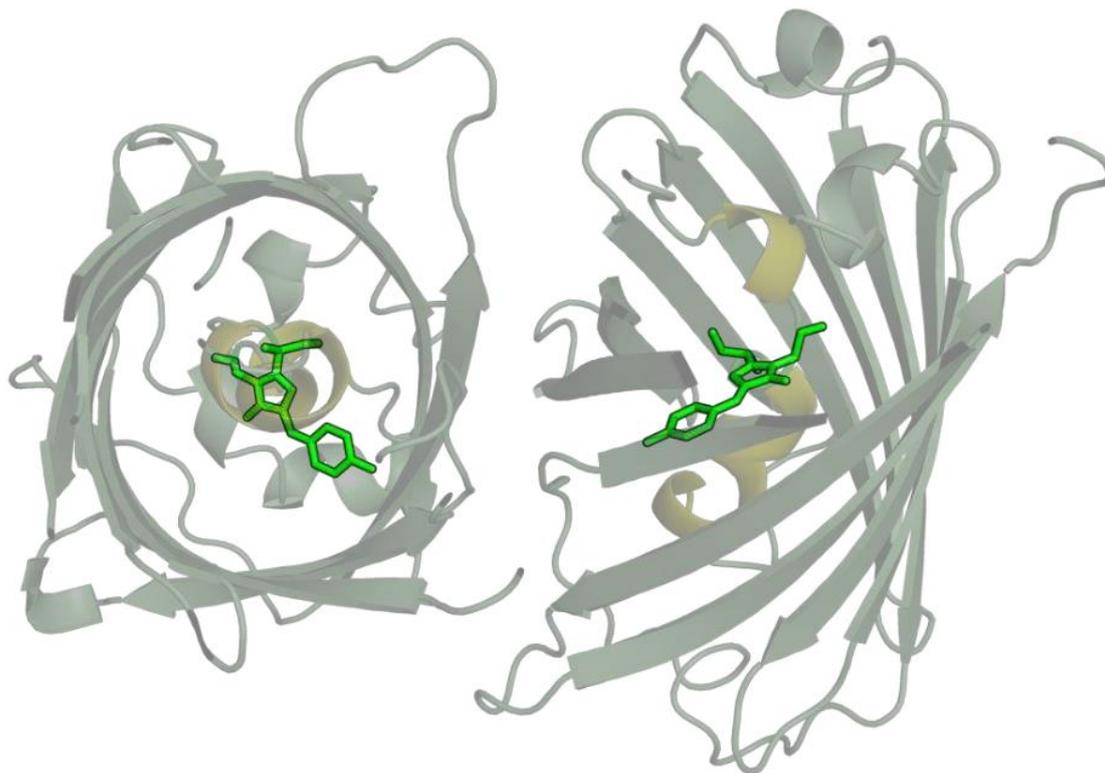


Figure 10. Structure cristallographique du dimère de la AvGFP.

Le chromophore (*vert*) est situé au centre de l'hélice alpha (*jaune*). Adapté de Yang et *al.*^[59]

Le chromophore de la AvGFP est composé d'un groupement phénol conjugué à un cycle imidazolinone. Celui-ci est formé par une étape de cyclisation entre les 3 acides aminés Ser65-Tyr66-Gly67 consécutifs présents sur l'hélice α suivie d'une étape de maturation catalysée par O_2 (Figure 11).^[60]

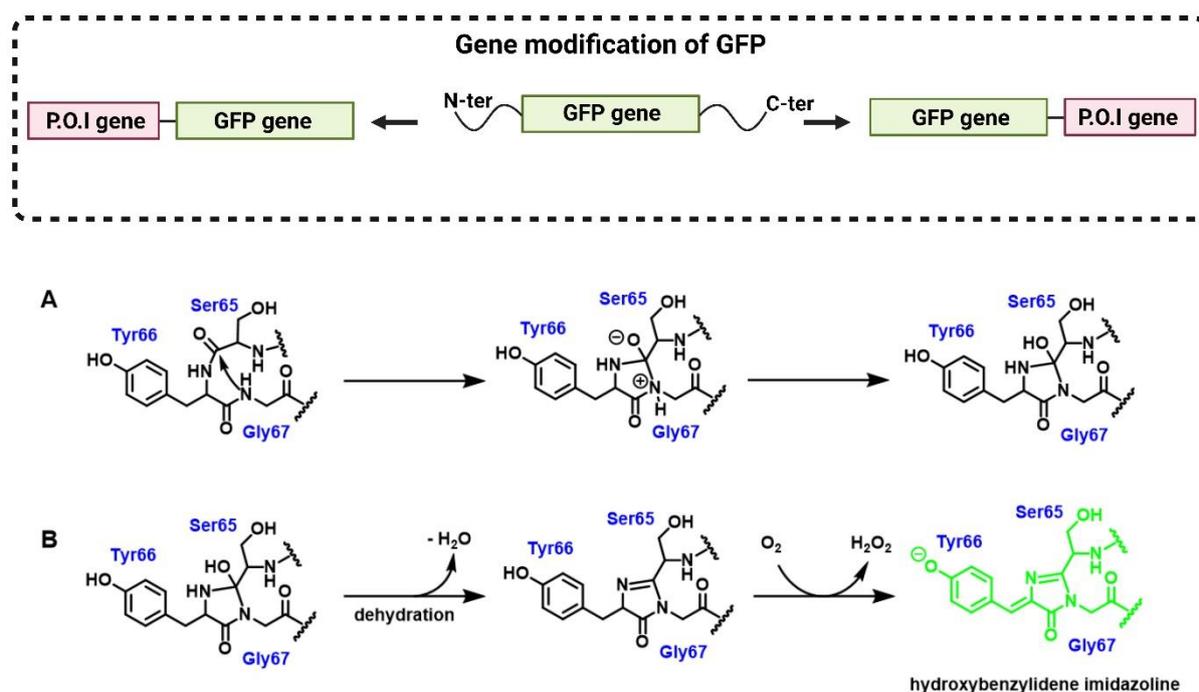


Figure 11. Principe de modification du gène de la GFP pour le marquage d'une protéine d'intérêt et formation du chromophore de la *Au*GFP.

(A) Cyclisation du chromophore par les acides aminés Tyr66/Ser65/Gly67 au sein de *Au*GFP et (B) Maturation du chromophore catalysée par O₂.

II.1.2. Caractéristiques photophysiques de la GFP

Le spectre d'excitation de la protéine *Au*GFP comporte une bande majeure à 395 nm et une bande mineure à 470 nm pouvant être attribuées respectivement à l'état protoné et l'état déprotoné du chromophore (Figure 12).^[60] L'absorption d'un photon dans l'une de ces deux bandes génère de la fluorescence verte avec un maximum d'émission autour de 510 nm (Figure 12). Cette observation se traduit par le fait que lorsque la protéine *Au*GFP est photoexcitée à 395 nm, le phénol du chromophore devient extrêmement acide (état non fluorescent) et transfère son proton vers l'acide aminé Glu222 *via* un réseau de liaisons hydrogène créant alors un état déprotoné du chromophore (état fluorescent). Ce mécanisme est appelé transfert de proton à l'état excité (ESPT).^[61] Après le retour à l'état fondamental, le proton retourne sur le chromophore et inhibe la fluorescence de *Au*GFP.

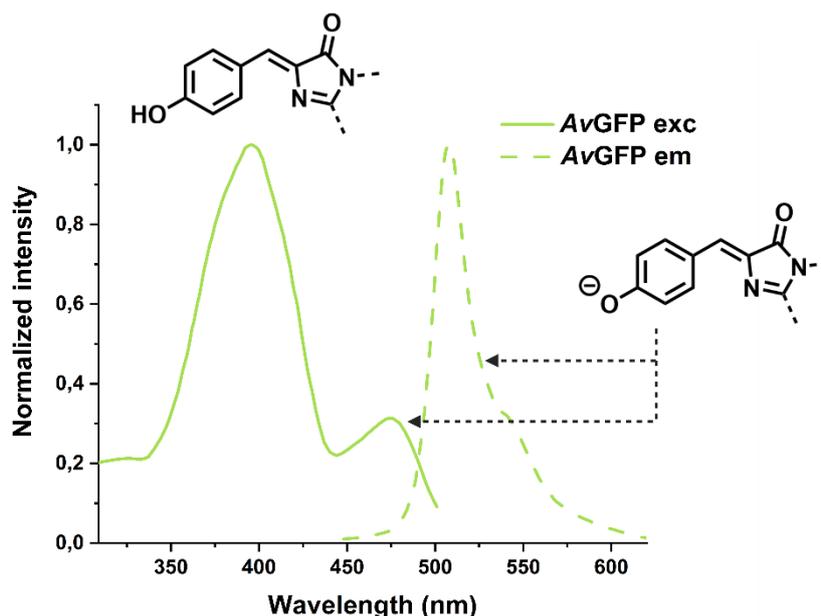


Figure 12. Spectre d'absorption et d'émission de la protéine AvGFP.

Adapté de Tsien. [60]

Le chromophore de la protéine AvGFP possède donc deux états, un état non fluorescent correspondant à la forme protonée du phénol et un état fluorescent correspondant à la forme déprotonée du phénol. Ces deux états sont donc équivalents à un couple acide/base caractérisé par une valeur de pK_a . La valeur du pK_a qui a été mesurée pour le chromophore de la protéine AvGFP est de 4,5.[60] Par conséquent, sur la gamme de pH physiologique, l'émission de fluorescence de la protéine AvGFP ne varie pas en fonction du pH ce qui en fait un marqueur fluorescent adapté pour la localisation subcellulaire de protéines d'intérêt. Toutefois, le chromophore de la protéine AvGFP est soumis à des processus de photoblanchiment irréversible intervenant après une certaine durée d'irradiation relatif à sa photostabilité, ce qui altère la capacité de faire de l'imagerie en temps réel.

Les mesures photophysiques réalisées sur la protéine AvGFP ont permis de déterminer des valeurs de $\epsilon = 25\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le coefficient d'extinction molaire, $\Phi_F = 0,79$ pour le rendement quantique et une brillance de $19\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La brillance de la protéine AvGFP est ainsi nettement inférieure à celle mesurée pour des fluorophores organiques comme les fluorescéines ou les cyanines (partie I.1.1.).

La protéine fluorescente verte *AuGFP* a révolutionné l'exploration cellulaire par ses propriétés structurales et photophysiques en permettant par exemple de suivre la régulation de l'expression des gènes et la localisation des protéines dans l'organisme.^[58] Toutefois, cette protéine présente certaines limites dont sa faible brillance et photostabilité.

II.2. Ingénierie de variants de la GFP

La qualité de l'imagerie cellulaire repose en partie sur l'utilisation de marqueurs fluorescents brillants et photostables (partie **I.2.**). Le groupe de Tsien a développé une multitude de nouvelles protéines fluorescentes dérivées de la protéine *AuGFP* via des travaux de mutagenèse dirigée afin d'obtenir une palette de couleurs avec des brillances et des longueurs d'ondes d'émissions différentes représentant aujourd'hui une boîte à outils considérable pour l'imagerie cellulaire. Le premier variant de la protéine *AuGFP* produit a été la protéine « enhanced Green Fluorescent Protein » (eGFP) possédant une seule bande d'absorption à 488 nm et une bande d'émission autour de 510 nm (Figure 13). Cette protéine a été obtenue à partir des deux mutations **F64L** et **S65T** sur la protéine native *AuGFP* et présente ainsi une meilleure photostabilité et une plus forte brillance ($33\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) très intéressantes pour l'imagerie cellulaire.^[62,63] En revanche, en raison de son pKa à 6,0, la protéine eGFP n'est plus fluorescente dans des environnements acides qui sont habituellement présents dans certains organelles de la cellule comme les vésicules, ce qui réduit le champ d'utilisation de cette protéine pour l'imagerie cellulaire.

Suite à ce premier variant, le groupe de Tsien a généré 4 autres variants « enhanced » de couleurs différentes: eBFP (*bleu*), eCFP (*bleu cyan*) et eYFP (*jaune*) (Figure 14).^[64,65] Cette approche a ouvert la voie à la création d'une multitude de protéines fluorescentes obtenues à partir d'autres organismes marins appartenant à la famille des coraux. Pour répondre au besoin de marqueurs fluorescents ayant d'autres longueur d'onde d'émission permettant de visualiser plusieurs protéines d'intérêt en même temps, la protéine fluorescente rouge *DsRed* a été obtenue à partir du corail *Discosoma s.* ($\lambda_{em} = 583\text{ nm}$). *DsRed* est un tétramère dont chaque monomère a une structure similaire à la GFP.^[66] Par la suite, le groupe de Tsien a élargi ce domaine

spectral d'émission vers le rouge lointain en créant la famille « mFruits » par le biais de mutations de *DsRed* (Figure 14).^[67]

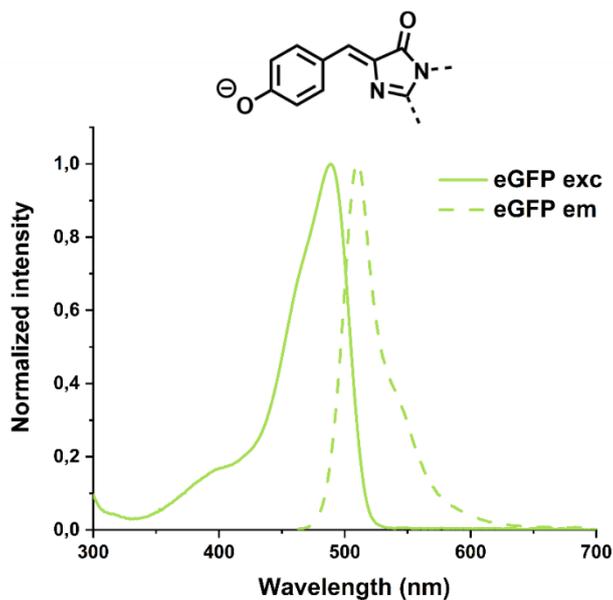


Figure 13. Spectres d'excitation et d'émission de la eGFP.

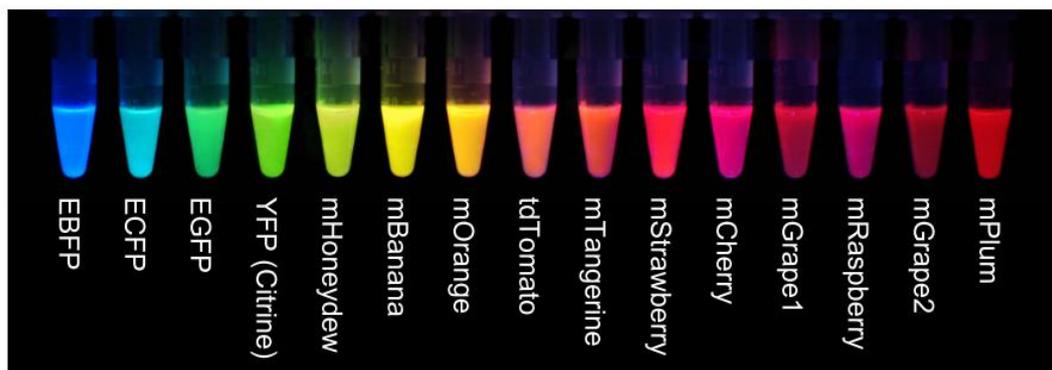


Figure 14. Palette de couleurs des protéines fluorescentes obtenues à partir de clonages.

Adapté de Zimmer.^[68]

Actuellement, une centaine de protéines fluorescentes dérivées soit de la protéine *AuGFP* soit de la protéine *DsRed* sont disponibles donnant accès à une grande variété de protéines fluorescentes avec des propriétés photophysiques distinctes (Table 3).

Table 3. Propriétés photophysiques de quelques protéines fluorescentes.

Les valeurs sont issues de la base de données <https://www.fpbases.org/>.

Protéine	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F	Brillance	pK _a
AuGFP	395/475	509	0.79	19 800	4.5
eGFP	488	507	0.60	33 500	6.0
eCFP	435	474	0.30	9 000	4.7
eYFP	513	527	0.67	44 900	6.9
mOrange	549	565	0.60	34 800	6.5
DsRed	558	583	0.68	49 300	4.7
mStrawberry	574	596	0.29	26 100	4.5
mCherry	587	610	0.22	15 800	4.5
mPlum	590	649	0.10	4 100	4.5

L'utilisation de ces protéines fluorescentes en tant que marqueurs génétiquement encodés a notamment permis de répondre à des questions biologiques essentielles comme la localisation, l'identification et la régulation des vésicules synaptiques glutamatergiques avec la protéine vésiculaire VGLUT1 fusionnée avec la protéine fluorescente Venus.^[69]

La conversion des protéines fluorescentes en biosenseurs c'est-à-dire dont la fluorescence dépend de l'environnement ou de l'interaction avec d'autres protéines a permis d'étudier les protéines dans des contextes cellulaires spécifiques comme l'endocytose et l'exocytose, l'activation de récepteurs et de voie de signalisation, ou l'augmentation de calcium au niveau subcellulaire.^[70]

II.3. Biosenseurs basés sur les protéines fluorescentes

Les biosenseurs basés sur les protéines fluorescentes présentent une activation de leur fluorescence lors de la détection d'un analyte ou d'une autre protéine.^[70,71] Les contraintes de développement de ces marqueurs sont plus nombreuses car il faut obtenir à la fois un temps de réponse rapide et une liaison spécifique à un analyte combinés aux contraintes de brillance et de photostabilité pour l'imagerie cellulaire.

La diversification des biosenseurs basés sur des protéines fluorescentes est en constante expansion (présentée dans les revues récentes de Wang^[72], de Kim^[70] ou de Nasu^[73]). Je présenterai ici succinctement les 2 grandes catégories de biosenseurs basés sur les protéines fluorescentes impliqués dans la détection d'analytes: celle des biosenseurs faisant intervenir deux protéines fluorescentes et celle des biosenseurs simples avec une seule protéine fluorescente.

La grande majorité de ces biosenseurs fluorescents sont construits à partir d'un couple de protéines fluorescentes et utilise le phénomène de « Fluorescence Resonance Energy Transfer » (FRET), décrit dans la partie **III** de ce chapitre. Ces biosenseurs sont composés d'une protéine de fusion comportant un domaine de détection situé entre deux protéines fluorescentes qui répondent aux critères du FRET. Le domaine de détection est spécifique et la reconnaissance de l'analyte par le biosenseur doit induire une variation de l'émission de fluorescence émise (ON/OFF ou changement de couleur par ratiométrie) (Figure 15B).^[74] Il existe actuellement une variété de biosenseurs fluorescents basés sur des protéines fluorescentes avec des sensibilité à divers analytes comme H⁺, Ca²⁺, NO ou l'ATP. On retrouve par exemple la classe de biosenseurs nommés « cameleon » qui sont des sondes calciques basées sur du FRET entre deux protéines fluorescentes.^[74,75]

D'autres familles de biosenseurs sont composées d'une unique protéine fluorescente contenant un domaine de détection (biosenseurs simples) dont l'intensité de fluorescence varie avec la détection d'un analyte.^[73] Les exemples classiques de ce type de biosenseurs sont les variants qui utilisent la sensibilité au pH de la protéine AvGFP pour former des sondes pH, c'est le cas des variants appelés « pHluorin ». ^[76] On retrouve également des biosenseurs simples qui requièrent une étape de modification génétique pour former un domaine de détection au sein de la séquence de la protéine fluorescente afin de générer un changement de conformation de la protéine fluorescente en présence d'un analyte. C'est le cas notamment de la famille de senseurs calciques dérivés de la protéine verte eGFP (Figure 15A).^[77] La protéine fluorescente eGFP permutée circulairement est fusionnée avec un domaine qui sera sensible au calcium et la détection de ce dernier par la protéine cpEGFP entraîne un changement de conformation permettant d'obtenir une émission de fluorescence suite à une photoexcitation.

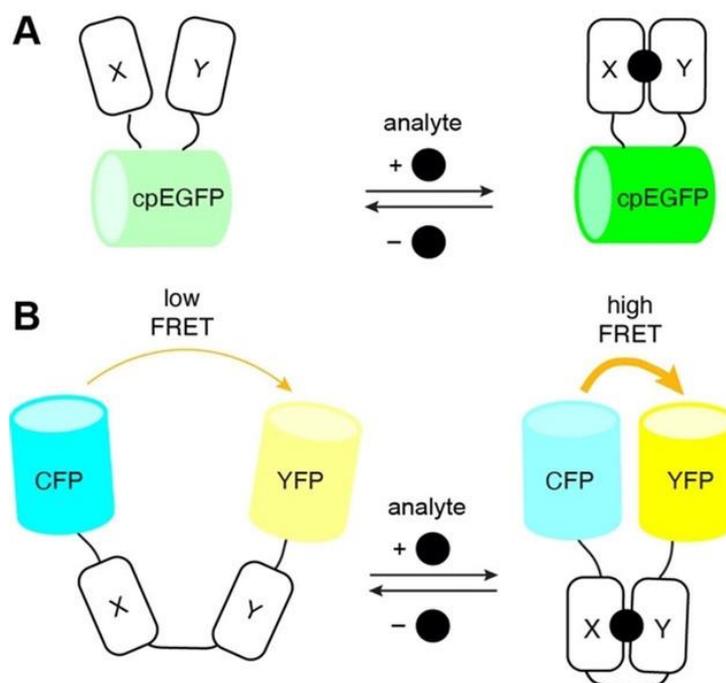


Figure 15. Différents mécanismes de détection par des biosenseurs basés sur des protéines fluorescentes.

(A) Structure générale de biosenseurs basés sur une seule protéine fluorescente (cpEGFP = eGFP permutée circulairement). (B) Structure générale de biosenseurs basés sur du FRET entre deux protéines fluorescentes (ici CFP: protéine fluorescente cyan et YFP: protéine fluorescente jaune). Adapté de Broch et *al.*^[78]

Pour conclure, les protéines fluorescentes sont des marqueurs fluorescents génétiquement encodés qui ont révolutionné notre compréhension du trafic de protéines au sein de la cellule et qui ont permis d'étudier l'activité de structures subcellulaires.

II.4. Limites des protéines fluorescentes pour l'imagerie cellulaire

L'étude de protéines fluorescentes pour l'imagerie cellulaire présente plusieurs limitations. Tout d'abord, la formation d'une protéine de fusion entre une protéine fluorescente avec une protéine d'intérêt peut engendrer des modifications stériques de la protéine d'intérêt et par conséquent perturber sa fonction. La taille des protéines fluorescentes est importante et peut modifier la structure de la protéine. De plus, les protéines de fusion sont le plus souvent surexprimées pour permettre leur détection

en imagerie. Cette surexpression ectopique peut entraîner des modifications dans la localisation de la protéine mais aussi modifier la physiologie de la cellule. Les protéines fluorescentes peuvent également former des agrégats notamment pour les tétramères ce qui peut provoquer une accumulation de la protéine dans des endo-lysosomes (voies de dégradation) ou encore engendrer une cytotoxicité pour les cellules.^[79]

Les protéines fluorescentes présentent des brillances souvent faibles notamment pour les protéines fluorescentes émettant dans le rouge ce qui limite la résolution des acquisitions en imagerie (faible rapport signal/bruit). Enfin, contrairement aux sondes chimiques, les protéines fluorescentes ont des spectres de fluorescence spécifiques et peu modulables ce qui limite leur utilisation simultanée dans le cadre d'une imagerie multi-couleurs.

Par conséquent, des systèmes hybrides ont été développés pour contourner ces limitations et permettre de bénéficier de la sélectivité de l'encodage génétique associée à la grande versatilité des fluorophores organiques, qui présentent généralement des brillances et une photostabilité plus élevées. La prochaine partie est une revue qui présente ces systèmes hybrides dits « chimiogénétiques » dans le cadre particulier de leur utilisation en tant que senseurs.

III. “Locally-activated chemogenetic biosensors for bioimaging”: a minireview

Justine Coïs^{1,2} and Blaise Dumat^{*,1}

¹ Laboratoire des biomolécules, LBM, Département de chimie, École normale supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.

² Laboratoire Neurosciences Paris Seine, Sorbonne Université, CNRS, INSERM, 75005 Paris, France.

*e-mail: blaise.dumat@ens.psl.eu

Abstract

Biosensors based on fluorescent proteins are widely used as genetically encoded indicators due to their capacity to target various biological analytes (metal ions, reactive oxygen species, biomolecule etc.) within cells with precise spatiotemporal resolution. However, their complex development associated to the lack of photophysical versatility constrains the scope of their application in biosensing. Alternatively, semisynthetic fluorescent biosensors that combine a small chemical indicator with a self-labeling protein (SLP) tag benefit from the versatility of molecular engineering and from the selectivity of the genetic encoding of recombinant protein. The photophysical properties variations of the chemical indicator upon analyte recognition provide high sensitivity, excellent selectivity and rapid response time making them attractive alternative for biosensing. Fluorogenic semisynthetic biosensors that are fluorescent only upon local activation by reaction with a SLP-tag provide an additional level of selectivity, allowing wash-free imaging experiments. This minireview focuses on this latter class of biosensors and gives an outlook of the different small molecular probe design strategies and self-labeling protein tag combination for their construction. We expect to bring new clues and ideas to researchers for further advances in this field.

Keywords: Semisynthetic biosensors; Fluorogenic probes; Rhodamines; fluorescent molecular rotors; fluorescence imaging

III.1. Introduction

III.1.1. Definitions

This review will refer to several types of fluorescent probes and sensors. To avoid any confusion, we would like to define a few terms that can sometimes be found in articles with different meanings. A fluorescent **chemosensor** refers to a molecule for sensing ions or other chemical species with a change of their fluorescent properties (*e.g.* intensity, wavelength, lifetime).^[80] **Fluorogenic probes** or **fluorogens** are small molecular fluorophores that bind biomolecules (herein proteins) with an increase of their fluorescence.^[81] **Biosensors** refer to fluorescent proteins-based sensors of biological activity. **Semisynthetic** probes or biosensors are fluorescent reporters based on the combination of a small molecular fluorescent probe and a genetically-encoded non fluorescent protein; they are also sometimes called **chemogenetic**^[78] or **chemigenetic** sensors.^[82]

III.1.2. Fluorescent sensors for bioimaging

Genetically encoded fluorescent proteins (FPs) have revolutionized bioimaging in living systems by providing unparalleled selectivity with cell or organelle-specific expression.^[83] Significant efforts have also been put into engineering FPs to develop biosensors with diverse photophysical properties and target analytes using evolved recognition motifs.^[72,84] However, the development and optimization of FP-based biosensors is complex especially for long-wavelength ones and numerous biological substances remain challenging or even impossible to detect using protein-based recognition motifs. Alternatively, fluorescent chemosensors based on organic fluorophores benefit from a long research history and offer virtually endless versatility thanks to the power of modern synthetic organic chemistry and well-identified sensing mechanisms and recognition groups (Figure 16A).^[85,86] However, the precise control of the intracellular localization of chemosensors in cells to visualize biological processes with high spatial selectivity remains an issue and explains the success of FPs and biosensors. Small organic molecules will usually accumulate in a given organelle or cellular compartment depending on their charge and lipophilicity (*e.g.* cationic rhodamines in mitochondria) but it is hard to predict and modulate. Chemical

targeting strategies have been put in place with functional groups that can direct chemosensors towards specific cellular locations, but again these strategies are not completely general and can fail due to the competition with the spontaneous localization of the parent molecule.^[87,88] Recently, hybrid chemical and genetic systems have emerged as an alternative that combines the best of both approaches. They are based on the targeting of small chemical compounds towards genetically-encoded proteins called self-labeling protein (SLP) tags and benefit from both the targeting selectivity of genetically-encoded proteins and from the diversity and versatility of chemical probes and chemosensors (Figure 16B). Efforts in the development of SLP-tags has led to two categories of covalent (SNAP-tag,^[89] HaloTag,^[50] CLIP-tag,^[90] PYP-tag,^[91] BL-tag^[92] and TMP-tag^[93]) and non-covalent (FAP^[94] and FAST^[48]) binding systems. Different semisynthetic biosensors for the genetically-targeted sensing of Zn^{2+} ,^[95-98] Ca^{2+} ,^[99-101] K^+ ,^[102] pH,^[103,104] nitric oxide,^[105,106] viscosity,^[107] membrane tension^[108] or voltage^[109] have been obtained by conjugating chemosensors to a SLP-tag ligand. In all these examples however, the chemosensor will be sensitive to its analyte or process whether or not it is linked to its target protein, which requires extensive washing steps to remove the excess of unbound molecules and ensure the selectivity of the signal (Figure 16B).

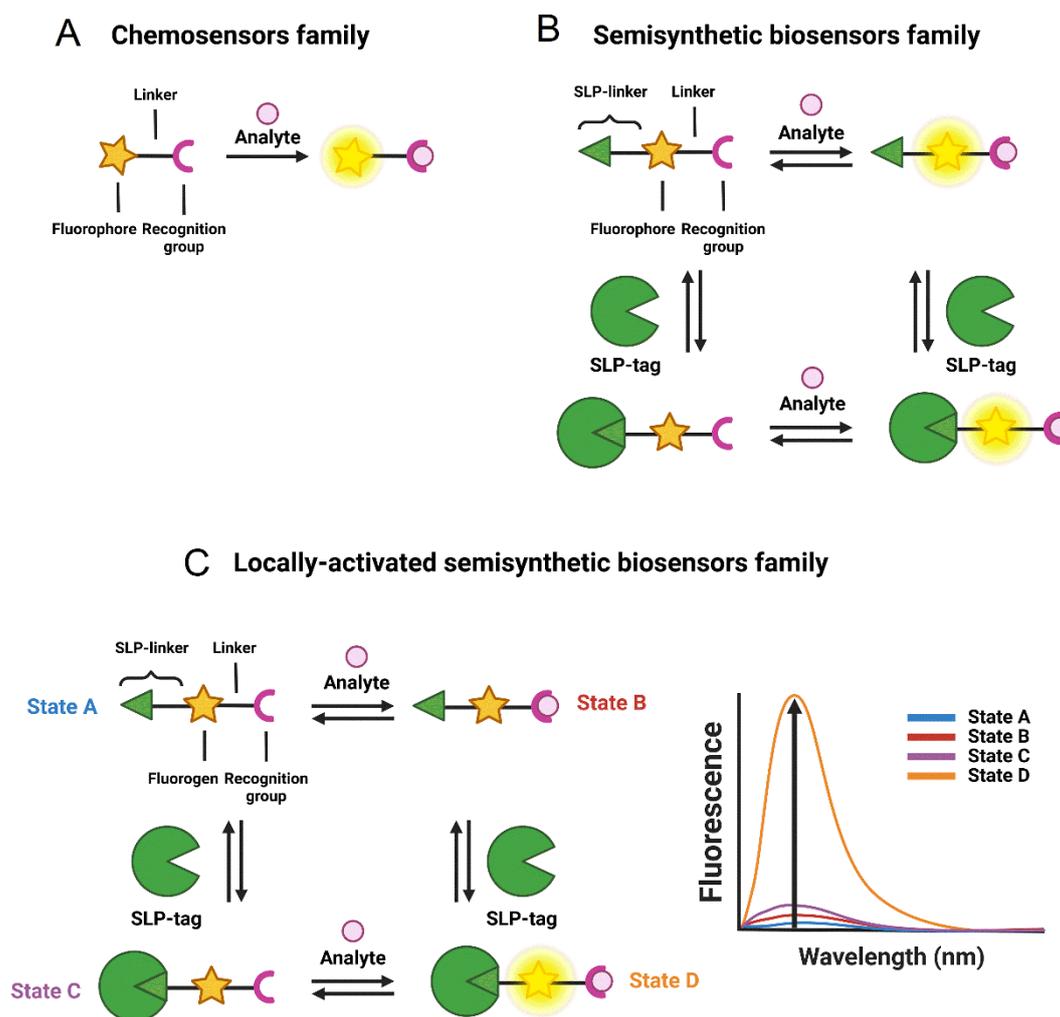


Figure 16. General principle of the different classes of sensors for bioimaging. (A) Chemosensors, (B) Semisynthetic biosensors and (C) Locally-activated semisynthetic biosensors.

To provide an alternative to FP-based biosensors with comparable selectivity, semisynthetic biosensors should be built on fluorogenic probes that only become fluorescent when they are bound to the target protein (Figure 16C). To achieve such fluorogenic semisynthetic sensors, two strategies have been used. The first one consists in using fluorogenic probes targeted towards modified SLP-tags that incorporate a sensing moiety.^[82,110,111] In that case, the detection is performed by the protein tag, in the same fashion as in FP-based biosensors and it does not avoid some drawbacks associated with them, such as complex protein evolution to ensure efficient detection and slower detection kinetics for fast biological processes such as calcium oscillations compared to synthetic chemosensors.^[112] This approach has been recently reviewed by Broch *et al.*^[78] This minireview will focus on the few reported examples of the second

strategy that is an all-molecular one and consists in incorporating two fluorescence control mechanisms within a single molecule: the first will ensure the activation of the fluorescence upon binding to the cognate SLP-tag and the second one will enable the detection of the target analyte (Figure 16C). The most commonly encountered SLP-tags are SNAP-tag and HaloTag that enable highly selective and rapid protein labeling (Figure 17). HaloTag in particular has established itself as the most promising technology with a chemically simple linker that facilitates the synthesis of the conjugates as well as their cell penetration and a very fast reaction rate. For a detailed review of HaloTag applications in bioimaging, the readers are referred to a recent review by Cook *et al.*^[113]

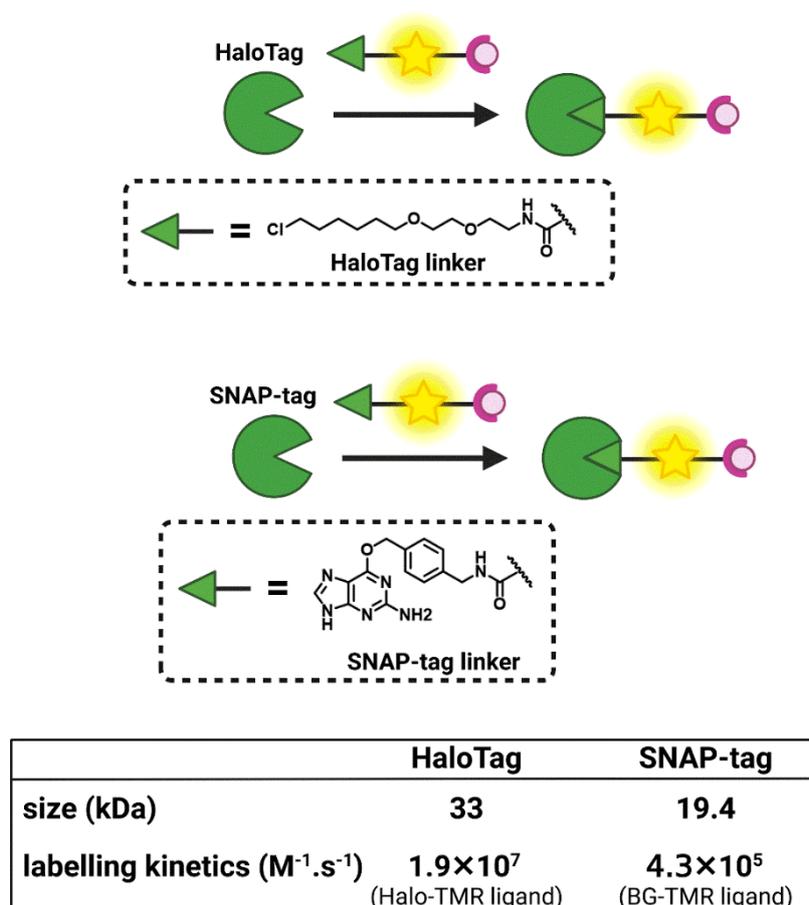


Figure 17. Comparison of HaloTag and SNAP-tag strategies for subcellular bioimaging.

In practice, these locally-activatable semisynthetic sensors that we also refer to as dual-input probes due to the dual control of the fluorescence, are based on the incorporation of an analyte-sensing group on a fluorogenic protein probe sometimes called fluorogen. This approach has the advantage of using well-established SLP-tags and is based on small molecule engineering. The different fluorogenic chemosensors will be classified depending on the type of fluorogens on which they are built rather than on the target analytes, considering that the sensing strategies are relatively well-known and that the originality of these research works lies in the efficient combination of the two fluorescence control mechanisms within the same molecule. The common theme of the works covered by this minireview is thus the local-activation of fluorescent chemosensors by genetically-encoded proteins. It encompasses diverse structures with different target analytes and includes some articles where the local activation was not necessarily underlined, especially for early works. We thus aim to show the common character of all these molecules and identify some guidelines for the design of future fluorogenic semisynthetic biosensors. In doing so we will also remind some generalities on the design of fluorescent chemosensors and fluorogenic probes.

III.1.3. Analyte detection mechanisms

To develop dual-input probes for genetically targeted analyte sensing, the protein fluorogen targeting specific SLP-tag must be combined with an analyte sensing mechanism. As previously stated, the field of chemosensors benefits from a very large body of work, with numerous well-identified analyte receptors (*e.g.* ion chelators, pH or ROS-sensitive groups) that can be coupled to a fluorophore to control its fluorescence with different photophysical mechanisms.^[86,114–117] The mechanisms that have been implemented in the design of locally-activated semisynthetic sensors are the three most commonly encountered: Photo-induced Electron Transfer (PeT), Intramolecular Charge Transfer (ICT) and Förster Resonance Energy Transfer (FRET) (Figure 18). Chemosensors based on PeT or ICT are composed of three distinct parts : a receptor for analyte detection, a fluorophore and a linker to couple them. Depending on the nature of this linker, the chemosensors will operate via PeT or ICT.^[118] If the linker is not conjugated, the receptor and fluorophore can essentially be considered as electronically independent and the receptor can transfer an electron to the excited state

fluorophore thus effectively quenching the fluorophore. Upon analyte binding, the energy of the electron donor (*i.e.* the analyte receptor) is lowered, thus inhibiting the PeT process and restoring the fluorescence (Figure 18A). Although the opposite is possible, reductive PeT is the most commonly found in the literature.^[119] A variety of fluorescent chemosensors based on PeT have been developed for targeting a variety of biological analytes.^[120,121] The difficulty in the PeT sensors design lies in the necessity to have properly positioned orbital energy levels to enable the electron transfer. The probability of PeT between an electron donor and acceptor is governed by the Rehm-Weller equation.^[119,122,123] If the receptor and fluorophore are electronically-conjugated, they cannot be considered independent and PeT will be replaced by ICT: upon analyte binding, the change in the electron density of the receptor will cause an intramolecular charge transfer within the molecule that can affect the absorption properties and/or the fluorescence emission and result in a switch-on of the fluorescence or in a bathochromic or hypsochromic shift depending on whether the receptor is the electron donor or the electron acceptor (Figure 18B). ICT is another classical mechanism for the development of chemosensors, with a more complex response than the off/on PeT sensors that can be exploited to develop ratiometric sensors.^[124–127] FRET-based Fluorescent chemosensors rely on two distinct fluorophores, a donor and an acceptor in close proximity (10-100 Å) (Figure 18C).^[117] FRET requires a spectral overlap between the emission of the donor and the absorption of the acceptor and is highly sensitive to the distance between the two. In FP-based FRET sensors, the most usual sensing mechanism is based on a change in the distance between the donor and the acceptor^[84] but, for chemosensors, it is very common that the analyte binding will induce a change in the photophysical properties of the donor or the acceptor, usually via one of the two previous photophysical mechanisms, PeT or ICT (Figure 18C).^[117]

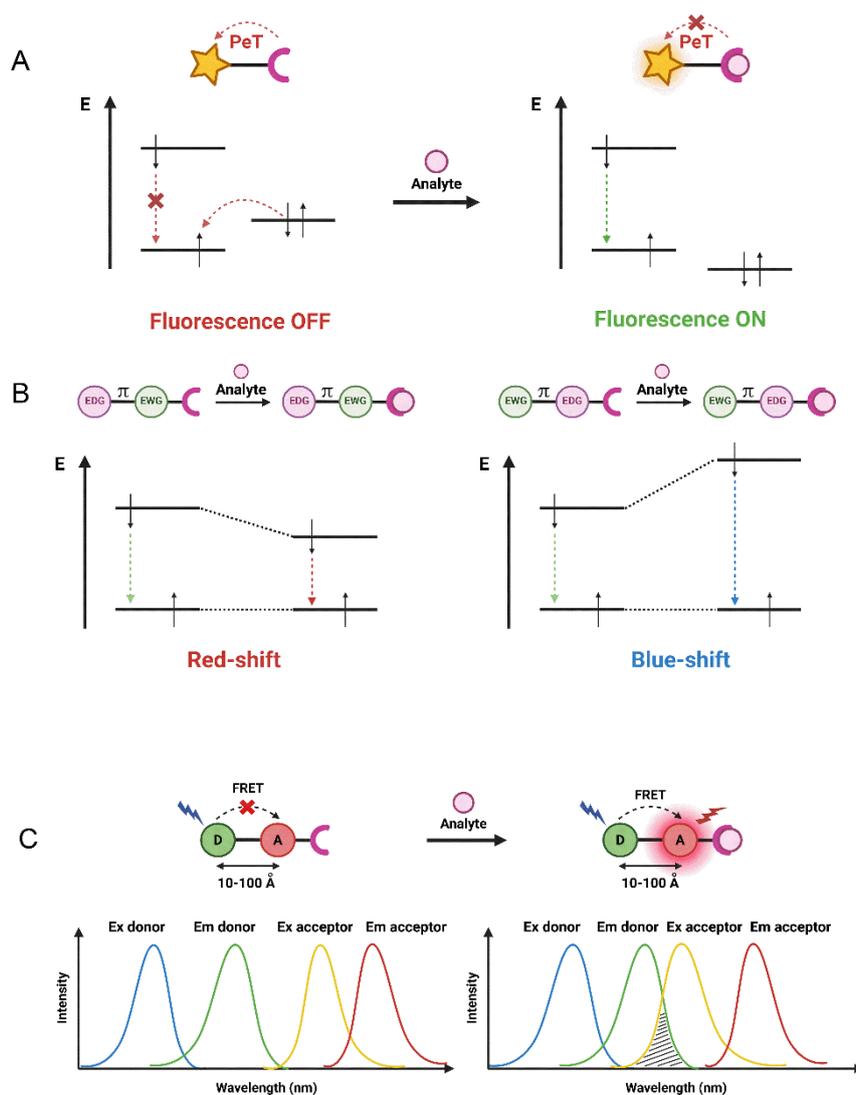
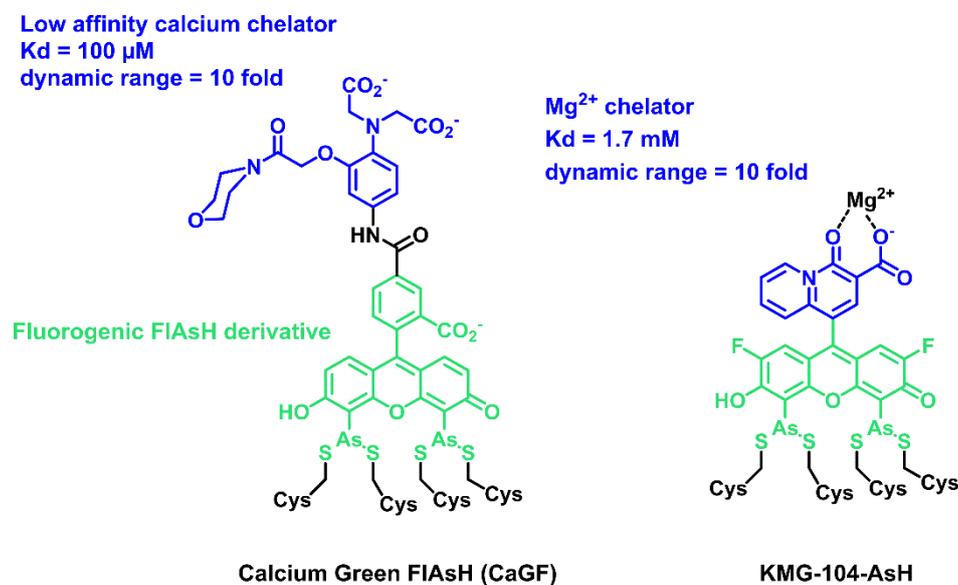


Figure 18. Schematic illustration of the different chemosensors fluorescence mechanisms.

(A) Photoinduced electron transfer PeT, (B) intramolecular charge transfer ICT (EWG = Electron-Withdrawing Group, EDG = Electron-Donating Group separated with a π conjugated linker) and (C) FRET (D: FRET donor, A: FRET acceptor) detection mechanisms used in the design of chemosensors.

III.2. Design of locally-activated semisynthetic biosensors

III.2.1. Early examples based on the biarsenical FAsH/tetracysteine tag system



Scheme 1. Structure of the dual-input calcium and magnesium sensors based on the FAsH fluorogenic probe.

In 2007, the group of Roger Tsien reported on the first example of locally-activated semisynthetic fluorogenic biosensor for Ca²⁺ CaGF (Scheme 1).^[128] It is based on the fluorescein derivative FAsH that reacts selectively in cells with a tetracysteine tag (TCTag) coupled to a BAPTA-derived calcium chelator with a low affinity.^[129] The chelator controls the fluorescence by PeT and the fluorescein becomes fluorescent in the presence of calcium. Although the dual activation properties were not discussed in details in this paper, the reaction of FAsH with the TCTag is intrinsically fluorogenic and so CaGF can be considered as a locally-activated semisynthetic biosensor. It was targeted to the connexin 43 protein in HeLa cells and shown to report on depolarization-evoked calcium waves at gap-junctions. More recently, Fujii et al. reported another example of dual-input sensor for magnesium ions based on FAsH (Scheme 1).^[130] KMG-104-AsH is based on a biarsenical difluorofluorescein for lower pH sensitivity combined with a magnesium chelator selective for Mg²⁺ over Ca²⁺. As for the previous example, this semisynthetic fluorogenic biosensor only becomes

fluorescent when bound to both the TC-tag and Mg^{2+} with more than a 10-fold fluorescence activation due to the fluorogenic binding with the TCTag and PeT quenching of the chelating moiety. It was used to visualize intracellular magnesium by targeting the mitochondria or actin. The TCTag combined with FlAsH was a pioneering approach opening the era of hybrid chemogenetic labeling strategies. It has the advantage of being intrinsically fluorogenic and based on a small non-perturbing peptide tag but it suffers from a poor selectivity due to the competition with other endogenous dithiols. The excess of probes must thus be quenched with 1,2-ethanedithiol to avoid nonspecific signal. Moreover, the TCTag cannot be easily adapted to other fluorophores in order to tune the photophysical properties. Due to these limitations, the TCTag was outperformed by the development of SLP-tags, such as SNAP-tag or HaloTag, that enable rapid and selective labeling of proteins with virtually any organic dyes. However, the reaction of usual fluorophores such as rhodamines and fluoresceins with SLP-tags is not fluorogenic and the development of locally-activated semisynthetic biosensors first required the development adequate fluorogens targeted towards these SLP-tags. Such fluorogens have been developed based mostly on rhodamines and small viscosity-sensitive molecular rotors. In the next parts of the review, we will describe these two classes of fluorogenic probes and how they can be combined with analyte receptors.

III.2.2. Fluorogenic semisynthetic biosensors based on rhodamines

III.2.2.1. Fluorogenic Rhodamines probes

Rhodamines are a class of xanthene-derived dyes with excellent photophysical properties, such as high brightness and good photostability (Figure 19). Rhodamines can undergo a polarity-sensitive equilibrium between a closed nonfluorescent and colorless spirocyclic form and an open fluorescent quinoid red-emitting form. This equilibrium has been exploited to develop chemosensors, but also to fluorogenically target biomolecules.^[131–135] The group of Johnsson pioneered this strategy by developing fluorogenic silarhodamines (SiR) that went from a closed form in water to an open fluorescent form in presence of a biomolecular target.^[136,137] It is assumed that the SiR fluorogens form hydrophobic aggregates in their closed form in water and that upon reaction with a biomolecule they go from a hydrophobic environment to a polar

aqueous medium in which they are open and fluorescent.^[138] By using electron-poor amide and sulfonamide, it has been possible to tune the spirocyclization reaction and adapt it to rhodamine or carborhodamine leading to a palette of bright fluorogenic rhodamine dyes.^[133,139] Given the excellent properties of the rhodamine scaffold, it has become a platform of choice to develop fluorogenic probes for bioimaging. The Lavis group has for instance played on the aniline auxochrome groups to improve the brightness and photostability.^[131,135] Since the HaloTag protein was optimized with the tetramethylrhodamine dye, it proved excellent to react rapidly and activate the fluorescence of fluorogenic rhodamines (HaloTag7 version, $k_2 = 1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for TMR-Halo at 25°C).^[50,140]

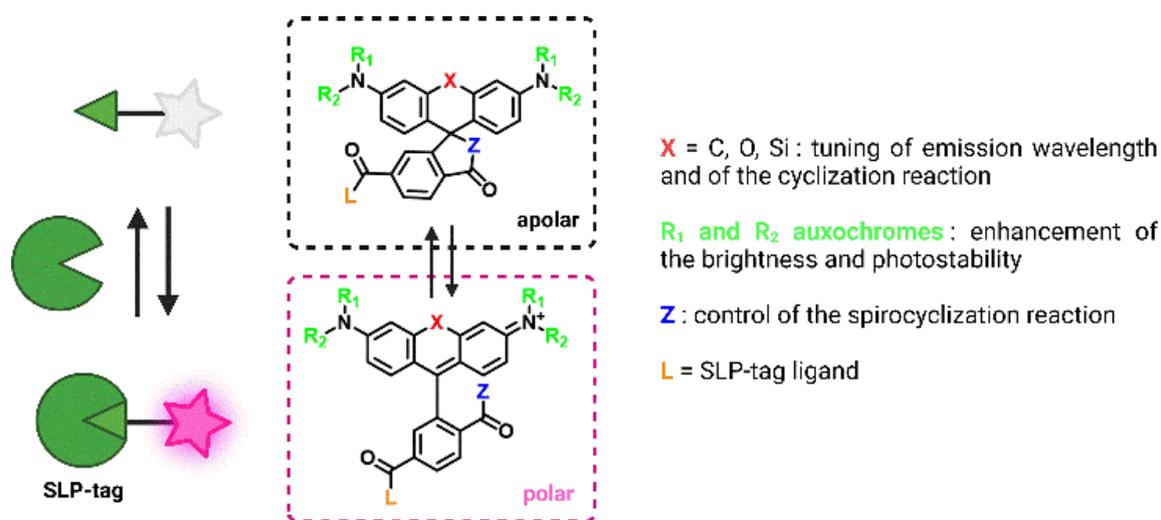


Figure 19. Structure of fluorogenic rhodamine derivatives.

III.2.2.2. Combination of fluorogenic rhodamine with analyte sensing modalities

Fluorogenic rhodamines in combination with HaloTag have been used to develop semisynthetic biosensors. The first attempt was made by the group of Lavis that combined a fluorogenic rhodamine with the calcium chelator BAPTA affording molecule **13** (Figure 20A).^[141] BAPTA was discovered by Roger Tsien and has become the gold standard to build up fluorescent calcium chemosensors, since it has a suitable micromolar affinity and a good selectivity for calcium over magnesium.^[142] As

discussed above, it can control the fluorescence of an associated fluorophore via PeT or ICT depending on the conjugation. In that case it is a PeT process that creates an off/on trigger actuated by calcium. The resulting probe has a good calcium sensitivity but it is poorly fluorogenic upon reaction with HaloTag with only a 2.4-fold increase of fluorescence which does not allow performing wash-free imaging. This first example testifies of the difficulty to combine efficiently several fluorescent control mechanism within the same molecular scaffold.

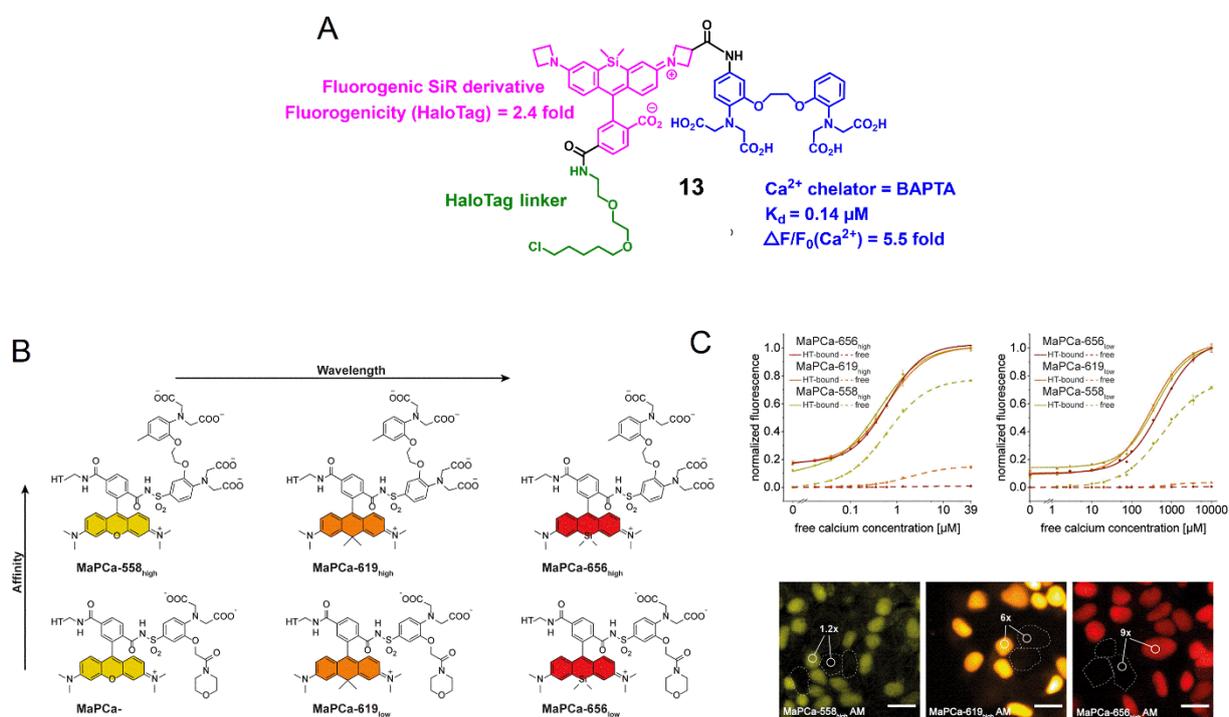


Figure 20. Fluorogenic calcium probes targeted towards HaloTag.

(A) First design of rhodamine-based fluorogenic and chemogenetic Ca²⁺ reported in ref [141]. (B) Structures of the MaPca indicators. (C) Calcium titrations of MaPca_{high} and MaPca_{low}. Fluorescence microscopy images of HEK293 cells expressing and nonexpressing HaloTag-NLS incubated with 1 μM of MaPca-558_{high} (left), MaPca-619_{high} (middle) and MaPca-656_{high} (right) for 2 h imaged under wash-free conditions. Turn-on numbers indicate average of n = 200 cells. Scale bar = 20 μm. Images adapted from reference [143] under the [CC-BY-4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

A few years later, the group of Johnsson developed another series of locally-activated fluorescent semisynthetic calcium indicators called “MaPCa indicators” with good fluorogenicity and tunable emission wavelength and affinity (K_D from 0.41 to 457 μM) (Figure 20B).^[143] MaPCa-656_{high} ($\lambda_{\text{exc}} = 656 \text{ nm}$) was identified as the best candidate with the highest fluorogenicity in presence of calcium (6-fold increase) and HaloTag (120-fold increase) and the highest contrast in wash-free live-cell imaging (Figure 20C,D&E). It exhibits a calcium affinity in a suitable range for cytosolic measurement ($K_D = 580 \text{ nM}$). A cell-permeant MaPCa-656_{high} acetoxymethyl (AM) ester was incubated on HEK293 cells expressing nuclear localized HaloTag and, after 2 h of incubation, fluorescence microscopy images highlighted efficient HaloTag labelling of the probe under no wash conditions with a signal-to-background ratio of 9 (Figure 20E). Moreover, the performance of MaPCa-656_{high} calcium indicator was evaluated in rat primary hippocampal neurons and showed efficient and homogeneous HaloTag labeling without any significant off-target signal. This work thus provides a very solid basis for the development of locally-activated semi-synthetic probes based on fluorogenic rhodamines. It is possible to envision replacing the BAPTA with a different receptor to target other analyte. It is worth noting that if the calcium sensitivity of the MaPCa sensors is comparable to that of protein biosensors ($F(+\text{Ca}^{2+})/F(-\text{Ca}^{2+})$ between 6 and 11), it is much lower to what can be attained with molecular calcium indicators,^[144] which is another display of the difficulty to combine the two fluorescence control mechanisms while maintaining their full efficiency.

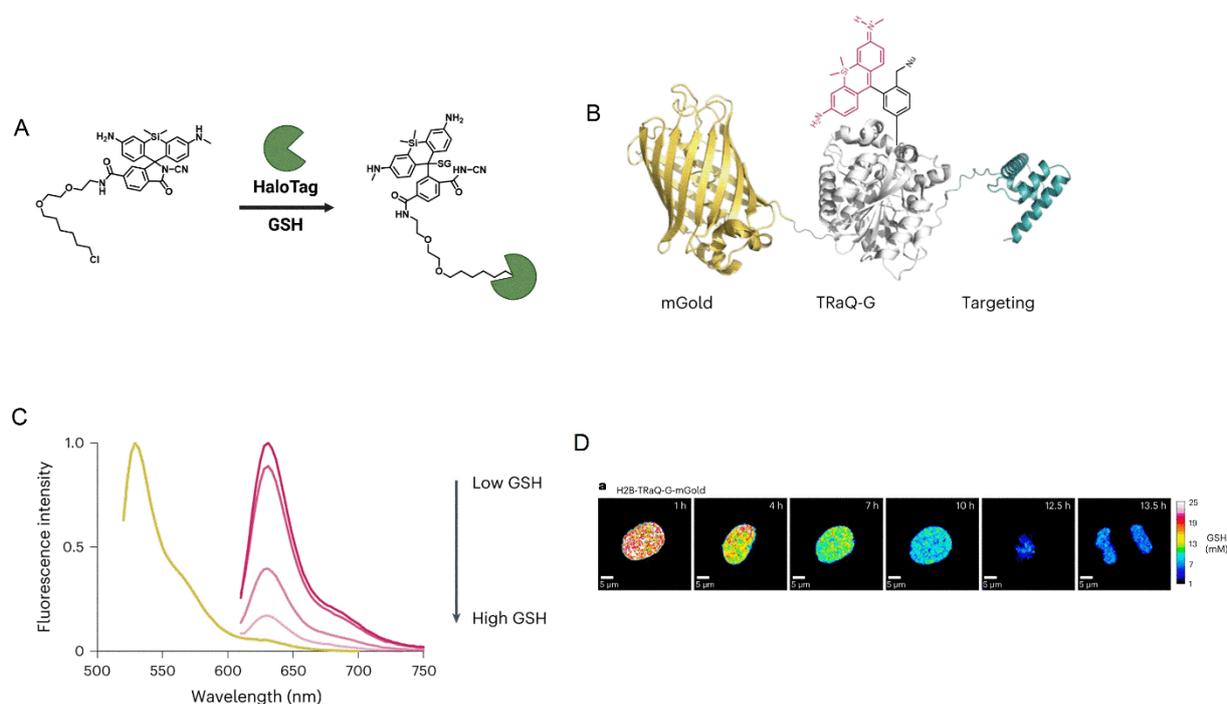


Figure 21. TRaQ-G dual-input glutathione sensor.

(A) Principle of the TRaQ-G sensing platform. (B) Design of the ratiometric GSH sensor using TRaQ-G combined to mGold fluorescent protein. (C) Fluorescence intensity spectra of mGold-TRaQ-G ratiometric probe with varying GSH concentration. (D) Visualization of nuclear GSH concentrations during cell proliferation with H2B-TRaQ-G-mGold: images of a single HeLa nucleus showing a decrease of GSH concentration from S phase to mitosis. Image adapted from reference ^[145] under the [CC-BY-4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

The combination of a Silarhodamine fluorogen with HaloTag protein has also been used by Emmert *et al.* to develop a glutathione (GSH) sensor named “TRaQ-G” based on the ring-opening process upon HaloTag binding resulting in a bright fluorescence emission and on the nucleophilic attack of the xanthene π -system of the SiR core by the nucleophilic GSH that quenches the fluorescence (Figure 21A).^[145] The structure containing a cyanamide nucleophile – TraQ-G – was found to act as a GSH sensor locally-activated by HaloTag. This example is particularly interesting since the unbound form of TRaQ-G is unable to react with GSH, contrary to the previous calcium sensors where unbound indicators can bind their target but without a detectable associated signal. However it is based on a decrease of fluorescence which is less efficient than a switch-on effect. The combination of HaloTag with mGold, a photostable redox-insensitive protein, was used to generate a ratiometric GSH sensor (Figure 21B). A calibration curve of the ratio of mGold/TRaQ-G fluorescence

intensities to GSH concentrations confirmed the linear response of this ratiometric fluorogenic semisynthetic GSH sensor in the biologically relevant range (1-20 mM) (Figure 21C). Live-cell imaging experiments using multiple organelle-targeting sequences confirmed the efficiency and accuracy of the TRaQ-G sensor for precise detection of GSH in cells (Figure 21D). Since there is no need to wash the ligand, the newly expressed protein can undergo continuous labeling in prolonged experiments.

These three examples show the early developments of rhodamine-based fluorogenic and chemogenetic biosensors. While this approach benefits from the excellent photophysical properties of the rhodamines scaffold, the synthesis of the most efficient rhodamines analogs is relatively complex, especially when it comes to combining several sensing groups on the same molecule. More chemically-accessible alternatives have been developed based on small viscosity-sensitive molecular rotors.

III.2.3. Fluorogenic semisynthetic sensors based on fluorescent molecular rotors

III.2.3.1. Fluorogenic molecular rotors targeting self-labeling protein tags

Another class of fluorogens are fluorescent molecular rotors (FMRs) based on fluorescent structures displaying rotation around an intramolecular single bond (Figure 22).^[146–148] These molecules exhibit viscosity-sensitive fluorescence emission related to the degree of intramolecular motion upon photoexcitation. In low-viscous media, the fast intramolecular rotation of FMRs induces non-radiative thermal relaxation of the photoexcitation but when the viscosity of the environment increases, the immobilization of the molecule leads to a restoration of the fluorescence emission. This is a very general mechanism and FMRs encompass wide variety of structures, but the most commonly found are “push-pull” structures composed of electron withdrawing and donating groups conjugated through a flexible bond (Figure 22A).^[147,148] These small fluorogens are particularly valuable tools as they are chemically accessible combining straightforward synthesis and easily-tunable photophysical properties.^[149,150] FMRs have been widely used as fluorogens to monitor viscosity in various cell compartments, but the viscosity-sensitive emission can also be used for the fluorogenic targeting of biomolecules and in particular SLP-tags. Yu and colleagues have generated a fluorescence-switchable probes using BG-CCVJ fluorogen

targeting SNAP-tag with a fluorescence activation up to 170-fold (Figure 22B).^[151] In order to red-shift the emission wavelength, Zhang and colleagues developed a Red Kaede-like chromophore activated by SNAP-tag binding ($\lambda_{em} = 620$ nm and 90-fold enhancement upon SNAP-tag binding) (Figure 22B).^[152] The most comprehensive work on SNAP-tag fluorogens based on dipolar FMRs has led to the development of a palette of probes with emissions ranging from 485 to 700 nm by varying the electron-donating and withdrawing groups.^[149] As for HaloTag, Kool and coworkers developed dimethylaminostyrylpyridinium fluorogens exhibiting a viscosity-sensitive emission that is activated upon reaction with HaloTag with a 27-fold fluorescence increase (Figure 22C).^[153] Our group also strongly focuses on the development of semisynthetic fluorescent reporters based on a palette of FMRs covering the green to far-red emission range and targeted towards HaloTag (Figure 22C).^[150,154]

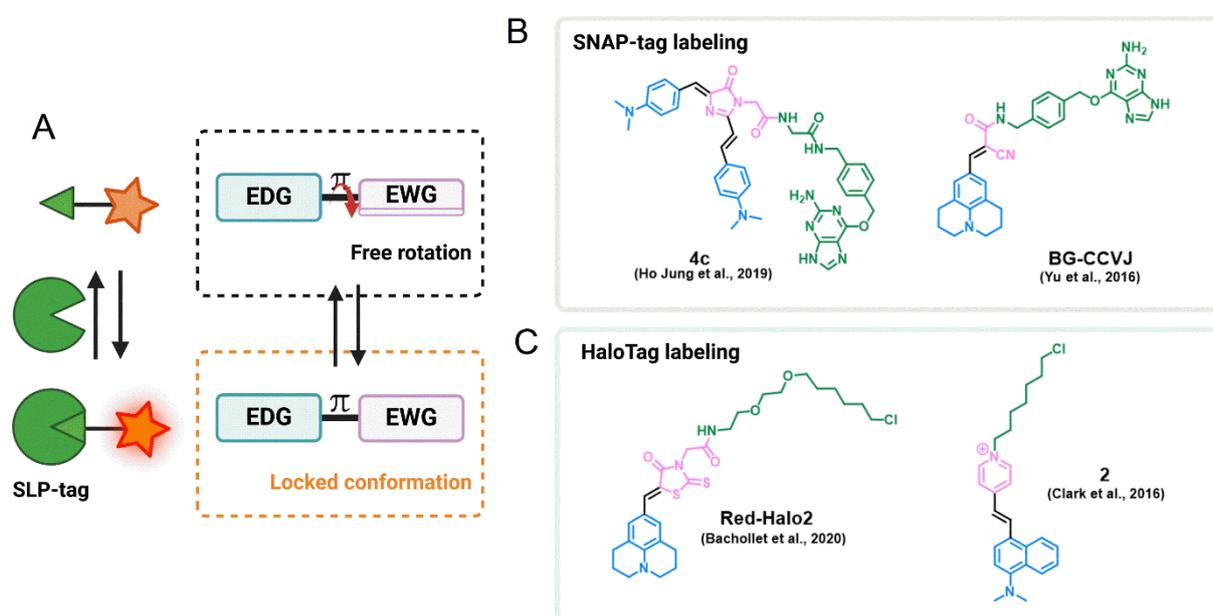


Figure 22. General characteristics of FMRs based fluorogens.

(A) Principle of fluorescence activation mechanism of FMR-based semisynthetic probes upon SLP binding. An EDG is π -conjugated to an EWG. Examples of some FMRs for SNAP-tag labeling (B) and HaloTag labeling (C).

Non-covalent semisynthetic fluorogenic probes involving FMRs have also been reported for non-covalent genetically-encoded strategies such as 4-hydroxybenzylidene rhodanine (HBR) derivatives combined to the FAST protein^[48,155] or 3,5-DiFluoro-4-Hydroxy-Benzylidene Imidazolinone (DFHBI) derivatives have

been extensively engineered as fluorogens enabling fluorescence emission upon binding to the core RNA aptamers.^[78,156,157] Non covalent Fluorogen Activating Protein (FAP) labeling has also been used to selectively bind FMR-based fluorogens such as malachite green and thiazole orange, and activate their fluorescence for wash-free bioimaging of subcellular organelles.^[94,158]

III.2.3. FRET-based semisynthetic pH sensors

Using FAP labeling, Bruchez and coworkers reported semisynthetic fluorogenic pH probes based on FRET ratiometric fluorescence activation.^[159,160] These pH probes rely on a tandem of a pH sensitive cyanine dye and a molecular rotor FAP fluorogen that is either the donor^[159] or the acceptor (Figure 23A).^[160] Variation of pH modulate the ICT in the cyanine structures and thus the emission properties of the donor Cy3 dye which in turn impacts the energy transfer (Figure 18C, Figure 23B). Local activation of the fluorogen moiety by FAP binding thus creates a ratiometric pH sensor that can be used in wash-free conditions. The second design, with a fluorogenic acceptor, ensures a better selectivity since the non-emissive acceptor also quenches the fluorescence of the pH-sensitive donor by energy transfer for unbound molecules (Figure 23).^[160] The resulting cell-impermeant probe was used to monitor membrane GPCR trafficking but cannot be used to image intracellular events. Additionally, the dual probe design uses most of the visible spectrum and precludes the use of other fluorescent probes for multiplexing.

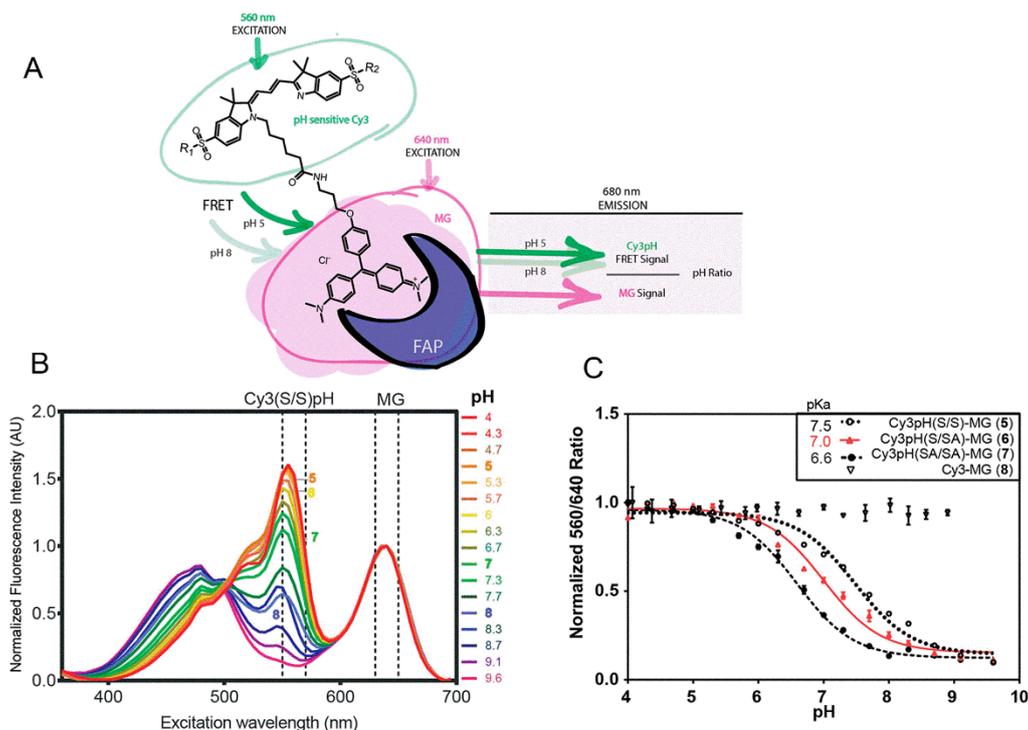


Figure 23. Structure and properties of ratiometric pH sensors based on FAP labeling.

(A) Structure of the FRET-based locally activated pH indicator targeting FAP. (B) Fluorescence emission of the tandem, showing the shift of emission of the Cy3 moiety due to pH and the FRET with MG. (C) Ratiometric pH calibration curve. Adapted with permission from reference [160]. Copyright 2018 American Chemical Society.

III.2.3.2. PeT and ICT based fluorogenic sensors

More versatile semisynthetic sensors based on a single fluorogen scaffold have been recently developed. Our group reported a dual-input calcium probe by combining a viscosity-sensitive red-emitting molecular rotor targeting HaloTag with a BAPTA group that controls the fluorescence by PeT (Ca-DIP, Figure 24).^[161] Similarly to previous MaPCa indicators based on Si-R fluorogens, Ca-DIP exhibits a locally activated red-emitting fluorescence signal upon both HaloTag binding and Ca²⁺ chelation. More precisely, in the absence of HaloTag protein, the intramolecular rotation of Ca-DIP quenches the fluorescence emission resulting in a very weak signal even in presence of calcium. When bound to HaloTag, Ca-DIP becomes fluorescent (25-fold fluorescence activation) with a good calcium sensitivity ($\Delta F/F_0 = 5.4$).

Although the calcium sensitivity is on par with that of the MaPCa indicators, its brightness is much lower owing to a partial activation of the fluorescence by HaloTag. HaloTag was indeed optimized for rhodamines scaffold and does not necessarily activates efficiently the fluorescence of FMRs. Recent findings however suggests that protein engineering can improve this aspect.^[162]

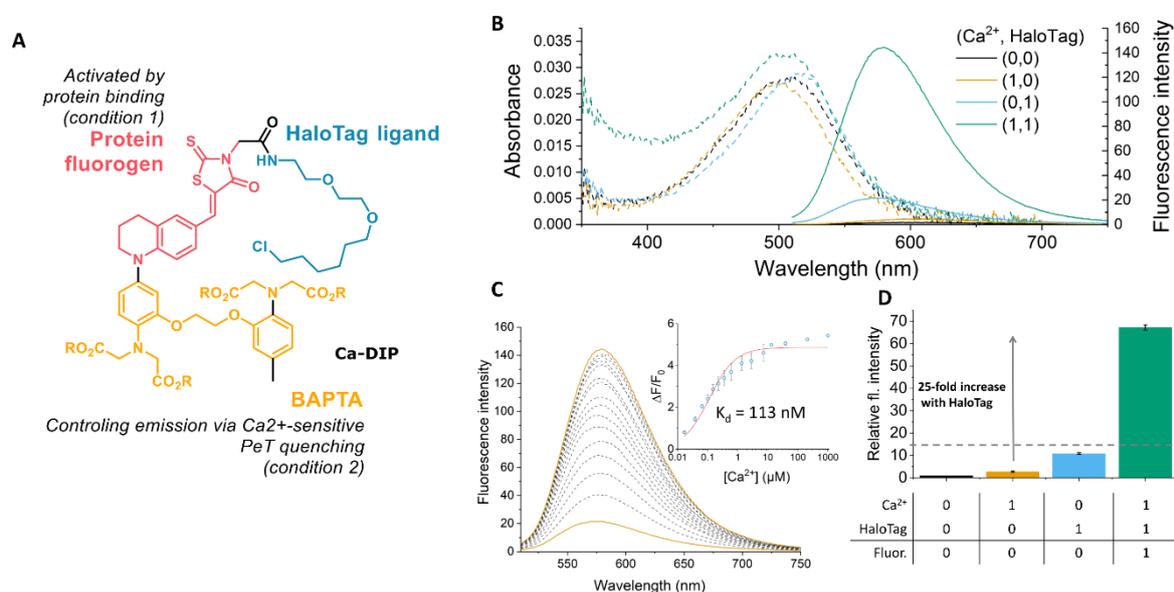


Figure 24. Structure and properties of the Ca-DIP sensor.

(A) Structure of Ca-DIP, (B) Absorption and emission properties in the four possible states of the system, with and without calcium and HaloTag, (C) Fluorimetric titration, (D) dual-input fluorescence activation. Adapted with permission from reference ^[161]. Copyright 2022 Royal Society of Chemistry.

The group of Baker used existing molecular rotors DFHBI derivatives to develop a dual-input fluorogenic semisynthetic platform for intracellular pH monitoring.^[163] This strategy is based on the binding of pH-sensitive DFHBI to mini fluorogen activating proteins mFAPs (Figure 25A). The moderate size, photostability and fast binding kinetics of mFAPs make them attractive candidates for the development of hybrid chemogenetic biosensors.^[164] The challenge was about the ability for the mFAP to bind both phenolic and phenolate states of DFHBI. Hence, to generate an effective pH-responsive semisynthetic probe using DFHBI-mFAP labeling strategy, the authors successfully designed with a de novo computational strategy a mFAP mutant, mFAP_pH, capable to bind these two states with equivalent affinities. Fluorimetric pH titration showed a suitable pK_a of 5.4, corresponding to the pK_a of free, unbound

DFHBI in solution.^[165] Upon stabilization of the cis-planar conformation by mFAP, the deprotonation of the phenol moiety at neutral pH increase the ICT that creates a bathochromic shift of the excitation spectra and activates the fluorescence, thus creating interesting ratiometric properties for quantitative pH sensing in the biological range (Figure 25B). It is worth noting that in this paper, the authors also report split reporters for protein/protein interactions and a mFAP-based calcium sensor, two features that are slightly out of the scope of this study. Although it reports on a similar type of chemogenetic sensor with a molecule combining a sensitivity to pH and fluorogenic activation by a genetically-encoded protein, this work presents a key difference compared to the other articles reviewed herein. It is indeed not based on small-molecule engineering, since they use a previously reported pH-sensitive fluorogenic probe, but solely on protein engineering to adapt the binding properties of mFAP to this molecule. While conventional protein engineering methods rely on the mutation of existing proteins, the de novo design used in this example consists in the generation of entirely new protein structures and functions to those found in nature.^[166]

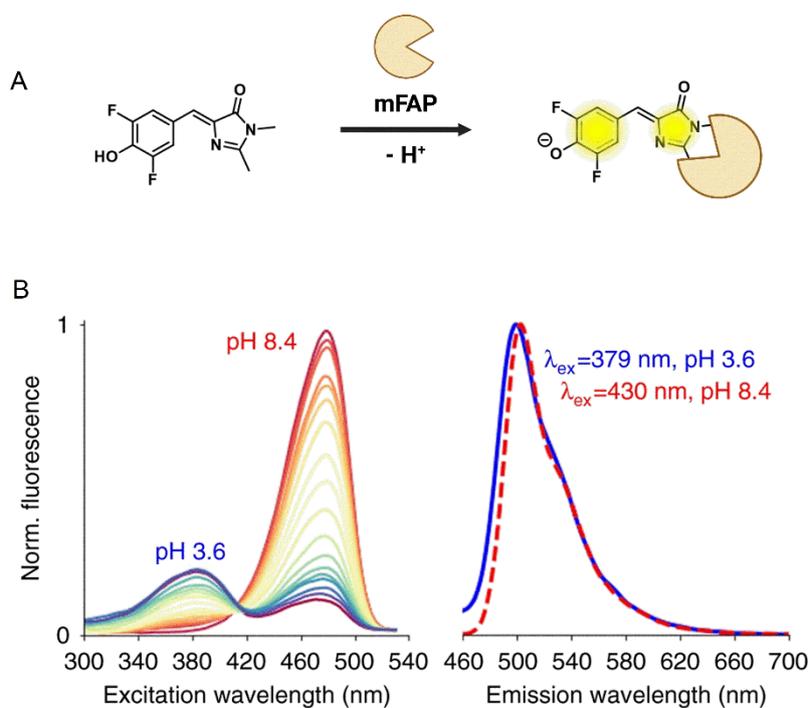
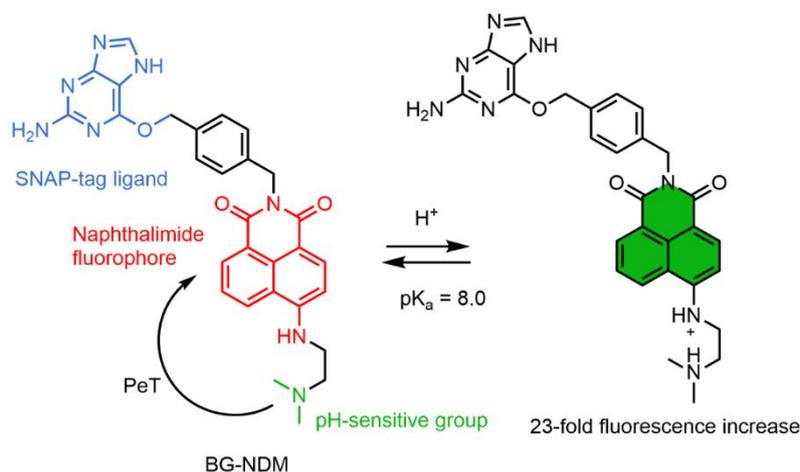


Figure 25. Fluorogenic chemogenetic pH sensor based on the de novo design of mFAPs.

(A) Principle of DFHBI-mFAP complex formation for pH monitoring. (B) Normalized fluorescence excitation spectra of the mFAP_{pH}-DFHBI complex for a pH titration between pH 3.6 and pH 8.4 (*left*) and normalized emission spectra at pH 3.6 and 8.4 (*right*). Image adapted from ref ^[163] under the [CC-BY-4.0 license](#).

III.3. Other example of locally-activated fluorogenic semisynthetic biosensor for pH



Scheme 2. Structure of the Naphthalimide-based dual-input pH probe BG-NDM.

Xu and coworkers developed a semisynthetic pH probe based on the combination of 1,8-naphthalimide fluorogens (BG-NDM) targeted towards SNAP-tag and incorporating an amine group that quenches the fluorescence via PeT (Scheme 2).^[167] In this design, SNAP-tag protein activates BG-NDM by preventing fluorophore aggregation and protonation of the amine at low pH inhibits the PeT. This dual-input locally activated pH probe displays a pK_a of 8.0 that is slightly high for the range of biological pH albeit with a good dynamic response. So far this is the only example of dual-input probe with an activation based on the aggregation ability of naphthalimide. Although it is not mentioned in this study, PeT between the benzylguanidine ligand of SNAP-tag and a naphthalimide has been reported and may also contribute to the fluorogenicity of this probe and constitutes a possible strategy to design dual-input probes.^[168]

III.4. Conclusion

There are so far only few examples of locally-activated semisynthetic biosensors, likely owing to the recent nature of the field but also to the design and synthetic challenges to efficiently combine two fluorescence activating mechanisms on a single molecule. Nonetheless, this approach certainly holds great potential to develop efficient sensors

that benefit from the high versatility of small molecular fluorophore and receptors and from the selectivity of the genetic encoding of recombinant protein. While FRET-based examples have interesting properties such as ratiometric emissions that enable quantitative measurements, the most versatile design is the one based on a single fluorophore. The development of biocompatible fluorogens targeting SLP-tags with low cytotoxicity, cell-permeability, high photostability and a wide range of emission wavelengths from the UV to the NIR provides molecular platforms that can be combined with a variety of sensing groups to engineer dual-input probes. Due to the small number of examples, only a few analytes have been targeted (pH, Ca²⁺ and Mg²⁺) but the dual-input probes described herein should be adjustable to other targets using the wide repertoire of chemical receptors, as has been done with the FLAsH derivative to switch from a calcium to a magnesium indicator (Scheme 1). Measurements of the redox potential of the fluorogens and receptors or Density functional theory (DFT) calculations can help predict the PeT process between the two partners to help design dual-input probes targeting new analytes with good sensitivity.^[122,123] Although remarkable examples have been achieved, researchers have also met limitations such as limited fluorogenicity or brightness. While it may be convenient and versatile to use well-established SLP-tags that can bind a variety of small molecular probes, the future of the field will likely rely on the combination of molecular and protein engineering to ensure the adequation between the two partners and in particular the efficient activation of the fluorescence. The protein engineering can be performed by rational design, directed evolution or more recent computational *de novo* design methods. A recent example of the incorporation of a molecular calcium chelator (BAPTA) in a fusion between a GFP and HaloTag also underlines the other possibilities that combined chemical and genetic approaches offer to develop hybrid sensors with unique properties.^[169]

IV. Objectifs et organisation du manuscrit de thèse

Pour résumer, le suivi de protéines cibles repose sur le choix d'une stratégie adaptée au contexte de l'étude. La plus courante, l'imagerie de fluorescence, met en jeu le marquage par fluorescence des protéines d'intérêt pour pouvoir les visualiser en microscopie. Pour marquer ces protéines cibles et suivre leur trafic, nous avons choisi d'utiliser la combinaison hybride d'une protéine de marquage, la protéine HaloTag, avec des fluorophores synthétiques. Cette stratégie présente l'avantage de bénéficier de la sélectivité de l'encodage génétique par le biais de la création d'une protéine de fusion entre HaloTag et la protéine cible, et de la versatilité de la chimie de synthèse des fluorophores. Cette combinaison hybride permet de diversifier l'étude d'une protéine d'intérêt à partir d'une seule protéine de fusion à laquelle on peut coupler différents fluorophores ou senseurs. Cela permet d'étudier la protéine dans différents contextes, par exemple sa localisation dans des organelles acides, son endocytose ou exocytose ou encore de faire une étude de la demi-vie de la protéine en distinguant les protéines intra- et extra-cellulaires. Les fluorophores que j'ai mis au point sont des rotors moléculaires présentant une émission de fluorescence sensible à la viscosité afin d'obtenir des sondes fluorogéniques chimiogénétiques caractérisées par une activation de fluorescence uniquement lorsque le rotor moléculaire est lié à la protéine HaloTag. Cette famille de sondes fluorogéniques présente l'avantage de pouvoir réaliser de l'imagerie cellulaire sans avoir à retirer l'excès de fluorophores non liés et obtenir de très bons contrastes. L'objectif de mon projet est ainsi de développer des sondes basées sur ce système fluorogénique chimiogénétique afin de répondre à 3 problématiques différentes qui seront abordées au cours de ce manuscrit de la manière suivante (Figure 26):

- **Chapitre II:** Ce chapitre décrit le développement de nouvelles sondes fluorogéniques chimiogénétiques hybrides pour la **localisation subcellulaire** de protéine d'intérêt. Dans ce contexte, il sera question de combiner l'ingénierie de molécules et l'ingénierie de la protéine HaloTag afin d'obtenir des sondes plus brillantes pour l'imagerie.
- **Chapitre III:** Ce chapitre présente l'étude des **processus biologiques dynamiques** en temps réel. En particulier, il s'agit de développer une sonde chimiogénétique sensible au pH pour le suivi de l'exocytose de protéines cibles.

Cette sonde appartient à la famille des biosenseurs chimiogénétiques localement activés (« dual-input ») présentée dans la partie **III** de ce chapitre.

- **Chapitre IV:** Ce chapitre traite de l'étude la protéine **hevin**, une **protéine matricellulaire** impliquée dans la plasticité synaptique dans le système nerveux central. Il s'agit d'une application de cette nouvelle boîte à outils chimiogénétiques pour étudier hevin, dont la localisation subcellulaire et les processus de sécrétion restent à ce jour mal décrits. Les enjeux de cette étude reposent sur le suivi dynamique d'une protéine dont le cycle de vie est associé à des systèmes cellulaires complexes interconnectés (neurones et astrocytes), pour laquelle les outils chimiogénétiques devaient être développés.

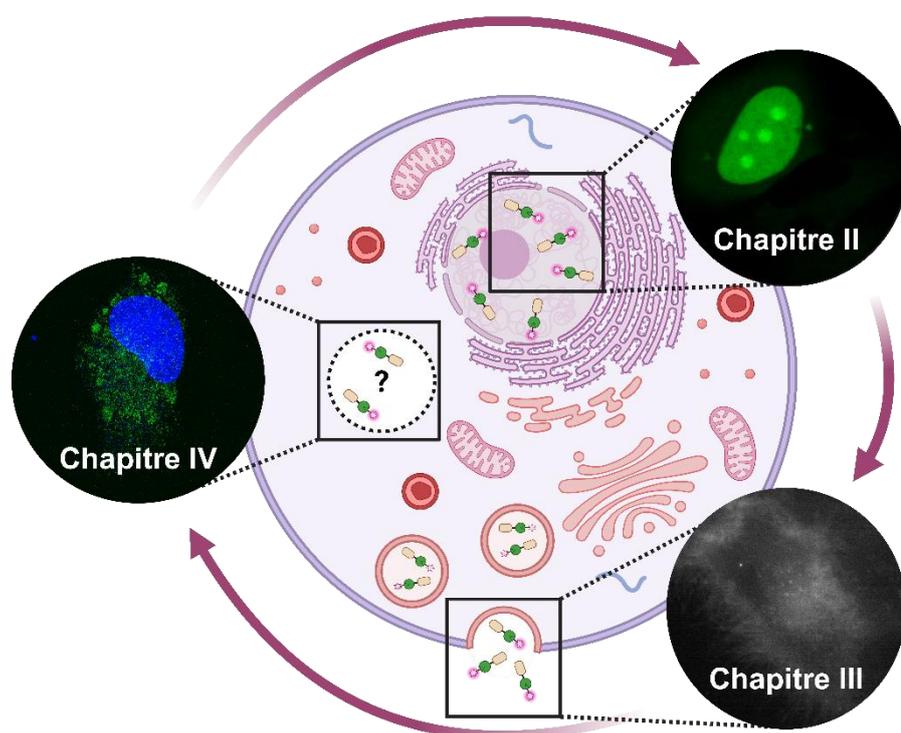


Figure 26. Représentation schématique des objectifs de cette thèse.

La première étape a été l'évaluation *in vivo* des propriétés photophysiques et biochimiques des nouveaux systèmes chimiogénétiques hybrides développés sur des cellules HeLa (**Chapitre II**). La protéine HaloTag a été notamment ciblée au niveau du noyau de la cellule grâce à la construction NLS-HaloTag. Dans une deuxième étape, la capacité des sondes pH à mesurer la sécrétion des protéines a été évaluée sur la protéine CD63 couplée à HaloTag (**Chapitre III**). L'exocytose de la protéine CD63 a été extensivement caractérisée et permet de valider l'efficacité de nos sondes pH par rapport à la littérature. Après validation, nous avons appliqué les sondes chimiogénétiques pour déterminer la localisation subcellulaire et la dynamique de la sécrétion de la protéine extracellulaire hevin (**Chapitre IV**).

Résultats

Chapitre II

**Conception et caractérisations de sondes
chimiogénétiques hybrides pour l'imagerie
de fluorescence en cellules vivantes**

Table des matières

I. Contextualisation	78
I.1. Ingénierie de rotors moléculaires fluorogéniques	78
I.1.1. Structure et propriétés de fluorescence des rotors moléculaires	78
I.1.2. Stratégies de synthèse et diversification des propriétés optiques	82
I.2. Ingénierie de protéines par design rationnel	86
I.2.1. Mutagenèse dirigée	88
I.2.2. Permutations circulaires	91
II. « Design of bright chemogenetic reporters based on the combined engineering of fluorogenic molecular rotors and of the HaloTag protein »	94
Abstract	94
II.1. Introduction	95
II.2. Results and discussion	97
II.2.1. Design of the fluorogens	97
II.2.2. Characterization in HaloTag7	101
II.2.3. Characterization in a HaloTag mutant	104
II.3. Live cell microscopy	107
II.4. Conclusion and perspectives	110
III. Résultats complémentaires	111
III.1. Production de mutants de HaloTag par mutagenèse dirigée	111
III.1.1. Clonage de HaloTag7 et de ses variants	111
III.1.2. Production et purification de la protéine HaloTag7 et de ses variants	113
III.1.3. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les variants	116
III.2. Permutations circulaires dans HaloTag (cpHT)	119
III.2.1. Principe et présentation des protéines cpHT étudiées	119
III.2.2. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les cpHT	122
IV. Conclusion et perspectives	125
VI. Partie expérimentale	128
VII. Annexes	137

Dans le cadre ce chapitre, nous développons de nouvelles sondes fluorogéniques hybrides pour l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes. Cette étude est axée sur la combinaison d'un nouveau design de sondes moléculaires permettant de moduler rapidement et facilement les propriétés optiques de celles-ci et en parallèle sur la modification de la protéine HaloTag afin d'améliorer la brillance du système hybride en imagerie (Figure 27). Plus particulièrement, ce chapitre s'inscrit dans la continuité du projet de développement de sondes hybrides déjà mis en place au sein du laboratoire de chimie et auquel j'ai contribué *via* la conception et la caractérisation de mutants de la protéine HaloTag. Les sondes impliquées dans ce projet sont des rotors moléculaires fluorogéniques dont j'ai réalisé l'étude *in vitro* dans différents variants de HaloTag. Ce travail a notamment permis d'identifier les meilleures combinaisons fluorophore – protéine pour l'obtention d'un système hybride plus brillant pour l'imagerie.

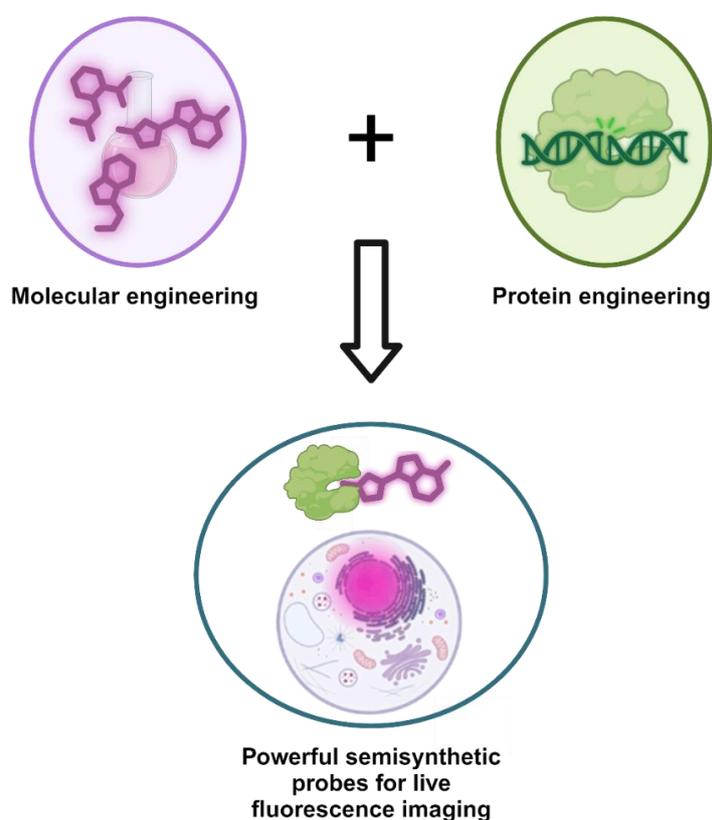


Figure 27. Principe général du challenge de développement de nouveaux outils hybrides basés sur la combinaison de l'ingénierie de molécules et de protéines.

-Toutes les sondes moléculaires ont été obtenues par **Louis Sanchez**, un stagiaire de M2 que j'ai co-encadré, ainsi que par les **Drs. Sylvestre Bachollet** et **Blaise Dumat**.

-Les mutants de HaloTag7 issus de permutations circulaires ont été obtenus par le **Dr. Kristina Mironova** (en collaboration avec le **Prof. Arnaud Gautier**).

-Les résultats d'imagerie cellulaires publiés dans l'article ont été obtenus par le **Dr. Blaise Dumat**.

I. Contextualisation

Dans cette partie sont présentés les différents concepts clés impliqués dans le développement, la modulation et l'amélioration de nouvelles sondes chimiogénétiques hybrides basées sur la combinaison de rotors moléculaires fluorogéniques (§ I.1) et de l'ingénierie de la protéine HaloTag (§ I.2).

I.1. Ingénierie de rotors moléculaires fluorogéniques

I.1.1. Structure et propriétés de fluorescence des rotors moléculaires

Les rotors moléculaires fluorescents (RMFs) sont de petites molécules organiques capables de tourner autour d'une liaison simple intramoléculaire. Il existe une diversité de familles de RMFs avec des structures différentes comme les BODIPY,^[170] les dioxaborine,^[171] les porphyrines^[172,173] ou encore les structures dipolaires de type « push-pull ».^[174-177] La variété structurelle de ces familles témoigne ainsi de l'intérêt que suscitent les RMFs pour la modularité leurs propriétés photophysiques et biochimiques. Dans le cadre ce projet, nous nous intéresserons uniquement aux structures de type push-pull dipolaires qui sont les plus courantes.

La structure de ces dipôles est généralement composée d'un groupement riche en électrons - donneur d'électrons (D) - et d'un groupement appauvri en électrons - accepteur d'électrons (A) - reliés par un système π -conjugué (Figure 28).^[178] Le point commun à toutes ces structures réside dans leur mécanisme d'activation de fluorescence qui leur confère la propriété de molécules fluorogéniques. En effet, après

l'absorption d'un photon, un transfert d'électrons s'effectue entre le groupement D et le groupement A à travers le système π conjugué conduisant alors à un transfert de charge intramoléculaire (ICT) *via* la création d'un dipôle. Ce transfert électronique conduit alors à la formation d'un état excité dit « twisted intramolecular charge transfer » (TICT) correspondant à un état dans lequel la molécule est tordue/non planaire et peut tourner autour d'une liaison simple reliant les deux groupements D et A (Figure 28).^[179–181] Différentes possibilités s'offrent alors au rotor moléculaire pour regagner l'état fondamental faible en énergie, comme l'illustre le diagramme simplifié de Jablonski figure 28:

-Désexcitation par **voie radiative** (dont l'émission de fluorescence) entre le niveau localement excité (LE) du niveau excité S_1 et l'état fondamental S_0 .

-Désexcitation par **voie non-radiative** entre le niveau TICT du niveau S_1 et l'état fondamental S_0 .

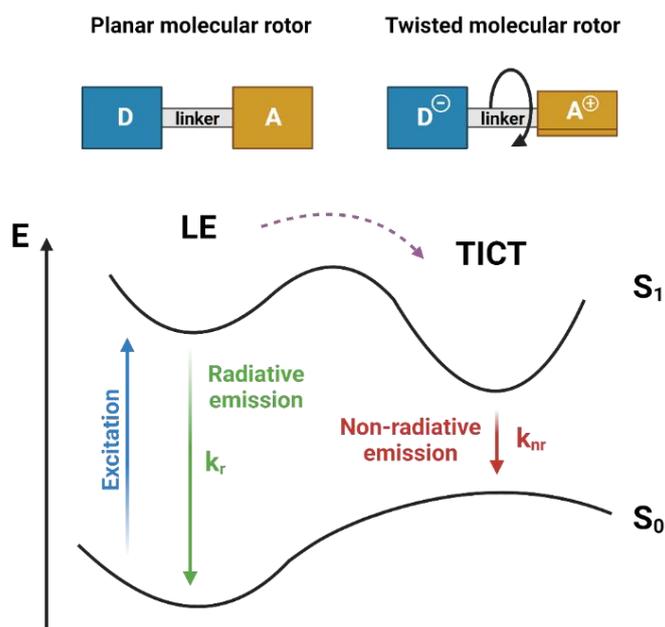


Figure 28. Diagramme simplifié de Jablonski relatif au mécanisme de fluorescence des rotors moléculaires de type push-pull.

LE : niveau localement excité, TICT : niveau de transfert de charge par rotation intramoléculaire, D : Donneur d'électrons, A : Accepteur d'électrons, k_r : constante de désexcitation radiative, k_{nr} : constante de désexcitation non radiative.

La fluorescence des rotors push-pull et des RMFs de manière plus globale est très sensible à l'environnement moléculaire et dépend en particulier des degrés de liberté de la molécule. En effet, leur rendement quantique de fluorescence varie avec la rigidité de la molécule, la viscosité du solvant ou encore la température.^[146,182–186] Plus précisément, la constante de désexcitation radiative (k_r) est reliée à l'absorption photonique (ϵ) tandis que la constante de désexcitation non-radiative (k_{nr}) est dépendante de la capacité de rotation du rotor moléculaire et donc de la viscosité du milieu environnant.^[187,188] Ainsi, dans un solvant très visqueux, la capacité d'un RMF à se relaxer par un changement de conformation (par rotation intermoléculaire) est entravée et il en résulte alors une augmentation du rendement quantique de fluorescence.^[189] Cette variation de l'intensité de fluorescence émise avec la viscosité a largement été étudiée afin de développer des traceurs fluorescents biocompatibles permettant de suivre des processus biologiques à l'échelle cellulaire^[148,173,188–193] et permettre ainsi de répondre à des problématiques biologiques comme la régulation de certaines maladies neurodégénératives.^[194]

Il existe une large variabilité de structures de RMFs de type push-pull comprenant plusieurs classes dont les dérivés de la 9-(dicyanovinyl)-julolidine (DCVJ), les dérivés de N,N-dialkylaniline, ou les dérivés de la Thiolavine T (Figure 29). Ces différentes classes de fluorophores présentent une excellente modularité de leurs propriétés spectrales par simple modification des groupements D et A ou de la longueur du système π (Figure 29).^[195,196] Cette propriété a d'ailleurs été utilisée au sein de notre équipe afin de générer une palette de sondes fluorescentes allant du vert au rouge lointain.^[150]

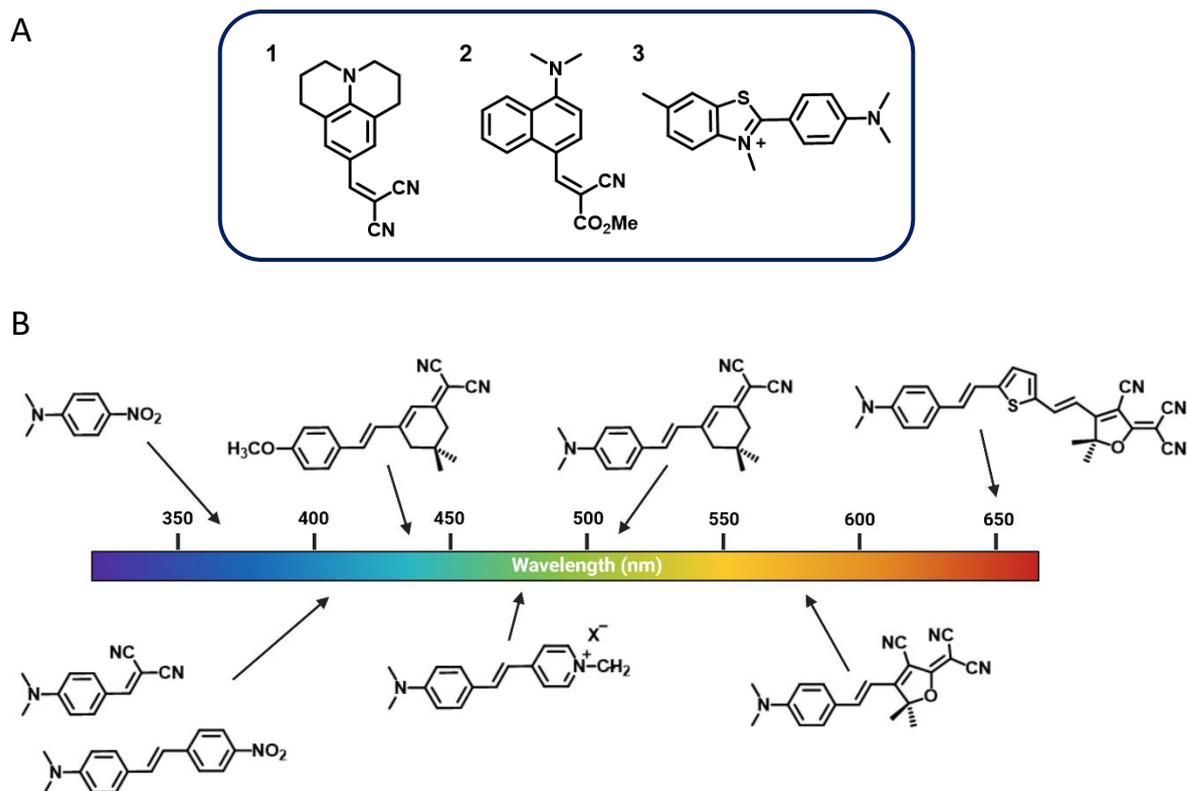


Figure 29. Diversifications structurelle et spectrale de quelques RMFs.

(A) Exemples de RMFs de type push-pull. **1** : DCVJ, **2** : dérivé de la N,N-dialkylaniline, **3** : dérivé de la Thiovaline T. (B) Exemples de rotors moléculaires de type push-pull π conjugués avec différents groupements A et D et leur longueur d'onde d'absorption respectives en solution.

Par ailleurs, la forte sensibilité de l'intensité de fluorescence de ces molécules à la viscosité a entraîné l'émergence de systèmes hybrides chimiogénétiques combinant des macromolécules biologiques comme les acides nucléiques, les protéines ou les membranes avec des RMFs (Figure 30).^[188,197-199] En effet, la présence d'un environnement contraignant comme la poche hydrophobe d'une protéine permet de bloquer la conformation des RMFs et d'augmenter ainsi leur rendement quantique de fluorescence comme l'illustre la figure 30.^[174,200] Ces protéines de marquage sont capables de se lier de manière sélective aux RMFs procurant ainsi une émission de fluorescence spécifiquement localisée en cellules vivantes. La sélectivité de l'encodage génétique des sondes chimiogénétiques associée à la facilité de synthèse et à la modularité des propriétés de fluorescence des RMFs sont des avantages considérables qui justifient l'intérêt de cette famille de fluorophores dans le développement de nouveaux outils pour l'imagerie en temps réel.

L'utilisation des dipôles push-pull pour le développement de systèmes chimiogénétiques hybrides a été initialement introduite par le groupe de Kool avec l'utilisation de styrylpyridiniums pouvant se lier à la protéine HaloTag.^[153] Depuis, une variété de sondes basées sur la combinaison de ces rotors fluorescents avec des protéines de marquage comme HaloTag ou SNAP-tag ont été recensés.^[162,201–204] La protéine HaloTag semble toutefois être la plus prometteuse pour des applications biologiques car les cinétiques de marquage avec les fluorophores organiques sont plus rapides et la structure du ligand nécessaire à l'étape de liaison est chimiquement plus simple. De plus, ce ligand est lui-même lipophile facilitant ainsi la pénétration cellulaire des molécules.^[113] D'autres systèmes chimiogénétiques hybrides récents utilisant ces structures dipolaires push-pull combinées aux protéines de marquage FAP^[163] ou FAST^[205,206] ont également été développés permettant d'obtenir de l'encodage génétique en cellules *via* un marquage non-covalent.

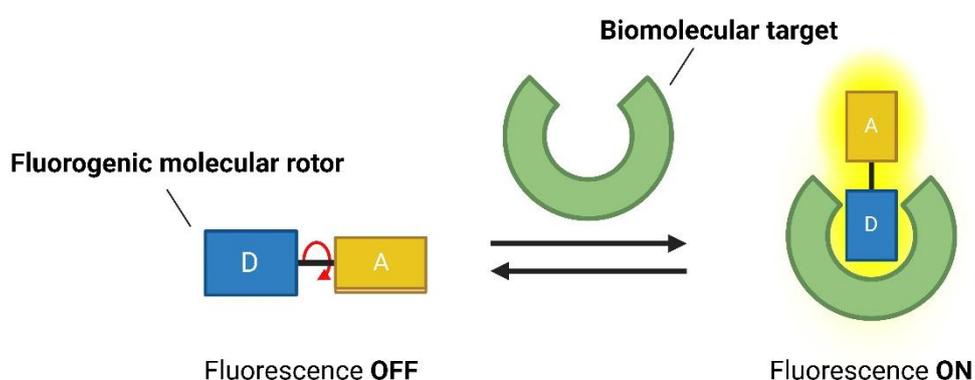


Figure 30. Principe général de l'activation des RMFs par une biomolécule.

1.1.2. Stratégies de synthèse et diversification des propriétés optiques

Les travaux précédents de l'équipe ont permis de développer une diversité de RMFs par modification des groupements donneurs et accepteurs.^[150,154] Les stratégies de synthèse mises en œuvre pour diversifier les propriétés photophysiques et biochimiques de ces sondes sont explicitées dans cette partie.

Un des enjeux majeurs pour le développement de sondes fluorescentes pour l'imagerie en cellules vivantes réside dans la volonté d'obtenir une diversité de

longueurs d'onde d'émission permettant de couvrir une large partie du domaine spectral et ainsi bénéficier d'une palette de couleurs pouvant correspondre à un maximum de lasers et de filtres disponibles sur les microscopes. Par ailleurs, le développement de fluorophores avec de larges déplacements de Stokes est également attractif afin de minimiser le recouvrement spectral entre la source d'excitation et la source d'émission et pouvoir augmenter le rapport signal/bruit et donc le contraste en imagerie de fluorescence. Les RMFs sont de bons candidats pour répondre à ces besoins. En effet, la simple modification structurelle de leur groupement A ou D permet d'obtenir des profils spectraux très différents, comme cela a été montré au sein de notre équipe.^[150,154] De plus, l'augmentation de la longueur de conjugaison du système π permet d'atteindre des longueurs d'onde d'émission dans le rouge voir le proche IR ce qui permettrait l'utilisation de ces sondes *in vivo*.^[184]

La versatilité des propriétés spectrales des RMFs repose sur différentes approches de modifications structurales. La modification du groupement A a été utilisée sur les RMFs de type DFHBI par le groupe de S. Jaffrey.^[156] Ces travaux ont montré que la substitution du cycle imidazolinone (groupement A) à diverses positions avec un groupement 1,1,1-trifluoroéthyle permet d'observer un effet bathochrome pour l'excitation et l'émission des DFHBI. De même, le développement d'autres RMFs comme les dérivés HBR et HMBR ayant des structures similaires mais avec une rhodanine à la place du cycle imidazolinone a permis de mettre en avant les effets de la force électro-acceptrice du groupement A sur les caractéristiques spectrales des RMFs.^[48] D'autre part, la modification du groupement donneur D a également un impact sur la stabilisation du dipôle à l'état excité et donc sur les propriétés spectrales des RMFs. Par exemple, Zachariasse et ses collègues ont étudié l'impact de la modification structurelle du groupement D sur les RMFs de type DMABN.^[207] Ces résultats montrent que plus la force du groupement D est importante, plus l'écart énergétique entre le niveau TICT et le niveau fondamental est faible et plus l'émission de fluorescence est décalée vers le rouge. Ces exemples démontrent ainsi que la stratégie consistant à moduler la force du groupement A et/ou D permet d'obtenir une variété de propriétés photophysiques avec des méthodes de synthèse relativement simples à mettre en œuvre. Enfin, une autre approche permettant d'atteindre des longueurs d'émission proche de l'IR avec les RMFs consiste à étendre la longueur de conjugaison du système π séparant les deux groupements D et A. Le groupe de Zhang a montré que cette extension de conjugaison permettait d'atteindre une longueur

d'onde d'émission autour de 714 nm avec un RMFs étendu par ajout d'une double liaison conjuguée au système π .^[188] De même, le groupe de Gautier a mis en évidence cet effet d'extension de conjugaison sur d'autres structures de type dipolaire push-pull.^[208] Plus récemment, une autre famille de RMFs présentant des structures de type D-A-D a permis d'obtenir une conjugaison beaucoup plus étendue et des longueurs d'onde d'émission dans le proche IR.^[184]

Concernant les travaux de l'équipe, la diversification des propriétés spectrales des rotors moléculaires a été initialement basée sur une stratégie linéaire permettant la production de fluorophores avec des structures similaires aux rotors CCVJ, DVCJ ou au chromophore de la GFP.^[150,154] Dans cette stratégie, les groupements D et A sont modifiés séparément puis couplés par une étape de condensation de Knoevenagel avant d'ajouter le ligand chloroalcane pour effectuer la liaison avec la protéine HaloTag. Cette dernière étape se fait notamment par couplage peptidique entre une fonction acide carboxylique présente dans tous les motifs A et la fonction amine du ligand chloroalcane (Figure 31).

Au niveau du choix du groupement D, les premières molécules rapportées ont été élaborées avec l'utilisation de trois différents motifs donneurs: le dialkylaminobenzène, l'azetidine et la julolidine. Ces fonctions ont des caractères donneurs de plus en plus forts permettant ainsi d'observer un effet bathochrome de plus en plus prononcé pour le profil spectral des RMFs caractérisés dans HaloTag (Figure 31). De plus, la cyclisation de l'amine dans le groupement julolidine permet de bloquer la libre rotation autour des liaisons aniline du motif dialkylaminobenzène permettant ainsi de contraindre davantage la conformation des RMFs et d'observer une meilleure augmentation de l'intensité de fluorescence du système hybride. Concernant le choix du groupement A, un effort de diversification avec des motifs plus ou moins électroattracteurs comme l'acide 2-cyanoacétique et l'imidazolinone a également été réalisé afin d'obtenir les dérivés CCVJ-Halo et Y-Halo émettant respectivement dans le vert et le jaune.

L'autre stratégie a consisté à étendre la conjugaison du système π entre le groupement D et le groupement A permettant d'obtenir les dérivés NIR-Halo1 et NIR-Halo2 avec des longueurs d'onde d'émission dans le proche IR ($\lambda_{em} = 671$ nm et $\lambda_{em} = 681$ respectivement) (Figure 31). Cependant, les tests de NIR-Halo1 en cellules vivantes ont montré la présence d'un signal non spécifique plus important que les autres RMFs.

Ce résultat peut s'expliquer par son fort caractère lipophile pouvant entraîner une activation de la fluorescence dans les structures lipidiques de la cellule telle que la membrane plasmique. La versatilité de synthèse de ces dipôles a alors permis de modifier également ses propriétés biochimiques afin de réduire le caractère lipophile de sa structure et améliorer le contraste en imagerie.^[150]

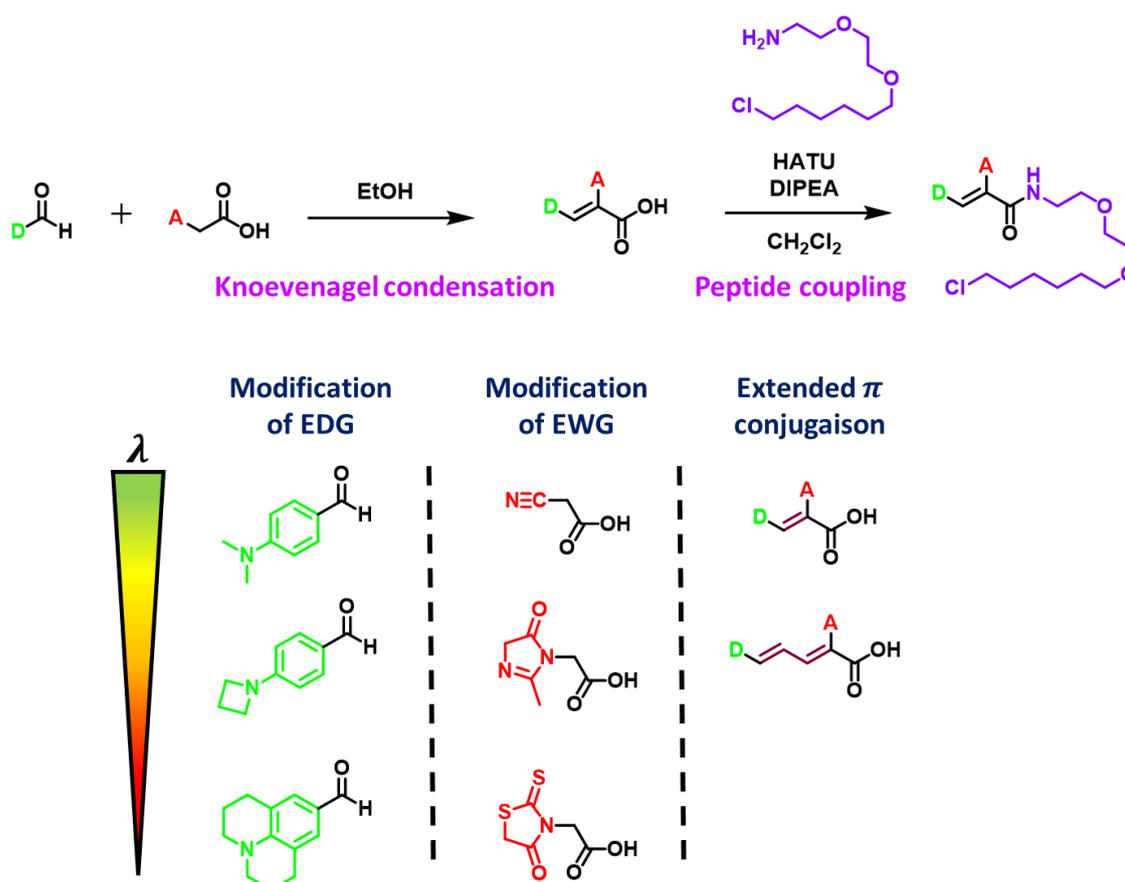


Figure 31. Stratégie de synthèse linéaire adoptée par l'équipe pour la diversification des propriétés photophysiques des rotors fluorescents de type push-pull.

Cette approche de synthèse linéaire au sein de l'équipe a donc mené à une première série de RMFs de type push-pull couvrant une large partie du domaine spectral allant du vert au proche IR et permettant un marquage rapide et spécifique avec la protéine HaloTag. Les tests d'imagerie de fluorescence en cellules vivantes ont confirmé l'efficacité du marquage avec des protéines de fusion (NLS-HaloTag, Actin-HaloTag, ER-HaloTag, etc.) permettant d'obtenir un bon contraste même sans étape

préalable de lavage des cellules vivantes. Toutefois, contrairement à d'autres fluorophores communément utilisés pour le développement de sondes fluorogéniques comme les rhodamines, les brillances mesurées *in vitro* et en cellules vivantes de nos RMFs restent modérées. Ce résultat est lié au fait que le blocage de la conformation des molécules dans la poche hydrophobe de la protéine HaloTag n'est que partiel ce qui conduit ainsi à une certaine mobilité de la molécule qui va alors réduire le rendement quantique de fluorescence des sondes chimiogénétiques hybrides.^[154] Afin d'obtenir de meilleures brillances, une première approche a consisté à produire de nouvelles structures moléculaires également basées sur des dipôles conjugués mais avec des groupements A et D différents. D'autre part, des études récentes ont montré que l'insertion de mutations au sein de la séquence de la protéine HaloTag pouvait avoir des effets bénéfiques à la fois sur la cinétique de liaison et le rendement quantique des RMFs liés à la protéine.^[162,209] Ainsi, l'utilisation de l'ingénierie de protéines représente une deuxième approche prometteuse pour l'amélioration des brillances de notre système.

I.2. Ingénierie de protéines par design rationnel

Nous avons vu précédemment qu'il était possible de modifier les propriétés photophysiques et biochimiques des systèmes chimiogénétiques hybrides en jouant sur la structure des fluorophores associés. Toutefois, ces propriétés sont également dépendantes des interactions entre le fluorophore et la protéine de marquage. Ainsi, une seconde approche, non exclusive de la première, consiste à modifier les domaines d'interaction entre le fluorophore et la protéine par modification de la séquence peptidique ou de la structure tridimensionnelle du site d'interaction de la protéine. En effet, l'amélioration de l'interaction protéine-sonde est essentielle pour la cinétique de marquage de la protéine, la stabilité de la sonde, et l'intensité de fluorescence émise par le fluorophore en condition expérimentale *in vivo*. Il existe deux stratégies pour générer de nouveaux mutants de protéines: **l'évolution dirigée** et le **design rationnel** (Figure 32).^[210]

L'évolution dirigée est une approche visant à mimer l'évolution darwinienne à l'échelle de la paillasse. Plus précisément, le gène de départ codant pour la protéine d'intérêt va être amené à évoluer dans un milieu spécifique afin d'obtenir les propriétés

désirées. Elle permet de sélectionner fonctionnellement des variants obtenus de façon aléatoire. Cette approche consiste ainsi en la création d'une banque de variants génétiques par des cycles de mutagenèse ou de recombinaison, suivi d'une étape de pression sélective permettant de sélectionner des protéines adaptées à l'application visée, ici l'augmentation de la brillance et de la cinétique de marquage avec les ligands moléculaires. La sélection génétique ou le criblage génétique à haut débit permet d'identifier les mutants possédant des propriétés améliorées pour l'application visée. Ces gènes triés peuvent ensuite être soumis à de multiples cycles supplémentaires de mutation et de criblage afin d'améliorer la mutation bénéfique identifiée précédemment. Concernant les systèmes hybrides, les travaux du groupe de Gautier ont montré l'intérêt de cette approche sur la protéine FAST dans le développement de nouveaux biosenseurs chimiogénétiques hybrides.^[110] Toutefois, cette stratégie nécessite de cribler expérimentalement une bibliothèque de variant assez exhaustive de l'ensemble des mutations possibles ce qui engendre un travail de biologie moléculaire très lourd.

À l'inverse de l'évolution dirigée, la stratégie du **design rationnel** repose sur la synthèse de variants dont la mutation est ciblée, choisie pour son potentiel fonctionnel à partir de données de la littérature ou de méthode prédictive computationnelles (Figure 32).^[210] Cette stratégie a notamment permis la modification génétique des protéines de marquage comme HaloTag^[211] ou SNAP-tag^[212] afin d'améliorer l'efficacité des systèmes chimiogénétiques hybrides rivalisant désormais avec leurs équivalents basés sur les protéines fluorescentes. Dans le cadre de ce projet, seules les méthodes relatives au **design rationnel** seront présentées, en particulier la **mutagenèse dirigée** et la **permutation circulaire** qui ont toutes les deux été appliquées ici.

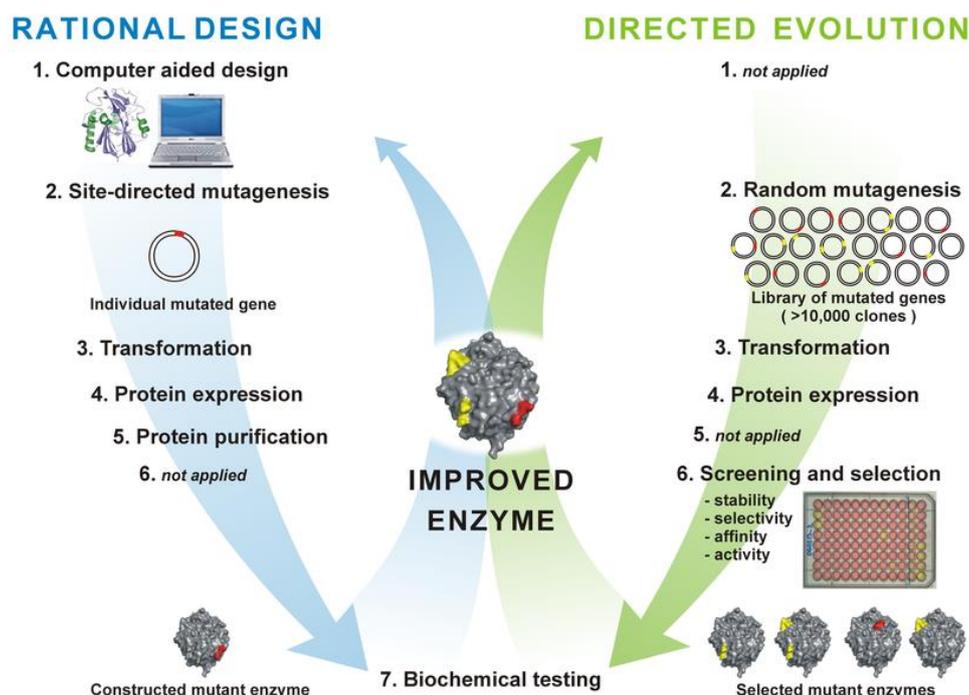


Figure 32. Comparaison des différentes étapes intervenant dans les deux approches d'ingénierie de protéines : *design rationnel* et *évolution dirigée*.

Adapté des travaux de Dvorak.^[213]

1.2.1. Mutagénèse dirigée

Dans la majorité des cas, l'ingénierie de protéines est réalisée par l'approche de mutagénèse dirigée.^[214–216] Cette approche permet de modifier de manière ciblée des acides aminés spécifiques en modifiant la séquence ADN codant pour la protéine et ainsi obtenir un variant de la protéine native. Au cours des trois dernières décennies, diverses techniques de mutagénèse ont été décrites et certains kits commerciaux basés sur ces techniques sont désormais disponibles rendant cette approche rapide, simple et fiable.^[217–224]

L'approche la plus courante consiste à introduire une mutation au niveau de la séquence de l'ADN par le biais de séquences modifiées d'oligonucléotides au cours d'une « Polymerase Chain Reaction » (PCR).^[225–227] Plus précisément, le design d'une paire d'amorces d'oligonucléotides inverses (« forward » et « reverse ») permet d'introduire sélectivement une mutation (Figure 33).^[228,229]

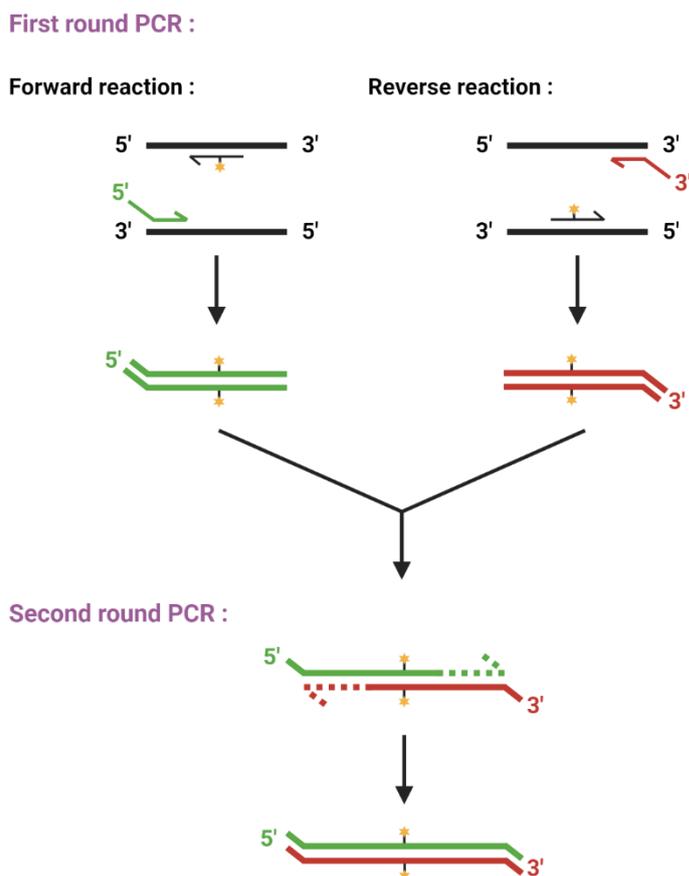


Figure 33. Représentation schématique du principe d'extension par PCR.

Introduction d'une mutation (*étoile orange*) avec l'utilisation d'oligonucléotides comprenant des brins complémentaires de la séquence ADN. Deux premières phases sont nécessaires pour créer de nouveaux fragments qui servent ensuite de base pour la deuxième étape de PCR.

Lorsque la ou les mutations ont été choisies, des oligonucléotides contenant la séquence ADN mutée sont utilisés pour amplifier un fragment d'ADN codant pour la protéine mutée. Le produit de PCR est alors inséré (l'insert) dans un nouveau plasmide (le vecteur) qui a été ouvert par digestion enzymatique afin d'insérer le produit de PCR (Figure 34). Après ligation de l'insert avec le vecteur, le plasmide est reconstitué, c'est-à-dire que tous les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons covalentes. Le nouveau plasmide est alors utilisé pour transformer (intégration du plasmide) des cellules procaryotes (*E. Coli*), ce qui va permettre l'amplification du plasmide par la réplication des cellules procaryotes. La séquence de l'ADN plasmidique extrait des cellules est vérifiée par la méthode de cartographie avec une restriction enzymatique puis par un séquençage de la région insérée pour s'assurer de la présence de la

mutation voulue. Cette méthode de mutagenèse permet donc de modifier la séquence protéique de manière spécifique. Elle peut être étendue à la construction de mutations multiples, d'insertions ou de suppressions de gènes.

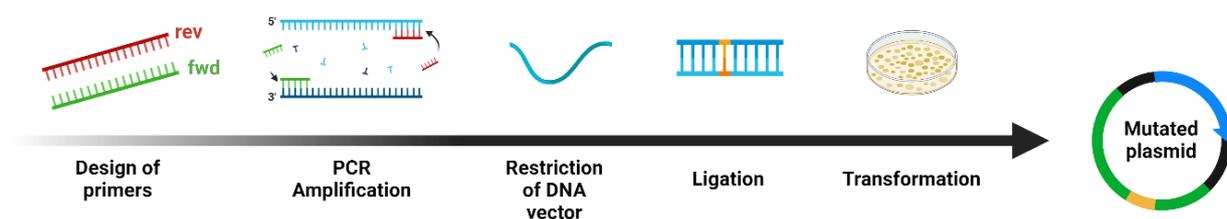


Figure 34. Présentation des différentes étapes impliquées dans la production d'un plasmide muté par technique de PCR.

La mutagenèse dirigée a également été utilisée sur les protéines fluorescentes afin de modifier leurs propriétés photophysiques^[230-232] et leur stabilité comme avec la pHluorin.^[233] Dans tous les cas, l'efficacité de cette technique requiert une connaissance sur le(s) site(s) de mutation(s) à choisir pour obtenir des résultats concluants. À l'heure actuelle, les techniques de modélisation moléculaire ou plus récemment de Machine-Learning sont des outils prometteurs dans la conception de protéines mutées *via* la stratégie de design rationnel.

De même, cette approche de mutagenèse dirigée a permis l'amélioration des performances des systèmes chimiogénétiques hybrides en jouant notamment sur la nature des interactions entre le fluorophore organique et la protéine de marquage. Initialement, la protéine HaloTag provient d'un travail de mutagenèse dirigée par mutation d'un résidu histidine dans le site actif de l'enzyme bactérienne déshalogénase *Rhodococcus* permettant de réaliser une liaison irréversible (covalente) avec des dérivés de chloroalcane.^[50]

Depuis, de nombreux travaux d'ingénierie de protéines comme ceux du groupe de Johnsson ont permis de générer de nouveaux variants de HaloTag permettant d'améliorer considérablement l'intensité de fluorescence des fluorophores de type rhodamines au sein de la poche hydrophobe de la protéine.^[211] Plus récemment, l'intensité de fluorescence ainsi que la vitesse de marquage de certains RMFs ont également été améliorées par mutagenèse dirigée de la protéine HaloTag.^[162,209]

I.2.2. Permutations circulaires

L'obtention de variants ayant des propriétés différentes peut également être réalisée par la technique de permutation circulaire. Initialement utilisées pour étudier le repliement des protéines, les permutations circulaires ont montré leur efficacité dans le domaine de l'ingénierie de protéines.^[234,235] Cette méthode permet notamment de générer de nouveaux variants dans le but d'augmenter une activité catalytique, une affinité avec un substrat ou encore de concevoir de nouveaux biosenseurs.^[77,236-239]

Cette technique consiste à réorganiser les différents domaines de la protéine, plus spécifiquement de relier l'extrémité amino-terminale et carboxy-terminale existante de la protéine *via* un lien covalent et en former de nouvelles par clivage d'une liaison peptidique existante (Figure 35). La permutation circulaire implique uniquement la réorganisation de l'ordre des domaines de la protéine et donc de sa structure tertiaire, et non leur substitution comme c'est le cas en mutagenèse dirigée. L'émergence d'une protéine nouvelle par le réarrangement de ses différents domaines est un processus qui a joué un rôle déterminant au cours de l'évolution.^[240]

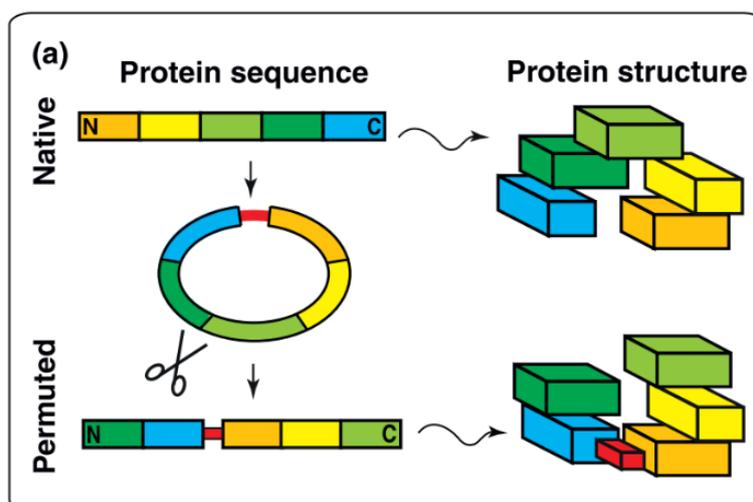


Figure 35. Principe de réorganisation de la séquence ADN d'une protéine par permutation circulaire.

Adapté de Yu et *al.*^[235]

Dans le cadre des protéines fluorescentes, la permutation circulaire a permis de générer de nouveaux variants avec des propriétés biophysiques différentes.^[77,241] Par

exemple, les protéines fluorescentes cpEGFP, cpECFP et cpEYFP présentent des spectres d'émission de fluorescence similaires aux protéines natives mais avec des valeurs de pK_a plus élevées.

La permutation circulaire a également permis d'étendre la palette des biosenseurs fluorescents basés sur des protéines fluorescentes.^[242] Contrairement aux protéines fluorescentes qui ont une structure assez rigide empêchant alors le chromophore d'avoir une sensibilité vis-à-vis de son environnement, les protéines fluorescentes permutes circulairement peuvent présenter de nouvelles extrémités proches du chromophore (sélectionnées par design rationnel) leur conférant une plus grande mobilité et une plus grande labilité de leurs propriétés spectrales. La création de biosenseurs à partir de protéines fluorescentes permutes consiste généralement à intégrer la protéine permutee dans une région flexible d'un domaine senseur ou entre deux domaines pouvant interagir ensemble sous certaines conditions.^[242] Un des premiers biosenseurs basés sur des protéines permutes est le senseur calcique G-CaMP.^[243] Depuis, de nouveaux biosenseurs basés sur des protéines permutes ont été développés et étudiés permettant ainsi de détecter une diversité d'analytes en milieu cellulaire.^[242]

Plus récemment, cette méthode d'ingénierie de protéines a également fait ses preuves dans le cadre de l'utilisation des protéines de marquage pour développer des biosenseurs chimiogénétiques hybrides. Le groupe de Lavis a réalisé un biosenseur calcique hybride avec la protéine HaloTag permutee circulairement (cpHaloTag).^[82] Ce senseur calcique hybride HaloCaMP s'inspire du design de G-CaMP en couplant cette fois-ci la protéine permutee cpHaloTag à une rhodamine. Un travail très similaire a été réalisé par le groupe de Zhu en utilisant cette fois-ci la protéine de marquage SNAP_f et un RMF (BG-F485) avec le même système de détection calcique.^[149] Ces premiers travaux d'ingénierie de protéines appliqués à HaloTag et SNAP-tag mettent en évidence l'attractivité de cette approche d'ingénierie de protéines pour la conception de nouveaux senseurs.

Pour conclure, le **design rationnel** est une stratégie de choix pour améliorer les performances d'un système hybride en ciblant beaucoup plus rapidement et spécifiquement les résidus à modifier, permettant d'améliorer efficacement les interactions entre le fluorophore synthétique et la protéine. Les deux méthodes de **mutagenèse dirigée** et de **permutation circulaire** ont des caractéristiques

différentes: dans un cas la mutation ciblée d'un ou plusieurs acides aminés et dans l'autre cas, la modification de l'agencement des domaines fonctionnels de la protéine et donc de la structure tertiaire.

Mon principal objectif dans ce projet a reposé sur la production de mutants de la protéine de marquage HaloTag par mutagenèse dirigée afin d'améliorer la brillance et la vitesse de formation des complexes RMF/HaloTag. J'ai également participé à la caractérisation de ces nouvelles sondes chimiogénétiques hybrides *in vitro*. La suite de ce chapitre regroupe la publication qui a été obtenue sur ces travaux combinant ingénierie de protéine et ingénierie de RMFs ainsi que les résultats complémentaires correspondant aux travaux non publiés que j'ai également réalisés dans le cadre de ce projet.

II. « Design of bright chemogenetic reporters based on the combined engineering of fluorogenic molecular rotors and of the HaloTag protein »

Justine Coïs,^{1,2} Sylvestre P. J. T. Bachollet,¹ Louis Sanchez,¹ Nicolas Pietrancosta,^{1,2} Vincent Vialou,² Jean-Maurice Mallet,¹ Blaise Dumat^{1*}

¹ Laboratoire des biomolécules, LBM, Département de chimie, École normale supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.

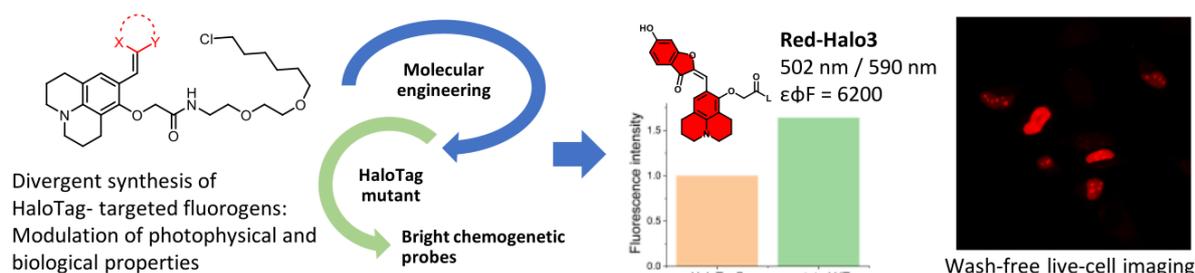
² Laboratoire Neurosciences Paris Seine, Sorbonne Université, CNRS, INSERM, 75005 Paris, France.

* Corresponding author: blaise.dumat@ens.psl.eu

Abstract

The combination of fluorogenic probes (fluorogens) and self-labeling protein tags represent a promising tool for imaging biological processes with high specificity but it requires the adequation between the fluorogen and its target to ensure a good activation of its fluorescence. In this work, we report a strategy to develop molecular rotors that specifically target HaloTag with a strong enhancement of their fluorescence. The divergent design facilitates the diversification of the structures to tune the photophysical and cellular properties. Four bright fluorogens with emissions ranging from green to red were identified and applied in wash-free live cell imaging experiments with good contrast and selectivity. A HaloTag mutant adapted from previous literature reports was also tested and shown to further improve the brightness and reaction rate of the most promising fluorogen of the series both in vitro and in cells. This work opens new possibilities to develop bright chemogenetic reporters with diverse photophysical and biological properties by exploring a potentially large chemical space of simple dipolar fluorophores in combination with protein engineering.

TOC graphic



II.1. Introduction

Chemogenetic reporters associating a genetically-encoded self-labeling protein (SLP) tag and fluorogenic small molecular probes (fluorogens) are a versatile alternative to the use of fluorescent proteins. The genetic encoding of the SLP-tag combined with the fluorogenicity of the probe ensures a high signal specificity, since the excess of fluorogen will remain undetected and, by simply changing the fluorophore, it is possible to tune the color of the reporter, avoiding the cloning and possible optimization of a new recombinant protein. The most commonly used SLP tags are the covalent HaloTag and SNAP-tag but several alternatives exist, including non-covalent strategies.^[48,50,89,244] As for the fluorescent ligands, most of the current research revolves around the rhodamine scaffold. Rhodamine-based fluorogens exploit a reversible spirocyclization reaction: dark aggregated rhodamines in the spirocyclic form open and become fluorescent upon reaction with HaloTag or SNAP-tag.^[137,138] First limited to silarhodamines, the strategy has been adapted to various rhodamine scaffolds with diverse emission wavelengths and to cyanine dyes.^[133,245,246] This approach benefits from the brightness and photostability of the rhodamine or cyanine derivatives but it relies on complex multistep synthetic pathways sometimes involving costly metal-catalyzed couplings.^[31,135,247] An alternative is to use environmentally-sensitive probes, such as molecular rotors.^[147,187] They are dipolar flexible structures that are not fluorescent in the free state due to non-radiative vibrational and rotational decay, but they become fluorescent when their structure is constrained in a viscous environment or when bound to biomacromolecules such as nucleic acids, proteins or membranes.^[151,188,190,248] Small dipolar structures, such as the ones described herein,

generally display moderate molar absorption coefficients and fluorescence quantum yields, especially compared to rhodamines or cyanines, but they constitute a valuable alternative with a different activation mechanism and present some undeniable advantages such as their accessibility in straightforward 2 or 3 synthetic steps and their tunability. Molecular rotors indeed encompass a wide chemical space of flexible dipolar structures and their absorption and emission wavelength can be easily tuned by changing the nature of the electron donating or withdrawing groups, or the length of electronic conjugation.^[150,187,188] Molecular rotor fluorogens have been successfully developed for SNAP-tag,^[149,152] but HaloTag represents a more promising target. It has a faster reaction rate and its chloroalkane ligand is chemically simpler and more lipophilic, which facilitates the synthesis of the conjugates and improves their cell penetration. We have recently started to explore the development of fluorogenic molecular rotors targeting HaloTag and we have obtained a palette of fluorogens (Halo probes) covering the green to near infra-red (NIR) range that enable wash-free imaging of proteins in live cells.^[150,154] However, the fluorescence brightness after reaction with HaloTag and the contrast in live cell imaging experiment strongly depend on the structure (Figure 36A and Table S1). Molecular modeling and experimental comparison with their properties in glycerol showed that their fluorescence is only partially activated in the HaloTag protein that seems to lack a defined hydrophobic pocket where the Halo probes could bind and be conformationally locked.^[150,154] Furthermore, the reaction rates observed are in the range of $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, which is fast but still several orders of magnitude lower than the reaction rate of tetramethylrhodamine (Halo-TMR) with HaloTag7 ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[140] Overall, our previous studies led us to the conclusion that (i) the properties of our Halo probes are structure-dependent and require a careful balance between the photophysical and biological properties to avoid non-specific activation and (ii) HaloTag is not perfectly fitted for molecular rotors with a partial fluorescence activation and moderate reaction rates.

HaloTag was indeed engineered around the rhodamine molecular scaffold up to the last commercial iteration HaloTag7.^[50,249] Additional engineering for rhodamine-based probes has been recently reported by the Johnson group to further improve the properties and enable lifetime multiplexing.^[211] In addition to rhodamines, HaloTag7 is active with a variety of molecules and probes but they do not work as well, displaying in particular lower reaction rates.^[153,209,250,251] Recent reports have however shown that

it is possible to engineer the HaloTag protein via rational design or directed evolution to optimize its interaction with scaffolds other than rhodamines such as a styrylpyridinium or benzothiadiazole dyes.^[209,252,253]

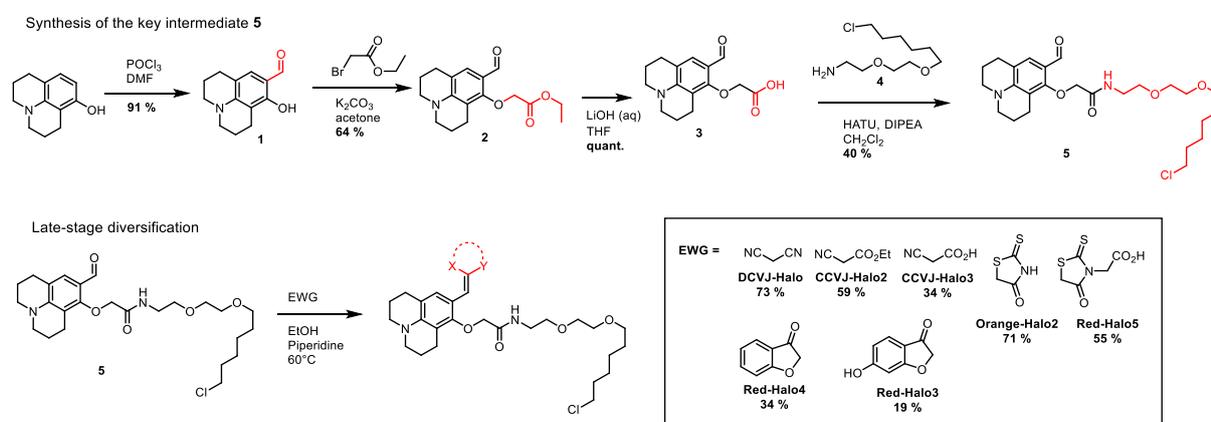
In this work we have thus combined a new molecular rotor design strategy with the engineering of a HaloTag mutant to obtain bright chemogenetic reporters. Seven new fluorogens were obtained using a divergent synthesis that facilitates the structural diversification and enabled both the tuning of the photophysical properties and the development of cell-excluded probes dedicated to membrane protein imaging. The probes were tested with HaloTag7 and with a HaloTag mutant mHT containing two mutations selected from previous literature reports. Their characterization *in vitro* and in live cells led to the identification of four probes with enhanced fluorescence properties, spanning the green to red emission range. They have been used to image intracellular and membrane proteins with high contrast following simple wash-free protocols. The properties of the brightest probe of the series (brightness and reaction rate) are improved in the presence of mutant mHT both *in vitro* and in cellular imaging experiments.

II.2. Results and discussion

II.2.1. Design of the fluorogens

The previous design strategy was based on a linear construction where the HaloTag linker was coupled to the electron-withdrawing group of the molecular rotors (Figure 36A). This linear construction was inspired by the work of the Kool group on styrylpyridinium structures that are also molecular rotors. Upon reaction with HaloTag, these so-called “channel dyes” are locked in the narrow binding channel of the protein, leading to an increase of their fluorescence.^[153] In the case of our previously reported Halo probes, molecular modeling calculations have shown that they do not enter the HaloTag binding channel, possibly due to their bent shape and bulkier electron-withdrawing groups, and have only evidenced few interactions with amino-acids on the surface of the protein. ^[150,154] Nonetheless, these surface interactions proved sufficient to activate the fluorescence of the probes, albeit with varying efficacy depending on their structures. Since the properties are very structure-dependent and difficult to predict by theoretical calculations, we have developed a new

design that facilitates the structural diversification. Since the objective is not to enter the HaloTag binding channel, we have implemented a new branched design where the HaloTag linker is attached directly onto the julolidine moiety. The julolidine moiety was chosen since it increases the fluorescence quantum yield by preventing the formation of a twisted intramolecular charge transfer (TICT) state around the aniline bond.^[154] It is also a stronger electron donor and induces a bathochromic shift in emission and absorption compared to a dimethylaminobenzyl group. This strategy allows a late-stage diversification in a single step of aldol condensation (Knoevenagel reaction) from one key intermediate 5 (Scheme 3, Figure 36B). The latter can be obtained in good yield in four synthetic steps, starting from 8-hydroxyjulolidine. Whenever two diastereoisomers are possible, only one was isolated and the selectivity is governed by the steric hindrance as shown previously for comparable structures.^[208,254,255] A variety of electron-withdrawing groups (EWGs) were tested, including some that were already found in the first generation of Halo probes, such as malononitrile (yielding derivatives of the classical CCVJ and DCVJ rotors,^[254] **CCVJ-Halo2** and **DCVJ-Halo**) or rhodanine (**Orange-Halo2**). The new design allowed us to introduce a free carboxylic acid function to develop cell-impermeant probes (**CCVJ-Halo3** & **Red-Halo5**) as well as new EWGs based on the benzofuranone scaffold to yield aurone derivatives (**Red-Halo3&4**). Aurones are natural pigments and have been reported to be fluorescent, but this scaffold remains poorly explored in fluorogenic probe design.^[255]



Scheme 3. Synthesis of the Halo probes.

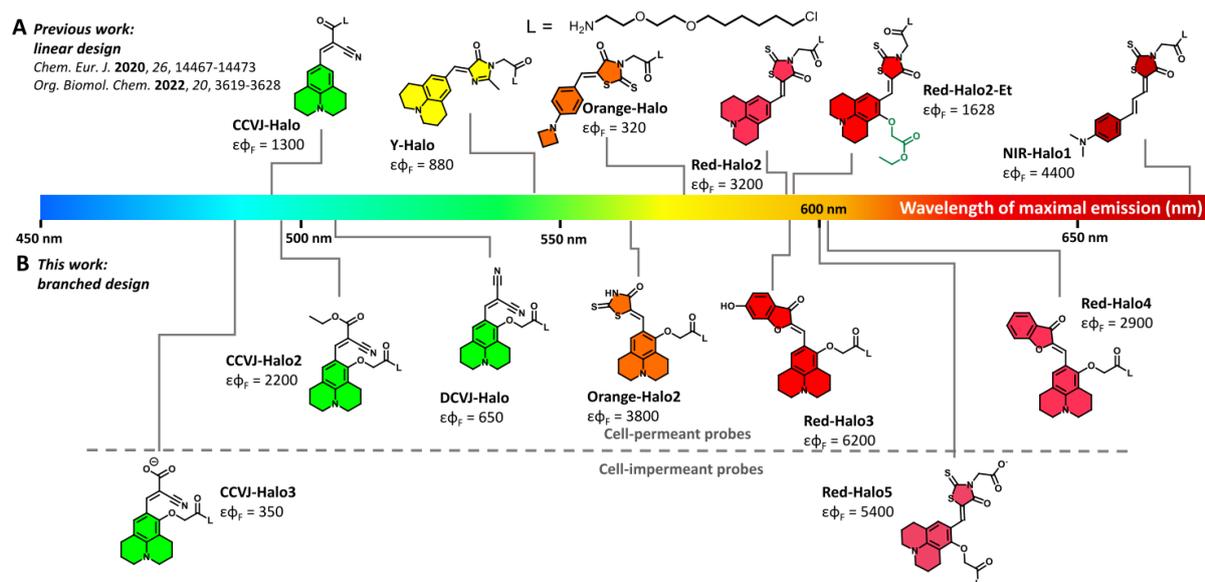


Figure 36. Design of the Halo probes.

Structures of the previously (A) and newly (B) developed Halo probes with the fluorescence brightness of their complex with the HaloTag protein. Probes are positioned on the visible spectrum according to their maximum emission wavelength.

The molecular rotors on which are built the new Halo probes have been previously studied but the presence of an unusual alkoxy group in the ortho position of the rotating bond may influence their property. As a preliminary evaluation, we have verified that they are indeed viscosity-sensitive fluorophores by comparing their properties in PBS and in PBS with 80 %w/v glycerol (Figure S1&S2). All probes are soluble in PBS at least until 10 μ M and they exhibit a very weak emission. Addition of 80% glycerol results in a slight hyperchromicity and a large increase of fluorescence showing that the HaloTag-targeted molecular rotors retain the viscosity-sensitive emission of their parent structures. It is worth noting also that **Orange-Halo2** and **Red-Halo3** have labile protons on their electron-withdrawing moieties and display pH-sensitive emissions with an increase of fluorescence from acidic to neutral pH and a pK_a of 7.4 and 7.1 respectively (Scheme S1, Figure S3). This equilibrium overlaps with a second one at very acidic pH due to the protonation of the julolidine amine that is common to all probes but happens outside of the relevant biological pH range. Before characterizing the probes in presence of HaloTag, we also evaluated them in live confocal microscopy of wild-type HeLa cells to assess their potential as fluorogenic probes. Indeed, our experience with the previous generation of Halo probes showed

that, despite their high fluorescence enhancements *in vitro*, some probes are prone to non-specific activation in hydrophobic organelles which can significantly reduce the contrast in cellular imaging.^[150] The non-specific signal of the newly developed probes was thus compared with the previously reported Red-Halo2 and Red-Halo2-Et or with CCVJ-Halo depending on their excitation wavelength (Figure S4). **CCVJ-Halo2** and **DCVJ-Halo** give a weak cytoplasmic signal, as was previously observed for CCVJ-Halo and **Orange-Halo2** similarly yields a dim signal on par with that of Red-Halo2-Et which was specifically developed to minimize the non-specific signal of Red-Halo2. The aurone derivatives **Red-Halo3** and in particular **Red-Halo4** give relatively high cytoplasmic signals and, regardless of its photophysical properties, the latter is therefore not expected to be a good fluorogen for wash-free live cell imaging. This first characterization in cells also showed that **CCVJ-Halo3** and **Red-Halo5**, as expected from the presence of a negative charge, likely do not enter cells since no nonspecific signal was observed (data not shown).

II.2.2. Characterization in HaloTag7

The properties of the probes were measured in presence of the HaloTag7 protein produced in our laboratory including, for comparison purposes, those of the previously reported probes that were initially tested with a commercial GST-HaloTag protein. Measurements for the first generation of probes are summarized in Table S1 and Figure 1 and gave significantly different results with typically higher quantum yields than previously reported.^[150,154] The second generation of Halo probes cover the green to red emission range (Figure 37A&B, Table 4) and, as was observed with glycerol, their fluorescence can be activated by reaction with HaloTag with up to 84-fold fluorescence enhancements (Figure 37C). The two probes bearing a free carboxylate function, **CCVJ-Halo3** and **Red-Halo5**, display significantly lower increases of fluorescence due to their stronger residual fluorescence in water that can be attributed to their higher hydrophilicity and also to the low brightness in the case of **CCVJ-Halo3**.

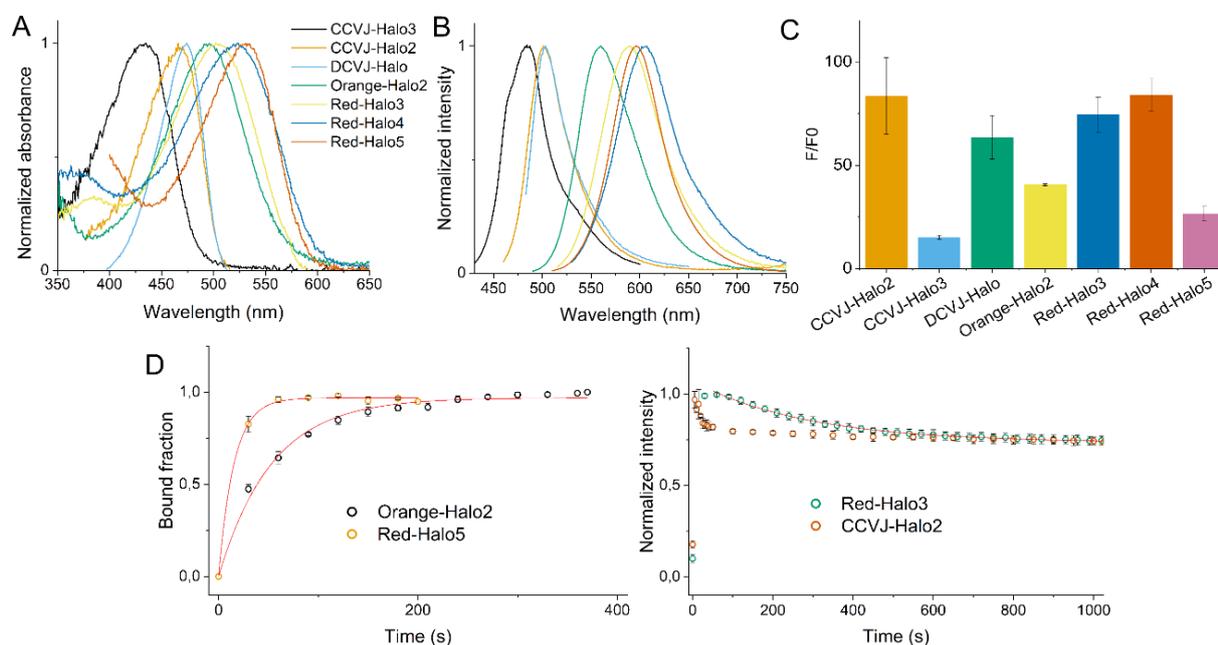


Figure 37. Characterization of the Halo probes in HaloTag7.

(A) Absorption and (B) fluorescence spectra of the probes in presence of HaloTag7. (C) Fluorescence enhancement factor F/F_0 in presence of HaloTag7. F: fluorescence of the HaloTag7 complex, F_0 : fluorescence of the free probes in PBS. Conditions: 1 μ M of probe in PBS with or without 1.5 eq of HaloTag7 protein. Average of two measurements (D) Kinetics of the reaction between the Halo probes and HaloTag7. Data was fitted to a monoexponential function except for CCVJ-Halo2. Average of two measurements.

As we observed in our previous studies, the efficiency of the HaloTag fluorescence activation is highly structure-dependent with unpredictable effects (Figure 36, Table 4). In 80 % glycerol aqueous solution all three derivatives of the CCVJ and DCVJ rotors exhibited comparable fluorescence intensities (Figure S2) but in presence of HaloTag **CCVJ-Halo3** and **DCVJ-Halo** both display a low brightness and were not further studied. The new design otherwise led to the identification of brighter probes in the green (**CCVJ-Halo2**), Orange (**orange-Halo2**) and red (**Red-Halo3**) range compared to the first generation and to a bright cell-excluded probe with a red emission (**Red-Halo5**). The benzofuranone EWG in particular yielded two of the brightest HaloTag complexes of the series with a red emission (**Red-Halo3&4**). These results confirm previous reports suggesting that the aurone scaffold is promising for the development of bright push-pull dipolar fluorophores.^[255–257] However, while **Red-Halo4** may be a good fluorogen for other applications, its high non-specific signal measured in confocal microscopy prevents its use in cellular imaging and it was not characterized in more details (see above and Figure S4). We next assessed the reaction kinetics of the four most promising probes (**CCVJ-Halo2**, **Orange-Halo2** and **Red-Halo3&5**) with HaloTag by following the increase of fluorescence intensity during the reaction in pseudo-first order conditions (20 equivalents of proteins) (Figure 37D). **Red-Halo5** and **Orange-Halo2** yield an expected increase of fluorescence that could be fitted to a monoexponential function to calculate the second order rate constants while **Red-Halo3** and **CCVJ-Halo2** yield a biphasic reaction curve. Such a behavior was already observed for Y-Halo and can be attributed to a two-step reaction mechanism where the probe first non-covalently associate to HaloTag before forming the covalent bond.^[258] In the case of **CCVJ-Halo2** the second phase is too fast to be fitted, but for **Red-Halo3** it was possible to extract the reaction rate constant corresponding to the covalent step (Table 4). The newly designed probes react faster than the previous ones with reaction rate constants one order of magnitude higher in the range of $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ except for **Red-Halo3** (Table 4 and Table S1). In the case of **CCVJ-Halo2**, even if the reaction rate constant could not be measured accurately, the reaction is essentially finished after one minute which makes it the fastest reacting probe of the two generations. The new fluorogen design thus afforded four new probes with emission in the green (**CCVJ-Halo2**), orange (**Orange-Halo2**) and red (**Red-Halo3&5**) ranges with superior photophysical properties and faster reaction rates with HaloTag compared to the first generation.

Table 4. Photophysical properties of the probes in PBS (pH 7.3) and after reaction with HaloTag7 or mHT.

Molecule	Protein	λ_{abs}	ϵ	λ_{em}	$\Delta\lambda$	ϕ_{F}	$\epsilon\phi_{\text{F}}$	Rel. bright.	F/F ₀	k_2^{b} (10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)
CCVJ-Halo2	HaloTag7	466	38800	503	37	0.056	2200	-	84	Nd
	mHT	473 ^a	-	497	24	-	-	0.60	-	-
	PBS	459	21000	498	-	-	-	-	-	-
CCVJ-Halo3	HaloTag7	419	14000	481	62	0.025	350	-	15	-
	PBS	432	13000	493	-	-	-	-	-	-
DCVJ-Halo	HaloTag7	474	31100	503	29	0.021	650	-	64	-
	PBS	469	19000	496	-	-	-	-	-	-
Orange-Halo2	HaloTag7	496	18200	560	64	0.21	3800	-	41	9.4 ± 0.40
	mHT	502 ^a	-	575	73	-	-	0.54	-	-
	PBS	487	20000	590	-	-	-	-	-	-
Red-Halo3	HaloTag7	502	24600	590	88	0.25	6200	-	75	1.7 ± 0.022
	mHT	500 ^a	-	582	82	-	-	1.6	108	17 ± 3.0
	PBS	475	22000	611	-	-	-	-	-	-
Red-Halo4	HaloTag7	523	19500	605	82	0.15	2900	-	84	-
	PBS	493	12200	613	-	-	-	-	-	-
Red-Halo5	HaloTag7	532	34000	600	68	0.16	5400	-	27	33 ± 6.0
	mHT	531 ^a	-	582	51	-	-	0.98	-	-
	PBS	523	32000	608	-	-	-	-	-	-

λ_{abs} : maximum absorption wavelength (nm), ϵ : molar absorption coefficient (M⁻¹cm⁻¹), λ_{em} : maximum emission wavelength (nm), $\Delta\lambda$: Stokes-shift in nm, ϕ_{F} : fluorescence quantum yield, $\epsilon\phi_{\text{F}}$: brightness, rel. bright.: brightness in mHT relative to HaloTag7, F/F₀: ratio of the fluorescence in the protein with that in PBS, k_2 : second order reaction rate constant.

^aMeasured on the excitation spectrum. ^bAverage of two independent measurements. **Nd**: not determined.

II.2.3. Characterization in a HaloTag mutant

In addition to designing enhanced fluorogens, we also sought to engineer the partner protein to improve the interaction of the two parts of our fluorescent chemogenetic reporters. To that end, we based ourselves on two previous literature reports of HaloTag engineering. Miro-Vinyals *et al.* engineered HaloTag for a styrylpyridinium “channel dye” by rational design, ending up with a mutant, HaloTag-SP5, with three mutations M175Y/V245A/L271D that shows increased brightness and reaction rate.^[162] The effect of the L271D mutation was attributed to an electrostatic interaction with the pyridinium and seems very specific to this structure, but the mutation of methionine 175 was also previously reported to increase the reaction rate of HaloTag with unrelated dansyl derivatives.^[209] In both papers, the substitution of M175 is shown to open more widely the HaloTag binding channel and speed up the reaction, which suggests that this mutation may work well with a variety of structures. According to a recent preprint, the directed evolution of HaloTag7 to optimize its interaction with a benzothiadiazole dye also led to the identification of mutation V245A, which also supports the choice of this mutation as a generally applicable one.^[253] Given the similar viscosity-based activation mechanism that our Halo probe share with the “channel dye”, we have thus chosen, as a starting point, to keep the two mutations M175Y/V245A to design a HaloTag mutant mHT. The brightest probes in the two generations of Halo dyes were tested in presence of mHT and their fluorescence compared to that observed with HaloTag7 (Figure 38, Figure S5).

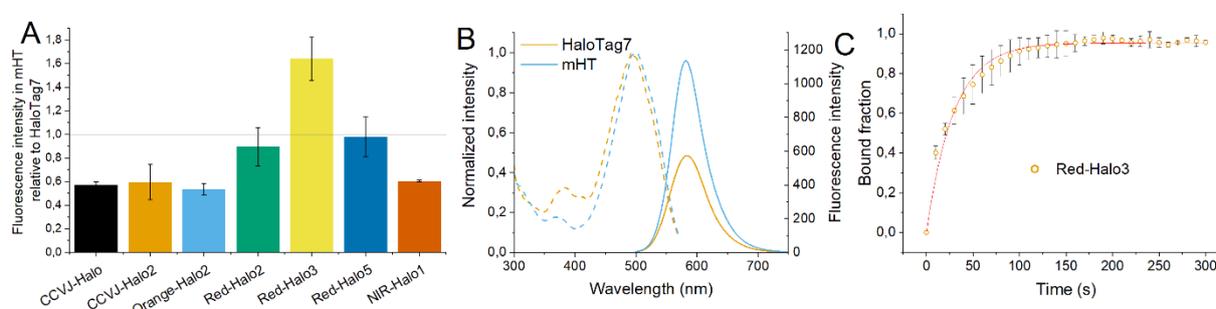


Figure 38. Characterization of the Halo probes in mHT.

(A) Fluorescence of the fluorogens in presence of mHT relative to their fluorescence in presence of HaloTag7. Average of two measurements. (B) Excitation spectra (normalized, dashed lines) and emission spectra (full lines) of Red-Halo3 in HaloTag7 and mHT. (C) Kinetics of the reaction between Red-Halo3 and mHT. Data was fitted to a monoexponential function. Average of two measurements.

The mHT mutant activates the fluorescence of our Halo probes, giving comparable spectral properties than in HaloTag7 with only minor shifts in excitation or emission wavelength observed for **Orange-Halo2** and **Red-Halo5** (Table 4, Figure 38 and Figure S5). However, the brightnesses are generally lower than in HaloTag7 with one exception, as **Red-Halo3** exhibits a 64 % increase of fluorescence (Figure 38A). We next monitored the reaction kinetics of **Red-Halo3** with mHT and, in contrast to HaloTag7, observed a classical growing curve (Figure 38C, Figure 37D). Even if this difference in behavior does not facilitate the comparison, the measured reaction rate constant of **Red-Halo3** with mHT is one order of magnitude higher than in HaloTag7 (Table 4). To elucidate the origin of the improved brightness of **Red-Halo3** in mHT, we performed 10 ns molecular dynamics on its complexes with HaloTag7 and mHT. The results show that **Red-Halo3** forms a more stable complex with mHT compared to HaloTag7 with a strong π - π interaction between the benzofuranone moiety and the mutated tyrosine (Figure 39A&B). The analysis of the root mean square fluctuations (RMSF) of the atoms of the fluorophore moiety and of the HaloTag linker show that both part are less mobile in the mutant, consistent with a better immobilization of the rotor and thus a better fluorescence activation. RMSF analysis of the binding pocket also show a lower mobility during the dynamics, consistent with a more stable mHT/Red-Halo3 complex. The two mutations appear to create a tighter binding pocket since, counterintuitively, the smaller alanine 245 allows the α helix containing the tyrosine 175 to fold more tightly by occupying the freed space, creating more constraints on the positioning of Red-Halo3, particularly on the HaloTag linker part (Figure 39D and Figure S6). These results confirm that these two mutations play a key role in the reaction with HaloTag, even though they are not as generally applicable as expected.

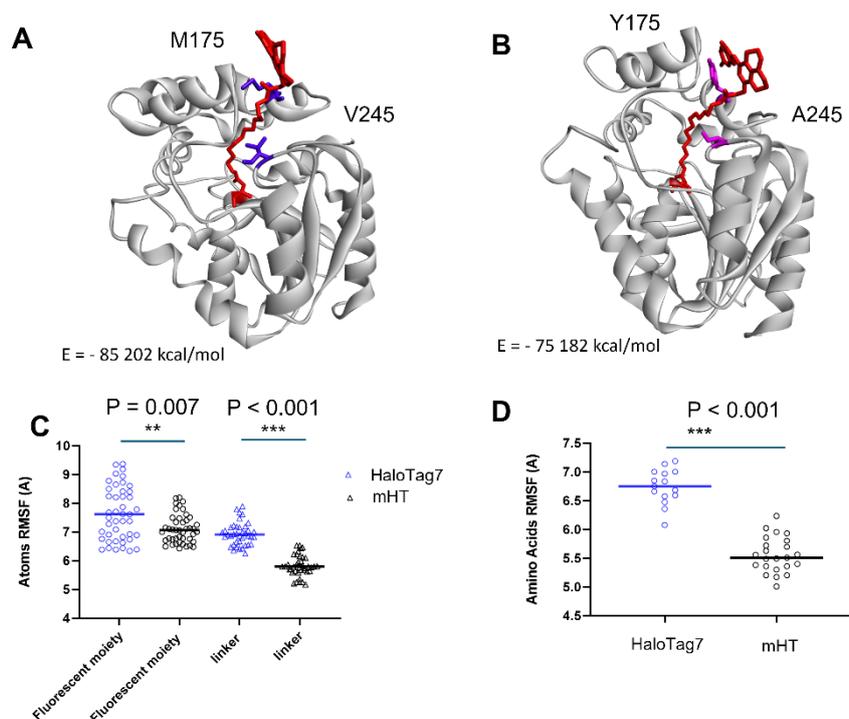


Figure 39. Molecular dynamics of HaloTag7 and mHT complexed with Red-Halo3.

Representative conformations and associated energies of **Red-Halo3** (in red) in HaloTag7 (**A**) and mHT (**B**), mutated residues are highlighted in blue and purple. (**C**) root-mean square fluctuations (RMSF) of the atoms in the fluorophore and HaloTag linker parts of **Red-Halo3**. (**D**) RMSF of the amino-acids in the binding pocket (within 4 Å distance to **Red-Halo3**).

II.3. Live cell microscopy

We next assessed the performances of the four most promising probes in confocal imaging of live-cell transfected with HaloTag7 or mHT proteins. To evaluate the imaging contrast, we first imaged live HeLa cells expressing a HaloTag7-NLS protein to measure the ratio S/NS between the specific signal S in the nuclei and the non-specific cytoplasmic signal NS (Figure 40A). To compensate for variations in protein expression levels, we analyzed a large number of cells (> 100 cells for each probe) and the distribution of the results is given on figure 40B. The three probes efficiently stain the nuclei of transfected cells, giving bright and contrasted images in wash-free imaging protocols. **CCVJ-Halo2**, that showed very little non-specific activation in wild-type cells exhibits a very good selectivity with a mean S/NS ratio of 10. **Red-Halo3** and **Orange-Halo2** exhibit comparable contrast (mean $S/NS = 7$) showing that the brightness of **Red-Halo3** partially compensate for its more important nonspecific signal (see above and Figure S1). The probes also proved to be efficient in staining actin as well as cytoplasmic organelles demonstrated here with the golgi apparatus (Figure 40C&D). To evidence the importance of the contrast, we also tested **Red-Halo4** in wash-free imaging and the results confirm that, despite its good *in vitro* properties, it is not suitable for wash-free imaging due to a strong off-target activation (Figure S3). It is worth noting that for cytoplasmic proteins the nonspecific signal will inevitably interfere more strongly than for the nuclear labeling and the success of wash-free imaging may depend on the nature of the protein and on its expression level.

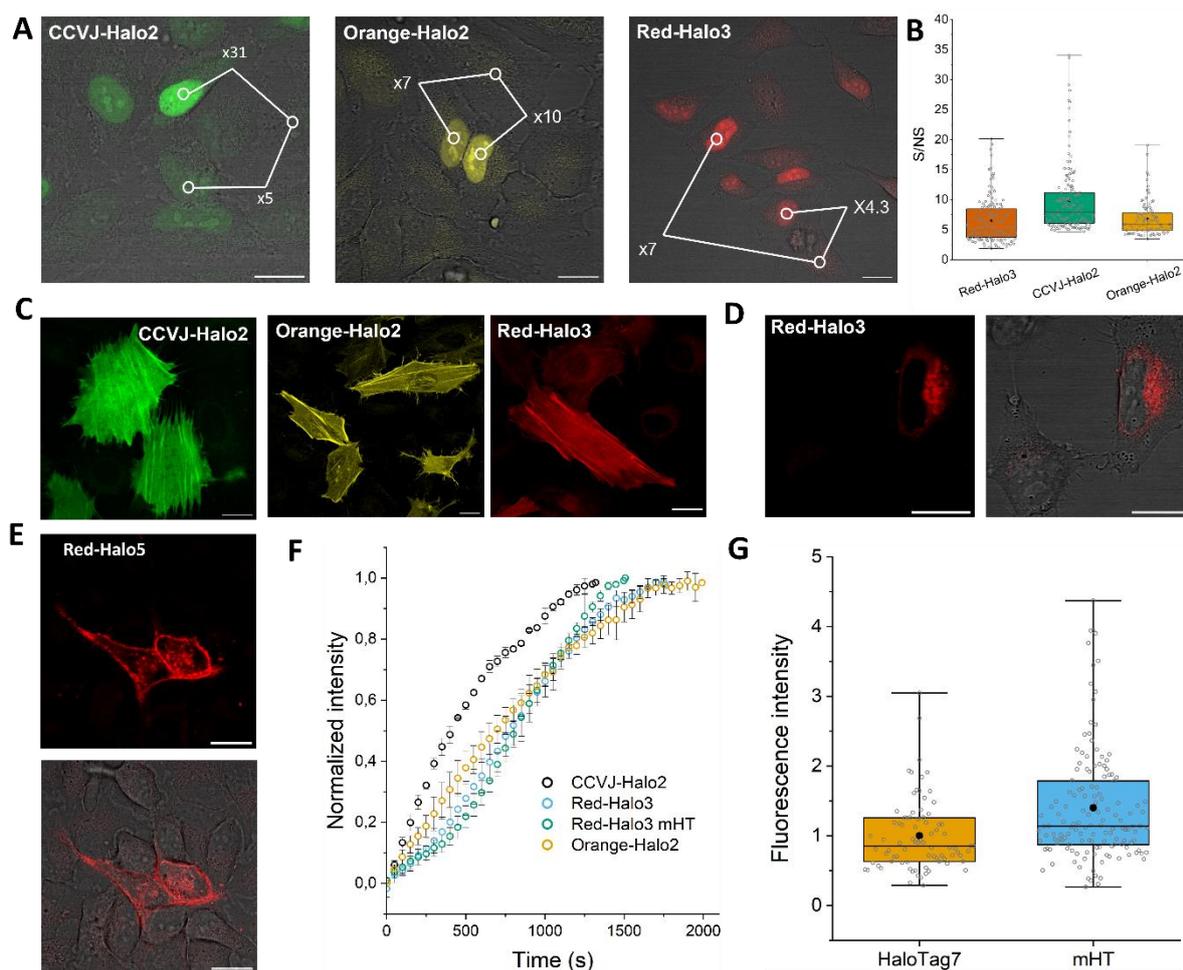


Figure 40. Properties of the Halo probes in live-cell imaging.

(A) Merged confocal microscopy and brightfield images of live HeLa transiently transfected with HaloTag7-NLS and incubated with 0.5 μM of Halo probe in wash-free conditions. On each panel is shown the contrast ratio between the nuclear and cytoplasmic signal for two cells. (B) Distribution of the contrast ratios measured for Red-Halo3 (N = 147), CCVJ-Halo2 (N = 158) and Orange-Halo2 (N = 99). Box and whiskers plot of the S/NS ratio measured for N cells in three independent experiments. S: specific nuclear signal and NS: non specific cytoplasmic signal (C) Live-cell imaging of HeLa cells transiently transfected with HaloTag-LifeAct and stained with 0.5 μM of Halo probe as indicated on each panel. (D) Live-cell imaging of HeLa cells transiently transfected with Golgi-HaloTag7 and stained with 0.5 μM of Red-Halo3. (*left*) fluorescence and (*right*) merged fluorescence and brightfield images. (E) Live-cell imaging of HeLa cells transiently transfected with EGFR-HaloTag7 and stained with 0.5 μM of Red-Halo5. (*top*) fluorescence and (*bottom*) merged fluorescence and brightfield images. (F) Labeling kinetics in live HeLa cells transfected with HaloTag-NLS or mHT-NLS where indicated. Fluorescence intensity measured every 10 s after addition of the probes in the nucleus of N cells from two independent experiments. CCVJ-Halo2 (N = 3), Orange-Halo2 (N = 4), Red-Halo3 (N = 5), Red-Halo3@mHT (N = 5). (G) Relative fluorescence intensity of live HeLa cells transfected with either HaloTag7-NLS (N = 82) or mHT-NLS (N = 142). Mean fluorescence intensity measured in the nuclei of N cells from two independent experiments and normalized to the mean value of HaloTag7-NLS.

Red-Halo5 with its free carboxylic function did not cross the cell membrane and no signal was measured in HeLa cells either wild-type or transfected with intracellular proteins (data not shown). It could however efficiently be used to label the EGFR-HaloTag7 membrane protein with excellent selectivity (Figure 40E). Such cell-impermeant probes are preferable for staining membrane proteins since they avoid nonspecific cytoplasmic signal and any intracellular signal can safely be attributed to membrane recycling and endosome formation. The labeling kinetics of the probes were assessed in HeLa cells transfected with HaloTag7-NLS (Figure 40F). In agreement with the reaction rate constants measured *in vitro*, **CCVJ-Halo2** reacts the fastest ($t_{1/2} = 6.8$ min) followed by **Orange-Halo2** ($t_{1/2} = 11.5$ min). The labeling curve of **Red-Halo3** shows two stages, with an initial lag phase followed by a more rapid increase of fluorescence. Our hypothesis is that **Red-Halo3** has a higher affinity for cytoplasmic organelles than its counterparts, as evidenced by the higher cytoplasmic signal measured in wild-type cells, which temporarily delays its reaction with HaloTag and explains the initial lag phase. Finally we tested the performance of the mHT mutant in cellular imaging by targeting a mHT-NLS protein. All three cell-permeant probes exhibit a similar nuclear labeling as observed with HaloTag7-NLS, showing that the mHT protein is active in cells (Figure S4). In agreement with the *in vitro* measurements, **Red-Halo3** is brighter in cells transfected with mHT-NLS with a 40 % increase on average (Figure 40G). No such increase of brightness is observed for **CCVJ-Halo2** or **Orange-Halo2** with mHT (Figure S5), which confirms that this improvement is indeed linked to the formation of a brighter complex between **Red-Halo3** and mHT and not for instance to a higher expression level of mHT in cells. The labeling kinetics of mHT with **Red-Halo3** in cells is similar to that of HaloTag7: although it seems that, after the lag phase, the reaction is slightly faster with mHT, the difference does not appear significant (Figure 40F).

The newly developed Halo probes are efficient for imaging HaloTag fusion proteins in live cells, yielding bright and contrasted images in wash-free conditions. They penetrate cells and react with HaloTag rapidly with labeling times that correlate well with the reaction rates measured *in vitro*. Cellular imaging experiments also confirm the improvement of the brightness of **Red-Halo3** in the mHT mutant.

II.4. Conclusion and perspectives

The molecular design strategy described herein enabled the enhancement of the photophysical properties and reaction rates of the Halo fluorogens and led to the discovery of three fluorogenic probes that can be used in combination with HaloTag to replace green- (**CCVJ-Halo2**), orange- (**Orange-Halo2**) or red-emitting (**Red-Halo3**) fluorescent proteins. Cell-excluded **Red-Halo5** was also developed for the specific labeling of membrane proteins. In cells expressing HaloTag fusion proteins, they yield bright and contrasted images with the simplest imaging protocol: add the probe and image after a 15 to 30 minutes incubation time. A first attempt at engineering HaloTag7 by selecting, from previous literature reports, two mutations that seemed applicable to our molecular rotors led to a mutant mHT that improves the brightness and reaction rate of **Red-Halo3** both *in vitro* and in cells, opening new possibilities to further improve our hybrid fluorescent reporters. This work shows that it is possible to develop bright HaloTag-targeted fluorogens based on simple molecular rotor structures. However, the large variability of the photophysical and cellular properties observed even for molecules with only minor structural differences such as **Red-Halo3&4** makes it difficult to establish clear guidelines for their future design. We anticipate that simple design strategies, such as the one described here, enable the rapid exploration of a large chemical space and will help identify adequate probes. This molecular chemistry approach should also be coupled to more powerful protein engineering techniques such as directed evolution to optimize the interaction of the two partners.

III. Résultats complémentaires

Dans cette partie sont présentés les résultats complémentaires obtenus sur ce projet. Plus précisément, d'autres mutants de HaloTag7 ont été développés en utilisant deux stratégies de **design rationnel** différentes: la mutagenèse dirigée et les permutations circulaires. La caractérisation des RMFs précédents avec ces variants est présentée ici.

III.1. Production de mutants de HaloTag par mutagenèse dirigée

III.1.1. Clonage de HaloTag7 et de ses variants

La volonté de combiner ingénierie de molécules et ingénierie de protéines a mené le projet vers la conception de nouveaux mutants de HaloTag7. En particulier, les travaux du groupe de Deliz Liang sur le développement de variants de HaloTag7 optimisés pour des RMFs de type styrylpyridium ont guidé nos choix concernant la méthode d'ingénierie à entreprendre.^[252] Il s'agit en effet du premier travail d'ingénierie de protéines réalisé dans l'équipe sur HaloTag7 afin d'optimiser les interactions entre la protéine et les RMFs synthétisés. Les résultats de ce papier identifient un mutant prometteur, HT-SP5, comprenant les trois mutations **M174Y/V245A/L271D**, présentant la cinétique de marquage la plus rapide ($\times 42$ par rapport à HaloTag7) combinée à une amélioration significative de la fluorescence mesurée en cellules HeLa (Figure 41). La troisième mutation L271D améliore les interactions électrostatiques entre le styrylpyridium chargé positivement et la protéine HaloTag. Étant donné que les RMFs développés dans l'équipe sont majoritairement neutres, seules les deux mutations **M174Y** et **V245A** ont été sélectionnées pour la suite du projet. L'efficacité de ces deux mutations sur les RMFs peut s'expliquer par leur position au sein de la protéine HaloTag7. En effet, la méthionine à la position M175 se situe plutôt à l'extérieur du canal de la protéine et sa substitution par une tyrosine (175Y) plus encombrée avec son cycle phénol pourrait aider à bloquer la conformation du fluorophore après l'étape de liaison covalente avec HaloTag. La valine se situe quant à elle à l'intérieur de ce canal (V245) et sa substitution par l'alanine (245A) moins encombrée peut améliorer l'entrée ou modifier l'orientation du RMF dans la poche de la protéine HaloTag conduisant ainsi à un meilleur blocage de sa conformation et donc à une augmentation de l'intensité de fluorescence observée.

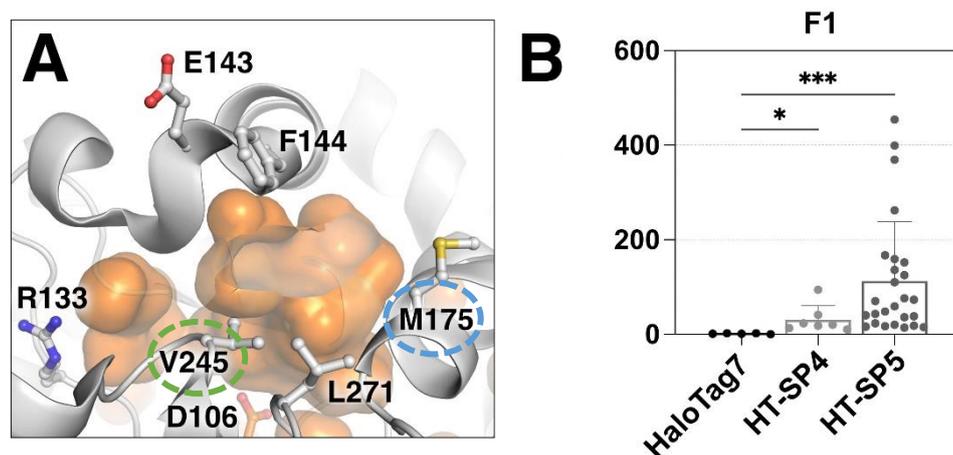


Figure 41. Sélection du meilleur variant de HaloTag7 par design rationnel.

(A) Sites des mutations sélectionnés sur données cristallographiques (PDB : 5VNP) de la protéine HaloTag7 : méthionine à la position 175 (entourée en bleu) et valine à la position 245 (entourée en vert). (B) Comparaison de l'intensité de fluorescence de cellules HeLa transfectées exprimant les protéines HaloTag7, HT-SP4 et HT-SP5 incubées avec le RMF d'étude F1 (styrilpyridium). Figure adaptée de Miro-Vinyals et al.^[162]

Au sein du laboratoire de biologie, nous avons produit trois plasmides exprimant les variants de HaloTag7: HaloTag **M175Y**, HaloTag **V245A** et HaloTag **M175Y+V245A** (Table 5). Nous avons réalisé une étude indépendante de l'effet de chaque mutation puis des deux combinées sur la fluorescence des RMFs synthétisés.

Le clonage des mutants de HaloTag7 a été réalisé par **mutagenèse dirigée** en utilisant des oligonucléotides portant la mutation (Table 5). Une première étape a consisté à retirer la séquence relative à HaloTag7 après restriction enzymatique du plasmide natif pET28_his_HaloTag7 avec les enzymes **NdeI** et **HindIII**. Le reste du vecteur (promoteur: T7 et gène de résistance : kanamycine) est resté identique. Le design d'oligonucléotides spécifiques à chaque mutant a ensuite été réalisé afin d'introduire les mutations sélectionnées par deux PCR différentes (Table 5). Les deux variants HaloTag **M175Y** et HaloTag **V245A** ont été insérés dans ce vecteur pET28_his digéré par NdeI et HindIII. Pour le variant HaloTag **M175Y+V245A**, le plasmide initial utilisé pour cette étape de restriction enzymatique a été le plasmide pET28_his_HaloTagM175Y contenant déjà la première mutation M175Y. Une dernière étape de clonage permettant de lier les trois fragments obtenus dans chaque cas a finalement permis d'obtenir les trois plasmides mutés. Ces plasmides ont ensuite

été intégrés et amplifiés dans des bactéries (*E. Coli*) afin de pouvoir obtenir les protéines mutées par le même protocole de purification que HaloTag7.

Table 5. Construction des plasmides des protéines HT M175Y, HT V245A et HT M175Y+V245A.

Plasmid	Name	Length	Produced by	5' End	3' End
pET28_his_HaloTagM175Y	pET28_his_HaloTag7	5309	Restriction Digest	HindIII	NheI
	HaloTagM175Y	580	PCR 1		
		311	PCR 2		
pET28_his_HaloTagV245A	pET25_his_HaloTag7	5309	Restriction Digest	HindIII	NheI
	HaloTagV245A	793	PCR 1		
		203	PCR 2		
pET28_his_HaloTagM175Y+V245A	pET25_his_HaloTagM175Y	5309	Restriction Digest	HindIII	NheI
	HaloTagV245A	793	PCR 1		
		203	PCR 2		

III.1.2. Production et purification de la protéine HaloTag7 et de ses variants

Durant ma première année de thèse, j'ai produit et purifié la protéine HaloTag7. Pour cela, nous sommes partis du plasmide pET28_his_pFAST qui nous a été donné par le groupe de Gautier. Ce plasmide contient une séquence poly-histidine permettant de purifier les protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Pour construire le plasmide analogue pET28_his_HaloTag, nous avons commencé par réaliser une restriction enzymatique du plasmide pET28_his_pFAST avec les enzymes **XhoI** et **NheI** qui a permis de retirer la séquence correspondante à pFAST et obtenir le fragment pET28_his jouant le rôle de vecteur pour la suite. En parallèle, nous avons utilisé le plasmide **H2B-HaloTag7** afin d'amplifier la séquence de l'insert HaloTag7 par PCR. Après récupération de chaque fragment (insert et vecteur) par une méthode d'extraction d'ADN, une ultime étape de clonage nous a

permis d'obtenir le plasmide final **pET28_his_HaloTag7** (Figure 42). L'expression de ce plasmide en bactéries (*E. Coli*) suivie d'une purification par chromatographie d'affinité nous a permis d'obtenir la protéine HaloTag7 purifiée.

Name	Length	Produced by	5' End	3' End
pET28_his_pFAST	5292	Restriction Digest	XhoI	NheI
HaloTag	993	Fwd Primer	Rev Primer	

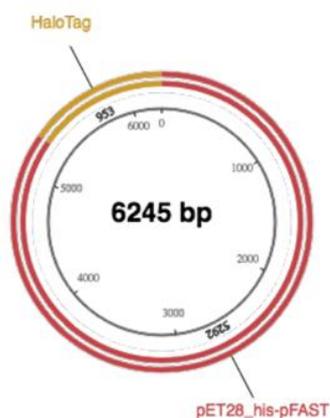


Figure 42. Principe de la construction du plasmide pET28_his_HaloTag à partir du plasmide pET28_his_pFAST.

Nous avons ensuite purifié également les protéines mutées HaloTag **M175Y**, HaloTag **V245A** et HaloTag **M175Y+V245A** en suivant le même protocole de chromatographie d'affinité (Figure 43).

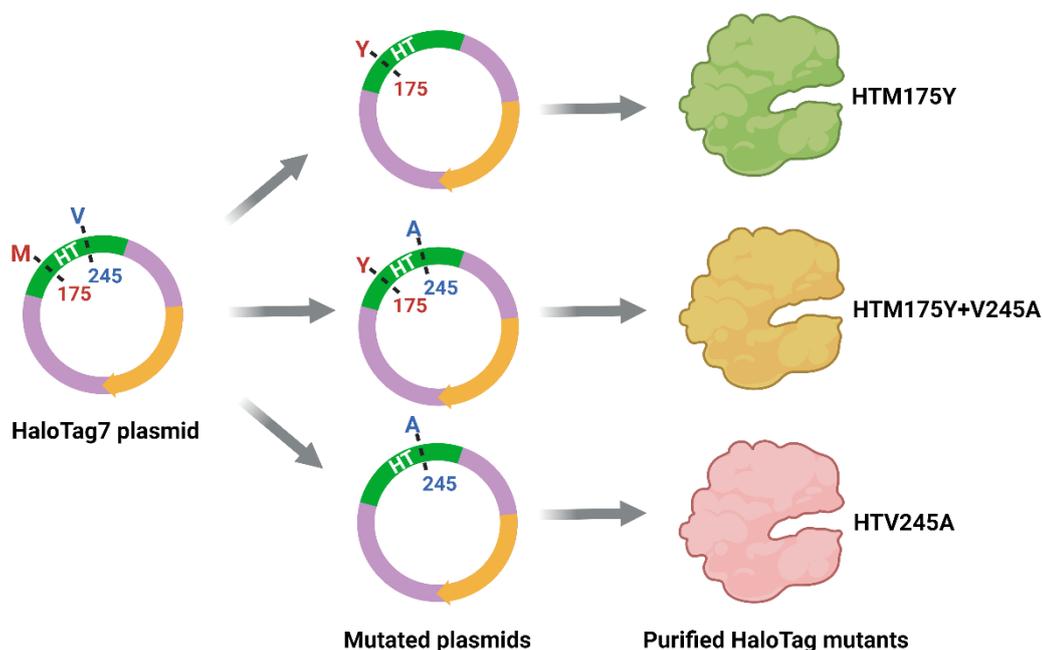


Figure 43. Principe de production des variants de HaloTag7 par mutagenèse dirigée.

Pour conclure, cette technique de mutagenèse dirigée nous a permis d'obtenir trois variants de HaloTag7. Les mutations ont été choisies sur la base d'un travail réalisé avec un autre type de RMF de type styrylpyridium mais nous avons souhaité partir de ces résultats prometteurs afin d'améliorer nos sondes fluorogéniques hybrides en augmentant notamment leur brillance en imagerie cellulaire. La partie suivante présente les caractérisations *in vitro* réalisées en combinant les RMFs obtenus avec ces trois variants de HaloTag7.

III.1.3. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les variants

L'intensité de fluorescence des RMFs précédemment et nouvellement synthétisés conjugués aux variants de HaloTag7 générés a été étudiée par un criblage *in vitro* consistant à mesurer l'intensité de fluorescence de chaque combinaison protéine-fluorophore. (Figure 44).

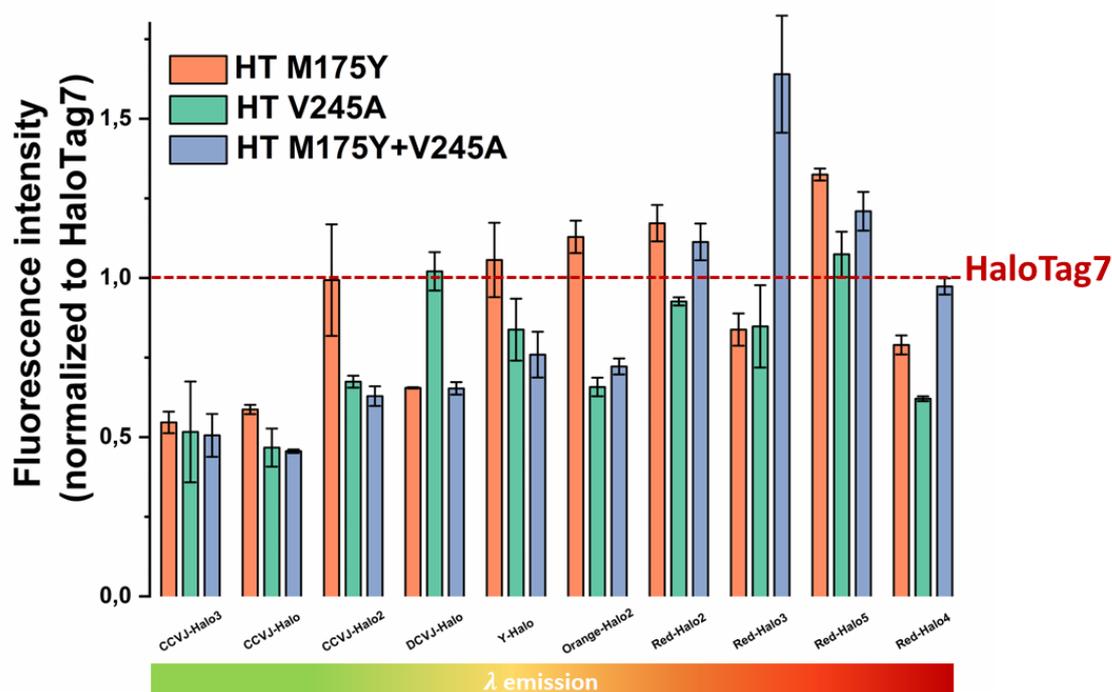


Figure 44. Intensité de fluorescence normalisée par rapport à HaloTag7 (ligne en pointillés rouge) des différents RMFs dans chaque variant de HaloTag7.

Ce criblage montre de faibles améliorations de l'intensité de fluorescence de certaines molécules avec certains variants comme HaloTag **M175Y** (*Orange*) et HaloTag **M175Y+V245A** (*Bleu*). Toutefois, dans l'ensemble, les variants de HaloTag7 n'ont pas permis d'améliorer significativement l'intensité de fluorescence de tous les RMFs. Nous avons souhaité caractériser *in vitro* les couples les plus prometteurs comme **Orange-Halo2/HT M175Y**, **Red-Halo2/HT M175Y** et **Red-Halo5/HT M175Y** afin de voir si, au-delà d'une augmentation de fluorescence des sondes chimiogénétiques hybrides, il pouvait y avoir une influence sur le profil spectral des fluorophores (Figure 45). Le couple **Red-Halo3/HT M175Y+V245A** a déjà été étudié dans la partie précédente et ne sera pas rediscuté ici.

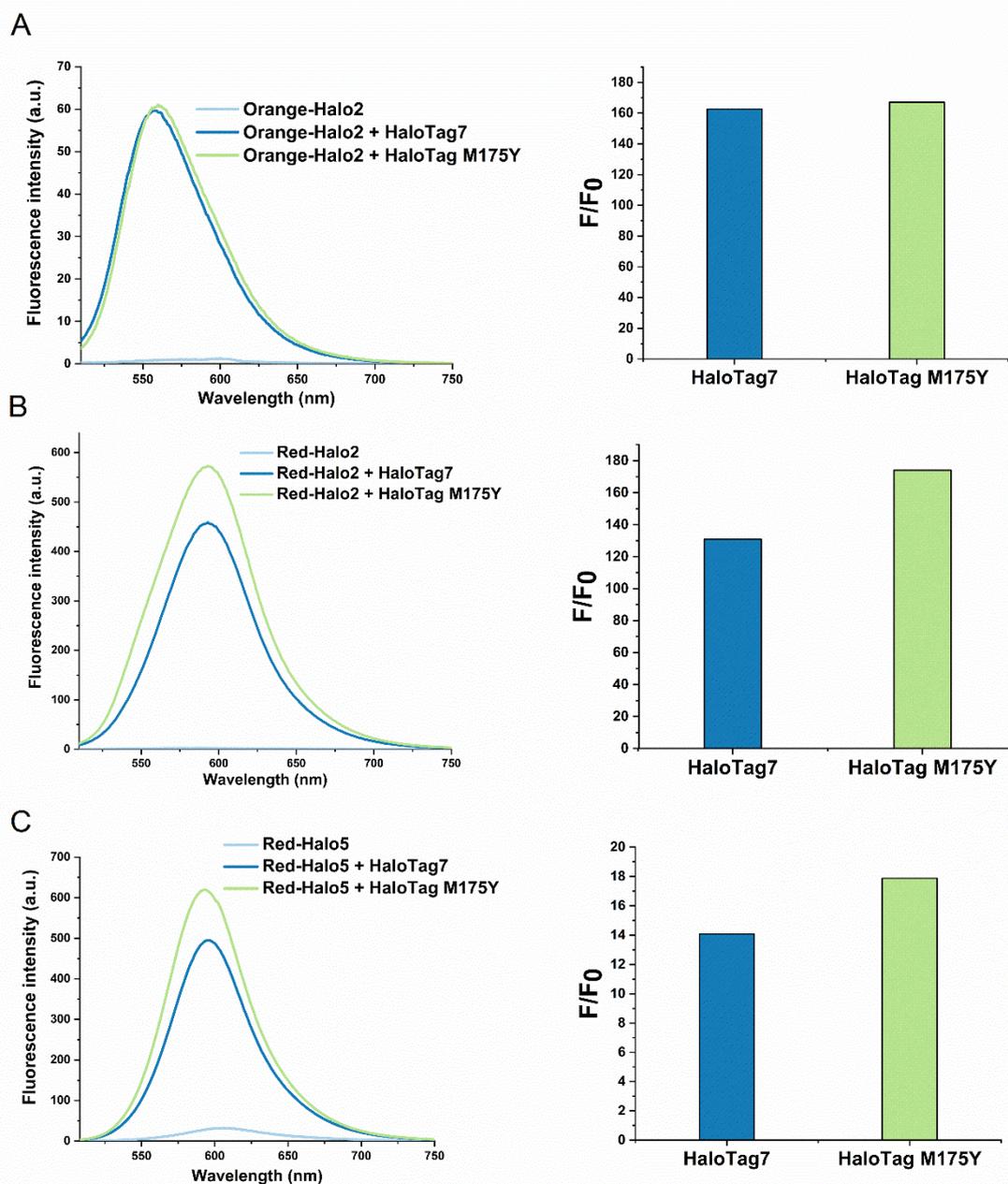


Figure 45. Caractérisations *in vitro* des RMFs Orange-Halo2, Red-Halo2 et Red-Halo5 dans la protéine HaloTag7 et la protéine HaloTag M175Y .

Spectres d'émission et facteur de fluorogénicité F/F_0 de (A) **Orange-Halo2** dans HaloTag7 et HaloTag M175Y, (B) **Red-Halo2** dans HaloTag7 et HaloTag M175Y et (C) **Red-Halo5** dans HaloTag7 et HaloTag M175Y.

L'augmentation de fluorescence du ligand **Orange-Halo2** dans le mutant HaloTag **M175Y** est très modérée avec un facteur de fluorogénicité (F/F_0) de $\times 1.02$ par rapport à HaloTag7. Pour les ligands **Red-Halo2** et **Red-Halo5**, l'effet de la protéine mutée est un peu plus marqué avec des facteurs F/F_0 de $\times 1.33$ et $\times 1.29$ par rapport à HaloTag7 respectivement. Toutefois, ces augmentations restent très modérées et peu

avantageuses en comparaison avec les résultats obtenus pour le ligand **Red-Halo3** conjugué à HaloTag **M175Y+V245A**. Ces observations soulignent la complexité de développement d'un mutant universel capable d'améliorer la brillance de toutes les sondes obtenues même par une approche de type **design rationnel**. Les interactions entre le fluorophore et les acides aminés présents dans le site actif de la protéine HaloTag semblent ainsi très dépendantes de la structure moléculaire de chaque fluorophore. Les bons résultats concernant l'augmentation de l'intensité de fluorescence et de la cinétique de marquage obtenus avec le mutant HT-SP5 pour la molécule styrylpyridium par Mirò-Vinyal et ses collègues peuvent se rationaliser par la présence d'interactions électrostatiques supplémentaires permettant de stabiliser davantage le fluorophore dans la poche de la protéine. Ainsi, nous avons souhaité poursuivre ce travail d'ingénierie de protéines dans l'espoir de trouver un ou plusieurs variants de HaloTag7 permettant d'obtenir une augmentation de fluorescence plus généralisée pour l'ensemble des RMFs. Pour cela, nous avons alors développé une collaboration avec le groupe de Gautier, spécialisé dans la production de protéines pour le développement d'outils chimiogénétiques.

III.2. Permutations circulaires dans HaloTag (cpHT)

Dans cette partie est présentée la collaboration établie avec l'équipe de Gautier. Cette association nous a notamment permis de travailler avec une nouvelle famille de protéines mutées, les protéines HaloTag7 permutoées circulairement (**cpHT**).

III.2.1. Principe et présentation des protéines cpHT étudiées

Le Dr. Mironova en post-doctorat dans le groupe de Gautier a développé 7 mutants de HaloTag permutoés circulairement notés **cpHT1** à **cpHT7** (Figure 46). Ces protéines ont été obtenues par une méthode classique de permutations circulaires avec des sites de clivage principalement localisés sur les parties flexibles de la protéine HaloTag7 et à des endroits stratégiques par rapport au site de liaison des fluorophores. Pour des raisons de confidentialité des données non publiées, les sites de permutations ne seront pas précisés ici.

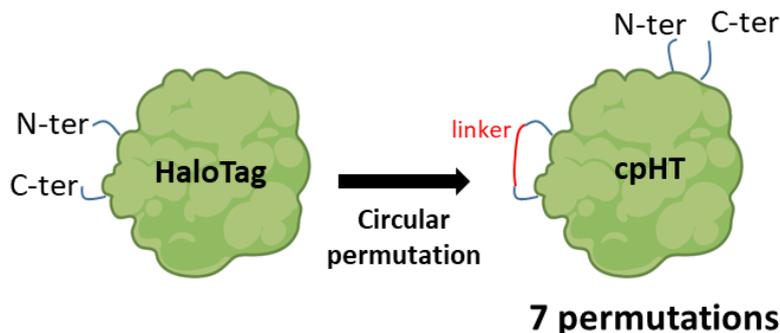


Figure 46. Principe général de l'obtention des protéines cpHT par le Dr. Mironova.

L'efficacité de ces protéines **cpHT** dans la formation de systèmes chimio génétiques hybrides a ensuite été évaluée en utilisant le fluorophore tetraméthylrhodamine (TMR). Plus précisément, une première étude d'imagerie en cellules vivantes a pu être réalisée avec des plasmides exprimant les différentes protéines cpHT solubles et incubées avec 5 μM du ligand TMR, optimisé pour HaloTag7 (Figure 47). Les résultats obtenus montrent la présence de fluorescence pour

chaque cpHT confirmant leur efficacité de liaison avec le ligand TMR en cellules vivantes. De plus, une étude de la cinétique de marquage des cpHT avec le ligand TMR par fluorescence a été réalisée sur gel (Figure 48). Ces derniers résultats révèlent des profils de vitesse similaires pour chaque cpHT. Toutefois, les vitesses de marquage de HaloTag7 (ou wtHT), cpHT1, cpHT2, cpHT3, cpHT5 et cpHT7 semblent plus rapides avec un maximum de fluorescence atteint quasiment instantanément en accord avec la constante de vitesse mesurée pour le marquage de TMR avec HaloTag7 ($1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

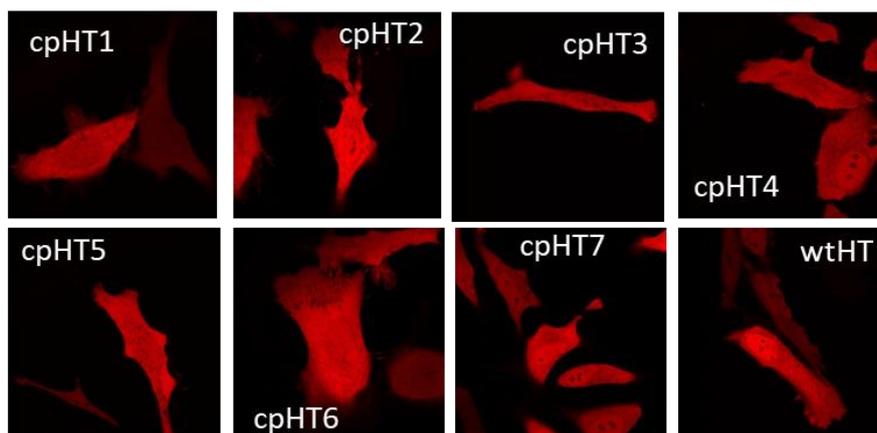


Figure 47. Images de microscopie confocale des cpHT marqués avec le ligand TMR (5 μM).

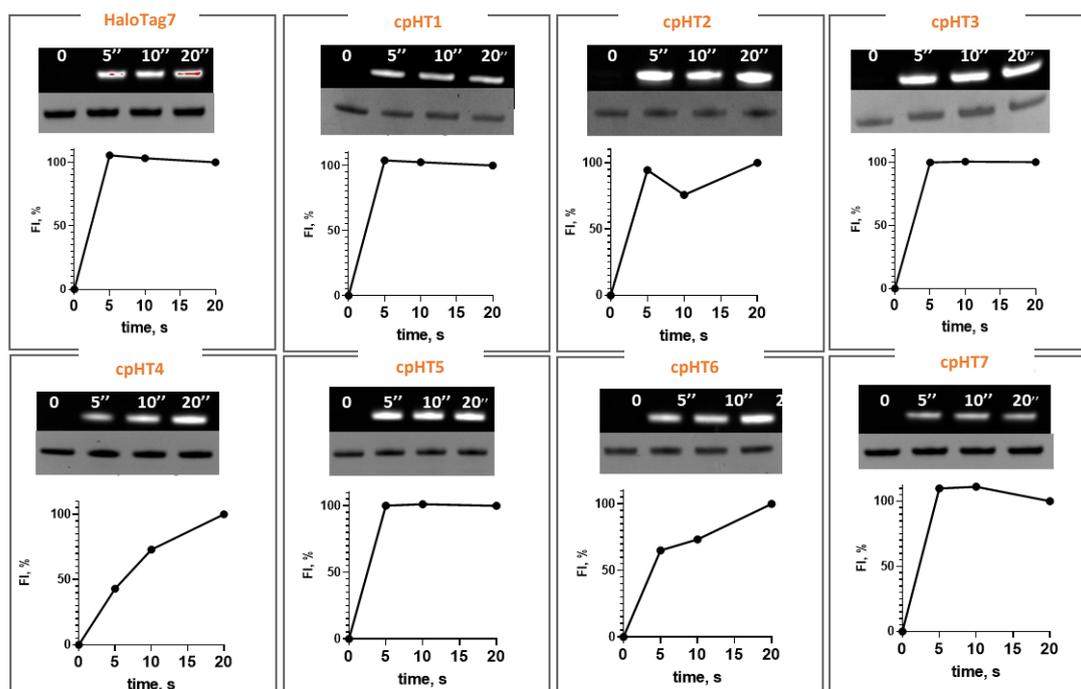


Figure 48. Cinétiques des réactions sur gel de chaque cpHT avec TMR.

Ces premiers résultats encourageants permettent de mettre en évidence une réactivité similaire pour chaque cpHT vis-à-vis du ligand TMR. Nous avons donc poursuivi le projet en étudiant les effets de chaque mutant cpHT sur les RMFs de notre équipe.

III.2.2. Études des propriétés spectroscopiques des sondes dans les cpHT

Afin d'évaluer l'efficacité de ces nouveaux mutants avec nos RMFs, nous avons réalisé diverses études *in vitro*. Une sélection de molécules a été faite initialement afin de choisir une série de fluorophores permettant de couvrir un maximum de longueurs d'onde du spectre du visible. Un premier criblage en microplaques a ensuite été réalisé sur le même principe que le précédent afin d'évaluer l'augmentation de fluorescence de chaque couple RMF/cpHT (Figure 49).

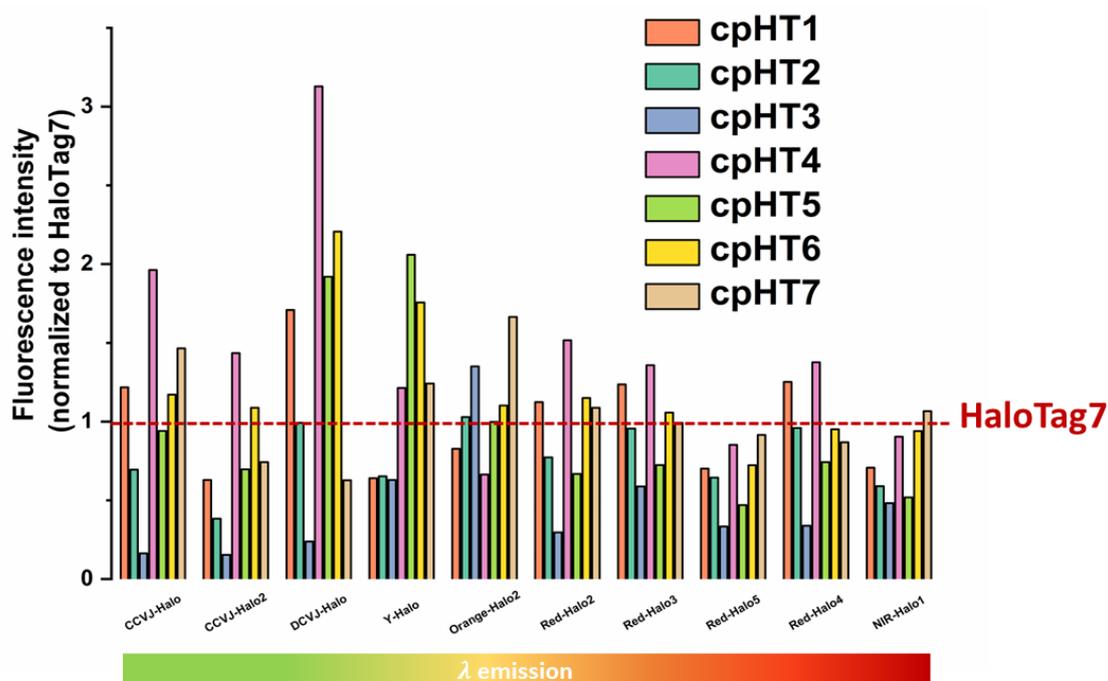


Figure 49. Intensité de fluorescence des différents RMFs dans les protéines permutées cpHT.

Les résultats de ce criblage montrent que la protéine permutée **cpHT4** semble être la plus efficace sur plusieurs rotors dont **CCVJ-Halo**, **CCVJ-Halo2**, **DCVJ-Halo**, **Red-Halo2**, **Red-Halo3** et **Red-Halo4**. Cependant, même si les valeurs d'augmentation de fluorescence par les cpHT semblent globalement plus élevées que celles obtenues pour les mutants générés par mutagenèse dirigée, aucune protéine cpHT ne semble ici présenter d'aptitude à augmenter universellement tous les RMFs. Cette observation généralise finalement la forte dépendance des interactions

fluorophore-protéine à la structure moléculaire dans le cas des protéines de marquage. Nous avons alors sélectionné les meilleurs RMFs présentant une augmentation de fluorescence significative avec **cpHT4** (**CCVJ-Halo**, **CCVJ-Halo2**, **DCVJ-Halo**, **Red-Halo2** et **Red-Halo3**) et approfondi les caractérisations spectroscopiques en cuvettes de ces sondes fluorogéniques hybrides (Figure 50 et Table 6).

Table 6. Comparaison des propriétés spectroscopiques des RMFs dans HaloTag7 et cpHT4.

Molécule	Protein	λ_{abs}	ϵ	λ_{em}	$\Delta\lambda$	Φ_{F}	$\epsilon\Phi_{\text{F}}$	F/F ₀
CCVJ-Halo	HaloTag7	458	17850	499	41	0.072	1300	149
	cpHT4	448 ^a	16560	487	39	0.15	2500	223
CCVJ-Halo2	HaloTag7	466	38800	503	37	0.056	2200	84
	cpHT4	463	34390	493	30	0.075	2600	76
DCVJ-Halo	HaloTag7	474	31100	503	29	0.021	650	64
	cpHT4	469	30515	496	27	0.034	837	63
Red-Halo2	HaloTag7	522	20100	588	66	0.16	3200	126
	cpHT4	503 ^a	21250	584	79	0.24	5100	87
Red-Halo3	HaloTag7	502	24600	590	88	0.25	6200	75
	cpHT4	498 ^a	26415	576	78	0.38	10000	145

λ_{abs} : maximum absorption wavelength (nm), ϵ : molar absorption coefficient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), λ_{em} : maximum emission wavelength (nm), $\Delta\lambda$: Stokes-shift in nm, Φ_{F} : fluorescence quantum yield, $\epsilon\Phi_{\text{F}}$: brightness, F/F₀: ratio of the fluorescence in the protein with that in PBS.

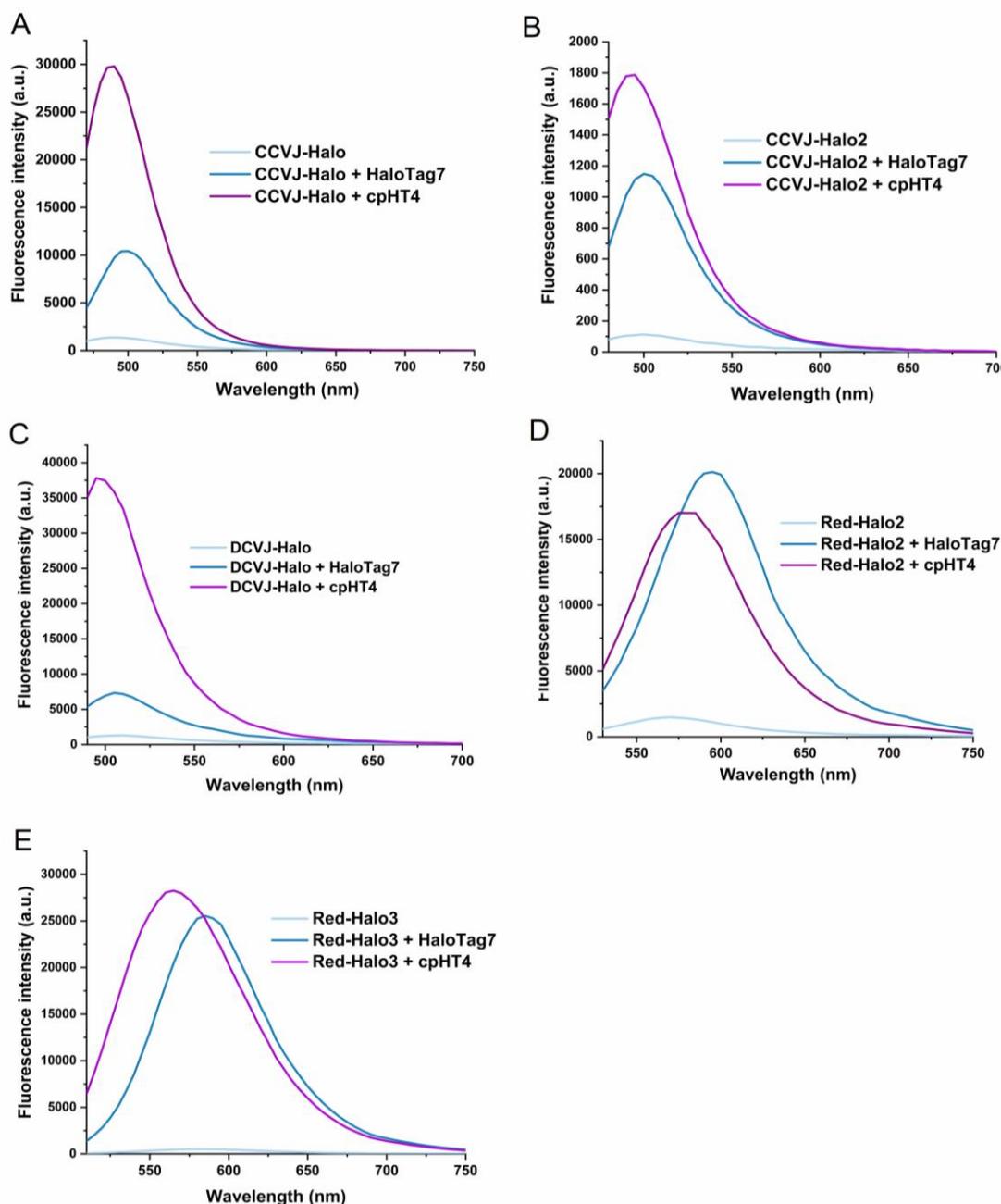


Figure 50. Étude des RMFs sélectionnés dans les protéines HaloTag7 et cpHT4. Comparaison de l'intensité de fluorescence de (A) **CCVJ-Halo**, (B) **CCVJ-Halo2**, (C) **DCVJ-Halo**, (D) **Red-Halo2** et (E) **Red-Halo3** dans le PBS 1X, HaloTag7 et **cpHT4** respectivement.

Les résultats de ces caractérisations supplémentaires révèlent une augmentation de la brillance de 30 % environ pour les ligands **CCVJ-Halo** et **DCVJ-Halo** conjugués à **cpHT4** et de 67 % environ pour le ligand **Red-Halo3** conjugué à **cpHT4**. De plus, l'ensemble de ces sondes chimiogénétiques présentent un décalage spectral vers le bleu

par rapport à leur homologue contenant la protéine HaloTag7. Cela met en évidence des interactions et un environnement différent dans la protéine **cpHT4**. Finalement, le couple **cpHT4/Red-Halo3** est le plus brillant et donc le plus prometteur pour l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes. Cette augmentation de brillance observée avec **cpHT4** est comparable à celle obtenue dans le mutant **mHT** de la partie **II** (64 %). Cependant, de façon similaire à **mHT**, il faudrait également mesurer la vitesse de formation de ce complexe fluorescent *in vitro* et en cellules vivantes afin de déterminer si celle-ci est améliorée dans ce nouveau mutant.

Tout comme avec la mutagenèse dirigée sur HaloTag7, les résultats obtenus avec les variants cpHaloTag visant à améliorer à la fois la brillance et les temps d'incubation pour la conjugaison des fluorophores soulignent la complexité de cette stratégie. En plus de l'influence de la structure moléculaire, le type de mutant généré par design rationnel impacte également les propriétés du système. Par conséquent, dans le cadre de ce projet visant à cribler une diversité de mutants choisis en fonction de données de la littérature avec les RMFs synthétisés, les limites de cette approche semblent être atteintes. Pour l'obtention d'un mutant efficace et applicable à toutes les structures dipolaires de type push-pull, une stratégie alternative associant le design rationnel à une étape préalable de simulation dynamique ou design computationnel serait à envisager ici comme perspectives de ces travaux.

IV. Conclusion et perspectives

Une stratégie de synthèse novatrice, basée sur une méthode divergente, a permis d'obtenir une nouvelle série de RMFs avec des propriétés photophysiques et biochimiques différentes. Parmi l'ensemble de ces fluorophores, la molécule **Red-Halo3** se démarque par sa brillance plus élevée dans la protéine HaloTag7. En outre, les études par imagerie de fluorescence sur cellules HeLa montrent une très bonne pénétration cellulaire associés à de bons contrastes pour les sondes ayant été testées. Ces résultats confirment donc l'efficacité de ce nouveau design à la fois sur le blocage de la conformation des RMFs et sur la facilité de diversification de leurs propriétés en synthèse organique.

Parallèlement, le développement de nouveaux variants de HaloTag7 par ingénierie de protéines a amélioré la brillance et/ou la cinétique de marquage pour certains RMFs. En particulier, la génération de mutants par mutagenèse dirigée et par permutation circulaire a permis d'identifier des couples fluorophore-protéine dont la brillance a pu être augmentée de façon significative. Le fluorophore **Red-Halo3** conjugué aux mutants **mHT** et **cpHT4** sont les combinaisons les plus brillantes pour l'imagerie de fluorescence en temps réel. Cependant, ce travail d'ingénierie de la protéine HaloTag n'a pas permis d'obtenir un mutant universel avec une amélioration de la brillance pour l'ensemble des RMFs synthétisés. Cet aspect du projet concernant l'ingénierie de HaloTag reste toutefois un enjeu majeur afin de pouvoir bénéficier de brillances comparables ou supérieures aux sondes analogues basées sur des protéines fluorescentes.

Les perspectives de ces travaux seraient donc dans un premier temps de continuer les caractérisations des **cpHT** avec les RMFs en cellules afin de vérifier les hypothèses émises concernant les meilleures combinaisons *in vitro* et notamment celle avec **Red-Halo3** et **cpHT4**. En effet, le niveau d'expression des protéines peut être différents en cellules vivantes ce qui peut impacter les résultats concernant la brillance et/ou la cinétique de marquage des sondes chimiogénétiques générées.

Dans un deuxième temps, un travail de **modélisation dynamique** computationnelle pourrait être mis en œuvre afin de continuer générer de nouveaux variants de HaloTag mais en s'appuyant cette fois-ci sur des données propres à nos structures dipolaires push-pull dans le but d'obtenir un mutant universel.

La dernière perspective concernant ce projet repose sur l'utilisation des sondes chimiogénétiques hybrides pour le développement de **senseurs** capables d'émettre de la fluorescence suite à la détection d'un analyte en cellules (Ca^{2+} , Zn^{2+} , H^+ , ROS, etc.). Le développement de sondes pH chimiogénétiques hybrides fait notamment l'objet du chapitre suivant.

**À retenir:**

- ✓ Diversification rapide des propriétés photophysiques des RMFs par synthèse **divergente**.
- ✓ La combinaison de l'ingénierie de la protéine HaloTag et de l'ingénierie de RMFs a permis d'augmenter la brillance et la cinétique du complexe **mHT/Red-Halo3**.
- ✓ Les **permutations circulaires** de la protéine HaloTag peuvent également améliorer la brillance des sondes chimiogénétiques hybrides basées sur des RMFs.
- ➔ De futurs travaux d'**ingénierie** de la protéine **HaloTag** spécifiques aux RMFs synthétisés pourraient permettre d'améliorer la brillance de toutes les sondes.

VI. Partie expérimentale

Chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich or TCI and were used as received. HeLa (CCL-2) cells were obtained from the ATCC. NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 MHz spectrometer. Mass spectra were obtained using a LTQ-Orbitrap XL from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and operated in positive or negative ionization mode, with a spray voltage at 3.6 kV.

Protein production.

HaloTag7 protein was obtained by using the plasmid pET28_his_HaloTag transfected into Top10 cells and plated onto LB/Agar/Kanamycin plates. Individual colonies were picked for sequencing. The recovered transformations were directly used for pre-cultures (37 °C overnight). The protein variants were expressed in LB media upon isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (0.4 mM, 4 h, 37 °C). The cells were then harvested by centrifugation and frozen at -20 °C. The cells were lysed with B-PER supplemented with lysozyme and DNase I. The protein HaloTag was then purified using Ni-NTA beads. The proteins were stored with PBS 1X buffer at -20°C.

The mutant mHT was cloned using overlapping-staggered primers containing the mutations and assembled with NEBuilder kit (HiFi DNA Assembly®, New England Biolabs). Briefly, for the PCRs, Red Extract (REExtract-N-Amp PCR ReadyMix, Sigma-Aldrich) was used according to the manufacture's recommendations. The PCR products derived from overlapping-staggered primers were purified on gel (QIAquick® Gel Extraction kit, Qiagen) and inserted into the plasmid pET28_his_HaloTag digested with NdeI and HindIII. Same protocol as HaloTag7 was used to purify mHT. The proteins were also stored with PBS1X buffer at -20 °C.

Name	Sequence	T _A (°C)	Type
M175Y	GGTACGCTGCCG TAT GGTGTCGTCCGCCCGCTGAC	65	St-Ov
V245A	GCACCCCAGGC GCT CTGATCCCACC	T-up	St-Ov

Plasmid construction.

HaloTag-NLS, Golgi-HaloTag, HaloTag-LifeAct and EGFR-HaloTag were previously reported. NLS-mCherry was obtained from Addgene (#108881). mHT-NLS was created by replacing the open reading frame of HaloTag7 for mHT in HaloTag7-NLS construct.

Spectroscopic methods.

UV/vis absorption spectra were recorded on a Cary 300 spectrophotometer (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) with a scanning speed of 600 nm/min at a step of 1 nm. Fluorescence spectra were recorded on a Jasco FP-8300 spectrofluorometer (Jasco Inc., Easton, MD, USA) with 5 nm excitation and emission bandwidths, medium sensitivity and a scanning speed of 500 nm/s. Measurements were performed in quartz cuvettes (1 cm pathlength, Hellma Analytics). Probes were dissolved in DMSO to afford 1 mM stock solutions. Experiments were performed by diluting the stock solutions in pH 7.4 PBS buffer (20 mM Phosphate and 100 mM NaCl) to the desired concentration.

Molar absorption coefficients and fluorescence quantum yields.

The UV-Vis and fluorescence spectra were recorded for solutions of probes with 1.5 equivalent of HaloTag protein. Three different concentrations (2, 1.5 and 1 μ M) were obtained by serial dilution. Molar absorption coefficients were obtained according to Lambert-Beer law. To calculate fluorescence quantum yields, the integrated fluorescence intensity I was plotted against the absorbance A for each solution. The data was fitted according to a linear function from which the slope was determined. ϕ_F values were calculated according to the following equation:

$$(S1) \phi_{sample} = \phi_{ref} \frac{grad_{sample}}{grad_{ref}} \times \frac{\eta_{sample}^2}{\eta_{ref}^2}$$

Where grad is the slope of the $I = f(A)$ curve and η the refractive index of the solvent.

Rhodamine in ethanol ($\phi_F = 0.94$) was used as reference except for compounds CCVJ-Halo2&3 and DCVJ-Halo were fluorescein in 0.1 M NaOH ($\phi_F = 0.91$) was used. Measurements were duplicated.

Kinetics study of the labeling reactions.

The second-order rate constants of the reactions were calculated by monitoring the fluorescence intensity during the reaction of the probes with a large excess of protein to assume a pseudo first-order kinetics law according to the following procedure.

GST-HT (2 μM) was added to a 50 μL solution of Halo probe (100 nM) in pH 7.4 Phosphate buffer (10 mM Phosphate, 100 mM NaCl) at $T = 295$ K. The fluorescence intensity (excitation and emission at the maximum absorption and emission wavelengths of each probe) was then recorded over time until completion of the reaction with a 5 s to 20 s step depending on the probe. The second order rate constants were then calculated according to a previously reported model.^[259]

Briefly, the fluorescence was converted to the labeled fraction according to the following equation:

$$(S2) \text{ Labeled fraction} = (F - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0)$$

Where F_{max} and F_0 are the maximum and initial fluorescence intensity respectively. Using Origin 2019 software, the data was fitted to the following equation to calculate the pseudo first-order rate constant k_{obs} :

$$(S3) \text{ Labeled fraction} = 1 - \exp(-k_{\text{obs}}t)$$

The second order rate constant k_2 was then obtained by dividing k_{obs} with the protein concentration.

Microplates fluorescence screening.

A mix of HaloTag protein (12 μM , 50 μL) and probe (4 μM , 50 μL) was added in each well of 96-well microplate. Fluorescence emission was measured using a microplate reader (Tecan, Spark). For each well the excitation and emission wavelengths were set for the corresponding probe.

Confocal microscopy.

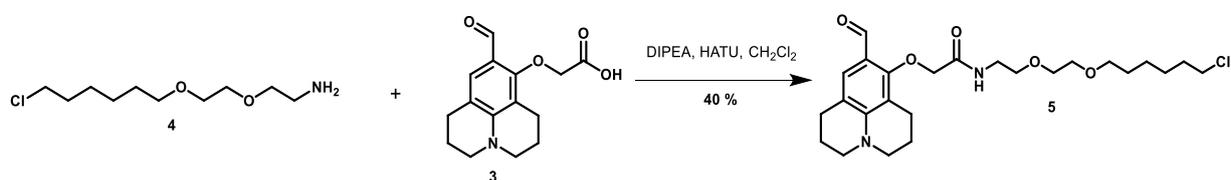
Hela cells were grown for 24 hrs on 8-well polymer μslides from Ibidi (#1.5 polymer coverslip, tissue culture treated) at 40k cells/well in 300 μL of DMEM (Corning) supplemented with 10 % fetal calf serum. Cells were washed twice with DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) and then transfected with the desired plasmid using Fugene 6 (Promega Corp.) according to the manufacturer's protocol. After 24

hours, the cells were washed twice with DPBS and the medium replaced with 150 μ L of FluoroBrite (Gibco) in each well. 150 μ L of 1 μ M Halo probe solution in FluoroBrite was then added to reach a homogeneous concentration of 0.5 μ M. After 30 minutes of incubation the cells were directly imaged live on a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope equipped with a Plan apochromat 40X/1.4 NA objective.

Synthetic procedures.

Intermediate 1 to 4 were synthesized according to previously reported procedure.^[150,259,260]

Synthesis of N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-((9-formyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)acetamide (5).



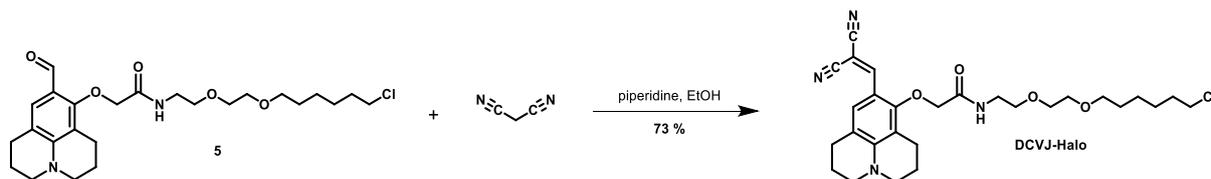
200 mg of 3 (0.89 mmol) was added in a round-bottom flask under Argon and mixed with 6.65 mL of anhydrous CH_2Cl_2 , 245 mg of 4 (0.89 mmol), 302 μ L of DIPEA (1.78 mmol) and 338.2 mg of HATU (0.89 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was monitored by TLC in 80/20 ethyl acetate/ CH_2Cl_2 ($R_f = 0.28$). The reaction was quenched with water and the product extracted with dichloromethane. The organic phase was dried over magnesium sulfate and dried under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (ethyl acetate: CH_2Cl_2 gradient from 0:100 to 80:20) to afford 170 mg of 5 as a dark green oil with a yield of 40%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 9.60 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.73 – 3.25 (m, 16H), 2.78 – 2.65 (m, 4H), 1.94 (m, 4H), 1.73 (dt, 6.6 Hz), 1.56 (dt, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.48 – 1.27 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 187.56, 168.80, 156.69, 149.08, 130.80, 117.37, 116.10, 112.70, 72.93, 71.33, 70.40, 70.01, 69.84, 50.13, 49.67, 45.12, 38.85, 32.56, 29.44, 27.33, 26.73, 25.40, 21.25, 20.67.

HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{Na}$ 503.2283. Found 503.2282.

Synthesis of N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-((9-(2,2-dicyanovinyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)acetamide (DCVJ-Halo).



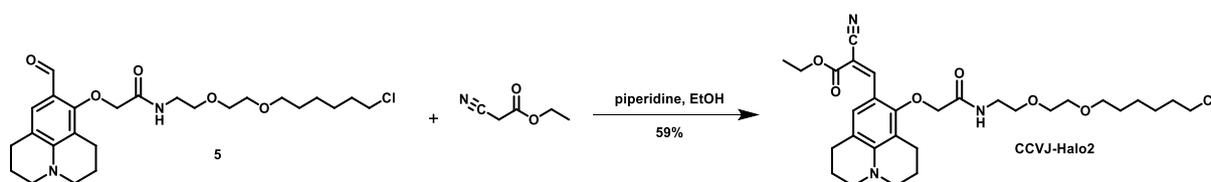
40 mg of **5** (83.2 μmol) were mixed with 8.2 mg of malononitrile (125 μmol) in the presence of 2 mL of ethanol and two drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated and the crude product was purified by flash chromatography (ethyl acetate:CH₂Cl₂ gradient from 0:100 to 80:20) to afford 32 mg of **DCVJ-Halo** as an orange oil (yield 73%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.69 – 3.34 (m, 16H), 2.73 (m, 4H), 1.96 (m, 4H), 1.73 (m, 2H), 1.45 – 1.36 (m, 2H), 1.36 – 1.27 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.43, 155.82, 150.38, 150.17, 127.02, 119.14, 116.90, 115.60, 112.50, 111.89, 77.36, 72.95, 71.39, 70.54, 70.17, 69.70, 50.53, 49.96, 45.19, 38.98, 32.62, 29.57, 27.58, 26.80, 25.51, 21.26, 21.08, 20.46.

HRMS calcd for C₂₈H₃₇ClN₄O₄H 529.2576. Found 529.2583.

Synthesis of ethyl (E)-3-(8-(2-((2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)-2-cyanoacrylate (CCVJ-Halo2).



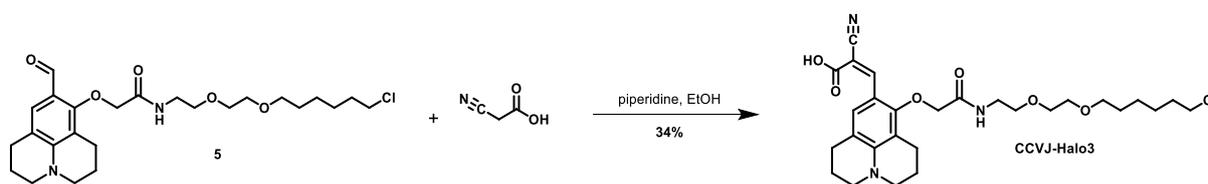
34 mg of **5** (70.7 μmol) were mixed with 20 mg of ethyl-2-cyanoacetate (200 μmol) in the presence of 2 mL of ethanol and two drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated and the crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane:ethylacetate gradient from 5:5 to 3:7) to afford 24 mg of **CCVJ-Halo2** as an orange oil (59 % yield).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.30 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.71 – 3.27 (m, 16H), 2.82 – 2.60 (m, 4H), 1.94 (m, 4H), 1.71 (m, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.46 – 1.30 (m, $J = 7.1$ Hz, 7H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 167.89, 164.55, 156.28, 149.06, 147.21, 127.64, 118.69, 118.09, 112.58, 111.63, 93.06, 73.04, 71.42, 70.53, 70.16, 69.77, 61.85, 50.36, 49.80, 45.18, 38.96, 32.64, 29.58, 27.62, 26.81, 25.52, 21.39, 21.28, 20.70, 14.47.

HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{Na}$ 598.2654. Found 598.2649.

Synthesis of (E)-3-(8-(2-((2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)-2-cyanoacrylic acid (CCVJ-Halo3).



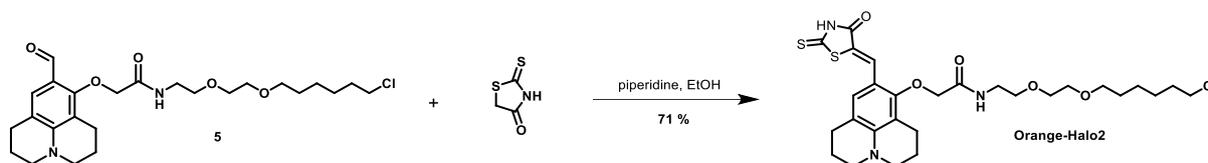
35 mg of **5** (72.7 μmol) were mixed with 12,36 mg of 2-cyanoacetic acid (145.4 μmol) in the presence of 2 mL of ethanol and two drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 :MeOH gradient from 95:5 to 90:10) to afford 13 mg of **CCVJ-Halo3** as a yellow oil (34 % yield).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD) δ 8.34 (s, 1H), 7.99 (s, 1H, H14), 4.27 (s, 2H), 3.75 – 3.35 (m, 16H), 2.85 – 2.63 (m, 4H), 1.95 (q, 4H), 1.68 (dt, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.42 – 1.30 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOD) δ 157.71, 150.23, 127.96, 119.85, 114.21, 112.43, 111.8, 73.78, 73.39, 72.26, 71.32, 71.18, 71.10, 70.35, 62.23, 51.14, 50.64, 45.70, 40.01, 33.73, 30.57, 28.75, 28.59, 27.76, 26.46, 22.38, 22.31, 21.72.

HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{H}$ 548.2522. Found 548.2529.

Synthesis of (Z)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-((9-((4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)acetamide (**Orange-Halo2**).



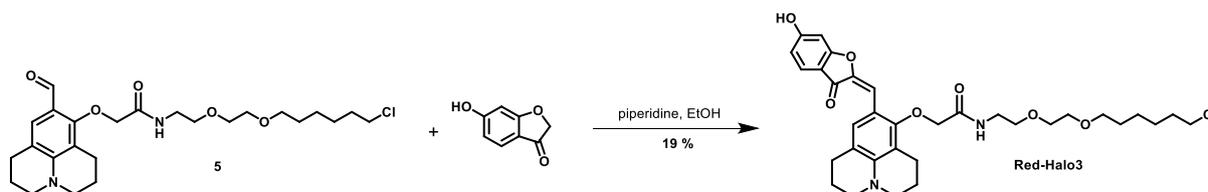
40 mg of **5** (70 μmol) were mixed with 14 mg of rhodanine (100 μmol) in the presence of 2 mL of ethanol and 2 drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated to dryness and the crude product purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2 :MeOH 100:0 to 80:20) to afford 35 mg of **Orange-Halo2** as a red oily solid (71 % yield).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10.04 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.36 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.77 – 3.56 (m, 8H), 3.46 (dt, $J = 11.3, 6.7$ Hz, 4H), 3.28 (q, $J = 5.6$ Hz, 4H), 2.70 (dt, $J = 12.2, 6.3$ Hz, 4H), 1.95 (tq, $J = 11.6, 6.0$ Hz, 4H), 1.69 (dt, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 2H), 1.54 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.44 – 1.23 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 193.59, 168.73, 168.03, 155.44, 146.98, 128.75, 127.99, 118.73, 117.53, 113.53, 112.82, 72.66, 71.27, 70.37, 70.02, 69.72, 50.09, 49.60, 45.08, 38.90, 32.53, 29.44, 27.64, 26.71, 25.39, 21.36, 21.26, 20.67.

HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}_2\text{H}$ 596.2014. Found 596.2006.

Synthesis of (E)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-((9-((6-hydroxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)acetamide (**Red-Halo3**).



30 mg of **5** (62 μmol) were mixed with 14 mg of 6-hydroxy-3-coumaranone (94 μmol) in the presence of 2 mL of ethanol and 2 drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated to dryness and the crude

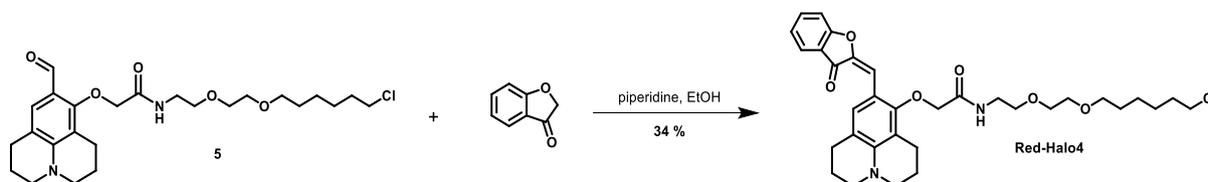
product purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂:MeOH 97:3 to 90:10) to afford 7 mg of **Red-Halo3** as a red oily solid (19 % yield).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.28 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 8.4, 0.5 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.76 – 6.63 (m, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.85 – 3.54 (m, 10H), 3.47 (td, J = 6.7, 5.6 Hz, 5H), 3.29 (s, 2H), 2.77 (s, 4H), 1.96 (dt, J = 11.6, 5.9 Hz, 4H), 1.77 – 1.60 (m, 3H), 1.52 (ddt, J = 9.2, 7.8, 6.7 Hz, 3H), 1.45 – 1.19 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 182.41, 169.08, 167.45, 165.11, 154.66, 146.05, 145.90, 130.23, 125.78, 118.67, 114.96, 113.08, 112.74, 112.04, 108.01, 99.12, 72.33, 71.46, 70.48, 70.13, 69.95, 50.15, 49.59, 45.17, 39.10, 32.62, 29.46, 27.80, 26.79, 25.46, 21.70, 21.56, 21.08.

HRMS calcd for C₃₃H₄₁ClN₂O₇Na 635.2494. Found 635.2506.

Synthesis of (E)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-((9-((3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-yl)oxy)acetamide (Red-Halo4).



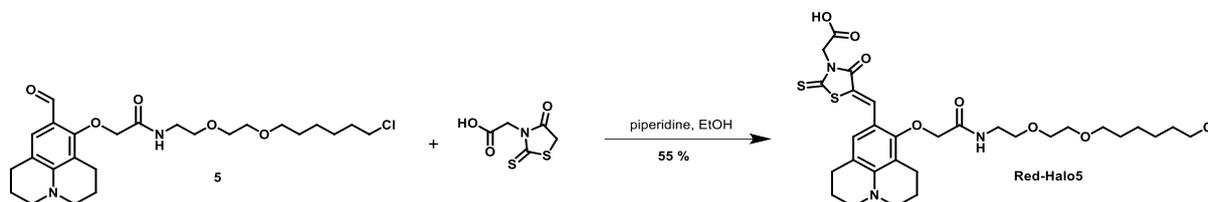
46 mg of **5** (95.6 μmol) were mixed with 19.23 mg of benzofuran-3(2H)-one (145.4 μmol) in the presence of 2 mL of EtOH and two drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (CH₂Cl₂:ethylacetate 50:50) to afford 20 mg of **Red-Halo4** as a red oil (34 % yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.88 – 7.28 (m, 5H), 7.11 (s, 1H, H14), 4.29 (s, 2H), 3.79 – 3.15 (m, 16H), 2.85 – 2.65 (m, 4H), 2.07 – 1.85 (m, 4H), 1.79 – 1.59 (m, 2H), 1.58 – 1.43 (m, 2H), 1.44 – 1.15 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 183.53, 168.36, 165.13, 155.10, 145.95, 145.31, 135.73, 130.28, 124.40, 123.02, 122.68, 118.77, 113.38, 112.88, 112.32, 108.70, 72.63, 71.40, 70.59, 70.17, 69.85, 50.21, 49.69, 45.19, 38.96, 32.66, 29.59, 27.88, 26.83, 25.51, 21.68, 21.58, 21.04.

HRMS calcd for $C_{33}H_{41}ClN_2O_6Na$ 619.2545. Found 619.2547.

Synthesis of (Z)-2-(5-((8-(2-((2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)methylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetic acid (**Red-Halo5**):



23 mg of **5** (50 μ mol) were mixed with 18 mg of rhodanine-3-acetic acid (100 μ mol) in the presence of 2 mL of ethanol and 2 drops of piperidine. The mixture was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated to dryness and the crude product purified by HPLC (MeCN:H₂O with 0.1 % TFA 3:7 to 10:0) to afford 17 mg of **Red-Halo5** (55 % yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H), 7.50 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.46 (s, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 3.72 – 3.56 (m, 8H), 3.46 (dt, J = 11.0, 6.7 Hz, 4H), 3.29 (q, J = 5.8 Hz, 4H), 2.70 (dt, J = 17.4, 6.2 Hz, 4H), 2.04 – 1.87 (m, 4H), 1.69 (dt, J = 8.0, 6.6 Hz, 2H), 1.59 – 1.47 (m, 2H), 1.39 – 1.24 (m, 5H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.87, 168.99, 168.86, 167.25, 155.39, 147.23, 129.45, 128.12, 118.79, 114.51, 113.45, 112.81, 72.25, 71.33, 70.20, 69.92, 69.45, 50.09, 49.59, 45.08, 44.59, 39.08, 32.50, 29.30, 27.66, 26.67, 25.31, 21.31, 21.25, 20.61.

HRMS calcd for $C_{30}H_{40}N_3O_7S_2$ 618.2302186. Found 618.2303.

VII. Annexes

- Additional figures and data

Table S1. Photophysical properties of the previously reported Halo probes in presence of HaloTag7 or mHT.

Molecule	protein	λ_{abs}	ϵ	λ_{em}	$\Delta\lambda$	Φ_{F}	$\epsilon\Phi_{\text{F}}$	Rel. bright.	F/F ₀	k_2 (10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	S/NS ^a
CCVJ-Halo	HaloTag7	458	17900	493	35	0.072	1300		149	1.0 ± 0.1	11
	mHT	459 ^b		493	34			0.57			
Y-Halo	HaloTag7	488	34000	542	54	0.026	880		19	n.d.	24
Orange-Halo^a	HaloTag7	487	16200	574	64	0.02	320		48	0.45 ± 0.03	10
Red-Halo2	HaloTag7	522	20100	593	71	0.16	3200		141	1.3 ± 0.2	6
	mHT	500 ^b	-	588	88			0.90			
Red-Halo2-Et	HaloTag7	498	14800	591	93	0.11	1600		34	0.29 ± 0.04	23
NIR-Halo1	HaloTag7	535	33500	664	129	0.13	4400		225	1.7 ± 0.04	5
	mHT	544 ^b	-	666	122			0.61			

λ_{abs} : maximum absorption wavelength (nm), ϵ : molar absorption coefficient (M⁻¹cm⁻¹), λ_{em} : maximum emission wavelength (nm), $\Delta\lambda$: stokes-shift in nm, Φ_{F} : fluorescence quantum yield, $\epsilon\Phi_{\text{F}}$: brightness, rel. bright.: brightness in mHT relative to HaloTag7, F/F₀: ratio of the fluorescence in the protein with that in PBS, k_2 : second order reaction rate constant, S/NS: imaging contrast, ratio of the specific nuclear signal S over the the non-specific cytoplasmic signal NS in live cell imaging of a nuclear HaloTag protein.

^a Values taken from ref^[161], ^b measured on the excitation spectra.

Equation	$y = a + b \cdot x$						
Plot	DCVJ-Halo	CCVJ-Halo2	CCVJ-Halo3	Orange-Halo2	Red-Halo3	Red-Halo4	Red-Halo5
Weight	No Weighting						
Intercept	0 ± --						
Slope	0,01921 ± 5,70869E-4	0,02135 ± 4,90733E-4	0,01257 ± 1,21945E-4	0,01997 ± 7,65305E-4	0,01576 ± 5,85481E-4	0,01222 ± 5,15487E-4	0,0318 ± 1,7991E-4
Residual Sum of Squares	2,28495E-4	1,67369E-4	1,0335E-5	4,07056E-4	2,38237E-4	1,8468E-4	2,24954E-5
Pearson's r	0,9978	0,99668	0,99976	0,99635	0,99657	0,99558	0,99992
R-Square (COD)	0,9956	0,99736	0,99953	0,99271	0,99314	0,99116	0,99984
Adj. R-Square	0,99472	0,99684	0,99944	0,99125	0,99177	0,98941	0,99981

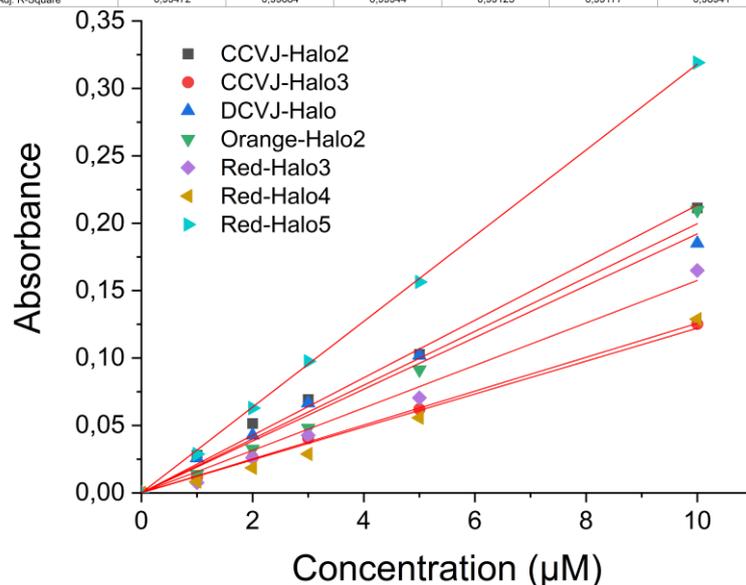


Figure S1. Water solubility of the Halo probes. Lambert-Beer law plots in PBS.

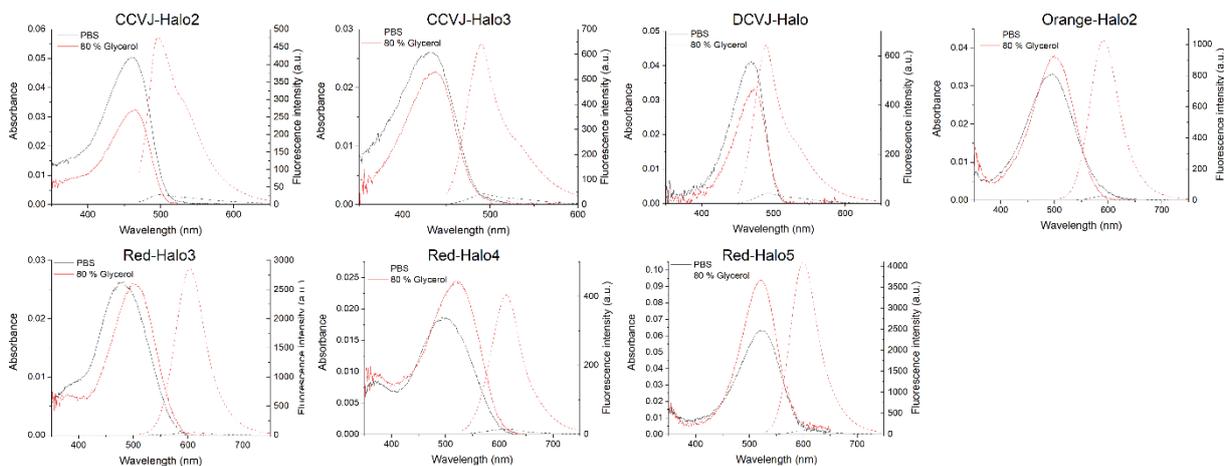
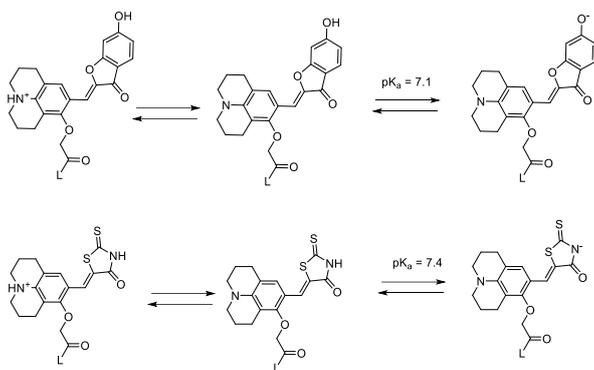


Figure S2. Absorption (full lines) and fluorescence (dashed lines) spectra of the Halo probes in pH 7.3 PBS with or without 80 %w of glycerol.



Scheme S1. Proposed acid-base equilibria for Red-Halo3 and Orange-Halo2.

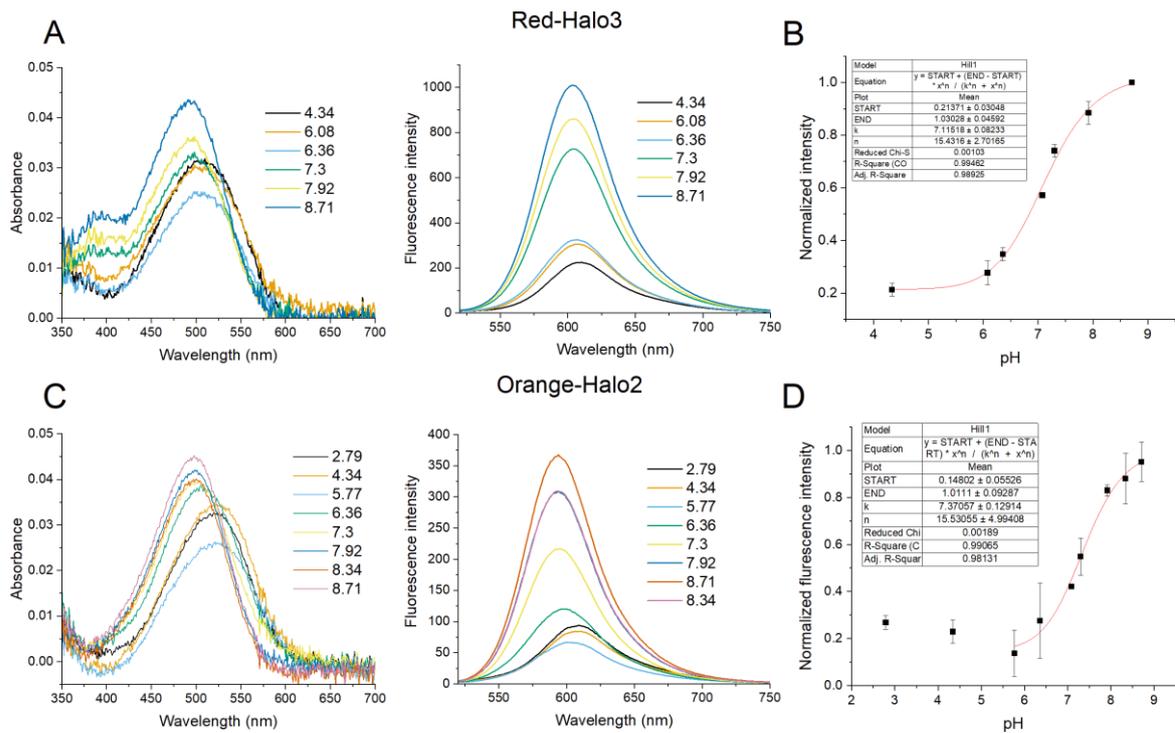


Figure S3. Absorption and fluorescence spectra of Red-Halo3.

(A) and Orange-Halo2 (C) at different pH in Tris buffers containing 40 % glycerol. (B,D) Corresponding fluorimetric pH titration curves: plot of the normalized integrated fluorescence intensity against the pH.

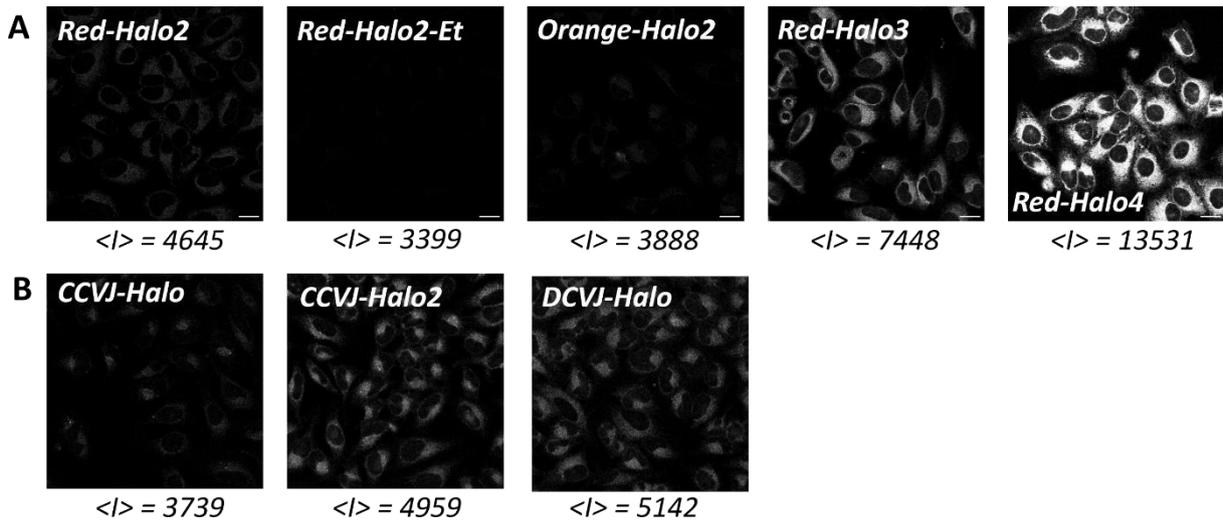


Figure S4. Live-cell confocal microscopy of wild-type HeLa cells stained with 0.5 μM of Halo probes.

For each set (A&B), the images were captured with the exact same microscope parameters and are presented with the same brightness and contrast settings. (A) red and orange-emitting probes ($\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$), (B) green-emitting probes ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). <I> indicates the mean fluorescence intensity measured over a threshold set to eliminate the background.

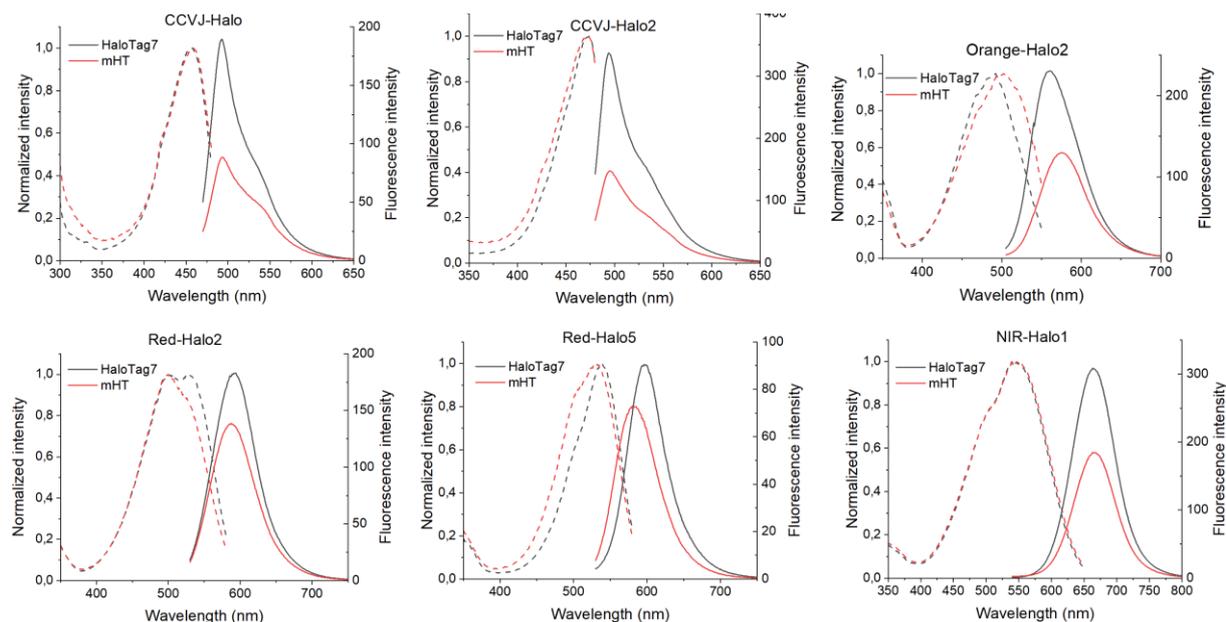


Figure S5. Photophysical properties of selected Halo dyes in HaloTag7 and mHT. Normalized excitation spectra (*dashed lines*) and emission spectra (*full lines*). Conditions: [dye] = 1 μ M in pH 7.4 PBS with 1.5 eq of protein.

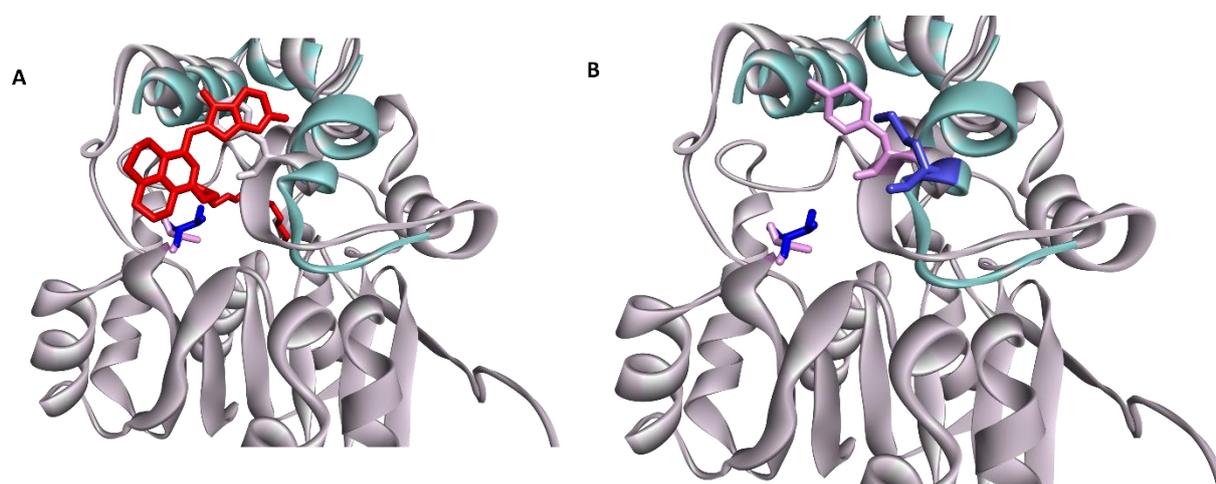


Figure S6. Conformational changes of the HaloTag7 and mHT binding pockets. (A) Structure of the Red-Halo3@mHT complex superimpose with parts of the Red-Halo3@HaloTag7 complex in blue, showing the α helix containing the tyrosine 175 closing the binding channel. (B) Same image not showing the Red-Halo3 ligand with side chains of amino acids 175 and 245 shown in blue for HaloTag7 and pink for mHT.

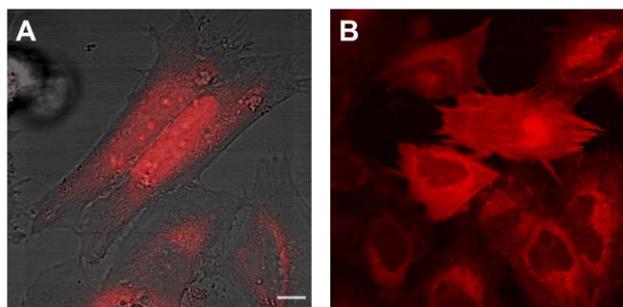


Figure S7. Live cell imaging of HeLa cells transiently transfected with HaloTag-NLS (A) or HaloTag-LifeAct (B) and stained with 0.5 μ M of Red-Halo4 in wash-free conditions.

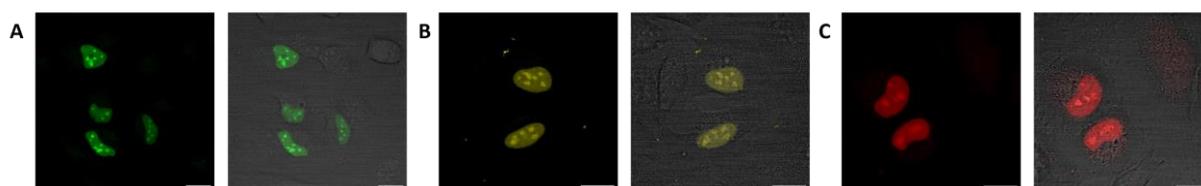


Figure S8. Confocal imaging of live HeLa cells transiently transfected with mHT-NLS and labeled with 0.5 μ M of CCJV-Halo2 (A), Orange-Halo2 (B) and Red-Halo3 (C).

Fluorescence image and merge with the brightfield image. Scale bar = 20 μ m.

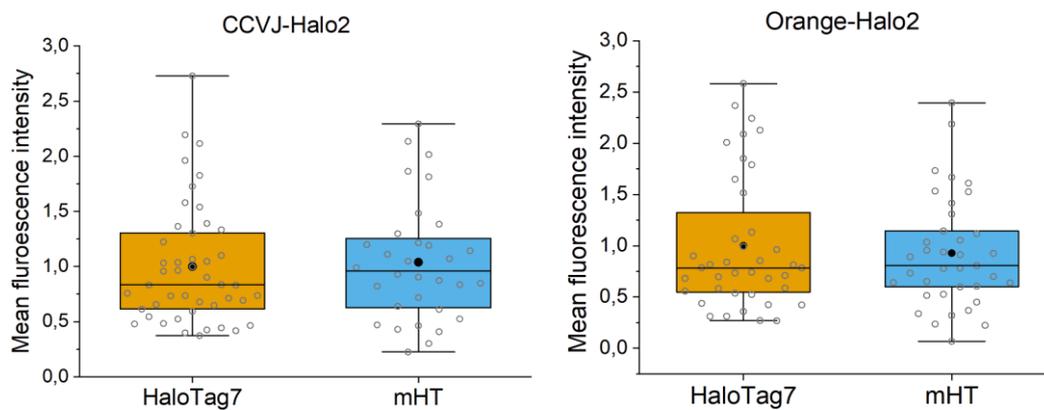
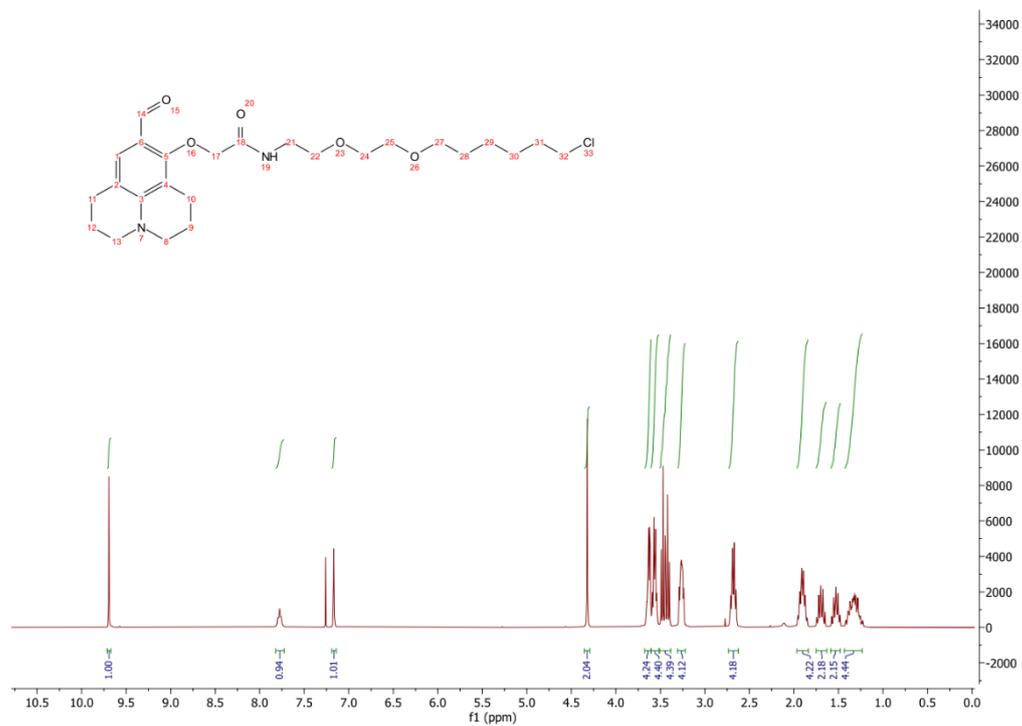


Figure S9. Comparison of the brightness of CCVJ-Halo2 and Orange-Halo2 combined with HaloTag7 or mHT in live cell confocal microscopy.

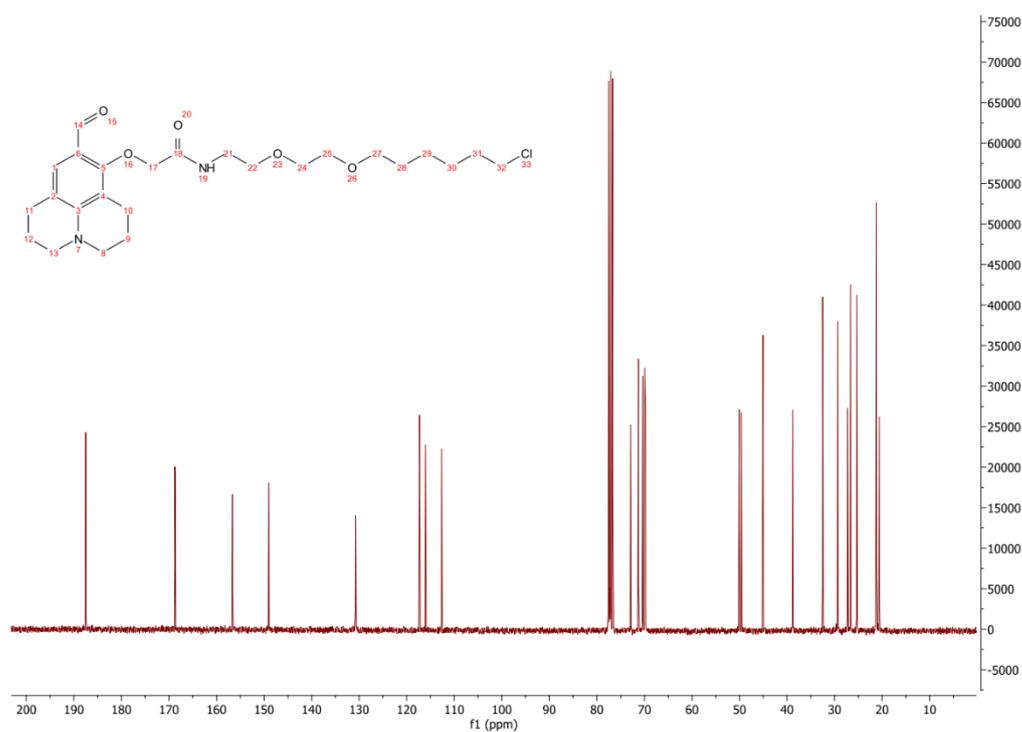
Mean fluorescence intensity measured in the nuclei of N cells transfected with HaloTag7-NLS or mHT-NLS and incubated with 0.5 μM of probe. Values normalized to the mean value of HaloTag7.

• **NMR Spectra.**

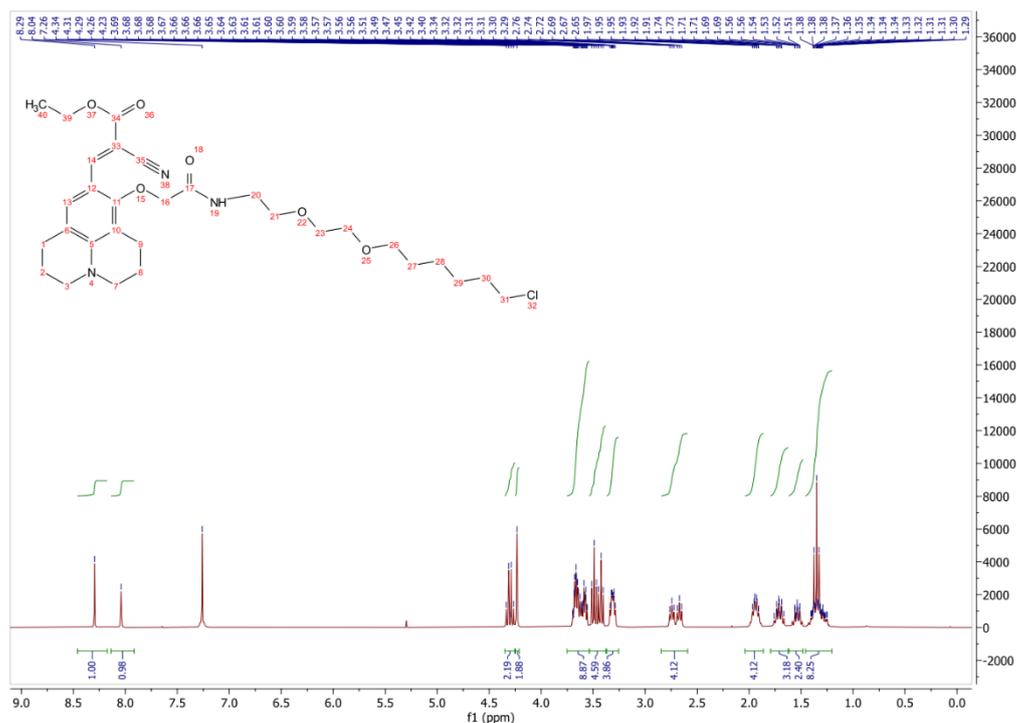
¹H NMR spectra of intermediate **5**



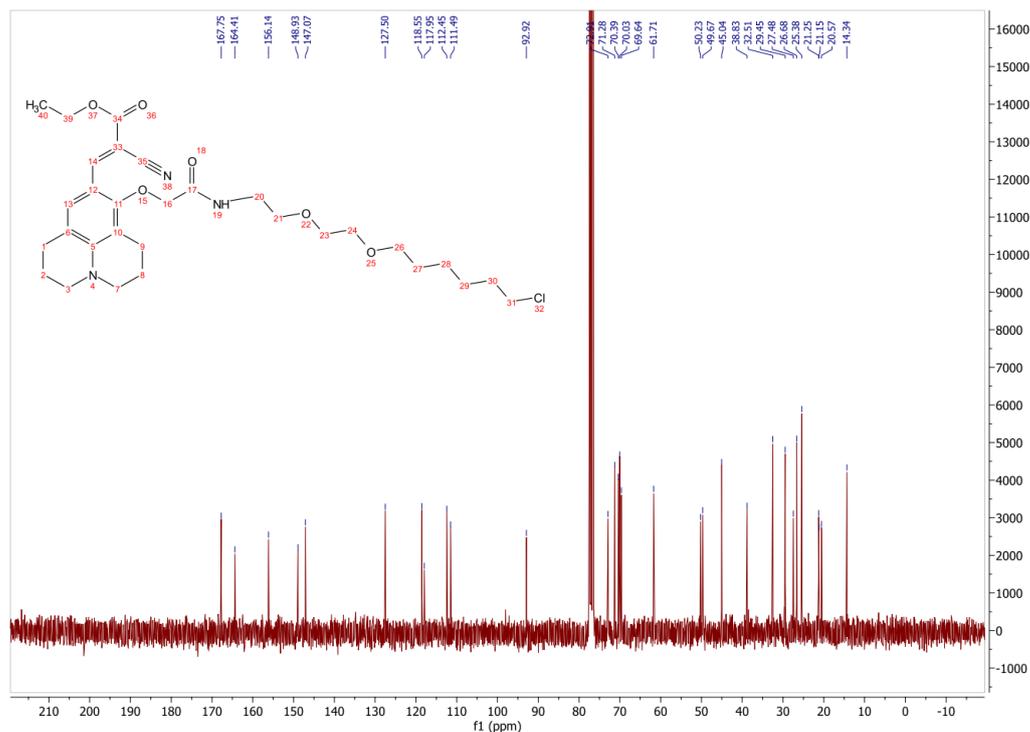
¹³C NMR spectra of intermediate **5**



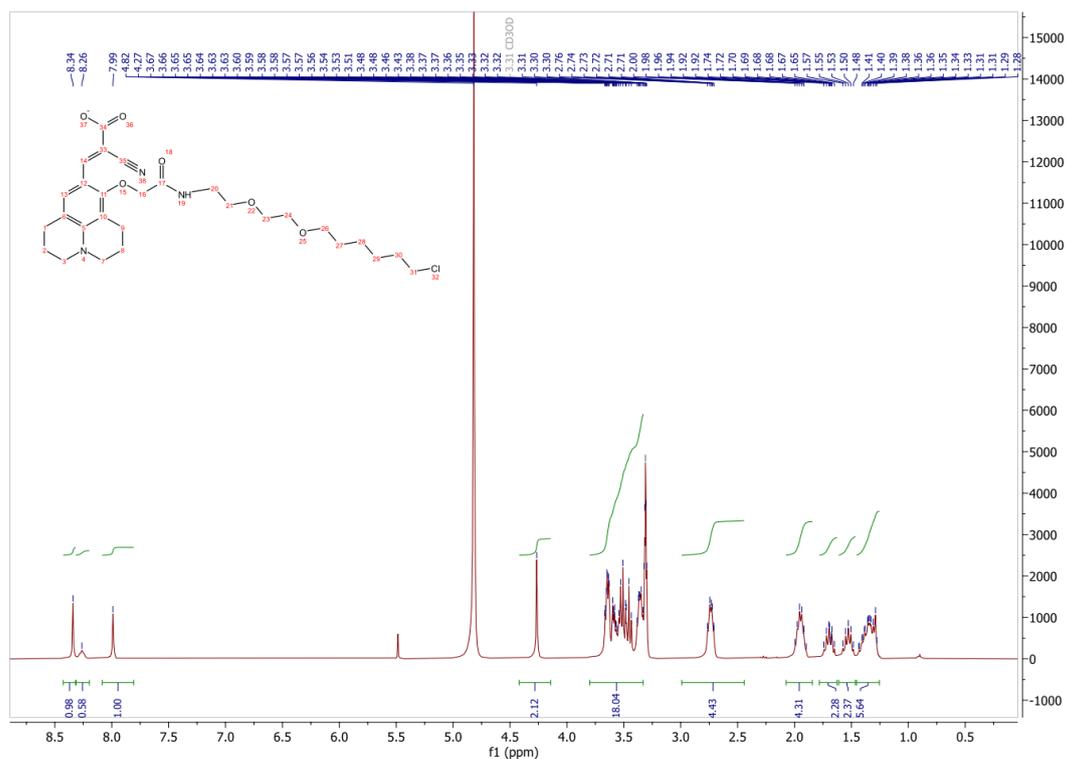
¹H NMR spectra of CCVJ-Halo2



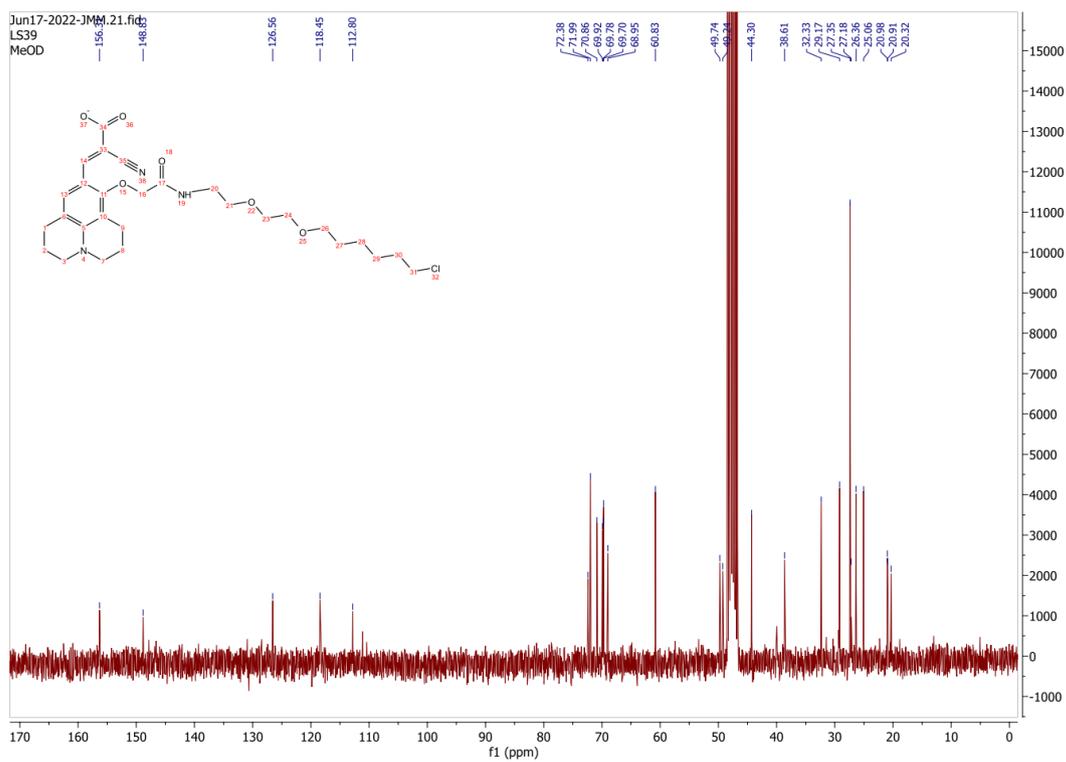
¹³C NMR spectra of CCVJ-Halo2



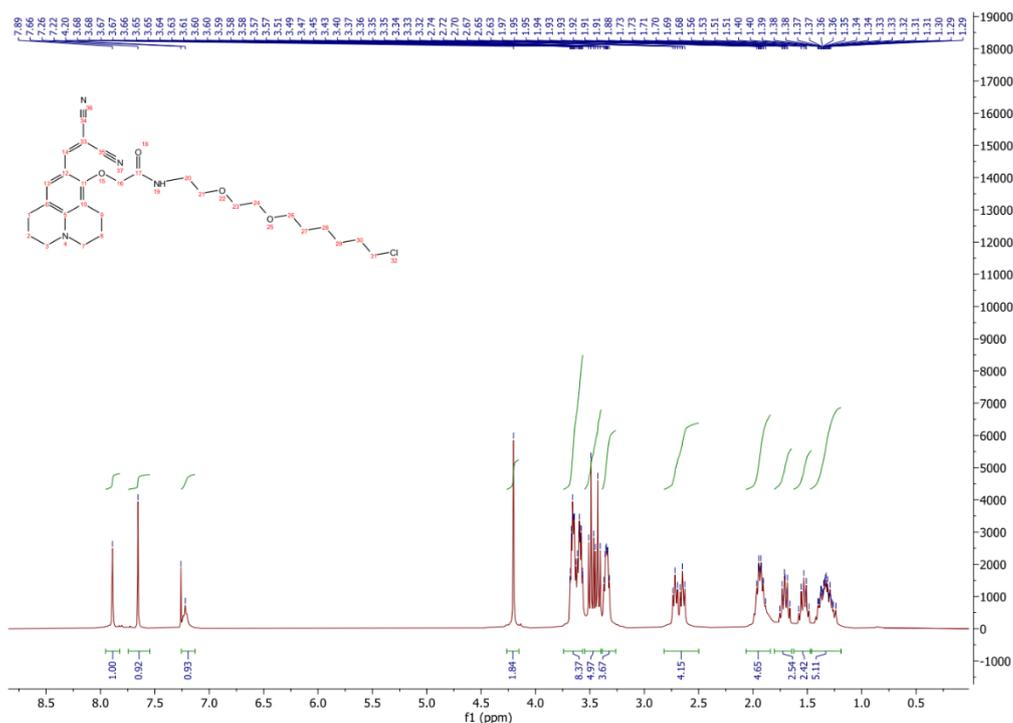
¹H NMR spectra of CCVJ-Halo3



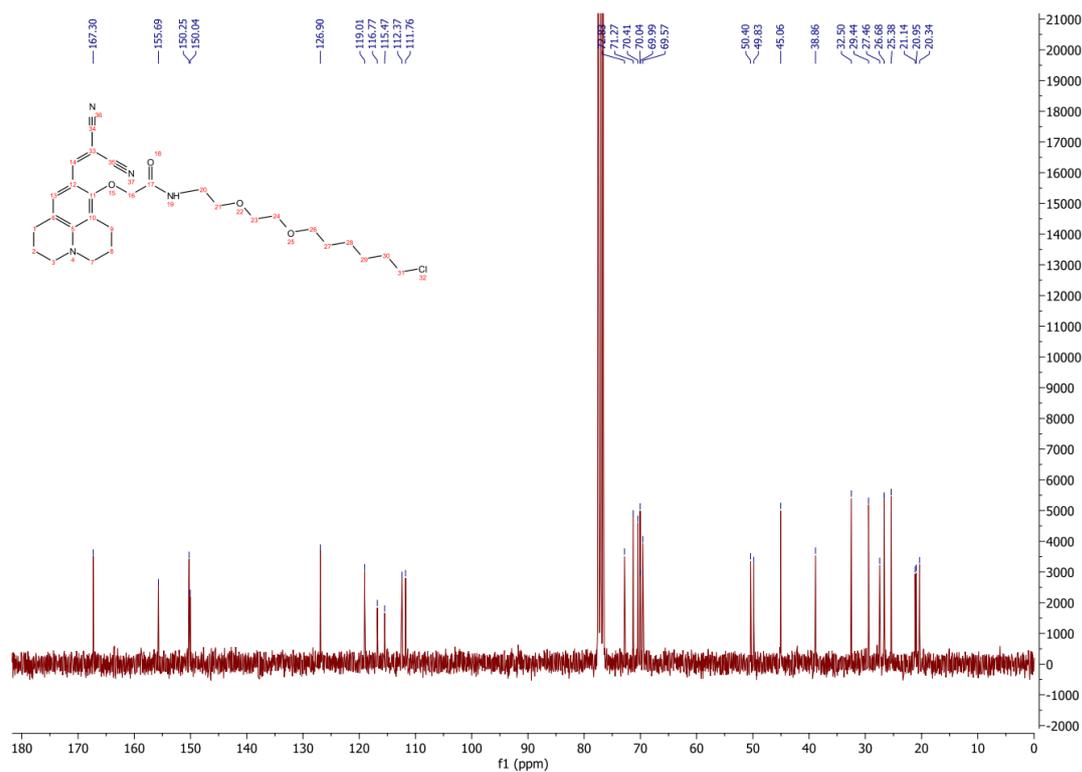
¹³C NMR spectra of CCVJ-Halo3



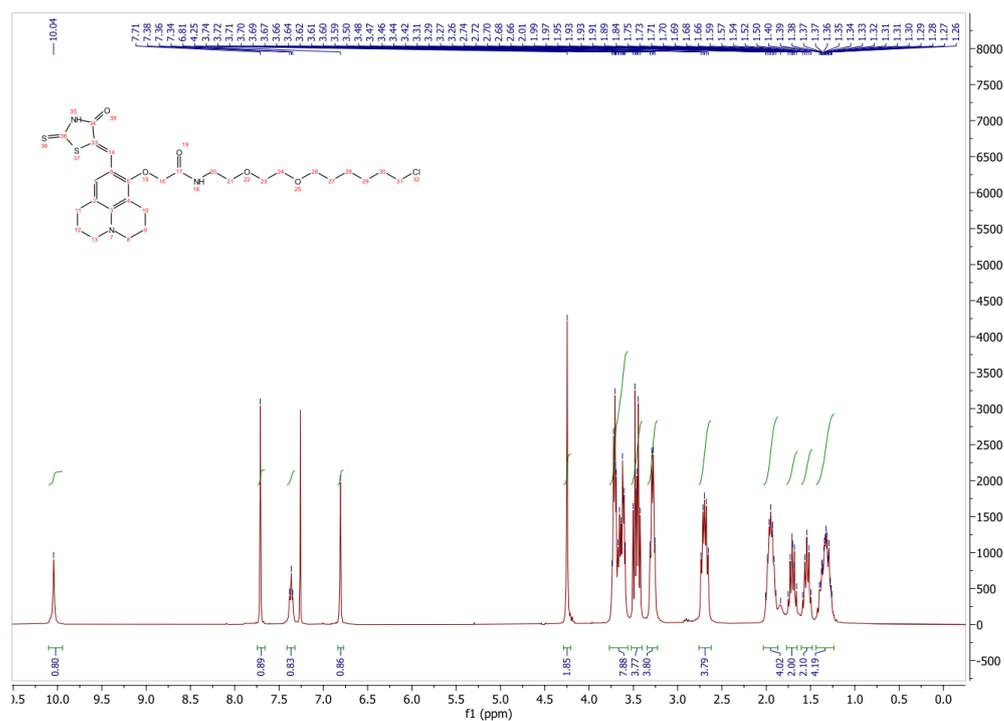
¹H NMR spectra of DCVJ-Halo



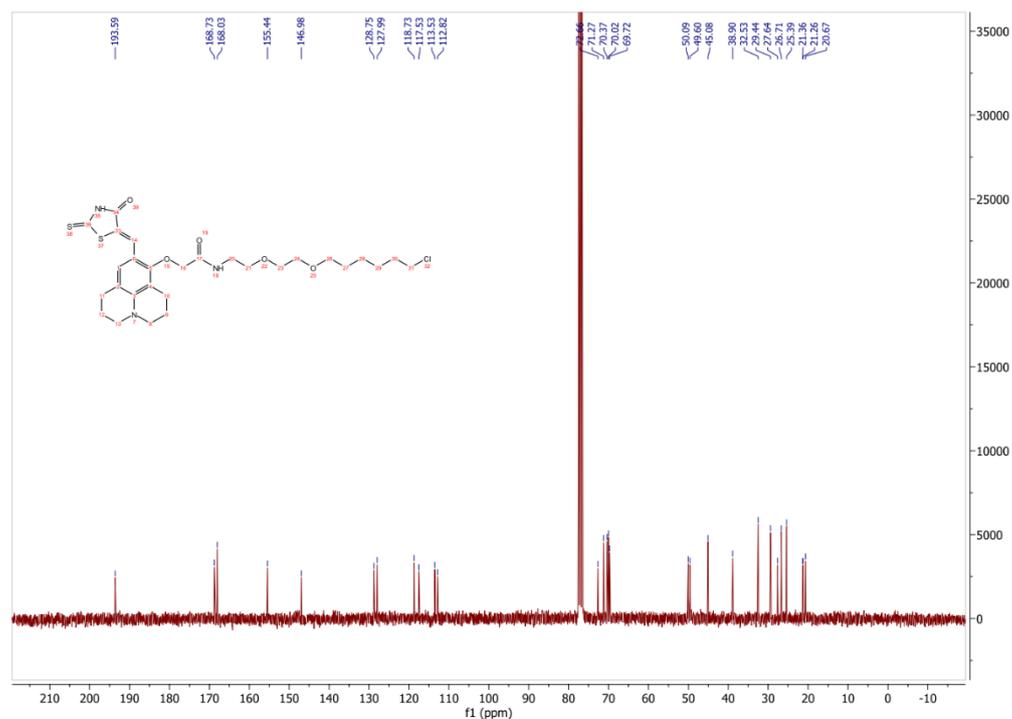
¹³C NMR spectra of DCVJ-Halo



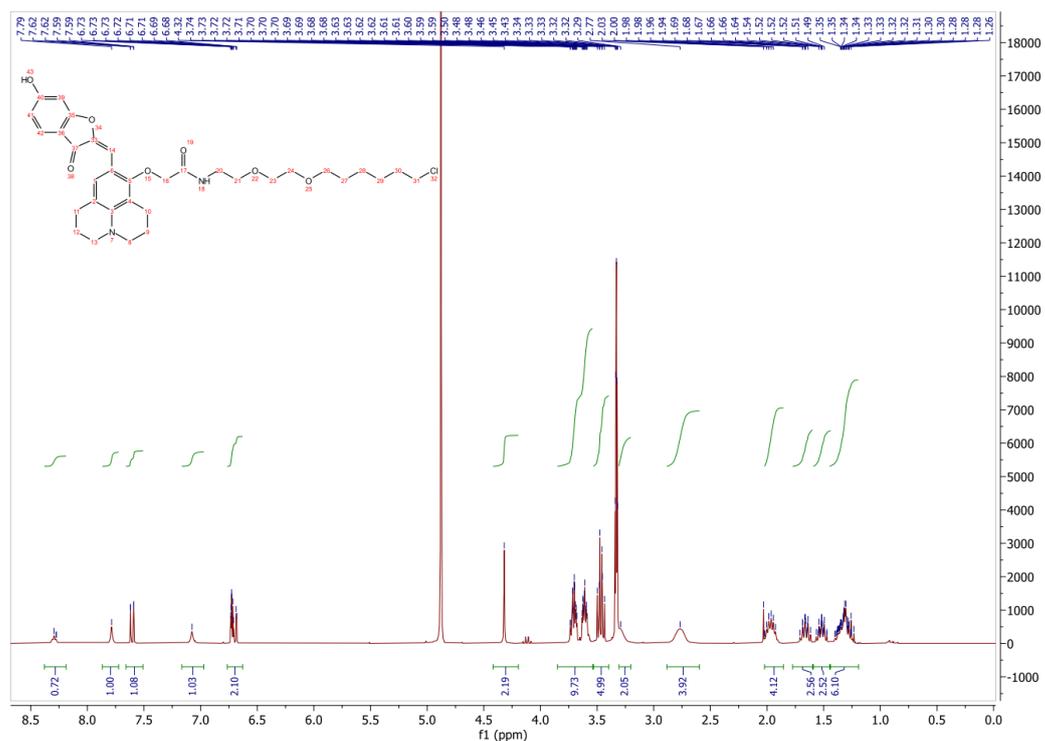
^1H NMR spectra of Orange-Halo2



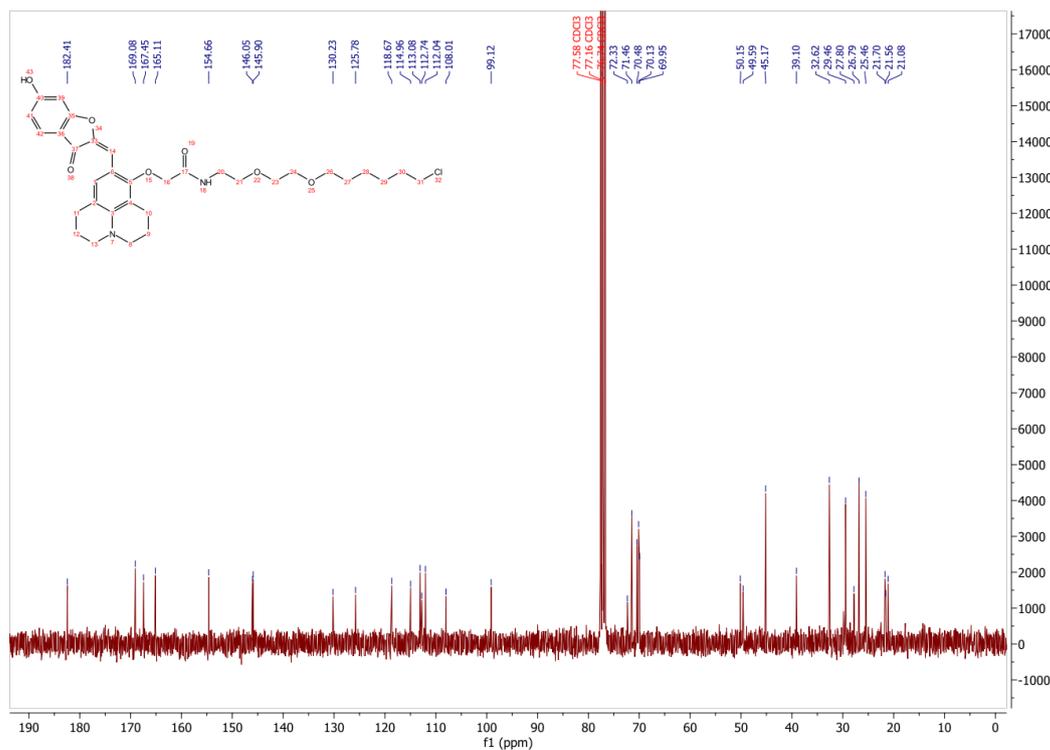
^{13}C NMR spectra of Orange-Halo2



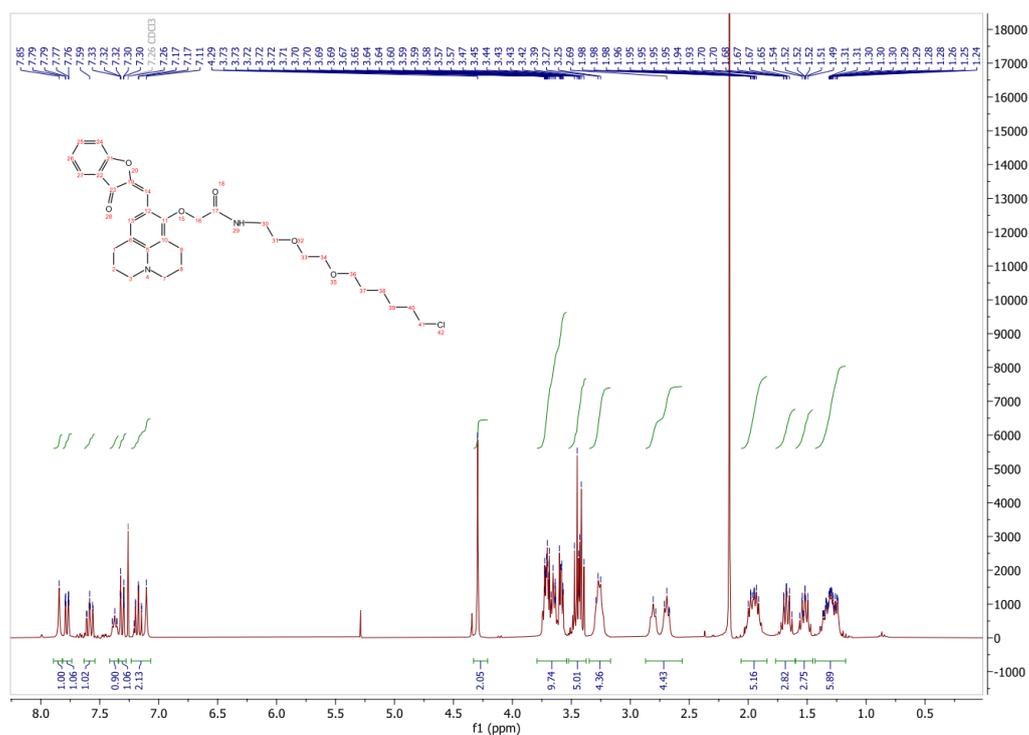
¹H NMR spectra of Red-Halo3



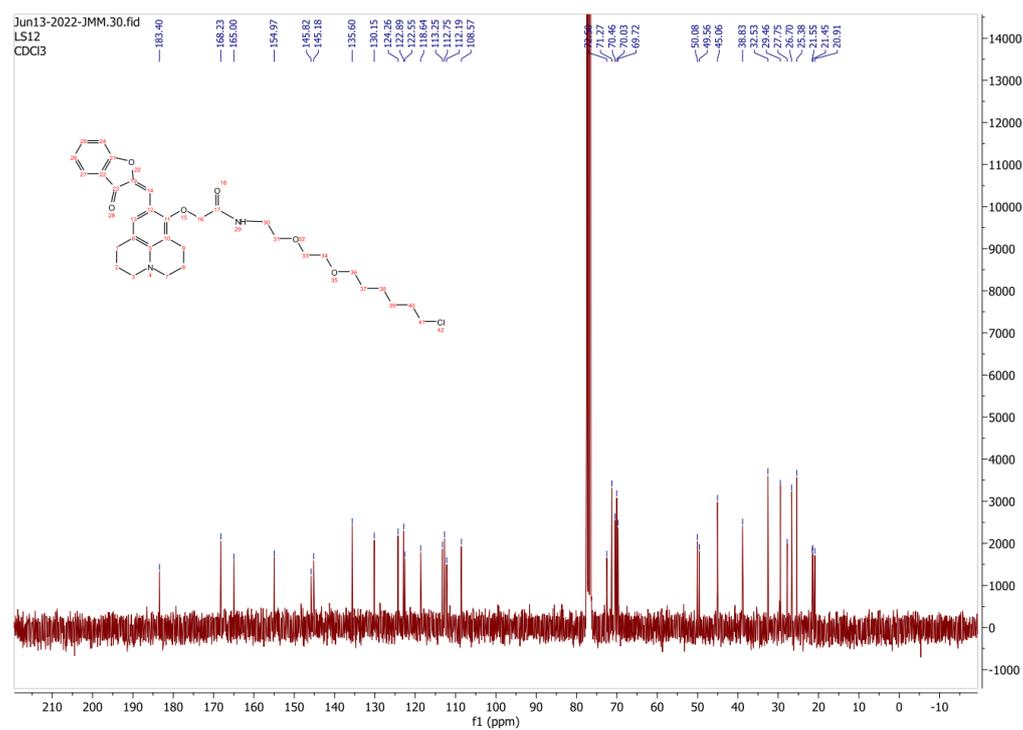
¹³C NMR spectra of Red-Halo3



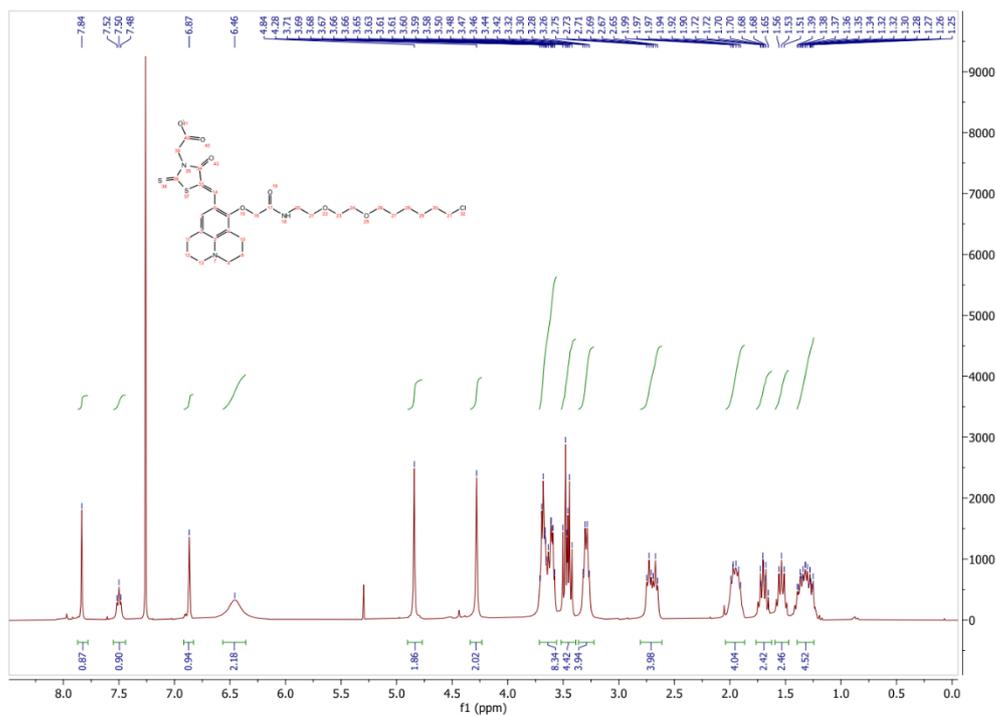
¹H NMR spectra of Red-Halo4



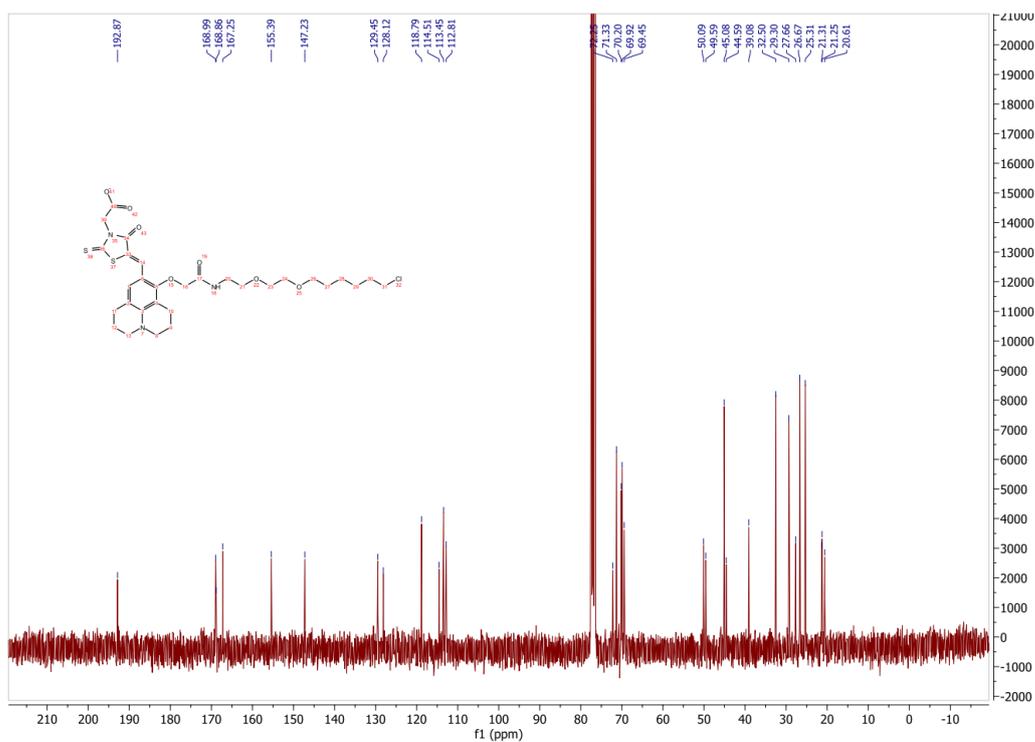
¹³C NMR spectra of Red-Halo4



¹H NMR spectra of Red-Halo5



¹³C NMR spectra of Red-Halo5



Chapitre III

**Développement de sondes pH
chimiogénétiques hybrides localement
activées pour étudier l'exocytose de
protéines en cellules vivantes**

Table des matières

I. Contextualisation	156
I.1. Le phénomène d'exocytose	156
I.1.1. Principe général de l'exocytose	156
I.1.2. Les différents modes de sécrétion	158
I.2. Sondes pH pour étudier l'exocytose par imagerie de fluorescence	160
I.1.1. Les protéines fluorescentes sensibles au pH	161
I.1.2. Les systèmes hybrides sensibles au pH	164
I.3. Méthodes de détection de l'exocytose par microscopie à fluorescence	167
I.1.1. La Microscopie à Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM)	169
I.1.2. La microscopie confocale Spinning-Disk	171
I.4. Un modèle d'étude de l'exocytose : sécrétion de la protéine CD63 dans les cellules HeLa	174
II. "Locally-Activated Chemogenetic pH Probes for Protein Exocytosis Monitoring"	176
Abstract	176
II.1. Introduction	177
II.2. Results and discussion	179
II.2.1. Design of fluorogenic pH probes.	179
II.2.2. Characterization in 40 % glycerol buffers.	182
II.2.3. Characterization in HaloTag.	184
II.2.4. Evaluation of chemogenetic pHluo-Halo indicators in live cells.	186
II.2.5. Detection of single exocytosis events in HeLa cells.	188
II.3. Conclusions and perspectives	191
III. Résultats complémentaires	193
III.1. Études spectroscopiques des ligands pHluo-Halo dans mHT	193
III.2. Imagerie de fluorescence des ligands pHluo-Halo-1&2 dans mHT	197
IV. Conclusion et perspectives	198
VI. Partie expérimentale	203
VII. Annexes	216

La synthèse de nouvelles sondes fluorogéniques hybrides a pour objectif d'étudier des mécanismes cellulaires dynamiques comme l'exocytose de certaines protéines. Ces sondes s'inscrivent parmi la petite famille de senseurs hybrides localement activés présentés dans le **Chapitre I**. Plus précisément, les fluorophores développés ici sont des rotors moléculaires présentant une double sensibilité au pH et à la protéine HaloTag. Leurs caractéristiques photophysiques permettent d'observer une activation de fluorescence à pH physiologique (pH 7.4) (Figure 51). La validation de ces sondes pH chimiogénétiques hybrides a été réalisée sur la protéine CD63 dont le processus de sécrétion est déjà connu. La visualisation du phénomène d'exocytose a été réalisée par microscopie TIRF sur une lignée de cellules HeLa. Ce travail a ainsi permis de valider l'utilisation de ces nouvelles sondes et permettre d'explorer la régulation de protéines d'intérêt dont le processus de sécrétion reste encore inconnu.

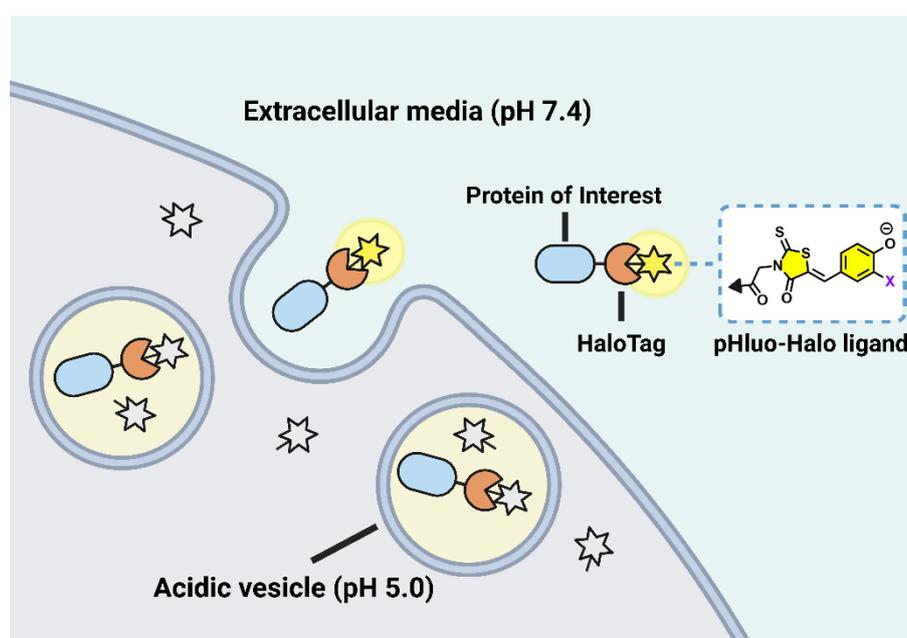


Figure 51. Principe général de l'utilisation de la plateforme des sondes pH chimiogénétiques hybrides obtenues pour étudier l'exocytose de protéines en cellules vivantes.

La synthèse des sondes **pHluo-Halo-2** et **pHluo-Halo-Red** a été réalisée par **Manon Wittwer** que j'ai encadrée dans le cadre de son stage de M2.

I. Contextualisation

Cette section traite du concept fondamental de l'exocytose dans les cellules ainsi que les méthodes permettant son étude par le biais de l'imagerie de fluorescence. De plus, elle introduit notre modèle d'étude, la protéine CD63, en fournissant une explication détaillée de ses caractéristiques.

I.1. Le phénomène d'exocytose

I.1.1. Principe général de l'exocytose

Les cellules, en tant qu'entités élémentaires constituant les êtres vivants, assurent des fonctions physiologiques à l'échelle de l'organisme *via* la communication intercellulaire. L'exocytose vésiculaire de messagers tels les facteurs de croissance, les hormones et les neurotransmetteurs permet aux cellules d'assurer des fonctions essentielles. Ces messagers contenus à l'intérieur de vésicules intracellulaires sont libérés dans le milieu extracellulaire par la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane cellulaire. Compte-tenu du rôle crucial de la communication intercellulaire et de son implication dans de nombreuses pathologies, l'exocytose constitue un champ de recherche en constante expansion depuis des décennies.^[260]

On retrouve généralement des vésicules de sécrétion de natures variées qui fusionnent avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire (Figure 52).^[261,262] La nature des vésicules dans les voies de sécrétion des messagers diffère en fonction du type cellulaire mais aussi en fonction de la nature de la molécule sécrétée.^[263] Par exemple, dans le cas des neurones, selon que le neurotransmetteur libéré dans la fente synaptique est un acide aminé comme le glutamate ou un neuropeptide comme l'enképhaline, les vésicules présynaptiques se distinguent au niveau moléculaire et structurel.^[264] De même, dans les astrocytes, on retrouve toute une variété de machinerie de vésicules de sécrétion.^[265] Dans le cadre

de ce projet, nous nous intéresserons exclusivement au phénomène d'exocytose dans des cellules non-neurales.

On distingue généralement deux types d'exocytose. L'exocytose **constitutive** dans laquelle les vésicules de sécrétion libèrent leur contenu lorsqu'elles atteignent la membrane plasmique et l'exocytose **régulée** ou **stimulée** par le calcium, dont la concentration augmente suite à un stimulus externe.^[266] Par définition, le processus d'exocytose constitutive n'est pas régulé par les concentrations calciques. Cependant, le mécanisme de régulation de fusion membranaire reste encore mal décrit. Le processus d'exocytose régulée est divisé en plusieurs étapes: i) le rassemblement en « grappes » des vésicules à la membrane plasmique, ii) l'accostage proche du site d'exocytose, iii) l'arrimage à la membrane plasmique, iv) l'amorçage et la fusion proprement dite qui dépend de l'augmentation de calcium cytosolique. Le calcium se lie à des protéines vésiculaires de complexe SNARE ce qui induit un changement de conformation et à la fusion de la membrane vésiculaire à la membrane plasmique.^[267]

D'un point de vue biochimique, les vésicules d'exocytose sont caractérisées principalement par une acidification de leur pH interne (Figure 52). Plus précisément, il existe un gradient de concentration en ions H⁺ régulé par une enzyme appelée V-ATPase ou « pompe à protons ». Cette enzyme est présente dans la membrane des vésicules et utilise l'énergie du nucléotide adénosine triphosphate ATP, pour accumuler des protons dans de nombreux compartiments subcellulaires tels que le réseau trans-Golgi (*trans-Golgi network*), les endosomes, les lysosomes, les vésicules de sécrétion ou les vésicules synaptiques.^[268] L'acidification de ces organelles est nécessaire à une multitude de processus biologiques (maturation, adressage ou recyclage de nombreuses protéines membranaires notamment) ainsi qu'au remplissage en médiateurs des vésicules de sécrétion et des vésicules synaptiques. La fusion entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique est un processus qui commence par l'exposition du milieu acide des vésicules avec le milieu neutre extracellulaire provoquant alors un changement de pH (alcalinisation) quasi immédiat (car dépendant de la diffusion des ions H⁺) du lumen des vésicules de sécrétion. Les molécules accumulées dans le lumen sont alors exposées à un changement de pH. Dans un second temps, les molécules vont diffuser dans le milieu extracellulaire. Ici, nous nous focaliserons sur les différents modes de sécrétion ayant été établis jusqu'à présent.

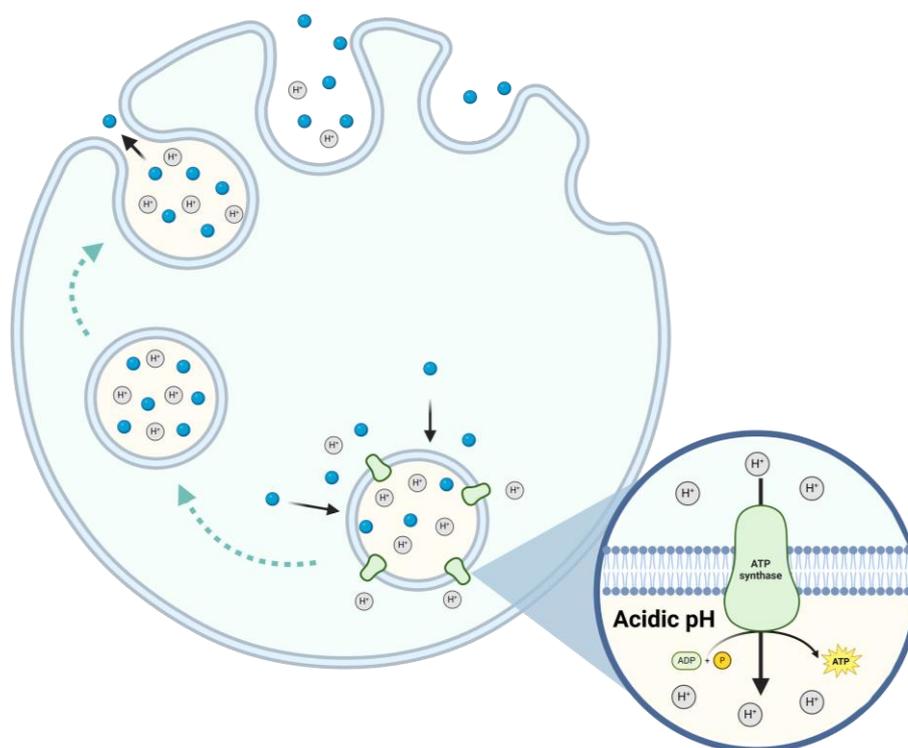


Figure 52. Principe de l'acidification des vésicules de sécrétion par l'enzyme ATPase dans une cellule eucaryote.

Principe de l'acidification des vésicules de sécrétion par l'enzyme ATPase dans une cellule eucaryote. L'accumulation des neurotransmetteurs (*en bleu*) est assurée par des transporteurs vésiculaires de façon active en utilisant le gradient électrochimique généré.

1.1.2. Les différents modes de sécrétion

Les travaux portant sur l'étude de la sécrétion à l'échelle cellulaire ont permis d'identifier deux modes d'exocytose (Figure 53).^[266]

- La fusion totale ou « **full-fusion** » dans laquelle les vésicules fusionnent complètement à la membrane plasmique après libération du contenu vésiculaire.
- La fusion « **kiss-and-run** » dans laquelle le pore de fusion s'ouvre puis se referme. Ce mode de sécrétion empêche ainsi une intégration complète de la vésicule à la membrane cellulaire et induit une libération partielle des composants intravésiculaires. Ce mode est notamment impliqué dans la régulation des processus d'exocytose cellulaire.

Ces 2 modes de sécrétion de molécules jouent des rôles distincts dans le fonctionnement de la cellule et la physiologie de l'organisme et coexistent au sein d'une même cellule.

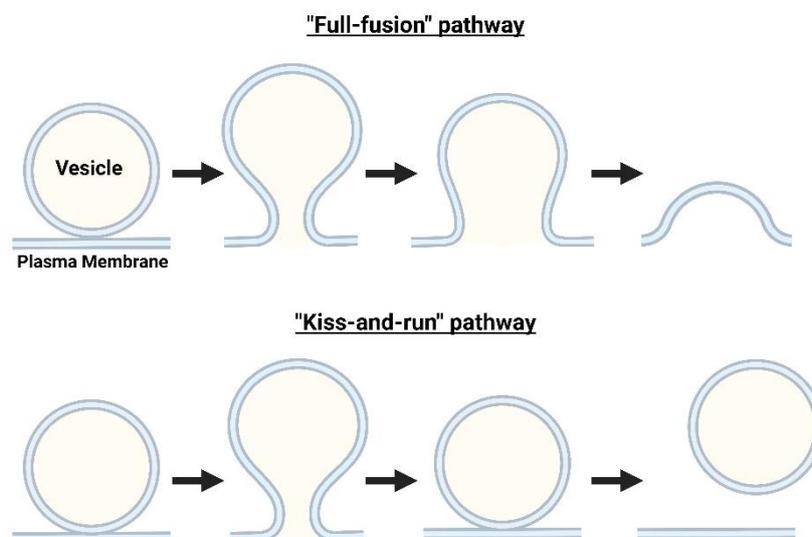


Figure 53. Deux catégories de fusion membranaire intervenant durant le phénomène d'exocytose.

L'exocytose est toujours suivie du processus d'endocytose dont la complexité dépend du degré de fusion qui a eu lieu entre la vésicule et la membrane plasmique. Dans le cas de l'exocytose de type « kiss-and-run », la vésicule s'attache transitoirement à la membrane ce qui permet un dépôt partiel de son contenu et ainsi une endocytose rapide de cette vésicule possible. La fusion complète de la vésicule entraîne une endocytose plus lente qui nécessite une machinerie spécifique. Les mécanismes d'exocytose que ce soit *via* la formation, l'adressage la sécrétion des vésicules ou encore de la régulation des facteurs déclencheurs sont particulièrement divers et complexes. À cela s'ajoute une grande variété de protéines et de molécules sécrétées qui peuvent être identifiées et dont l'altération peut contribuer à des anomalies du développement neuronal dans des modèles de maladies neurodéveloppementales.^[269]

Les techniques utilisées pour étudier l'exocytose régulée sont de 2 ordres: les techniques fonctionnelles, comme l'ampérométrie ou la méthode de patch-clamp, et

les techniques de microscopie.^[270,271] La très petite taille des vésicules, qui peut aller de 50 nm à 200 nm requiert de l'imagerie à haute résolution. L'approche optique reposant sur la microscopie à fluorescence offre des avantages majeurs comme une très grande sensibilité de détection, une résolution spatio-temporelle très élevée et la possibilité de suivre plusieurs cellules simultanément. Les avancées technologiques en matière de microscopie chez l'animal vivant permettent maintenant de visualiser des protéines directement dans le tissu et donc de suivre des phénomènes physiologiques *in vivo*.^[272] L'imagerie de protéines vésiculaires ou de biosenseurs fluorescents permet d'améliorer considérablement la détection et l'analyse du phénomène d'exocytose. Une diversité de sondes fluorescentes a ainsi été développée afin d'observer l'exocytose en temps réel sans perturber le fonctionnement physiologique des cellules tout en permettant une analyse précise.^[273,274] En particulier, le changement de pH apparaissant au moment de la fusion membranaire a été exploité pour générer des sondes fluorescentes sensibles au pH permettant de révéler le phénomène d'exocytose en microscopie à fluorescence.

I.2. Sondes pH pour étudier l'exocytose par imagerie de fluorescence

On peut mentionner deux applications notables permettant de suivre des processus d'exocytose grâce à la fluorescence. Ces dernières exploitent le fait que, lorsque la vésicule fusionne avec la membrane plasmique, il y a un échange rapide de biomolécules à travers le pore de fusion accompagné d'une diffusion de l'excès des protons vésiculaires vers le milieu extracellulaire entraînant une augmentation du pH local environnant les biomolécules sécrétées. La première application consiste à utiliser de petits colorants moléculaires fluorescents pouvant rapidement diffuser à l'intérieur ou à l'extérieur de la vésicule et ainsi marquer par fluorescence la globalité de la vésicule en tant que traceurs fluorescents. Dans cette catégorie, on retrouve notamment les « Fluorescent false neurotransmitters » (FFNs) qui permettent d'imager l'exocytose au niveau des neurones dopaminergiques ou encore les colorants basés sur des motifs styrylpyridinium (FM1) qui sont non-perméables à la membrane et permettent ainsi de suivre le cycle de vie des vésicules synaptiques.^[275,276] La seconde application repose sur l'utilisation de sondes pH fluorescentes pouvant être fusionnées spécifiquement à une protéine d'intérêt afin de suivre les mécanismes de sécrétion et

de régulation de cette dernière. L'avantage de ces sondes senseurs du pH est de pouvoir bénéficier de la sélectivité de l'encodage génétique par formation d'une protéine de fusion entre la protéine ciblée et la sonde pH fluorescente.

La suite de cette partie se consacre uniquement à cette deuxième application, avec le développement de biosenseurs fluorescents sensibles au pH permettant d'explorer le processus d'exocytose d'une protéine marquée en cellules vivantes.

1.1.1. Les protéines fluorescentes sensibles au pH

L'acidification du lumen des vésicules conduit une baisse de pH autour 5.0. Au début de l'exocytose, lors de la fusion de la membranaire vésiculaire, le contenu de la vésicule est rapidement exposé au pH neutre du milieu extracellulaire ce qui induit une alcalinisation du milieu vésiculaire. Ce phénomène est à la base du principe de développement de protéines sensibles au pH pour suivre et étudier l'exocytose par imagerie de fluorescence. Une approche de mutagénèse dirigée par Rothman et ses collaborateurs a permis de mettre au point deux variants de la GFP nommés ecliptic- et ratiométrique pHluorin contenant chacun des mutations générant une sensibilité au pH de la GFP initiale.^[76] En condition acide (pH < 6), la protéine ecliptic-pHluorin est non fluorescente et lorsque le pH augmente vers un environnement plus neutre, la fluorescence produite par les deux bandes d'excitation augmente significativement. Par conséquent, l'expression ciblée de ces protéines fluorescentes sensibles au pH aux vésicules de sécrétion permet de visualiser le phénomène de fusion membranaire de l'exocytose en temps réel reconnaissable grâce à une augmentation ponctuelle et localisée de la fluorescence. Sankararayanan et ses collaborateurs ont développé plus tard un variant de l'ecliptic-pHluorin, la superecliptic pHluorin (SEP) permettant d'améliorer considérablement l'émission de fluorescence correspondante au pic d'excitation à 475 nm tout en maintenant sa sensibilité au pH.^[277] La protéine SEP est devenue la protéine de référence pour l'analyse de l'exocytose avec une fluorescence brillante à pH physiologique et un pK_a autour de 7 permettant son extinction à pH acide dans les vésicules de sécrétion (Figure 54). Une diversité de protéines analogues appelées « pHluorin » a ainsi été générée depuis, avec l'objectif d'améliorer les caractéristiques spectrales, la photostabilité ou encore de cibler d'autres caractéristiques spécifiques pour assurer la qualité de l'imagerie.^[279–281]

Combinées à diverses protéines d'intérêt *via* la construction d'une protéine de fusion, ces pHluorins ont permis d'étudier leur mécanisme de sécrétion par encodage génétique et ainsi répondre à de nombreuses questions biologiques (Figure 54). Par exemple, l'équipe de Wachowiak a pu observer et comprendre l'activité neuronale reliée à l'odorat chez la souris en exprimant la protéine de fusion synapto-pHluorin dans certains neurones reliés au bulbe olfactif.^[281]

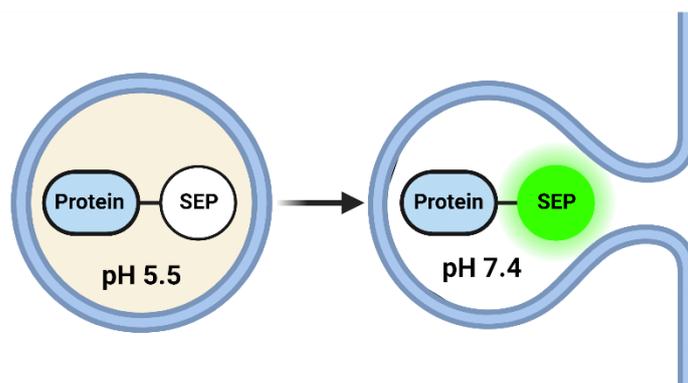


Figure 54. Principe de l'utilisation des protéines fluorescentes sensibles au pH (ici la SEP) pour suivre l'exocytose d'une protéine d'intérêt depuis une vésicule acide vers le milieu extracellulaire à pH neutre.

En outre, afin de pouvoir s'affranchir de l'auto-fluorescence des cellules, atténuer la diffusion de la lumière, réaliser de l'imagerie multi-couleur et envisager l'imagerie sur des tissus ou *in vivo*, des protéines fluorescentes sensibles au pH émettant à de plus grandes longueurs d'onde dans le rouge ou le proche IR ont été développées comme mOrange2,^[283] pHTomato,^[283] pHoran4,^[284] pHuji^[284] ou plus récemment pHmScarlet (Figure 55).^[285] De façon similaire aux pHluorins, ces protéines fluorescentes sensibles au pH ont un pK_a autour de 7 et présentent ainsi une fluorescence très faible ou nulle lorsqu'elles sont présentes dans les vésicules de sécrétion et une fluorescence intense dans le rouge ou le proche IR lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire au moment de la fusion membranaire.

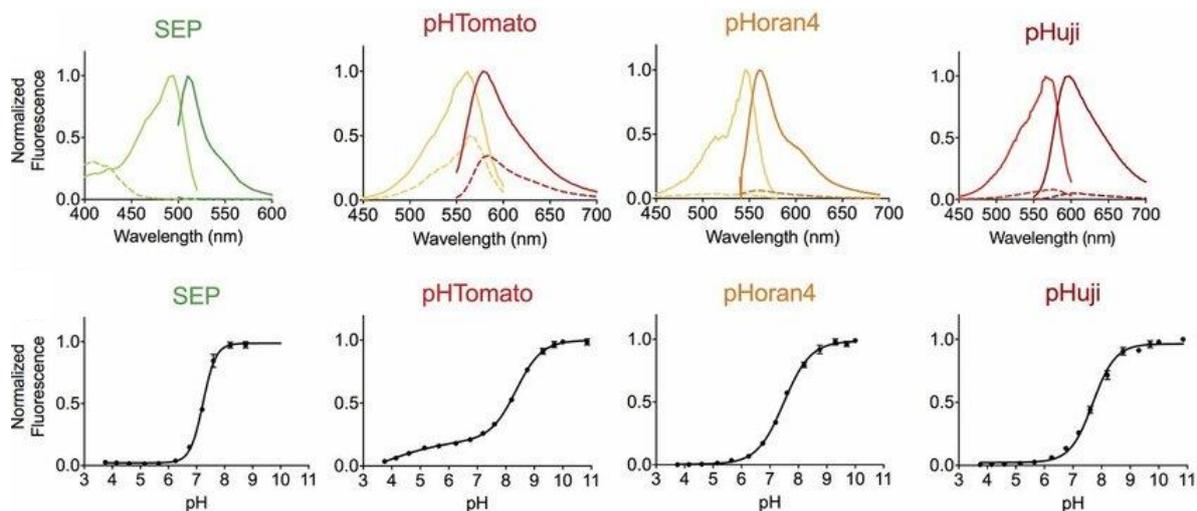


Figure 55. Spectres d'absorption et d'émission de quelques protéines fluorescentes pH sensibles et spectres de leur titration pH.

Adapté des travaux du groupe de D. Perrais.^[285]

Néanmoins, le développement de ces protéines fluorescentes sensibles au pH est souvent complexe et long et elles ont pour inconvénient de présenter une faible versatilité de leurs propriétés photophysiques et biochimiques. Générer de nouveaux outils fluorescents alternatifs génétiquement encodés pour analyser et évaluer les dynamiques de sécrétion et de régulation du trafic intracellulaire avec une plus grande modularité serait un atout considérable. L'essor des systèmes chimiogénétiques hybrides sensibles au pH depuis quelques décennies permet de répondre à ce besoin.

I.1.2. Les systèmes hybrides sensibles au pH

La diversité moléculaire de la chimie a permis de générer un nombre considérable de molécules présentant une sensibilité au pH et qui ont été utilisées pour étudier le phénomène d'exocytose par imagerie de fluorescence.^[273,287] Pour pallier au manque de spécificité du marquage des molécules synthétiques dans les cellules en culture, les systèmes hybrides ont été développés comme nouveaux outils alternatifs aux pHluorins. L'utilisation de ces systèmes hybrides sensibles au pH repose sur la construction d'une protéine de fusion contenant la protéine d'intérêt associée à une enzyme étiquette de marquage pouvant se lier à un fluorophore synthétique dont l'émission de fluorescence est dépendante du pH environnant (Figure 56). Ainsi, la construction d'une seule protéine de fusion exprimée en cellules vivantes offre la possibilité de moduler facilement et rapidement le fluorophore et ainsi obtenir une diversité de sondes pH avec des propriétés spectrales ou biochimiques différentes.

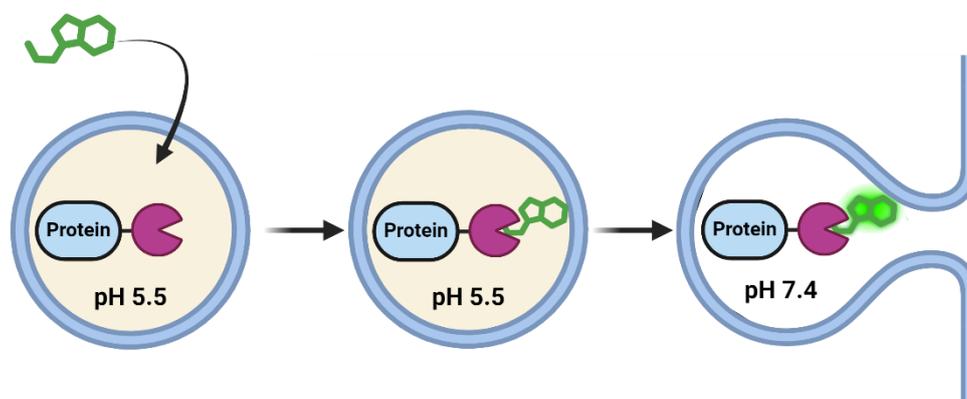
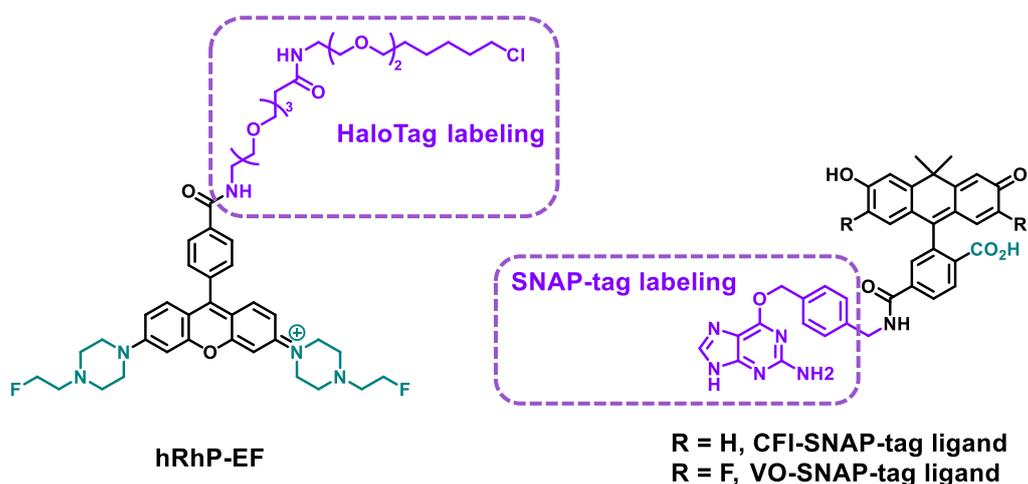


Figure 56. Principe de l'étude de l'exocytose avec l'utilisation d'un système chimiogénétique hybride pH sensible.

Pour obtenir un système chimiogénétique hybride adapté et efficace dans le suivi du phénomène d'exocytose en cellules vivantes, il y a un cahier des charges à respecter à la fois pour le design des fluorophores et de la biomolécule de marquage. Concernant la partie moléculaire, le fluorophore doit présenter une bonne dynamique de variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH. En effet, une sensibilité au pH peu marquée ne permettra pas d'observer convenablement l'effet « ON/OFF » de fluorescence au moment de la fusion membranaire et entraînera une perte de la

résolution spatio-temporelle. Les fluorophores synthétisés doivent également présenter une bonne pénétration cellulaire afin d'assurer le marquage des protéines dans divers compartiments cellulaires comprenant les vésicules de sécrétion. Enfin, ces derniers doivent également présenter une brillance suffisante et une bonne photostabilité pour assurer la qualité de l'acquisition. Concernant la partie hybride du système, la liaison entre le fluorophore synthétique et la biomolécule de marquage doit être spécifique afin de garantir la sélectivité de l'encodage génétique. De plus, la formation du complexe fluorophore/biomolécule doit conserver les propriétés photophysiques intrinsèques du fluorophore.

Le design de quelques sondes pH fluorescentes hybrides respectant ce cahier des charges a été décrit précédemment. En 2014, Asanuma et ses collaborateurs ont développé des sondes pH fluorescentes hybrides activables en milieu acide afin de visualiser le phénomène d'exocytose en cellules vivantes.^[103] Le fluorophore de ces sondes pH est constitué d'un motif rhodamine couplé à des piperazines permettant de combiner la forte brillance des rhodamines avec la sensibilité au pH apporté par les piperazines à travers un mécanisme de transfert électronique photoinduit (PeT) (Scheme 4). Ce fluorophore est également décoré d'un ligand supplémentaire permettant d'établir une liaison covalente avec la protéine de marquage HaloTag (Scheme 4). Les études *in vitro* de la molécule seule ont permis de caractériser sa viabilité pour étudier la sécrétion protéines cibles en cellules vivantes avec un pK_a de 5.1 et une forte sensibilité au pH traduite par un ratio d'activation de 58 entre pH 5.0 et pH 7.4. Cette sonde chimiogénétique hybride sensible au pH a permis d'observer une émission de fluorescence à pH acide dans des vésicules de sécrétion notamment dans le cas de l'exocytose de la protéine VAMP2 (Figure 57).



Scheme 4. Structures moléculaires de fluorophores utilisés pour le design de sondes pH chimiogénétiques hybrides pour suivre le phénomène d'exocytose.

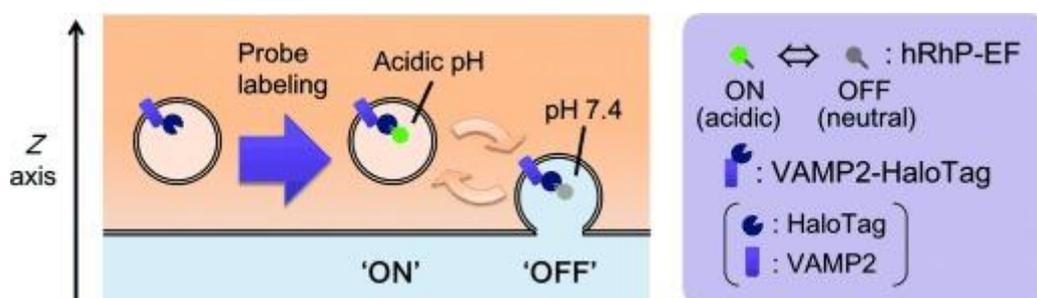


Figure 57. Principe du marquage de l'exocytose de VAMP2 avec la sonde pH hybride hRhP-EF.

Adapté de Asanuma et *al.*^[103]

Par la suite, le groupe de Perrais a développé d'autres sondes pH hybrides en utilisant une carbofluorescéine (CFI et VO) avec un marquage ciblée à la protéine SNAP-tag: ligands CFI-SNAP-tag et VO-SNAP-tag (Scheme 4).^[104] Le mécanisme d'activation de fluorescence est différent ici car la fluorescence est activé à pH neutre et éteinte à pH acide suite à un mécanisme de cyclisation intramolécule de la fluorescéine. Les caractérisations *in vitro* de ces fluorophores ont également permis de valider l'intérêt de ces sondes pH pour étudier l'exocytose en cellules vivantes avec un pK_a autour de 7 ainsi qu'une bonne sensibilité au pH permettant d'observer une forte émission de fluorescence à pH physiologique au moment de la fusion membranaire, notamment dans le cas de la sécrétion de la protéine VAMP2 (Figure 58).

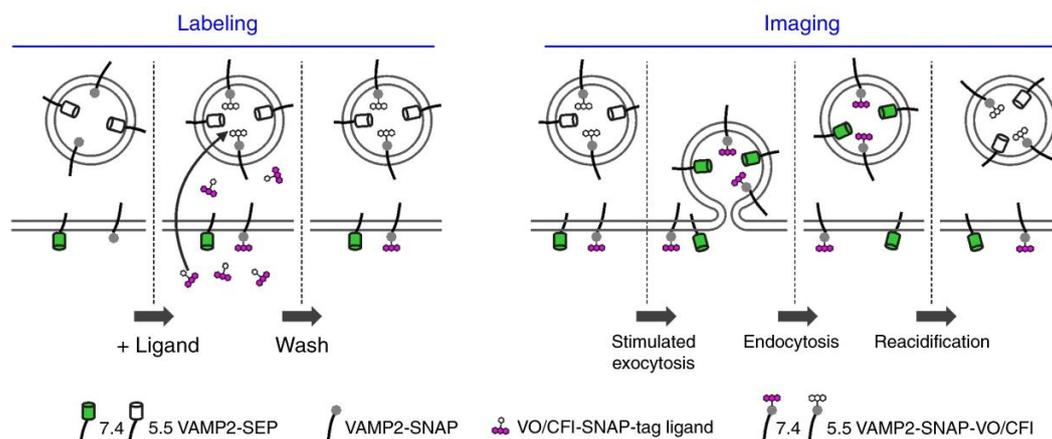


Figure 58. Principe de détection du phénomène d'exocytose en utilisant les systèmes hybrides SNAP-tag/VO et SNAP-tag/CFI.

Adapté de Martineau et al.^[104]

En outre, ces systèmes hybrides permettent également de visualiser le mécanisme d'endocytose des protéines situées à la membrane en mesurant l'activation inverse de fluorescence de la sonde (ON/OFF ou OFF/ON) comme le montre le schéma de la figure 58. Ces résultats mettent ainsi en évidence l'efficacité et la simplicité de mise en œuvre des sondes pH hybrides pour visualiser le phénomène d'exocytose ou d'endocytose.

Le développement de ces divers outils fluorescents constitue un enjeu important pour observer la sécrétion vésiculaire et l'exocytose par une approche optique. En parallèle du développement de sondes fluorescentes sensibles au pH, des avancées technologiques dans les moyens de visualisation de ces évènements complexes qui nécessitent une grande résolution spatio-temporelle ont également été réalisées.

I.3. Méthodes de détection de l'exocytose par microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence repose sur l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiquement localisés ou associés à une réponse physiologique de la cellule.^[10] Dans le contexte de l'étude du phénomène d'exocytose, le besoin est de pouvoir visualiser les vésicules de sécrétion au sein de milieu intracellulaire grâce à l'utilisation de sondes sensibles au pH comme celles précédemment détaillées. Le choix du type de

microscopie à fluorescence est primordial compte tenu de la taille des structures ciblées (échelle nanométrique) et de la rapidité de la fusion des vésicules (de l'ordre de la ms ou de la ns), qui nécessitent donc une grande résolution spatio-temporelle. Malgré sa bonne résolution spatiale, la microscopie confocale est très peu utilisée pour la détection optique du phénomène d'exocytose.^[288,289] En effet, sa résolution spatiale (400-800 nm de profondeur de champ) et temporelle (\sim s) permet de visualiser les vésicules au sein du cytoplasme cellulaire mais sans permettre de caractériser la dynamique du phénomène de sécrétion (Figure 59).^[8] Les techniques de microscopie à haute résolution comme la microscopie STED, commencent également à être utilisées pour étudier l'exocytose permettant ainsi de bénéficier d'une résolution optique plus élevée mais demeurent assez lentes pour l'acquisition du phénomène.^[290] La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM) est la méthode la plus couramment utilisée pour le suivi de l'exocytose^[291,292] en raison de ses caractéristiques spécifiques qui permettent l'excitation d'une faible épaisseur au niveau de la membrane cellulaire, avec un rapport signal/bruit élevé et des dommages cellulaires (phototoxicité) réduits. Une autre technique également utilisée en raison de ses caractéristiques adaptées à la détection du phénomène d'exocytose sur une plus longue durée est la microscopie confocale Spinning-Disk. Les caractéristiques de ces deux types de microscopies sont détaillées à la suite de cette partie.

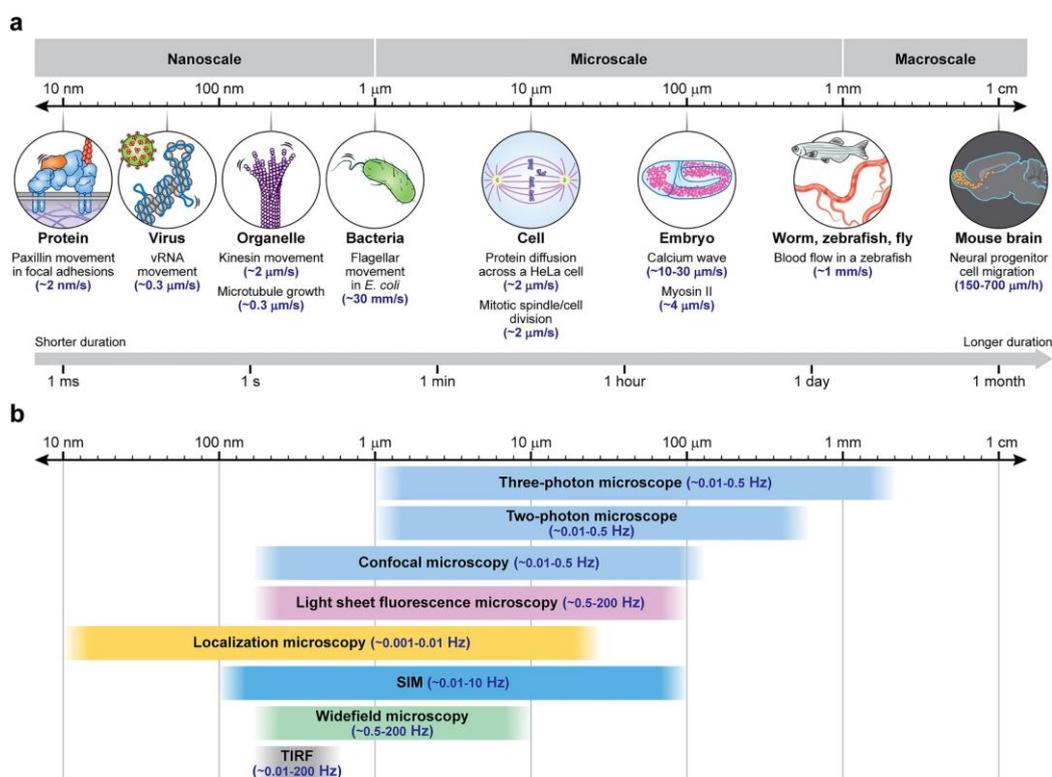


Figure 59. Présentation des différentes échelles spatiotemporelles du vivant accessibles par les techniques de microscopie.

(a) Exemples des phénomènes biologiques se produisant en fonction de l'échelle spatiale et temporelle.
 (b) Méthodes de microscopies à fluorescence utilisées dans le vivant pour observer ces phénomènes.
 Adapté de Wu et al.^[8]

1.1.1. La Microscopie à Fluorescence par Réflexion Totale Interne (TIRFM)

La microscopie TIRF a été développée par Axelrod au début des années 1980^[292] puis largement utilisée par la suite pour diverses applications biologiques sur cellules en culture.^[293,294] Cette technique se distingue par sa capacité à restreindre le champ de profondeur d'illumination à une faible épaisseur (entre 50 et 300 nm) grâce à un champ évanescent généré par l'orientation du faisceau d'irradiation selon un certain angle. La valeur de cet angle se calcule *via* la loi de Snell-Descartes:

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

Avec n_1 l'indice de réfraction du premier milieu contenant le rayon incident, n_2 l'indice de réfraction du deuxième milieu contenant le rayon réfracté, θ_1 l'angle d'incidence (en radian) et θ_2 l'angle de réfraction pour lequel les conditions de réflexion totale sont

respectées (en radian). En règle générale dans les conditions d'imagerie, $n_1 > n_2$ car le milieu incident correspond au verre qui supporte l'échantillon ($n_1 = 1,5$) et le milieu du rayon réfracté correspond à l'échantillon biologique composé majoritairement d'eau ($n_2 = 1,33$).

En condition d'incidence TIRF, l'angle θ_1 choisi est supérieur à l'angle critique θ_c correspondant à l'angle limite pour lequel il n'y a plus réfraction mais réflexion totale du faisceau incident. La lumière réfléchie pénètre ainsi sur une courte distance dans le milieu d'indice n_2 générant ainsi une onde évanescente dont l'intensité diminue exponentiellement avec la distance à l'interface avec l'échantillon à analyser. Cette lumière va donc irradier le milieu sur une faible profondeur et exciter uniquement les fluorophores proches de l'interface entre les deux milieux. Dans le contexte de l'exocytose, cette condition permet l'excitation sélective des vésicules de sécrétion de l'échantillon biologique marquées par des fluorophores et localisées à proximité de la membrane des cellules attachées sur le verre (Figure 60).^[295-297] Le microscope TIRF présente ainsi un excellent rapport signal/bruit et une phototoxicité très faible permettant de suivre localement la dynamique et la trajectoire de ces vésicules de sécrétion. Dans le cas de l'utilisation des sondes pH fluorescentes, la mesure de la variation de l'intensité de fluorescence entre le milieu acide intravésiculaire (pH 5.0) et le milieu extracellulaire à pH physiologique (pH 7.4) au niveau de la membrane plasmique se traduit par l'apparition de points lumineux ou « burst » sur la vidéo d'acquisition.^[298]

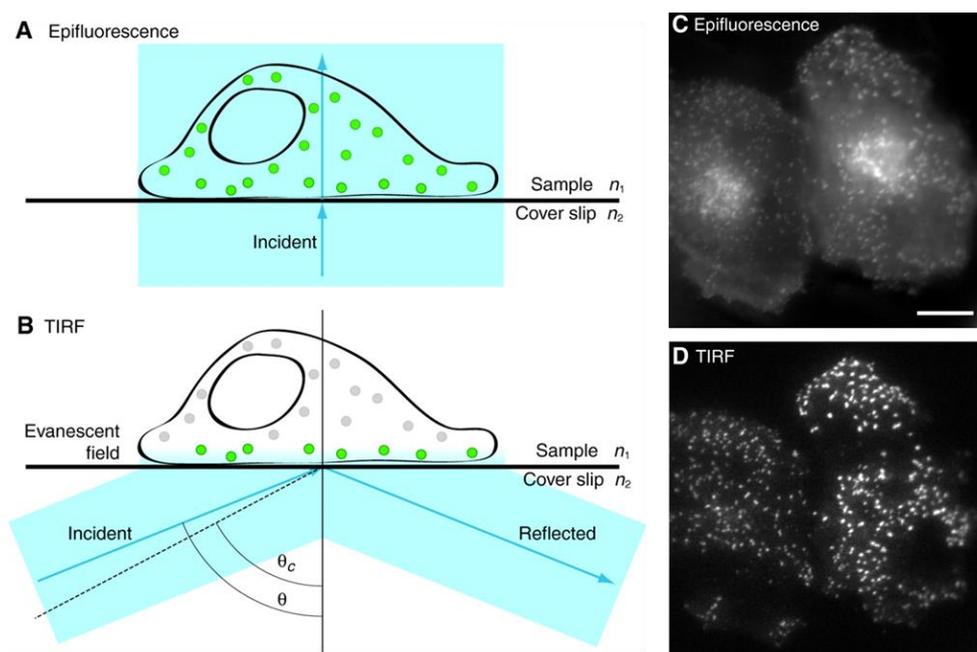


Figure 60. Comparaison entre la microscopie épifluorescence et la microscopie TIRF.

(A) Epifluorescence. Le faisceau d'excitation traverse directement tout l'échantillon et excite tous les fluorophores. (B) TIRF. Le faisceau d'excitation entre à gauche de l'échantillon avec un angle θ plus élevé que l'angle critique θ_c de réflexion totale. Le faisceau d'excitation est réfléchi en dehors de l'interface avec l'échantillon créant une onde évanescente à l'intérieur de l'échantillon. Seuls les fluorophores compris dans cette onde évanescente sont excités (en vert). L'indice de réfraction de l'échantillon (n_1) doit être plus faible que l'indice de réfraction de la lamelle (n_2) pour observer ce phénomène de réflexion totale interne. (C,D) Comparaison d'images obtenues en utilisant la microscopie épifluorescence *versus* TIRF. Protéine clathrine fusionnée à la GFP observée en épifluorescence (C) et en TIRF (D) dans des cellules HeLa. Barre d'échelle : 10 μm . Figure adaptée de A. L. Mattheyses et al.^[293]

Cependant, la microscopie TIRF ne permet pas d'imager des vésicules distantes de la membrane plasmique et se restreint aux cultures de cellules adhérentes. Pour suivre le devenir des vésicules avant et après l'étape de fusion membranaire, la microscopie confocale Spinning-Disk a été développée.

1.1.2. La microscopie confocale Spinning-Disk

La microscopie confocale Spinning-disk est une technique d'imagerie optique qui permet d'obtenir des images en coupe optique de cellules, de tissus et de petits organismes (drosophiles^[299], zebrafish^[300], etc.) avec une haute résolution latérale.

Elle présente de nombreux avantages par rapport à la microscopie confocale à balayage laser, notamment en termes de rapidité d'acquisition, de réduction du photoblanchiment, de phototoxicité et de possibilité d'imager des échantillons épais. Cette technique repose sur l'utilisation d'un disque rotatif percé de trous microscopiques qui éclairent simultanément plusieurs points de l'échantillon. Environ 1% de la surface du disque est constituée de trous de largeur fixe disposés en pistes spirales vers l'extérieur.^[301] Ce disque, initialement inventé par Nipkow dans les années 1890 est placé entre la source d'illumination (i.e. généralement un LASER) et l'échantillon. La lumière de fluorescence émise par les fluorophores est ensuite collectée par des microlentilles et dirigée vers un détecteur (le plus souvent une caméra).^[302] Initialement, ces trous étaient positionnés de manière à ce que chaque partie de l'image soit balayée lorsque le disque tournait et que la lumière de chaque point soit transmise électriquement et réassemblée à distance à travers un second disque. Plusieurs décennies plus tard, ce système a évolué vers le développement d'un microscope confocal à disque de balayage tandem avec le même principe de focalisation de la lumière issue de l'échantillon mais permettant cette fois-ci le balayage de tout le champ de l'échantillon à grande vitesse et la capture de l'image par une caméra (Figure 61).^[302] Ainsi, cette technique permet des acquisitions très rapides et limite le photoblanchiment et la phototoxicité pour des observations de longue durée. Cette approche est tout particulièrement bien adaptée à l'imagerie du vivant notamment dans le cadre de l'exocytose pour imager les vésicules de sécrétion à grande vitesse et en limitant le photoblanchiment des sondes fluorescentes.^[303-305]

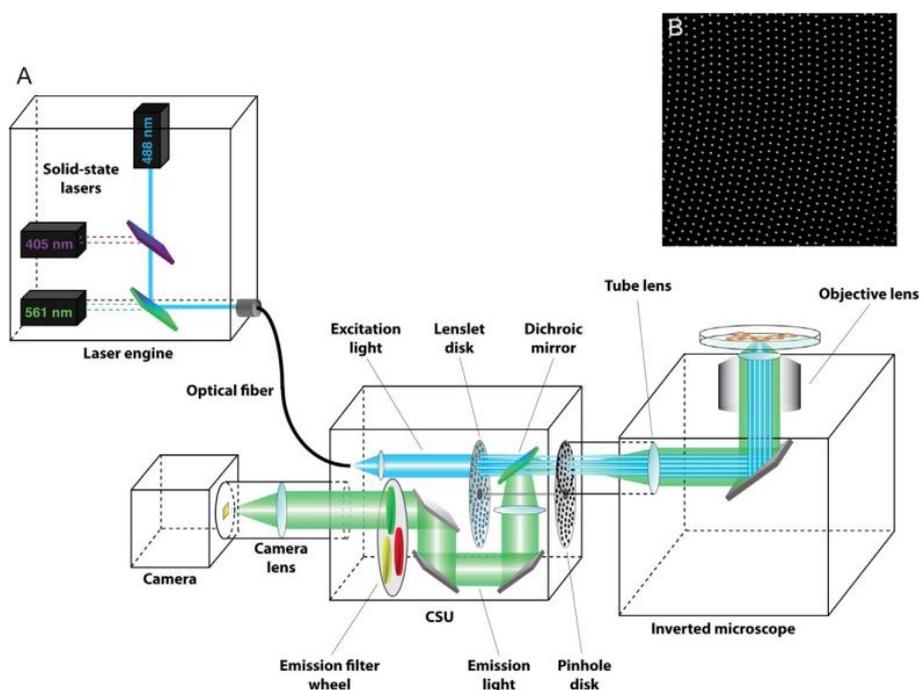


Figure 61. Principe de fonctionnement d'un microscope confocal Spinning-Disk.

Adapté de Oreopoulos et coll.^[306]

Toutefois, cette technique présente également quelques limites. Bien que la microscopie Spinning-Disk permet de réduire le photoblanchiment et la phototoxicité par rapport à la microscopie confocale à balayage laser, ces deux phénomènes continuent de se produire pour de longues acquisitions répétées et lors de l'utilisation de puissances laser élevées. De plus, le champ de vision de la microscopie Spinning-Disk est limité par le nombre de microlentilles sur le disque. Il y a également une limite à l'imagerie de tissus épais et profond car la lumière diffusée par les couches supérieures peut obscurcir les détails des couches inférieures. Enfin, la résolution spatiale de cette technique dépend de la taille des trous qui dépendent de l'objectif utilisé et qui ne sont pas réglables.

Ainsi, l'efficacité de l'étude du phénomène d'exocytose repose sur la combinaison de sondes pH ou traceurs fluorescents optimisés avec une bonne dynamique d'activation associés à une technique de microscopie adaptée permettant de bénéficier d'une grande résolution spatio-temporelle. Il faut noter que de nouveaux outils fluorescents pour l'étude de l'exocytose comme l'utilisation des quantum dots^[307]

continuent d'émerger reflétant la quête d'outils toujours plus performants pour l'étude de phénomènes biologiques complexes.

I.4. Un modèle d'étude de l'exocytose : sécrétion de la protéine CD63 dans les cellules HeLa

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de valider la nouvelle sonde pH fluorogénique hybride localement activée en étudiant la sécrétion de la protéine CD63 dans les cellules HeLa par microscopie TIRF. La protéine CD63 est une protéine appartenant à la grande famille des protéines tetraspanines qui sont des protéines transmembranaires exprimées dans divers types cellulaires.^[309] La protéine CD63 est exprimée principalement dans le système endosomal, en particulier dans les endosomes tardifs ou « multivesicular bodies » (MVB) et les lysosomes. Cette protéine peut également être présente au niveau de la surface cellulaire. Les MVB contiennent des vésicules intraluminales appelées exosomes enrichies de divers lipides, acides nucléiques et protéines dont CD63. Une majeure partie des MVB fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu^[310] mais une autre partie est dirigée vers la membrane cellulaire avec laquelle elle fusionne et libère dans le milieu extracellulaire leurs exosomes contenant CD63 (Figure 62). Une fois ces exosomes libérés dans le milieu extracellulaire, ils vont pouvoir assurer différents rôles dans des processus physiologiques ou pathologiques variés comme le développement cellulaire, la régulation immunitaire ou la progression cancéreuse.^[311–315] Comprendre les mécanismes sous-jacents de régulation, de dynamique et de trafic de ces exosomes en temps réel est un enjeu majeur en biologie.

Plusieurs travaux ont caractérisé le cheminement et la libération des exosomes depuis les MVB jusque dans le milieu extracellulaire par imagerie TIRF en utilisant la protéine CD63 fusionnée avec des protéines fluorescentes sensibles au pH comme CD63-pHluorin (Figure 62).^[233,316,317] La fluorescence de la pHluorin est éteinte à l'intérieur des MVB acides et s'active lors de l'étape de fusion entre les MVB et la membrane cellulaire (Figure 62) permettant ainsi de visualiser en temps réel la libération des exosomes contenant la protéine CD63 dans le milieu extracellulaire, de pH physiologique. La plupart de ces études utilisent une lignée de cellules HeLa qui

montrent une fréquence d'événements de sécrétion plus importantes que dans d'autres lignées.^[316]

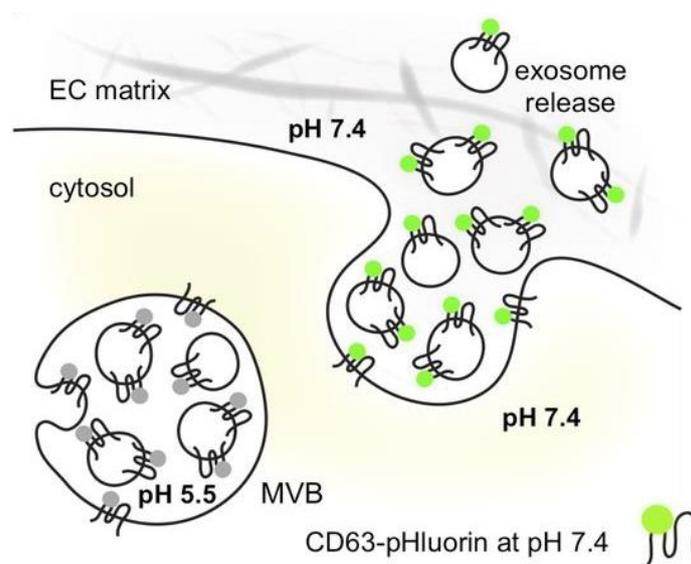


Figure 62. Modèle pour la visualisation de la sécrétion de la protéine CD63.

La protéine pHluorin fusionnée à CD63 est éteinte à pH acide dans les MVB et s'allume instantanément durant la fusion membranaire responsable d'une neutralisation du milieu intravésiculaire. Adapté de Verweij et *al.* ^[316]

Par conséquent, le suivi de la sécrétion et de la régulation de la protéine CD63 dans les cellules HeLa nous a paru un modèle pertinent pour la validation de nos sondes pH. En effet, nos résultats pourront être directement comparés aux données de la littérature rapportant l'utilisation de protéines fluorescentes sensibles au pH, aussi bien pour la taille des vésicules que pour la dynamique et la durée de l'étape de fusion membranaire. La suite de ce chapitre porte sur la publication que nous avons soumise concernant le développement de nouvelles sondes pH hybrides fluorogéniques localement activées, validées en utilisant ce modèle d'exocytose cellulaire.

II. “ A Fluorogenic Chemogenetic pH Sensor for Imaging Protein Exocytosis”

Justine Coïs,^{1,2} Marie-Laure Niepon², Manon Wittwer,¹ Hessam Sepasi Tehrani,³ Philippe Bun,⁴ Jean-Maurice Mallet,¹ Vincent Vialou^{2*} and Blaise Dumat^{1*}

¹Ecole normale supérieure, CNRS, Laboratoire des Biomolécules, 75005 Paris France

²Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Neurosciences Paris Seine, 75005 Paris, France

³PASTEUR, Département de chimie, École normale supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France

⁴Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris (IPNP), INSERM U1266, NeurImag Imaging Core Facility, 75014 Paris, France

*Corresponding authors: vincent.vialou@inserm.fr; blaise.dumat@ens.psl.eu

Abstract

Fluorescent protein-based pH biosensors enable the tracking of pH changes during protein trafficking and in particular exocytosis. The recent development of chemogenetic reporters combining synthetic fluorophores with self-labeling protein tags offers a versatile alternative to fluorescent proteins that combines the diversity of chemical probes and indicators with the selectivity of the genetic-encoding. However this hybrid protein labeling strategy does not avoid common drawbacks of organic fluorophores such as the risk of off-target signal due to unbound molecules. Here, we describe a novel fluorogenic and chemogenetic pH sensor based on a cell-permeable molecular pH indicator called pHluo-Halo-1 whose fluorescence can be locally activated in cells by reaction with HaloTag ensuring excellent signal selectivity in wash-free imaging experiments. pHluo-Halo-1 was selected out of a series of four fluorogenic molecular rotor structures based on protein chromophore analogs. It displays a good pH sensitivity with a pKa of 6.3 well-suited to monitor pH variations during exocytosis and an excellent labeling selectivity in cells. It was applied to follow the secretion of CD63-HaloTag fusion proteins using TIRF microscopy. We anticipate that this strategy based on the combination of a tunable and chemically-accessible fluorogenic probe with a well-established protein tag will open new possibilities for the development of

versatile alternatives to fluorescent proteins for elucidating the dynamics and regulatory mechanisms of proteins in living cells.

II.1. Introduction

Exocytosis is a process by which cells are able to release biomolecules (e.g. proteins, neurotransmitters) into the surrounding environment via the fusion of the secretory vesicles to the plasma membrane of cells. It is involved in various critical cellular events such as cell communication, hormone regulation or immune defense.^[317] Therefore, precise understanding of exocytosis events is crucial to improve knowledge about physiopathological pathways in various organs including the central nervous system. Over the past decades, significant efforts have been carried out to understand molecular dynamics of exocytosis using fluorescence microscopy techniques.^[273,286,318] In particular, the exocytosis process is associated with varying pH conditions, from typically acidified secretory vesicles (pH \approx 5.5) to neutral compartments and extracellular environment (pH \approx 7.4) and can be visualized by pH-sensitive fluorescent probes such as the superecliptic pHluorin (SEP) derived from the green fluorescent protein.^[76] The emission of this pH-sensitive fluorescent protein (FP) is activated when going from acidic to basic pH with properties well-suited for monitoring exocytosis: a pK_a value of 7.2, cooperative protonation and low background fluorescence at pH 5.5.^[277] In order to limit the interference of autofluorescence and enable multiplexing, a palette of pH sensitive FPs has been developed in particular in the red emission range with the examples of pHuji^[284], pHTomato^[283], pHoran4^[284] or pHmScarlet^[285]. have also been developed. None of them however matches the pH sensitivity of SEP and the engineering of pH-sensitive FPs with tuned spectral properties, correct dynamic range and high photostability remains complex.^[319] An emerging alternative to FP-based biosensors are chemogenetic (also called semisynthetic or chemigenetic) biosensors that combine a genetically-encoded self-labeling protein (SLP) tag such as SNAP-tag or HaloTag with an organic fluorophore.^[47,50,212] The latter can be a simple dye for visualizing the target protein or a chemical indicator able to sense its environment. This approach benefits from the unparalleled selectivity of the genetic encoding of recombinant proteins and from the versatility of fluorescent probes development to enable diverse applications. While protein engineering relies on repeated cycles of

evolution to reach the desired properties, organic chemistry benefits from a long history of fluorophore development to support the rational design of adequate chemical indicators that can then be coupled to SLP tags.^[86,320] A wide palette of dyes or indicators can thus be used allowing multiple applications with a single fusion between a protein of interest (P.O.I.) and a SLP-tag.^[78,113] For instance, a chemogenetic fluorescent pH sensor based on the combination of a pH-sensitive carbofluorescein derivative with SNAP-tag was recently reported.^[104] With a pK_a value of 7.3, it enabled the monitoring of exocytosis and endocytosis. Fluorescent pH indicators based on fluorescein, carbofluorescein or rhodamine derivatives were also combined with HaloTag, to visualize cellular pH and study protein trafficking.^[103, 321, 322] However, in these strategies, the pH indicator is fluorescent regardless of whether it is linked or not to the target protein, which requires washing steps to remove the excess of probe and avoid off-target signal. In order to match the selectivity of fluorescent protein biosensors, an ideal hybrid sensor should be based on a chemical indicator that is only fluorescent when bound to its target SLP tag. Fluorogenic probes whose emission is activated by the reaction with a SLP-tag have been widely developed for labeling proteins with high selectivity^[47,50,89,90,258] but there are very few examples of hybrid sensors that combine fluorogenic activation with the ability to detect a biological analyte. For instance, locally-activated sensors for calcium or glutathione (GSH) based on fluorogenic rhodamines and HaloTag have recently been reported.^[143,145] For most fluorogenic sensors, the selectivity of the signal is ensured by the local activation of the fluorescence upon binding to the target protein but the bound and unbound forms of the sensor are equally able to bind to the cognate analyte (Figure 63B). It is worth noting that for the GSH sensor, the reaction with HaloTag activates both the fluorescence and the ability of the probe to react with GSH that then quenches the emission. Regarding pH sensors, Xu and colleagues reported a derivative of naphthalimide fluorophore (BG-NDM) activated by reaction with SNAP-tag to monitor intracellular pH.^[167] BG-NDM has a pK_a of 8.0 and a reverse pH sensitivity that makes it poorly suited to visualize protein exocytosis. The Bruchez group developed a hybrid sensor based on the energy transfer (FRET) between malachite green and a pH-sensitive cyanine.^[159,160] Selectivity is achieved through the fluorogenic activation of malachite green by genetically-encoded fluorogen-activating proteins (FAPs). However, this dual-probe design exploits almost the entire visible spectrum, excluding multiplexed imaging, and is not cell permeant, restricting its application to the

targeting of membrane proteins. Therefore, there is still no small cell-permeant molecular pH probe that can be activated locally with high selectivity to visualize protein trafficking and exocytosis in live cells in wash-free conditions.

In this work, we thus set out to develop pH probes with a fluorescence that can be dually controlled by pH and reaction with HaloTag to monitor protein exocytosis. Due to this dual control of the fluorescence, we refer to them as dual-input probes. We synthesized a series of fluorogenic HaloTag ligands (fluorogens) with close structural similarity to the GFP or Red Kaede protein chromophore. Their pH-sensitive emission is selectively activated by reaction with HaloTag, due to the viscosity-sensitive character of the molecular rotor structures. Among the series, yellow-emitting probe **pHluo-Halo-1** displays high fluorescence turn-on upon rapid reaction with HaloTag, good sensitivity to pH and a suitable pK_a to be used in exocytosis imaging. It also showed excellent selectivity with negligible non-specific signal in confocal imaging of HaloTag-expressing HeLa cells. This is, to the best of our knowledge, the first report of a dual-input pH probe locally-activated by reaction with HaloTag and we successfully applied the resulting chemogenetic pH sensor to follow the transport and secretion of the exosomal protein CD63 by TIRF microscopy.

II.2. Results and discussion

II.2.1. Design of fluorogenic pH probes.

To image exocytosis, we aimed to develop chemogenetic pH sensors with similar sensing properties as the SuperEcliptic pHluorin (SEP) with a quenched fluorescence in acidic vesicles (pH 5.5) that instantaneously turns-on upon plasma membrane fusion (pH 7.4). To build our hybrid system we chose the well-established and efficient SLP-tag HaloTag and thus sought to design fluorogenic and pH-sensitive small molecular HaloTag ligands. We have previously shown that viscosity-sensitive molecular rotors could be used as fluorogenic HaloTag probes and used as a platform to build a dual-input calcium sensor.^[150,154,161,325] We have adapted this approach to design a dual-input pH probe by exploring GFP-based chromophore structures that already possess pH-sensitive properties due to their phenol group and are based on a flexible molecular rotor structure that should also be activated by reaction with HaloTag (Figure 63A&B). The pK_a of the isolated GFP chromophore is too high for the

biological pH range and we synthesized HaloTag-targeted GFP analogs with tuned emission and pKa. We first replaced the imidazolone cycle of the GFP chromophore by a rhodanine heterocycle that red-shifts the emission and proved more efficient in previously reported fluorogenic protein probes (Figure 63A).^[154,329] To lower the pKa to a biologically relevant range, we tested two distinct strategies by introducing an amide group (**pHluo-Halo-1&3**) or a fluorine atom (**pHluo-Halo-2**) in ortho position of the phenol. The use of a fluorine atom is a common strategy and lowers the pKa by a strong electron-withdrawing inductive effect.^[323] In a more unusual approach, the amide group yields a similar result due to the formation of an H-bond between the phenol and the amide.^[324] The amide bond was also used to introduce a hydrophilic diethylene glycol chain in the **pHluo-Halo-1** ligand in order to limit the non-specific activation in cells. Our previous studies on molecular rotor fluorogens indeed showed that the non-specific activation can be mitigated by lowering their lipophilicity.^[150] To allow for specific labeling of recombinant HaloTag proteins, we introduced a chloroalkane linker on the rhodanine group. Since the binding to the protein may affect the sensing properties of the pH-probes, **pHluo-Halo-3** was synthesized to evaluate an alternative attachment position of the HaloTag linker (Figure 63A). To further red-shift the emission wavelength and avoid potential issues with cell autofluorescence, we incorporated the pH-sensitive phenol group with an amide in a Red Kaede protein chromophore analog to yield **pHluo-Halo-Red** (Figure 63A).^[326]

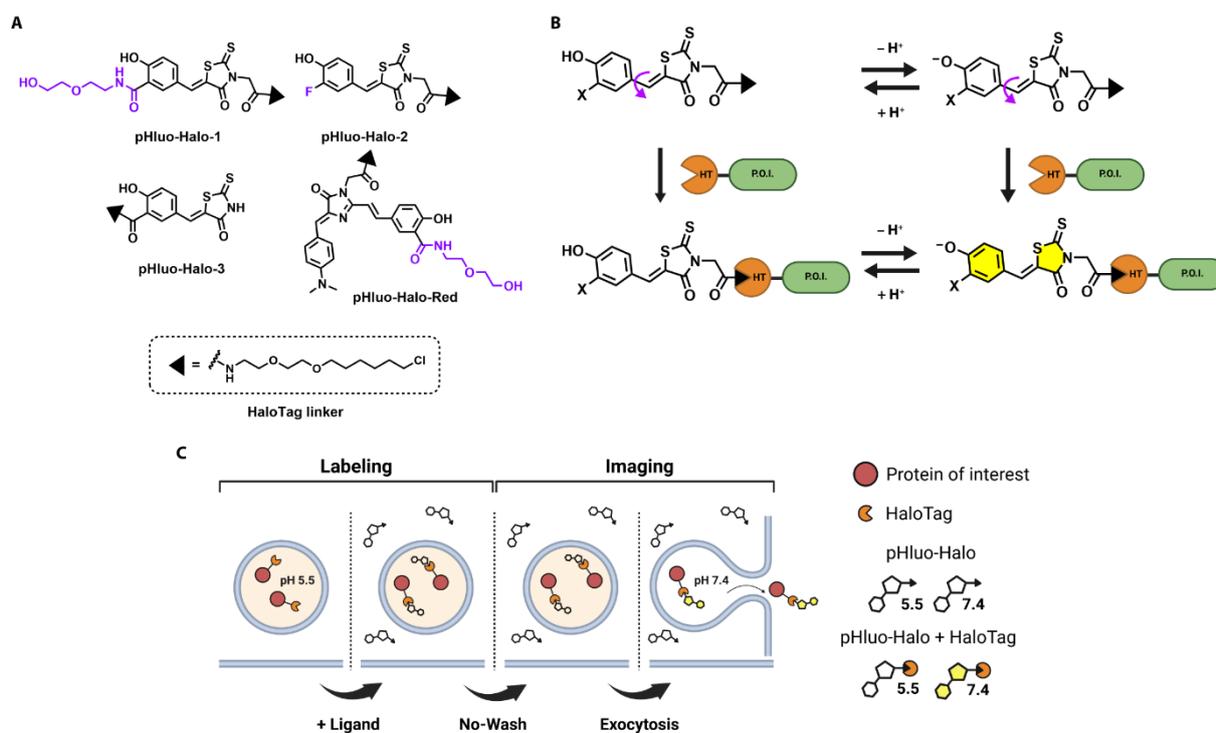


Figure 63. Design and working principles of the pHluo-Halo reporters to monitor protein exocytosis.

(A) Chemical structures of **pHluo-Halo-1**, **pHluo-Halo-2**, **pHluo-Halo-3** and **pHluo-Halo-Red**. (B) Principle of the dual-input activation of the fluorescence emission of the pHluo-Halo probes. (C) Schematic depiction of vesicles expressing HaloTag protein fused to a P.O.I. and labeled with a pHluo-Halo ligand to image protein exocytosis under no-wash condition.

The synthesis of the probes **pHluo-Halo-1** to **3** is straightforward and they are easily obtained by a Knoevenagel reaction between a rhodanine group and the corresponding aldehyde (Scheme S1). The pHluo-Halo probes based on protein chromophore analogues are designed to have a dual-input fluorescence emission and enable selective imaging of protein exocytosis: binding to HaloTag will lock the fluorogens and activate their pH-sensitive fluorescence emission that is modulated by the change in the intramolecular charge transfer (ICT) between the phenol and phenolate forms (Figure 63B&C).

II.2.2. Characterization in 40 % glycerol buffers.

As expected from their molecular rotor structures, the pHluo-Halo ligands display very low fluorescence in water.^[148,325] To assess their intrinsic photophysical properties independently of the target protein, the four pH-sensitive dyes were first characterized by UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopies in buffers containing 40 % glycerol to increase the viscosity and activate their fluorescence. The low glycerol content leads to a weak activation of the probes (ca. 4-fold enhancement of fluorescence at pH = 7.4) but it is sufficient to characterize them in buffers with controlled pH (Figure 64). All four probes are fluorescent at pH 7.4 with one main absorption band showing that there are mostly deprotonated in neutral conditions (Figure 64A and Table 1). Replacing the imidazolinone of the GFP chromophore with a rhodanine shifts the emission from the green to yellow range ($\lambda_{em} = 560$ nm for **pHluo-Halo-1&2**). **pHluo-Halo-3** is slightly blue-shifted since the rhodanine is not alkylated ($\lambda_{em} = 543$ nm). The extended conjugated structure of **pHluo-Halo-Red** based on the Red Kaede protein leads to a fluorescence emission even more red-shifted than the parent chromophore ($\lambda_{em} = 615$ nm). For **pHluo-Halo-1,2&3**, the absorption spectra display two absorption peaks depending on pH corresponding to the protonated and anionic forms of the molecules (Figure 64B and Figure S1). Deprotonation of the phenol leads to an increase in intramolecular charge transfer and to a bathochromic shift in absorption. While **pHluo-Halo-2** exhibits a clear isosbestic point that is the sign of a simple equilibrium between the phenol and phenolate forms, it is not the case for **pHluo-Halo-1&3**. For **pHluo-Halo-3**, it is due to a second pH equilibrium involving the amine of the rhodanine cycle, as has been observed in a related structure,^[326] but in the case of **pHluo-Halo-1**, it is yet unclear which additional species could be involved. As for the GFP chromophore, only the deprotonated form is fluorescent, and the emission intensity increases strongly with pH (Figure 64C and Figure S1). Fluorimetric pH titrations gave a pK_a of 6.0 for both **pHluo-Halo-1&3** and a pK_a of 6.6 for **pHluo-Halo-2** (Figure 64D, Table 1 and Figure S1). The measured pK_a values are slightly lower than that of SEP but are still relevant for the pH variations involved during exocytosis. In the extended **pHluo-Halo-Red** structure, only one absorption band is recorded at 524 nm and increasing the pH leads to a hyperchromic effect with no wavelength shift (Figure S1). Changes in pH thus lead to lower variations of fluorescence with only a 2-fold increase between

pH 4.3 and pH 8.3. The design of **pHluo-Halo-Red** successfully led to a red-emitting probe but its pH sensitivity is not sufficient to develop a pH sensor

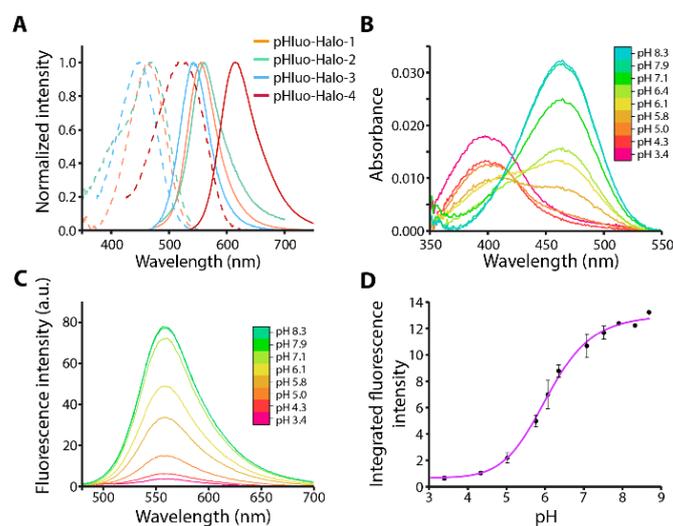


Figure 64. Characterization of the pH probes in Tris buffers with 40 %w/v of glycerol.

(A) Absorbance (dashed lines) and fluorescence emission (full lines) spectrum of pHluo-Halo probes at pH 7.4. (B) UV-Vis absorption and (C) fluorescence pH titration of **pHluo-Halo-1**. (D) Fluorimetric pH titration curve of **pHluo-Halo-1** ($pK_a = 6.0$). Mean + SD of two independent experiments.

Table 7. Photophysical properties of pHluo-Halo probes in Tris buffers with 40 % glycerol and in presence of HaloTag protein.

Molecule	Solvent /Target	λ_{abs} (nm) ^a	ϵ (mol ⁻¹ .cm ⁻¹ .L)	λ_{em} (nm) ^a	Φ_F	$\epsilon \cdot \Phi_F$	$F_{HaloTag}/F_{PBS}$ ^b	Dynamic Range ^b	$F_{pH7.4}/F_{pH5.5}$ ^b	pK_a ^b
pHluo-Halo-1	Glycerol (40% in PBS)	465	31 300	556	-	-	-	12	-	6.0
	HaloTag	470	42 500	553	0.04	1 900	21	14	4.5	5.9
pHluo-Halo-2	Glycerol (40% in PBS)	468	24 600	560	-	-	-	55	-	6.6
	HaloTag	478	28 400	553	0.01	340	18	37	10	6.5
pHluo-Halo-3	Glycerol (40% in PBS)	449	31 900	543	-	-	-	10	-	6.2
	HaloTag	442	18 000	546	0.01	220	8	10	-	6.4
pHluo-Halo-Red	Glycerol (40% in PBS)	524	29 700	615	-	-	-	2	-	7.6
	HaloTag	524	57 200	591	0.02	970	4	-	-	-

SEP		495	45 000	512	0.52	23 150			50	7.2
pHuji		572	31 000	598	0.22	6 820			22	7.7

^aMeasurement conditions: 1 μ M dye with 1.5 eq. of HaloTag in pH 8.3 TRIS buffer. ^bAverage of duplicate experiments.

Properties of previously reported fluorescent proteins SEP and pHuji are shown for comparison purposes. λ_{abs} and λ_{em} maximum absorption and emission wavelengths, ϵ : molar absorptivity coefficient, Φ_{F} : fluorescence quantum yield, $\epsilon \cdot \Phi_{\text{F}}$: brightness, $F_{\text{HaloTag}}/F_{\text{PBS}}$: fluorescence enhancement factor where F_{HaloTag} and F_{PBS} are the integrated fluorescence intensities in HaloTag and in PBS (pH 7.4) respectively, **Dynamic range**: ratio of the integrated fluorescence intensities at the maximum and minimum pH, $F_{\text{pH 7.4}}/F_{\text{pH 5.5}}$: ratio of the intensities of the fluorescent HaloTag complexes at pH 7.4 and pH 5.5.

II.2.3. Characterization in HaloTag.

The photophysical properties of the probes were next evaluated after reaction with HaloTag. The activation of **pHluo-Halo-Red** by HaloTag is low (4-fold increase) which further disqualifies it as a candidate probe. However, it has a relatively high extinction coefficient and it may become an interesting red-emitting fluorogen if its interaction with HaloTag and thus its fluorescence quantum yield were to be improved. The pH sensing ability of the other three probes, **pHluo-Halo-1,2&3**, were evaluated in more details to study the influence of the protein environment on the fluorescence emission and on the pH sensing ability. The protein activates the fluorescence of the three probes with similar spectral properties as were observed in 40 % glycerol buffers (Figure S2, Table 1). The properties of the HaloTag complexes were studied in acidic (pH 4.3) or slightly basic (pH 8.3) conditions to ensure full protonation or deprotonation of the chromophores (Figure 65A). As expected from the design rationale, the fluorescence emission of the three probes is dually controlled by pH and HaloTag: among the four possible states of the system (bound/unbound and protonated/deprotonated), only the deprotonated and protein-bound chromophore is fluorescent with an excellent turn-on ratio (Figure 63B and Figure 65A). In particular, **pHluo-Halo-1&2** exhibit a strong activation by the HaloTag protein as well as a good pH dynamic range (Figure 65A and Table 1). Both the pH sensitivity and HaloTag activation of **pHluo-Halo-3** are poorer and, considering also its low brightness, it was not studied further. **pHluo-Halo-1&2** have similar pK_a values in presence of HaloTag as in 40 % glycerol buffers, showing that the protein successfully activates the fluorescence without interfering with the pH sensitivity (Figure 65B and Figure S2). A

control experiment was performed with a previously reported pH-insensitive dye Red-Halo2.^[150] It retains a high fluorogenicity and similar fluorescence intensity regardless of pH, showing that the fluorescence variations observed for the HaloTag/pHluo-Halo complexes are indeed linked to the pH sensitivity of the ligands (Figure S3). The pK_a of **pHluo-Halo-1** in HaloTag is slightly higher than in glycerol but still lower than the ideal pK_a value of SEP. For exocytosis monitoring, the important parameter is indeed the ratio between the intensity at pH 7.4 and the intensity at pH 5.5 (Table 1). For the latter to be as low as possible, the pK_a should be closer to 7 but our probes are nonetheless almost entirely quenched at pH 5.5.

With a better dynamic range, especially between pH 7.4 and 5.5, and a higher pK_a, **pHluo-Halo-2** presents more promising sensing properties for monitoring exocytosis, but this is counterbalanced by the higher brightness of **pHluo-Halo-1**. The latter is indeed the brightest of the series. Its brightness is sufficient to perform imaging experiments but it remains about 10-fold lower than that of SEP and 3.5-fold lower than that of pHuji (Table 1). However, recent reports suggests that it should be possible to enhance the brightness of the HaloTag/fluorogen complexes by engineering the HaloTag protein while conserving or maybe improving as well the pH-sensing properties of the molecular probes.^[162, 211, 326] The photostability was also assessed and compared to that of eGFP, using a recently reported protocol based on fluorescence spectroscopy under high power LED illumination.^[328] **pHluo-Halo-1&2** are less photostable than GFP with a 3.5 to 5 times faster photobleaching time (Figure S4). While it may become an issue for long-term imaging on the hour scale, this is still sufficient for the experiments performed herein on a minute timescale. Finally, we studied the reaction kinetics of the two most promising pHluo-Halo probes with HaloTag by following the increase of fluorescence over time after addition of the protein with a 10 s interval (Figure 65C). The reaction was found to be very fast and the maximum fluorescence intensity is attained right from the first measurement point. Consequently, the data could not be fitted to calculate reaction rate constants. HaloTag is known for its high reaction speed with tetramethylrhodamine ($k_2 \approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and other rhodamine derivatives,^[140] but the rate constants measured for other molecular scaffolds are usually several order of magnitude lower,^[113, 250] as was also observed in our previous studies with fluorogenic molecular rotors.^[150,154] The very fast reaction of HaloTag with **pHluo-Halo-1&2** is thus a very positive result as it can ensure a better temporal control over the labeling during imaging experiments.

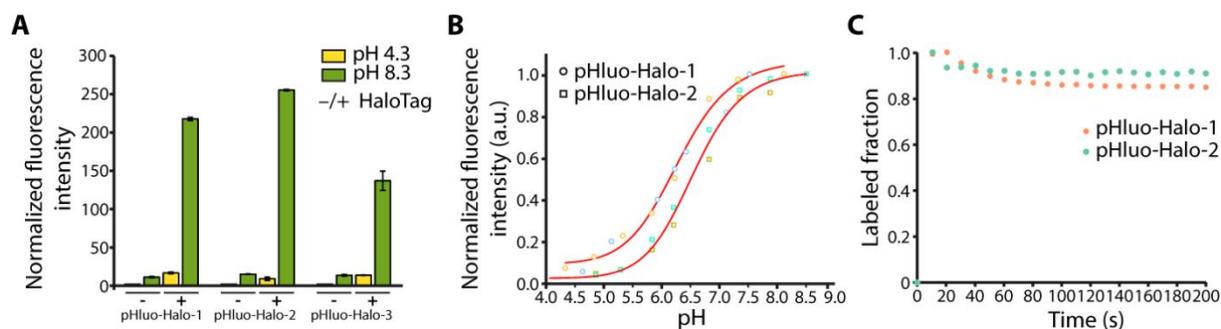


Figure 65. Reaction of the pHluo-Halo probes with HaloTag and characterization of the resulting chemogenetic pH sensors.

(A) Dual-input activation of the chromophores. Integrated Fluorescence intensity of the free and HaloTag-bound pHluo-Halo probes at pH 4.3 or 8.3. For each set of values, the intensities were normalized to the fluorescence of the free probe at pH 4.3. Conditions: [pHluo-Halo] = 1 μ M, [HaloTag] = 1.5 μ M. (B) Fluorimetric pH titrations of **pHluo-Halo-1** (circles) and **pHluo-Halo-2** (squares) conjugated to HaloTag. Two replicates for each probe are shown in different colors. (C) Reaction kinetics of **pHluo-Halo-1** (Orange) and **pHluo-Halo-2** (green) with HaloTag. Conditions: [dye] = 100 nM, [HT] = 2 μ M, T = 298 K.

II.2.4. Evaluation of chemogenetic pHluo-Halo indicators in live cells.

We next assessed the selectivity and contrast of the selected dyes **pHluo-Halo-1** and **pHluo-Halo-2** in wash-free confocal imaging of live HeLa cells either wild-type or expressing a nuclear HaloTag protein. In non-transfected HeLa cells, incubation of 0.5 μ M of **pHluo-Halo-1** followed by confocal imaging without washing steps gives a negligible fluorescence signal, while **pHluo-Halo-2** exhibits a detectable non-specific signal (Figure S5). This is consistent with the hypothesis that the non-specific activation is linked to the lipophilicity of the probes. Imaging of HeLa cells expressing a HaloTag-NLS protein after incubation of the probes with the same protocol leads to efficient nuclear labeling demonstrating that these 2 dyes are cell permeable and react selectively with HaloTag in cells (Figure 66A). The comparison of the cytosolic background fluorescence intensity in non-expressing cells versus the nuclear signal of expressing cells reveals an excellent signal-to-background ratio ($F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyt}} = 40$) for **pHluo-Halo-1** contrary to **pHluo-Halo-2** ($F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyt}} = 5.2$), which is consistent with the non specific signals observed in wild-type HeLa cells (Figure 66B and Figure S5). The imaging contrast of **pHluo-Halo-1** is much higher than what was measured for our other molecular rotor-based fluorogens, and it is an excellent fluorogenic protein probe with virtually zero non specific signal.^[150,326]

After these photophysical and biological characterization steps, **pHluo-Halo-1** combines the desired properties to build a fluorogenic and chemogenetic pH biosensor in combination with HaloTag: a dual-input pH-sensitive fluorescence emission that is activated by a very fast reaction with HaloTag and an excellent contrast in cellular imaging.

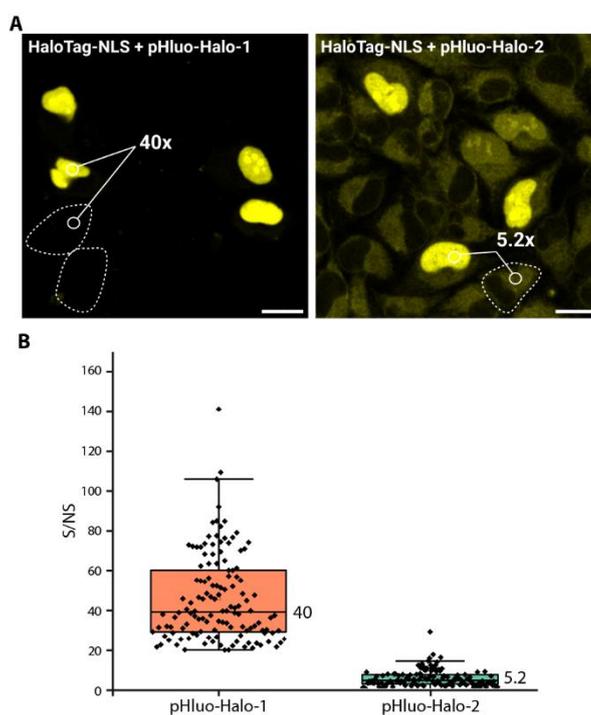


Figure 66. Selectivity of the pHluo-Halo probes in live HeLa cells.

(A) Confocal microscopy images of HaloTag-NLS-expressing and non-expressing HeLa cells. Cells were incubated with 0.5 μM **pHluo-Halo-1** (*left*) and **pHluo-Halo-2** (*right*) for 15 min and imaged in wash-free conditions. The signal is measured in the nuclei of transfected cells, while the background is measured in the cytoplasm of non-transfected cells. Turn-on numbers represent median of $n = 130$ cells. Scale bar = 20 μm . (B) Contrast of **pHluo-Halo-1** and **pHluo-Halo-2** measured in HeLa cells expressing HaloTag-NLS of $n = 130$ cells.

II.2.5. Detection of single exocytosis events in HeLa cells.

To test the efficiency of our novel semisynthetic locally-activated pH biosensor, we applied it to image the exocytosis of the tetraspanin protein CD63 (Figure 67A).^[233,315] CD63 is a transmembrane protein mostly located in exosomes, which are small endosome-derived extracellular vesicles found in multivesicular bodies (MVB).^[329] These vesicles play a crucial role in cell-cell communication, and are released when MVBs fuse with the plasma membrane (PM).^[315] Building on the existing CD63-SEP plasmid, we replaced the SEP sequence to design a CD63-HaloTag construct and checked its correct expression in HeLa cells (Figure S6). We next used this construction combined with **pHluo-Halo-1** to image the exocytosis of CD63 in HeLa cells using Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy, a technique commonly used for visualizing biological processes located at the plasma membrane (PM).^[76,277,316,330,332] For data analysis, we used the recently developed ExoJ plugin for automatic detection and feature characterization of single exocytic events.^[331] Time-lapse live-cell imaging of 2 minutes enabled the detection of multiple fusion events scattered across the PM under basal condition. These events were characterized by an abrupt brightening followed by spreading of the fluorescence signal into the background (Figure 67B). We focused solely on MVB-PM fusion events that display an intensity profile similar to Figure 67B and a number of events where exosomes remain attached to the cell surface without releasing their cargo were not included in our analysis.^[333] To validate the correct labeling of CD63-tagged exosomes with our hybrid sensor, we performed dual-color TIRF microscopy using co-transfected HeLa cells expressing both CD63-pHuji and CD63-HaloTag proteins and incubated with **pHluo-Halo-1** (Figure 67C).^[316] The fluorescence of CD63-pHuji and CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** co-localized with a Pearson's coefficient of 90 % and the dynamics of the recorded exocytic events were similar (Figure 67C and Figure S7). To further test the robustness of our hybrid sensor, we stimulated HeLa cells with histamine that is known to increase MVB-PM fusion activity and the secretion of CD63.^[315,316] Upon addition of 100 μ M histamine, the rate of fusion events between MVB and the PM immediately increased up to 2-fold compared to basal fusion activity (Figure 67D). The higher number of detected events could be attributed to increased fluorescence intensity but the exocytic events detected in basal or stimulated conditions exhibited comparable normalized peak intensity ($\Delta F/F_0$) (Figure 67E), indicating an actual

increase in the exocytosis of MVB. To assess the accuracy of the identification of fusion events, we compared intrinsic parameters such as apparent vesicles size and fusion duration with values obtained with the well-established SEP biosensor (Figure 67F&G). The apparent radius of vesicles obtained with CD63-SEP or CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** were similar (around 150 nm) and consistent with previous qualitative analysis at supra-optical electron microscopy resolution using a dynamic correlative light electron microscopy approach (Figure 67F).^[315] Likewise, the duration of the fusion events quantified by the mean lifetime decay were similar for both labeling strategies and independent of histamine stimulation (Figure 67G). These results show that our pH sensors based on a hybrid chemical and genetic strategy is able to report correctly on protein exocytosis and offers new possibilities to label protein while tracking the pH of their environment with fast labeling time and high selectivity even in wash-free conditions.

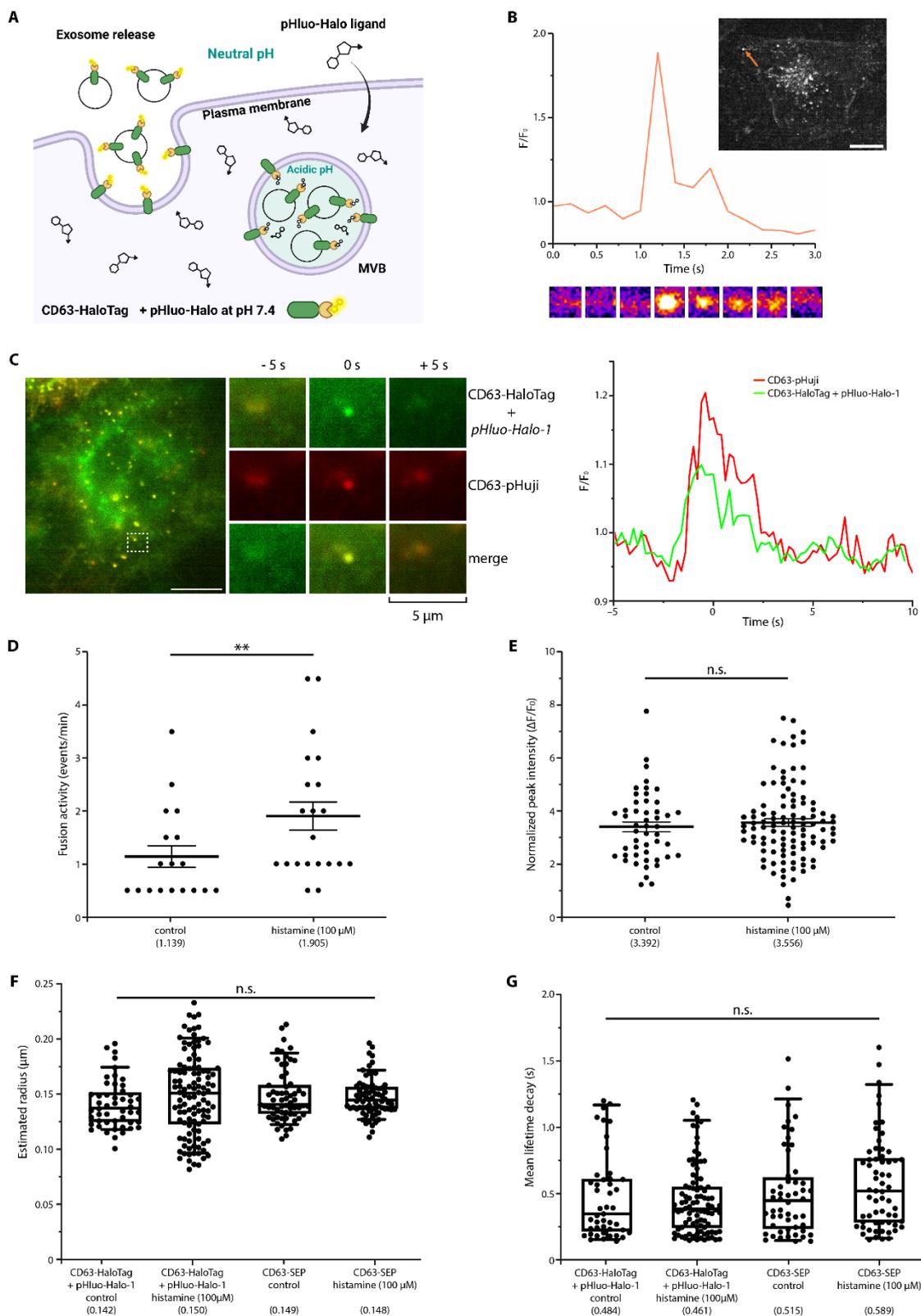


Figure 67. Detection of single CD63 exocytosis in HeLa cells.

(A) Experimental scheme: prior to imaging, CD63-HaloTag transfected HeLa cells were incubated with cell-permeable **pHluo-Halo-1** ligand to specifically label CD63-HaloTag fusion proteins. (B) TIRF microscopy images of HeLa cell expressing CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** undergoing

fusion. Image of the whole cell with a fusion event indicated with orange arrow (*top*); Normalized intensity traces for a selected fusion event (*bottom*); Time-lapse of the marked exocytotic event (*middle*, 5 μm); **(C)** *Left*, merged stills of dual-color TIRF imaging with CD63-SEP and CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** (*top*) at the moment of MVB-PM fusion (*in the white dashed square*). Scale bar, 10 μm . Enlarged stills of the MVB-PM fusion event 10 s before fusion, at the moment of fusion, and 10 s after fusion (*middle*). Normalized intensity traces for the marked fusion event labeled with CD63-HaloTag + **pHluo-Halo-1** (*Green*) and CD63-pHuji (*Red*). **(D)** Comparison of fusion activity of HeLa cells stimulated with histamine (100 μM). $n \geq 8$ per condition. In parenthesis are shown median values. Mann-Whitney test ($U = 106.5$), $P = 0.0084$. **(E)** Comparison of normalized peak intensity ($\Delta F/F_0$) of fusion events from CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** in basal condition (ctrl) and after histamine stimulation (100 μM). In parenthesis are shown median values. Mann-Whitney test ($U = 2407$), $P = 0.3243$. **(F)** Apparent size of single vesicles population labeled with CD63-SEP and CD63-HaloTag + **pHluo-Halo-1** in basal condition and after histamine stimulation (100 μM). In parenthesis are shown median values. Kruskal-Wallis (4.148), $P = 0.246$. **(G)** Event duration τ (ns) of fusion events from CD63-HaloTag labeled with **pHluo-Halo-1** in basal condition (ctrl) and after histamine stimulation (100 μM). Kruskal-Wallis (4.944), $P = 0.176$. Outliers were identified using ROUT ($Q = 1\%$) and excluded of the analysis. In parenthesis are shown median values.

II.3. Conclusions and perspectives

We developed a pH-sensitive molecular fluorescent indicator **pHluo-Halo-1** that can be targeted and locally-activated in cells by a rapid reaction with the HaloTag protein. It presents a good pH-sensitivity and was successfully applied in TIRF microscopy to visualize protein exocytosis in live HeLa cells with excellent selectivity in wash-free conditions. The unique combination of pH sensitive fluorescence and fluorogenic activation by a genetically-encoded protein is a powerful alternative offering more versatility than FP-based biosensors. Such hybrid imaging tools indeed enable the study of a protein of interest with a single construct that can be combined with a large palette of available fluorophores. The main limitation of the hybrid reporters described in this work is their limited brightness which could be improved by engineering the HaloTag protein to ensure a better adequation with the fluorogenic ligands and thus a higher fluorescence activation. Further molecular engineering of the ligands can also lead to new indicators with different sensing (e.g. pK_a) or spectral properties. Since pHluo-Halo-Red did not give the desired results, the design of red-shifted fluorogenic pH indicators remains an important goal to avoid autofluorescence and for in vivo applications. We thus believe that the results described herein, can open new directions

for the development of hybrid pH biosensors to study protein trafficking and regulation.

III. Résultats complémentaires

Cette section porte sur les résultats complémentaires obtenus avec les ligands **pHluo-Halo-1** et **pHluo-Halo-2** présentés dans la partie précédente, combinés au mutant mHT lui-même introduit dans le **Chapitre II**. L'objectif ici est de savoir si cette protéine mutée mHT peut permettre d'améliorer la brillance et/ou la cinétique de marquage des sondes pH chimiogénétiques hybrides dans l'optique de leur utilisation en TIRF pour le suivi du phénomène d'exocytose en cellules vivantes.

III.1. Études spectroscopiques des ligands **pHluo-Halo** dans mHT

Les résultats présentés dans la partie précédente ont permis de démontrer l'intérêt de deux fluorophores pour l'étude du phénomène d'exocytose en temps réel: les rotors **pHluo-Halo-1** et **pHluo-Halo-2**. Le ligand **pHluo-Halo-2** conjugué à HaloTag7 a cependant montré ses limites en imagerie confocale avec une brillance très faible et un signal non-spécifique important en cellules HeLa. En outre, malgré son efficacité validée pour le suivi du phénomène d'exocytose, la sonde **pHluo-Halo-1** présente une brillance modérée par rapport d'autres rotors fluorescents de structures similaires comme les dérivés HBR spécifiques à la protéine FAST.^[48] Nous avons étudié nos fluorogènes sensibles au pH avec le mutant mHT présenté dans le **chapitre II** et qui s'est révélé efficace pour améliorer la fluorescence de **Red-Halo3**.

La mesure des spectres d'absorption et d'émission des sondes **pHluo-Halo-1&2** conjugués à la protéine mutée mHT révèle un léger décalage vers le rouge du profil spectral des deux sondes pH (Figure 68A et Table 8). Compte-tenu du mécanisme d'émission de fluorescence de ce type de fluorophores dipolaires push-pull, ce déplacement pourrait découler d'un environnement légèrement plus polaire et d'interaction différente dans le mutant mHT et la protéine HaloTag7.

Table 8. Caractérisations spectroscopiques de pHluo-Halo-1 et pHluo-Halo-2 dans la protéine mutée mHT dans le PBS (pH = 7.4).

Molécule	Solvent /Target	λ_{abs} (nm) ^a	ϵ (mol. ⁻¹ .cm ⁻¹ .L)	λ_{em} (nm) ^a	Φ_{F}	$\epsilon \cdot \Phi_{\text{F}}$	$F_{\text{HaloTag}}/F_{\text{PBS}}^{\text{b}}$	$F_{\text{pH}8.3}/F_{\text{pH}4.3}^{\text{b}}$	$\text{pK}_{\text{a}}^{\text{b}}$	k_2 (10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)
pHluo-Halo-1	mHT	476	41 000	558	0.06	2600	27	17	6.0	4.9
pHluo-Halo-2	mHT	482	27 900	557	0.03	840	33	50	6.4	6.3

λ_{abs} et λ_{em} longueurs d'onde maximum d'absorption et d'émission, ϵ : coefficient d'absorption molaire, Φ_{F} : rendement quantique de fluorescence, $\epsilon \cdot \Phi_{\text{F}}$: brillance, $F_{\text{HaloTag}}/F_{\text{PBS}}$: facteur d'augmentation de fluorescence où F_{HaloTag} et F_{PBS} sont les intensités de fluorescence intégrées dans la protéine mHT et dans le PBS respectivement. $F_{\text{pH}8.3}/F_{\text{pH}4.3}$: gamme dynamique de pH où $F_{\text{pH}8.3}$ et $F_{\text{pH}4.3}$ sont les intensités de fluorescence intégrées des sondes pHluo-Halo conjuguées à mHT à pH 8.3 et pH 4.3 respectivement. k_2 : constante cinétique de réaction d'ordre 2. a Conditions de mesure: 1 μM de sonde avec 1.5 eq. de protéine mHT dans un buffer TRIS (0.05 M) à pH 8.3 contenant 100 mM de NaCl. b Moyenne d'expérience dupliquée.

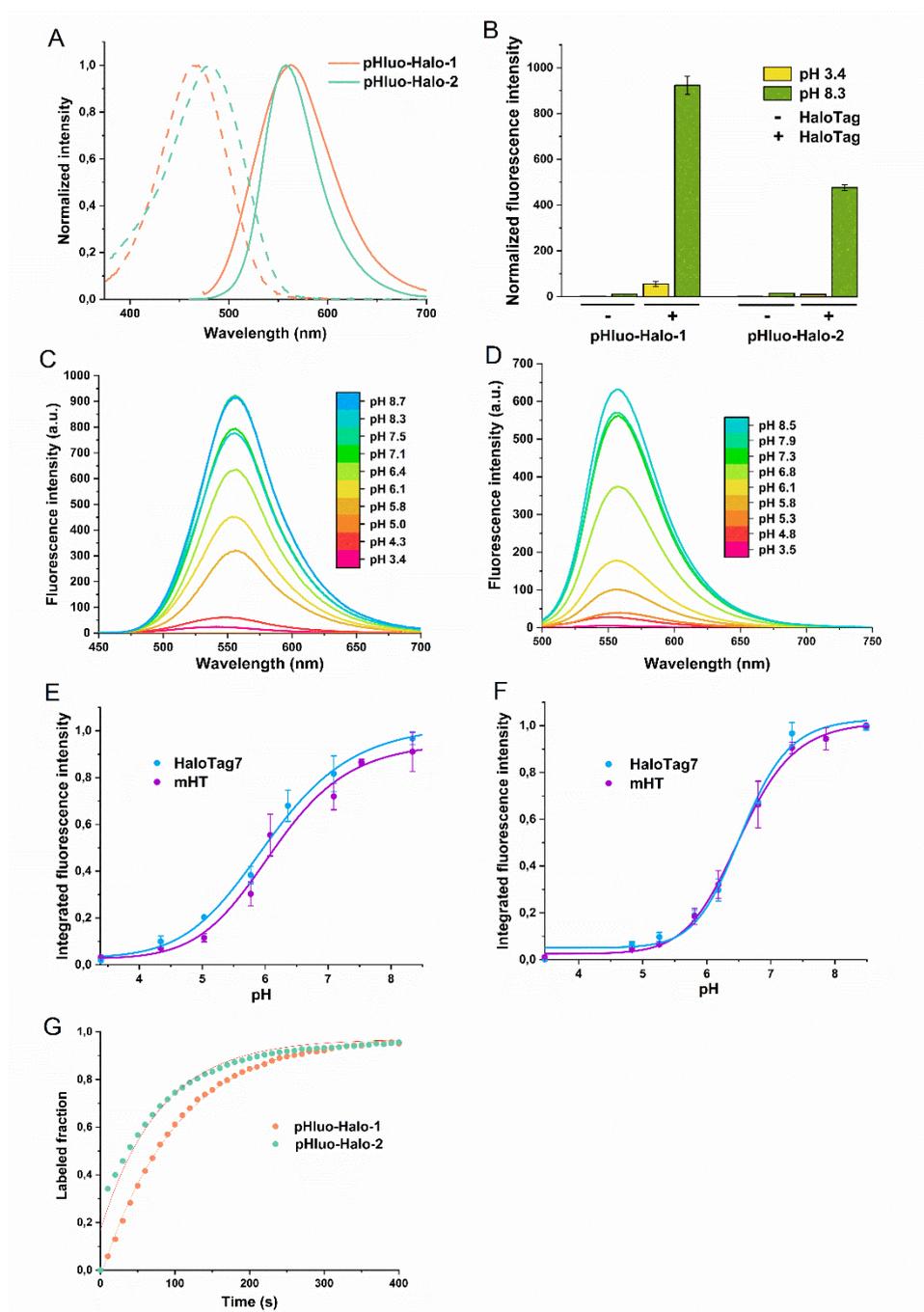


Figure 68. Caractérisations spectroscopiques des sondes pHluo-Halo-1 et pHluo-Halo-2 dans la protéine mutée mHT.

(A) Spectres d'absorption et d'émission normalisés des sondes **pHluo-Halo-1** (Orange) et **pHluo-Halo-2** (Vert) dans la protéine mutée mHT. (B) Double activation de fluorescence des sondes fluorogéniques dans mHT. Comparaison de l'intensité de fluorescence intégrée des sondes **pHluo-Halo-1&2** à pH 3.4 (Orange) et à pH 8.3 (Vert) dans la protéine mHT. Pour chaque valeur, les intensités ont été normalisées par rapport à la fluorescence de la sonde seule à pH 3.4. (C) Intensité de fluorescence de la sonde **pHluo-Halo-1** conjuguée à mHT en fonction du pH. (D) Intensité de fluorescence de la sonde **pHluo-Halo-2** conjuguée à mHT en fonction du pH. (E) Courbes de titrations de la sonde **pHluo-Halo-1** dans HaloTag7 (Bleu) et dans mHT (Violet). (F) Courbes de titrations de la sonde

pHluo-Halo-2 dans HaloTag7 (*Bleu*) et dans mHT (*Violet*). (G) Vitesse de réaction des sondes **pHluo-Halo-1** (*Orange*) et **pHluo-Halo-2** (*Vert*) avec mHT. Conditions de mesure: [pHluo-Halo] = 100 nM, [mHT] = 2 μ M, T = 298 K.

Nous avons ensuite évalué le caractère « dual-input » des sondes en comparant la valeur de l'intensité de fluorescence à pH 3.4 et à pH 8.3 normalisée par rapport à l'intensité de fluorescence de la sonde seule dans l'eau à pH 3.4 (Figure 68B). Les résultats confirment la double sensibilité au pH et à la protéine mHT. Cependant, les effets de la protéine mutée mHT sont plus marqués pour la sonde **pHluo-Halo-2** avec une augmentation de la fluorogénicité (F/F₀) de $\times 1.83$ et de la sensibilité au pH (F(pH 3.4)/F(pH 8.3)) de $\times 1.61$ par rapport aux résultats obtenus dans HaloTag7 (Table 8). Pour la sonde **pHluo-Halo-1**, la protéine mHT n'améliore la fluorogénicité que de $\times 1.28$ par rapport à HaloTag7 et diminue la sensibilité au pH de la sonde par rapport à HaloTag7 de 59% (Table 8). La réalisation de titrations pH par fluorescence dans les mêmes conditions que pour HaloTag7 nous a permis d'obtenir des valeurs de pK_a autour de 6.0, comparables à celles obtenues dans HaloTag7 (Figure 68C,D,E&F et Table 8). Ainsi, la protéine mutée mHT semble améliorer la fluorogénicité des sondes **pHluo-Halo-1&2** sans modifier la valeur de leur pK_a respectifs. Nous avons ensuite déterminé les rendements quantiques de fluorescence et brillances des deux sondes dans mHT (Table 8). Les résultats obtenus mettent en évidence le meilleur blocage conformationnel de la structure du ligand **pHluo-Halo-2** dans la poche hydrophobe de la protéine mHT avec une augmentation de $\times 2.47$ de la brillance par rapport à HaloTag7 alors que pour le ligand **pHluo-Halo-1** l'augmentation de la brillance est plus modérée ($\times 1.37$) par rapport à HaloTag7 (Table 8). Enfin, la dernière propriété que nous avons souhaité évaluer est la cinétique de marquage des ligands **pHluo-Halo-1&2** dans ce nouveau mutant mHT (Figure 68G). Il est en effet d'autant plus intéressant dans le cadre du développement d'outils biosenseurs chimiogénétiques hybrides pour l'imagerie de fluorescence en temps réel que la vitesse de marquage soit rapide voire instantanée si l'on souhaite faire un suivi spatiotemporel par exemple (ajout de la sonde à différents instants pendant le même enregistrement). Les résultats de cette étude mettent en évidence une réaction plus lente pour la formation de la liaison covalente entre les ligands pHluo-Halo et mHT par rapport à HaloTag7. En effet, le plateau correspondant au maximum d'intensité de fluorescence et donc à la fin de la réaction est atteint au bout de 5 min environ avec des constantes de vitesse de $4,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $6,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour **pHluo-Halo-1** et **pHluo-Halo-2**

respectivement. Ces valeurs restent tout même très correctes pour une application de microscopie à fluorescence en cellules vivantes. Cependant, cette différence par rapport à HaloTag7 souligne une nouvelle fois la complexité de la stratégie de combinaison concertée d'ingénierie de protéines et d'ingénierie moléculaire qui est très dépendante de la structure chimique et demande parfois de faire certains compromis concernant les améliorations visées. Pour conclure, ces premières études *in vitro* des sondes **pHluo-Halo-1&-2** associées au mutant mHT montrent qu'il est également possible d'améliorer la brillance d'autres types de sondes chimiogénétiques hybrides par le biais de l'ingénierie de protéines. Nous avons ainsi poursuivi les caractérisations de ces sondes en imagerie de fluorescence en cellules vivantes afin de voir si ces propriétés sont également vérifiées *in vivo*.

III.2. Imagerie de fluorescence des ligands **pHluo-Halo-1&2** dans mHT

De manière analogue à l'étude des sondes **pHluo-Halo-1&-2** dans HaloTag7 de la partie II, nous avons ici évalué les propriétés de ces sondes avec la protéine mHT par imagerie de fluorescence confocale en cellules HeLa transfectées avec le plasmide NLS-mHT (Figure 69A). Pour les cellules HeLa exprimant la protéine de fusion NLS-mHT, un signal intense a été observé dans le noyau des cellules confirmant l'efficacité de mHT à activer la fluorescence des sondes **pHluo-Halo-1&-2** dans les conditions *in vivo*. De même que pour HaloTag7, la comparaison du signal de fluorescence dans le cytoplasme des cellules HeLa non transfectées avec celui du noyau des cellules HeLa transfectées montre que **pHluo-Halo-1** présente également un meilleur contraste avec un ratio $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyt}} = 22$ contrairement à **pHluo-Halo-2** ($F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyt}} = 9,4$) (Figure 69B). En revanche, la comparaison de ces ratios avec ceux obtenus dans la partie II associés à la protéine HaloTag7 révèle un rapport signal/bruit divisé quasiment par 2 pour **pHluo-Halo-1** dans la protéine mutée mHT. Cette observation ne semble pas cohérente avec les études réalisées *in vitro*. Toutefois, le très faible signal non spécifique mesuré pour cette sonde peut entraîner une forte variation des ratios signal/bruit. Pour **pHluo-Halo-2**, ce rapport signal/bruit est amélioré dans mHT avec une augmentation remarquable de 81 %. Cependant, le signal non spécifique associé au ligand **pHluo-Halo-2** non lié à mHT reste présent visuellement réduisant

ainsi l'intérêt de cette sonde pH pour l'étude de l'exocytose qui nécessite un excellent contraste.

Ainsi, malgré l'augmentation de la brillance des sondes **pHluo-Halo-1&2** conjuguées à mHT, la combinaison de la sonde **pHluo-Halo-1** avec la protéine HaloTag7 reste le système chimiogénétique hybride sensible au pH le plus performant pour l'imagerie de fluorescence en cellules vivantes avec un excellent rapport signal/bruit (S/NS = 40) qui n'a pas été amélioré par la présence des deux mutations **M175Y** et **V245A** au sein de la protéine HaloTag.

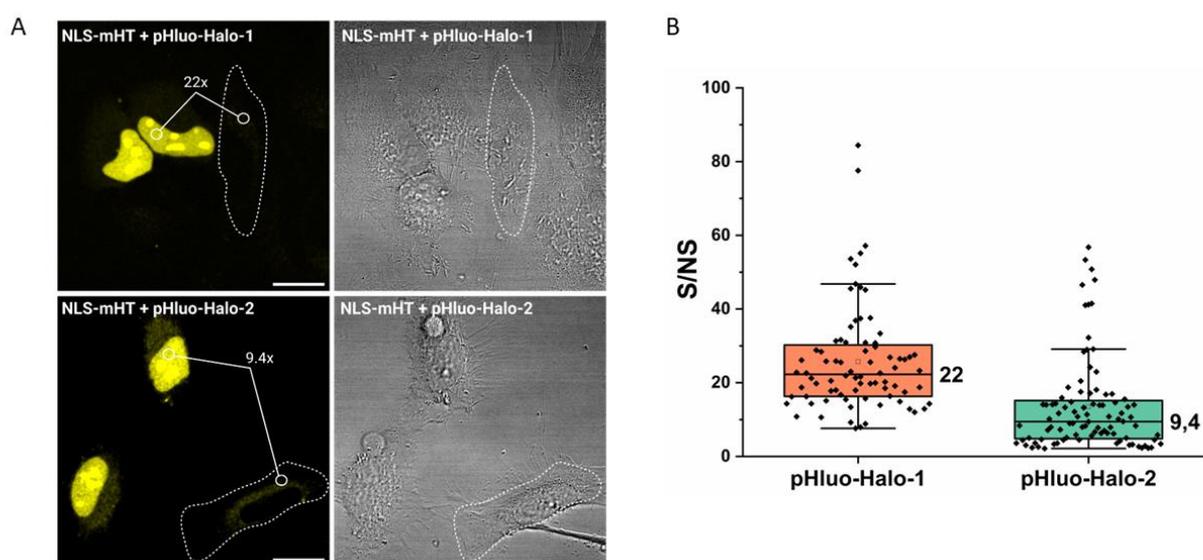


Figure 69. Evaluation *in vivo* des sondes pHluo-Halo-1&2 dans mHT.

(A) Images de microscopie à fluorescence confocale et images en lumière transmise de cellules HeLa exprimant et n'exprimant pas la protéine NLS-mHT. Les cellules ont été incubées avec 0,5 µM de ligand **pHluo-Halo-1** (*haut*) et de ligand **pHluo-Halo-2** (*bas*) pendant 10 minutes sans étape de lavage. Les ratios affichés correspondent aux valeurs médianes obtenus pour $n \geq 80$ cellules. Bar d'échelle = 20 µm. (B) Contraste de **pHluo-Halo-1** et **pHluo-Halo-2** mesurée en cellules HeLa exprimant mHT-NLS de $n \geq 80$ cellules.

IV. Conclusion et perspectives

Ce chapitre porte sur le développement d'une nouvelle plateforme de sondes pH chimiogénétiques hybrides localement activés pour le suivi du phénomène d'exocytose en cellules vivantes. Ces sondes sont constituées d'un chromophore de structure proche de celui de la protéine GFP substitué par un ligand chloroalcane permettant

d'établir une liaison covalente avec la protéine étiquette de marquage HaloTag. La particularité de ces sondes pH hybrides réside dans leur mécanisme d'activation de fluorescence qui repose sur deux conditions. La première est la conjugaison avec la protéine HaloTag permettant d'obtenir un blocage conformationnel du rotor moléculaire et la deuxième correspond à un état déprotoné du fluorophore à pH neutre. En effet, la déprotonation du groupement phénol permet d'activer son caractère donneur en électrons et donc le transfert de type ICT au sein du dipôle. La synergie de ces deux conditions permet ainsi d'observer une émission de fluorescence des sondes pH uniquement au moment de la fusion membranaire, c'est-à-dire lorsque le pH de la vésicule de sécrétion se neutralise.

Parmi l'ensemble des 4 structures proposées, la sonde **pHluo-Halo-1** se démarque par son excellent contraste en cellules vivantes combiné à sa vitesse de marquage instantanée avec la protéine HaloTag7 et par son pK_a proche de 6, adapté à l'étude du phénomène d'exocytose. Les tests en imagerie TIRF pour le suivi de la sécrétion de la protéine CD63 en cellules vivantes HeLa ont révélé une excellente spécificité de la sonde **pHluo-Halo-1** vis-à-vis de la protéine d'intérêt. De plus, l'activation localisée de cette nouvelle sonde pH nous a permis d'observer des événements de sécrétion dont les caractéristiques intrinsèques (rayon apparent des vésicules ou durée de l'événement) sont identiques à celles obtenues dans les mêmes conditions avec la protéine SEP, notre référence d'étude.

Toutefois, la brillance modérée de **pHluo-Halo-1** par rapport à d'autres RMFs de structures similaires comme celles du groupe de Gautier^[48] laisse supposer que la sonde pH n'est activée que partiellement au sein de la poche hydrophobe de la protéine HaloTag. C'est pourquoi, nous avons souhaité appliquer la même stratégie que pour le **chapitre II** en utilisant l'ingénierie de la protéine HaloTag afin d'augmenter la brillance de cette sonde pH. Les études réalisées avec **pHluo-Halo-1** combinée à la protéine mutée mHT révèlent une légère amélioration de la brillance de la sonde mais un contraste diminué en cellules vivantes HeLa. Par conséquent, nous n'avons pas souhaité poursuivre l'étude de ce mutant en microscopie TIRF pour le suivi de l'exocytose de la protéine CD63. Il s'agit cependant ici d'une étude réalisée avec un seul mutant de HaloTag. Par conséquent, une méthode de design rationnel plus complète amorcée par un travail de dynamique moléculaire pourrait permettre de générer un mutant spécifique à la structure de notre plateforme pHluo-Halo pour augmenter le

blochage conformationnel et donc la brillance de toutes les sondes pH introduites dans ce chapitre.

Les perspectives de ce projet sont multiples. En effet, cette plateforme « dual-input » sensible au pH est une première version d'un nouvel outil qui peut être largement étendue par le développement de diverses structures moléculaires de type push-pull. De même, un autre aspect non abordé ici serait l'utilisation de sondes pH avec une dynamique de fluorescence inversée afin d'étudier le processus d'endocytose. Il serait effectivement envisageable de suivre l'activation de fluorescence correspondante à une acidification du lumen des vésicules de sécrétion qui endocytent/recyclent des protéines à la membrane, comme cela a été fait dans les travaux de Asanuma et de ses collègues.^[103] Une stratégie envisageable pour obtenir des sondes pH basées sur des structures similaires à **pHluo-Halo-1** mais possédant une extinction de fluorescence à pH neutre serait d'intégrer un groupement pipérazine qui induirait un mécanisme de PeT permettant d'éteindre la fluorescence à pH neutre (Figure 70). À pH acide en revanche, la protonation de ce groupement pipérazine inhiberait le mécanisme de PeT et rétablirait la fluorescence de la sonde pH.

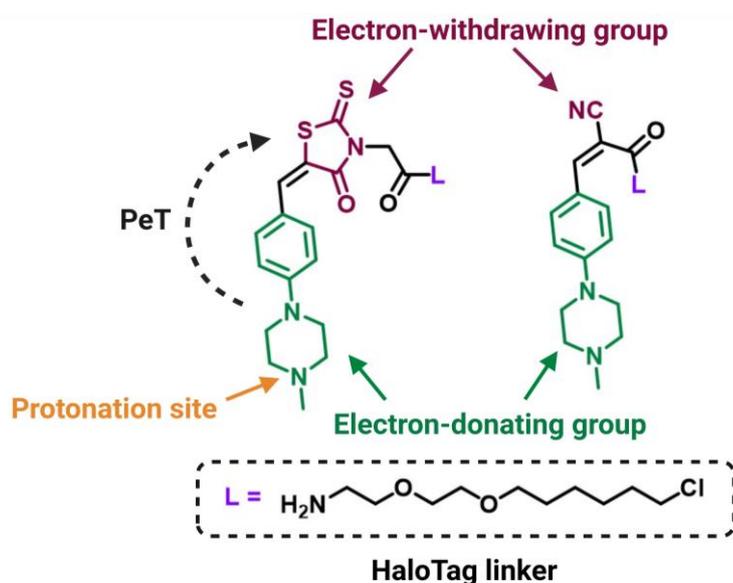


Figure 70. Structures moléculaires de type dipolaires push-pull envisagées pour la conception de sondes pH « inverses ».

Une autre perspective concernant la partie ingénierie de molécules pour le développement de nouvelles sondes pH hybrides concerne l'augmentation de la sensibilité au pH des sondes en réduisant notamment la bande de transition du signal entre le milieu acide et le milieu basique avec un pK_a approprié pour l'étude de l'exocytose. En effet, il est important pour ce type d'étude que la transition entre la forme fluorescente et non fluorescente de la sonde soit la plus courte possible afin d'éliminer tout signal résiduel non-spécifique. La synthèse de ce type de sondes a notamment été récemment mise en œuvre par Luo et ses collègues avec l'utilisation de sondes de type « Hill » présentant une transition d'une seule unité de pH entre la forme allumée et éteinte.^[334] De même, il serait très intéressant d'essayer de moduler davantage le pK_a de nos sondes pH afin d'obtenir une valeur plus proche de 7 (comme la SEP) par le biais de différents groupement électroattracteurs en position ortho du phénol. Un pK_a plus proche de 7 permettrait en effet d'assurer une extinction totale de la sonde en milieu acide.

Enfin, la dernière perspective de ce projet s'inscrit dans le cadre plus général du développement de nouveaux outils biosenseurs localement activés basés sur des rotors moléculaires fluorogéniques. Les premiers travaux de l'équipe ont permis de développer une sonde calcique dont l'activation de la fluorescence est observée par la double présence de calcium et de la protéine HaloTag.^[161] Néanmoins, la dynamique et la brillance de cette sonde pourraient également être améliorées en combinant l'ingénierie de protéines et l'ingénierie moléculaire. En outre, l'extension de cette stratégie à la détection d'autres cations métalliques comme le zinc est également un projet de thèse actuel de notre équipe.



À retenir:

- ✓ Développement d'une nouvelle plateforme **sensible au pH** (pHluo-Halo) basée sur l'utilisation de la protéine HaloTag et de petits rotors moléculaires.
- ✓ **Double activation** de la fluorescence permettant d'obtenir d'excellent contrastes en microscopie, sans étape de lavage.
- ✓ Sonde **pHluo-Halo-1** validée en cellules comme nouvel outil pour le suivi de l'exocytose de protéines cibles.
- ➔ Utilisation de l'**ingénierie de la protéine** HaloTag pour améliorer la brillance des sondes pH.
- ➔ Extension de cette stratégie de développement de senseurs à d'**autres analytes**.

VI. Partie expérimentale

General organic synthesis methods.

Commercial reagents were obtained from Merck or TCI and used as received. Anhydrous solvents were purchased in septum-sealed bottles and stored under an inert atmosphere. All reactions were sealed with septa through which a nitrogen atmosphere was introduced unless otherwise noted. Reactions were conducted in round-bottomed flasks with a magnetic stir bar. Heating of reactions was accomplished with an aluminum reaction block on top of a stirring hotplate equipped with an electronic contact thermometer to maintain the indicated temperatures.

Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on precoated TLC glass plates (silica gel 60 F254, 250 μm thickness). TLC chromatograms were visualized by UV illumination (254 nm) or developed with ninhydrin reagent. Reaction products were purified by flash chromatography or by preparative HPLC analysis (Phenomenex Gemini-NX 30 \times 150 mm 5 μm C18 column). Analytical HPLC analysis was with an Agilent Eclipse XDB 4.6 \times 150 mm 5 μm C18 column under the indicated conditions. ESI-MS experiments were carried out using a LTQ-Orbitrap XL from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and operated in positive or negative ionization mode, with a spray voltage at 3.6 kV.

NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer. ^1H and ^{13}C chemical shifts (δ) were referenced to TMS or residual solvent peaks. Data for ^1H NMR spectra are reported as follows: chemical shifts (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Data for ^{13}C NMR spectra are reported by chemical shift (δ ppm). Original spectra for all reported ^1H and ^{13}C NMR data are given in Supplementary Figs.

Spectroscopic methods.

Absorption and fluorescence spectroscopies.

UV/vis absorption spectra were recorded on a Cary 300 spectrophotometer (Agilent technologies). Scanning was set at 600 nm/min with a step of 1 nm. Fluorescence emission spectra were recorded on a Jasco FP8300 spectrofluorometer (Jasco Inc.). Scanning speed was set to 500 nm/min, excitation and emission slits were set to 5 nm

and the PMT to medium. Measurements were performed in quartz cuvettes (1 cm pathlength, Hellma Analytics). Probes were dissolved in DMSO to afford 1 mM stock solutions. Experiments were performed by diluting the stock solutions in pH 7.4 PBS buffer (20 mM Phosphate and 100 mM NaCl) to the desired concentration.

Fluorescence quantum yields measurements in presence of HaloTag.

Fluorescence quantum yields were calculated using Fluorescein ($\phi_F = 0.91$ in 0.1 M NaOH) or Rhodamine 6G ($\phi_F = 0.94$ in ethanol) as reference. The absorption and fluorescence spectra of the references and samples solutions were measured at 3 different concentrations (2 μM , 1.5 μM and 1 μM) and for three different wavelengths while keeping the absorbance < 0.1 . For each sample and reference, the integrated fluorescence intensity was plotted against the absorbance at the excitation wavelength to give a linear curve. Using the slope value (grad), the quantum yield was calculated according to the following equation and averaged:

$$\Phi_f^i = \Phi_f^s \times \frac{(\text{grad}_i \times n_i^2)}{(\text{grad}_s \times n_s^2)}$$

Where Φ_f is the fluorescence quantum yield, grad the gradient from the plot of integrated fluorescence intensity vs absorbance, n the refractive index of the solvent and the superscript s and i refer to the standard and the sample respectively.

Kinetics study of the reaction with HaloTag.

The reaction with HaloTag was studied according to a previously reported protocol with a 20-fold excess of protein to assume a pseudo-first order kinetics law.^[150] The fluorescence of a 100 nM solution of pHluo-Halo probe was measured to give the reference point (F_0) and then 2 μM of HaloTag protein was added and the fluorescence intensity was recorded over time with a 10 s step. Excitation and emission wavelengths were set at the maximum absorption and emission wavelength for each probe. Each experiment was performed in duplicate.

pKa measurement.

pH fluorescence titrations were done using TRIS buffers (TRIS 0.05 M, Mes 0.025 M, NaCl 0.1M) and pH was adjusted with NaOH 1 M and HCl 1 M solutions. pKa values

were obtained by plotting integrated fluorescence and pH then data were fitted using Origin2019 software.

Site-directed mutagenesis and expression of HaloTag7.

HaloTag7 protein was expressed from plasmid pET28_his_HaloTag. Transfected Top10 cells, plated onto LB/Agar/Kanamycin plates, were sequenced. The recovered transformations were directly used for pre-cultures (37 °C overnight). Protein translation was induced upon isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.4 mM, 4 h, 37 °C). Cells were harvested by centrifugation and frozen at -20 °C. Cells were lysed with B-PER supplemented with lysozyme and DNase I and the protein HaloTag was purified using Ni-NTA beads. Protein samples were stored with PBS 1X buffer at -20°C.

Plasmid construction.

The HaloTag cDNA was amplified by PCR and cloned into the CD63-pHluorin plasmid (CD63-pHluorin in pCMV-SPORT6 - Addgene ID#130901) after removing pHluorin with BglII enzymatic restriction. The oligonucleotides used for HaloTag amplification and cloning (Eurofins) were designed using NEBuilder Assembly Tool. PCR reactions were performed using Q5 polymerase (New England Biolabs), and PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Assembly reaction was performed using NEBuilder kit (HiFi DNA Assembly, New England Biolabs). Ligation products were transformed in C2987H cells (New England BioLabs). Plasmid constructs were first selected by restriction mapping and validated by SANGER sequencing (GATC) with appropriate sequencing primers (Eurofins). HaloTag-NLS was previously reported.^[154] CD63-SEP and CD63-pHuji were obtained from Addgene (ID#130901 and #130902).

Cell culture and transfections.

HeLa cells were obtained from the ATCC (CCL-2) and grown in DMEM containing 4 mM L-glutamine, supplemented with 10% fetal bovine serum, and 5% penicillin/streptomycin, at 37 °C in 5 % CO₂.

For **confocal microscopy** experiments, HeLa cells were grown for 24 h on 8-well polymer μ slides from Ibidi (#1.5 polymer coverslip, tissue culture treated) at 40 k cells/well in 300 μ L of DMEM (Corning) supplemented with 10 % fetal calf serum.

Cells were washed twice with PBS and then transfected with the desired plasmid using Fugene 6 (Promega Corp.) according to the manufacturer's protocol. Cells were imaged 24 h after transfection.

For **TIRF** experiments, HeLa cells were plated onto 18-mm round poly-L-lysine-coated glass cover-slips and transfected ~24–48h later with 1 µg CD63-HaloTag and CD63-SEP using a mix of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ThermoFisher) and OptiMEM 1X Reduced Serum Medium (Gibco) following the manufacturer's protocol. Cells were imaged 24 h after transfection.

Western blotting.

Cells were harvested in Lysis Buffer (150 mM sodium chloride, 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Nonidet P-40 in PBS 1X for 30 min on ice. Cell debris was pelleted by centrifuging the lysate at 16 000 g for 20 min at 4°C. Samples were stored at -70°C until processing for Western blot. Protein samples (16 µl) were prepared with NuPage LDS sample buffer (Invitrogen, NP0008) and DTT 1 M 10%. Samples were loaded and separated by Bis-Tris sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (4-12% gels) and transferred onto nitrocellulose membranes (LC2000, ThermoFisher). Transfer efficacy was controlled by Ponceau staining. Unspecific binding sites were blocked with phosphate-buffered saline containing 5 % nonfat milk and 0.1 % Tween-20, and membranes were immunoprobed with primary antibodies (o/n at 4°C). Membranes were incubated with IRDye-labeled secondary antibodies in phosphate buffer containing 5% nonfat milk and scanned using BioRad Imaging System.

Primary antibodies for Western blot were mouse anti-HaloTag (1/500, G921A, Promega), rabbit anti-GFP (1/1000, A11122, ThermoFisher), mouse β-actin (1/1000, 05-661, Millipore).

Secondary antibodies for Western-blot were donkey anti-mouse 680 nm and donkey anti-rabbit 800 nm (IRDye 680DX and IRDye 800CW; 1/5000; LI-COR Biosciences).

Confocal microscopy.

Twenty-four hours after transfection, the cells were washed twice with PBS and the medium replaced with 150 µL of FluoroBrite (Gibco) in each well. 150 µL of pHluo-Halo probe solution (1 µM) in FluoroBrite was then added to reach a homogeneous concentration of 0.5 µM. After 15 minutes of incubation the cells were directly imaged

live on a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope with a 488 nm excitation wavelength and a Plan apochromat 40x 1.4 NA oil immersion objective.

TIRF microscopy.

Twenty-four hours after transfection, HeLa cells were incubated with 1 μ M of **pHluo-Halo-1** for 5 min and directly imaged on an inverted microscope (Axio Observer 7, Zeiss) equipped with a TIRF module and a top stage imaging chamber (Tokai Hit STX-CO2) ensuring a constant temperature at 37°C. All imaging experiments were carried out with a 63x 1.4 NA oil objective (Zeiss) with a TIRF angle set for 300-400 nm penetration depth. Images were acquired with Zen Black (SP2.3, Zeiss) onto a PCO.edge sCMOS camera (Excelitas Technologies) at a frame rate of 5 Hz for 1 to 2 minutes. An additional optovar 1.6x was added on the optical path to reach a pixel size of 64 nm. Excitation was carried out using an air-cooled 488 nm at 10% power and a diode pumped solid state 561 nm laser lines. Collection of emission light was done using a BP 495-575 + LP 750 (resp. LBF 488/561) filter for single (resp. dual) color imaging. Fluorescent time series were saved as czi files. Image analysis was performed using Image-J with the plugin Exo-J.

Analysis of TIRF images using the ExoJ plugin in imageJ.

After a few rounds of optimization, we set the detection threshold values $k\sigma_{\text{wavelet}}$ to 2.0 for both fusion events reported by CD63-SEP and CD63-HaloTag. We set minimal (resp. maximal) vesicle radius to 2 pixels (resp. 4 pixels) ensuring the detection of the majority of exocytic events. We imposed a minimal signal duration of two frames. We completed the detection of candidate events with additional frames corresponding to 1.6 s before and after the maximal peak fluorescence at to (expanding frames). We limited the temporal window to 0.6 s (resp. 2-3 s) before (resp. after) the maximal peak. The fluorescence profiles were fitted with a minimal number of 5 points and a minimal goodness-of-fit R^2 of 0.75 were set as the fitting threshold. We only selected events that corresponded to a duration between 0.2 and 10 ns. In details, we reported the number of identified events n for each protein reporters as follows: CD63-SEP (ctrl), $n = 60$; CD63-SEP (histamine), $n = 73$; CD63-HaloTag + **pHluo-Halo-1** (ctrl), $n = 50$; CD63-HaloTag + **pHluo-Halo-1** (histamine), $n = 109$.

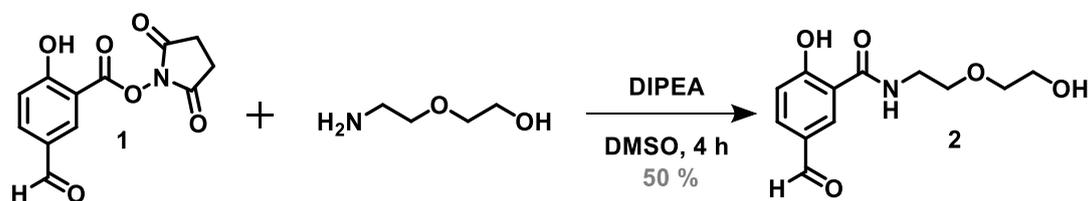
Statistics.

PRISM (GraphPad software) was used for statistical calculations. Outliers were identified using the ROUT method with $Q = 1\%$ and excluded for further analysis. Cleaned data distribution was first tested for normality using Shapiro-Wilk test. Our data did not meet this assumption. Non-parametric Mann-Whitney test was then used to compare the effects of histamine stimulation on CD63-HaloTag with pHluo-Halo-1 exocytosis. Non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the differential effect of histamine stimulation on CD63-HaloTag with pHluo-Halo-1 and on CD63-SEP.

Synthetic procedures.

Compounds **(1)**, **(3)**, **(4)**, **(6)** and **(7)** have been synthesized according to previously reported procedures.^[154,184,323]

Synthesis of 5-formyl-2-hydroxy-N-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzamide (**2**)



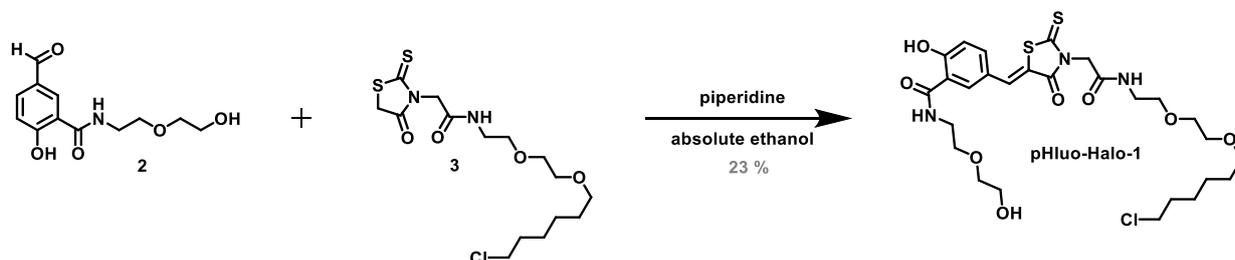
1 (100 mg, 0.38 mmol, 1 eq.) and 2-(2-aminoethoxy)ethanol (48 mg, 0.46 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in anhydrous DMSO. Then, DIPEA (0.16 mL, 0.95 mmol, 2.5 eq.) was added and the mixture was stirred for 4 hours at room temperature and monitored by TLC silica (EtOAc/cyclohexane, 6/4). The crude was diluted in EtOAc and acidified with a 1 M HCl solution 3 times. The organic layer was extracted with EtOAc, dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The purification was carried out by flash column chromatography (EtOAc/cyclohexane, gradient : 40 to 90% of EtOAc) to obtain **2** as a yellow oil (48 mg, 0.19 mmol, yield : 50%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.83 (s, 1H), 9.10 (t, $J = 5.4$ Hz, NH), 8.47 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.62 – 3.39 (m, 8H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 190.84, 167.91, 164.91, 134.36, 131.36, 128.03, 118.32, 116.02, 72.23, 68.57, 60.30, 39.22.

HRMS calculated for C₁₂H₁₅NO₅Na : 276.0842. Found 276.0843 ; (Error: 0.2 ppm)

Synthesis of (Z)-5-((3-(2-((2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)-2-hydroxy-N-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzamide (**pHluo-Halo-1**)



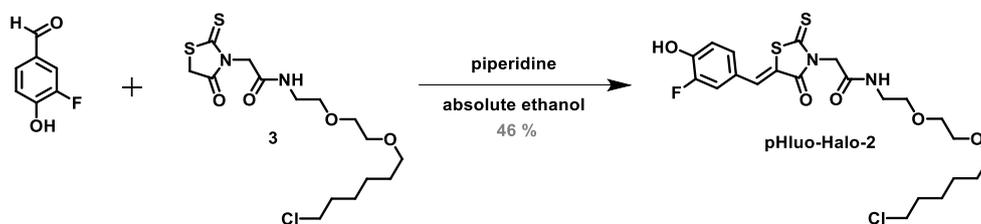
3 (488 mg, 1.23 mmol, 3.0 eq.) and **2** (104 mg, 0.411 mmol, 1.0 eq) were mixed in absolute ethanol under argon. Then, 5 drops of piperidine were added and the mixture was stirred overnight under reflux. The reaction was monitored by TLC silica (EtOAc/cyclohexane, 7/3). The organic layer was extracted with DCM, washed with 1 M HCl and dried with MgSO₄ before being evaporated under vacuum. Purification step was carried out with flash column chromatography (EtOAc/cyclohexane, gradient : 0 to 80% EtOAc) to obtain **pHluo-Halo-1** as yellow solid (57 mg, 0.164 mmol, yield: 23%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.66 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 3.65 – 3.17 (m, 20H), 1.76 – 1.64 (m, 2H), 1.49 (p, J = 6.8 Hz, 2H), 1.42 – 1.25 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.25, 166.76, 164.57, 161.98, 135.20, 133.04, 123.45, 119.05, 118.93, 117.82, 72.22, 70.27, 69.70, 69.50, 68.96, 68.73, 60.26, 46.12, 45.44, 32.08, 29.14, 26.20, 25.00.

HRMS calculated for C₂₇H₃₈ClN₃O₈S₂ : 632.1862. Found : 632.1862; (Error: 0.1 ppm).

Synthesis of (Z)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-(5-(3-fluoro-4-hydroxybenzylidene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamide (**pHluo-Halo-2**)



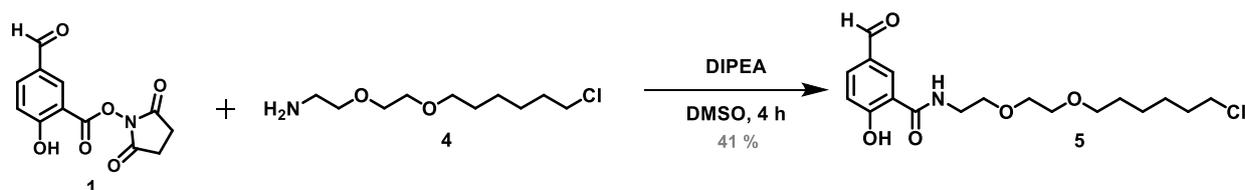
3 (200 mg, 0.503 mmol, 1.4 eq.) and 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde (50 mg, 0.357 mmol, 1.0 eq) were mixed in absolute ethanol under argon. Then, 3 drops of piperidine were added and the mixture was stirred overnight under reflux. The reaction was monitored by TLC silica (EtOAc/cyclohexane, 1/1). The organic layer was extracted with DCM, washed with 1 M HCl and dried with MgSO₄ before being evaporated under vacuum. Purification step was carried out with flash column chromatography (EtOAc/cyclohexane, gradient : 0 to 80% EtOAc) to obtain **pHluo-Halo-2** as yellow solid (85 mg, 0.164 mmol, yield: 46%).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.70 (s, 1H), 7.38 – 7.25 (m, 2H), 7.06 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.63 – 3.47 (m, 12H), 1.75 (dt, *J* = 8.1, 6.5 Hz, 2H), 1.60 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.51 – 1.35 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 193.97, 167.82, 166.97, 132.88, 128.51, 125.82, 125.73, 120.89, 118.83, 118.62, 118.36, 71.42, 70.44, 70.38, 69.59, 46.21, 44.85, 39.81, 32.91, 29.69, 26.90, 25.64.

HRMS calculated for C₂₂H₂₈ClFN₂O₅S₂Na : 541.1004. Found : 541.1004; (Error: 0.0 ppm).

Synthesis of N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-5-formyl-2-hydroxybenzamide (**5**)



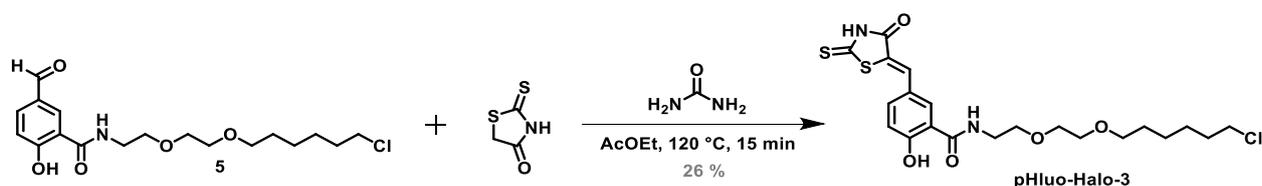
1 (204 mg, 0.912 mmol, 1.2 eq.) and **4** (200 mg, 0.760 mmol, 1.0 eq.) were added in anhydrous DMSO (4 mL) under argon. The mixture was stirred until complete dissolution of the reactants. Then, DIPEA (0,32 mL, 1.90 mmol, 2.5 eq.) was added to the mixture. The reaction was monitored by TLC silica (EtOAc/cyclohexane, 4/6). The crude was diluted in EtOAc and acidified with a 1 M HCl solution 3 times. The organic layer was extracted with EtOAc, dried with MgSO₄ and evaporated under vacuum. The purification was carried out by flash column chromatography (EtOAc/cyclohexane, gradient : 50 to 70% of EtOAc) to obtain **5** as a orange oil (116 mg, 0.31 mmol, yield : 41%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.84 (s, 1H), 8.09 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 5.1 Hz, NH), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.78 – 3.37 (m, 12H), 1.69 (dt, J = 8.1, 6.5 Hz, 2H), 1.60 – 1.45 (m, 2H), 1.45 – 1.06 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.25, 169.39, 167.24, 135.59, 128.73, 127.68, 119.25, 114.87, 71.37, 70.36, 70.10, 69.38, 45.09, 39.70, 32.50, 29.40, 26.67, 25.38.

HRMS calculated for C₁₈H₂₆ClNO₅H : 372.1572 Found : 372.1565; (Error: -2.0 ppm).

Synthesis of (E)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)-2-hydroxy-5-((4-oxo-2-thioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)benzamide (**pHluo-Halo-3**)



5 (100 mg, 0.269 mmol, 1.0 eq.) and 2-thioxothiazolidin-4-one (36 mg, 0.269 mmol, 1.0 eq.) were added in a minimum volume of EtOAc and the solution was stirred for a few minutes. Then, a catalytic amount of urea (1.62 mg, 0.027 mmol, 0.1 eq.) was added and the solution was stirred for 15 min at 120°C. A purification step was carried out by flash column chromatography (MeOH/DCM, gradient : 0 to 10% MeOH) to obtain **pHluo-Halo-3** as a yellow solid (33 mg, 0.07 mmol, yield : 26%).

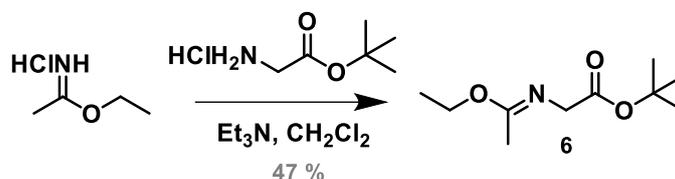
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.14 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 3.63 – 3.28 (m,

12H), 1.65 (p, J = 6.8 Hz, 2H), 1.44 (p, J = 6.8 Hz, 2H), 1.28 (dq, J = 20.3, 7.1, 3.2 Hz, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 196.23, 170.54, 167.37, 161.39, 135.40, 132.75, 131.35, 124.44, 123.59, 119.08, 117.83, 70.67, 70.14, 69.90, 69.06, 45.80, 32.46, 29.53, 26.58, 25.37.

HRMS calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}_2\text{H}$: 487.1123 Found : 487.1121; (Error: -0.3 ppm).

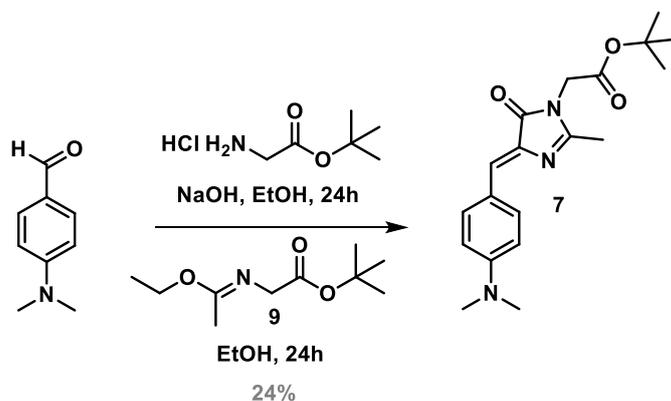
Synthesis of *tert*-butyl (Z)-2-((1-ethoxyethylidene)amino)acetate (**6**)



Ethyl acetimidate hydrochloride (552 mg, 4.47 mmol, 1.0 eq), glycine *tert*-butyl hydrochloride (750 mg, 4.47 mmol, 2.0 eq) and K_2CO_3 (618 mg, 4.47 mmol, 1.0 eq) were dissolved in 10 mL of Et_2O and 5 mL of water. After 10 minutes of stirring at room temperature, the organic phase was extracted. 10 mL of Et_2O were added and the mixture was stirred again for 1 minute. After drying and evaporating the solvent, a translucent oil **6** was obtained with a yield of 47%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 1.86 (s, 3H), 4.47 (s, 9H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

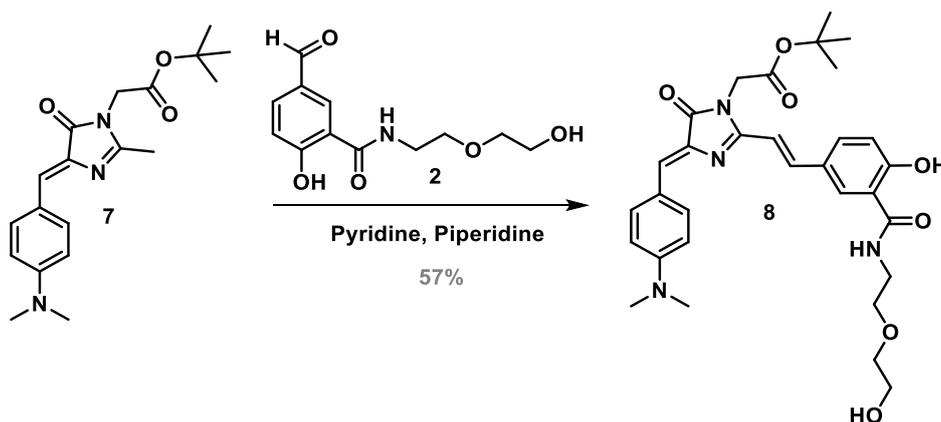
Synthesis of (Z)-2-(4-(4-(dimethylamino)benzylidene)-2-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)acetate (**7**)



Glycine tert-butyl ester hydrochloride (124 mg, 0.74 mmol, 1.1 eq) was combined with NaOH in EtOH and stirred 1 hour at room temperature. 4-(dimethylamino)benzaldehyde (100mg, 0.67 mmol, 1.0 eq) was added and the mixture was stirred overnight. The reaction was followed by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 95/5). After 24 hours, tert-butyl (Z)-2-((1-ethoxyethylidene)amino)acetate 10 (135 mg, 0.67 mmol, 1.0 eq) freshly prepared was added. The mixture turned red. After stirring overnight, the crude was quenched by water and extracted with CH₂Cl₂. The organic fraction was collected, dried and concentrated. The crude product was purified by silica flash chromatography (AE/cHex 0/100 to 30/70). An orange oil **7** was obtained with a 24% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 7.99 (m, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.75 – 6.64 (m, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.04 (s, 6H), 2.29 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

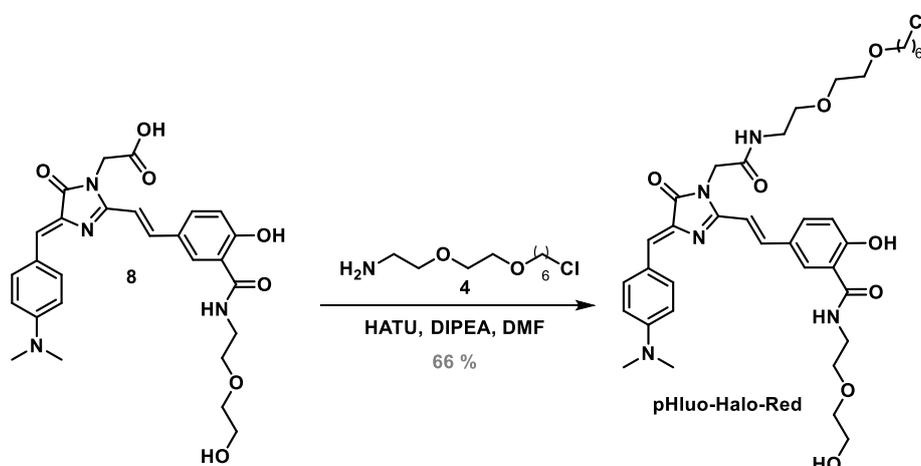
Synthesis of tert-butyl-2-(4-((Z)-4-(dimethylamino)benzylidene)-2-(4-hydroxy-3-((2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)carbamoyl)styryl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)acetate (**8**)



7, **2** and one drop of piperidine were dissolved in 1 mL of dry pyridine and refluxed overnight under argon. After cooling, solvent was removed under vacuum and purified by silica flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100/0 to 98/2) to yield the product as a red solid **8** (57%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.85 – 7.75 (m, 2H), 7.66 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.96 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.85 (dd, J = 5.6, 3.2 Hz, 2H), 3.78 – 3.61 (m, 7H), 3.06 (s, 6H), 1.41 (s, 9H).

Synthesis of 5-((E)-2-(1-(2-((2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-4-((Z)-4-(dimethylamino)benzylidene)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)vinyl)-2-hydroxy-N-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzamide (**pHluo-Halo-Red**)



Deprotected **8** (126.7 mg, 0.237 mmol, 1.0 eq), the HaloTag ligand **4** (74.3 mg, 0.332 mmol, 1.4 eq), HATU (90.2 mg, 0.237 mmol, 1.0 eq) and DIPEA (61.2 mg, 0.474 mmol, 0.08 mL, 2.0 eq) were added under argon in dry DMF and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was followed by TLC (CH₂Cl₂ /MeOH 95/5). Solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by silica flash chromatography (CH₂Cl₂ 100% to CH₂Cl₂ /MeOH 97/3) (66%).

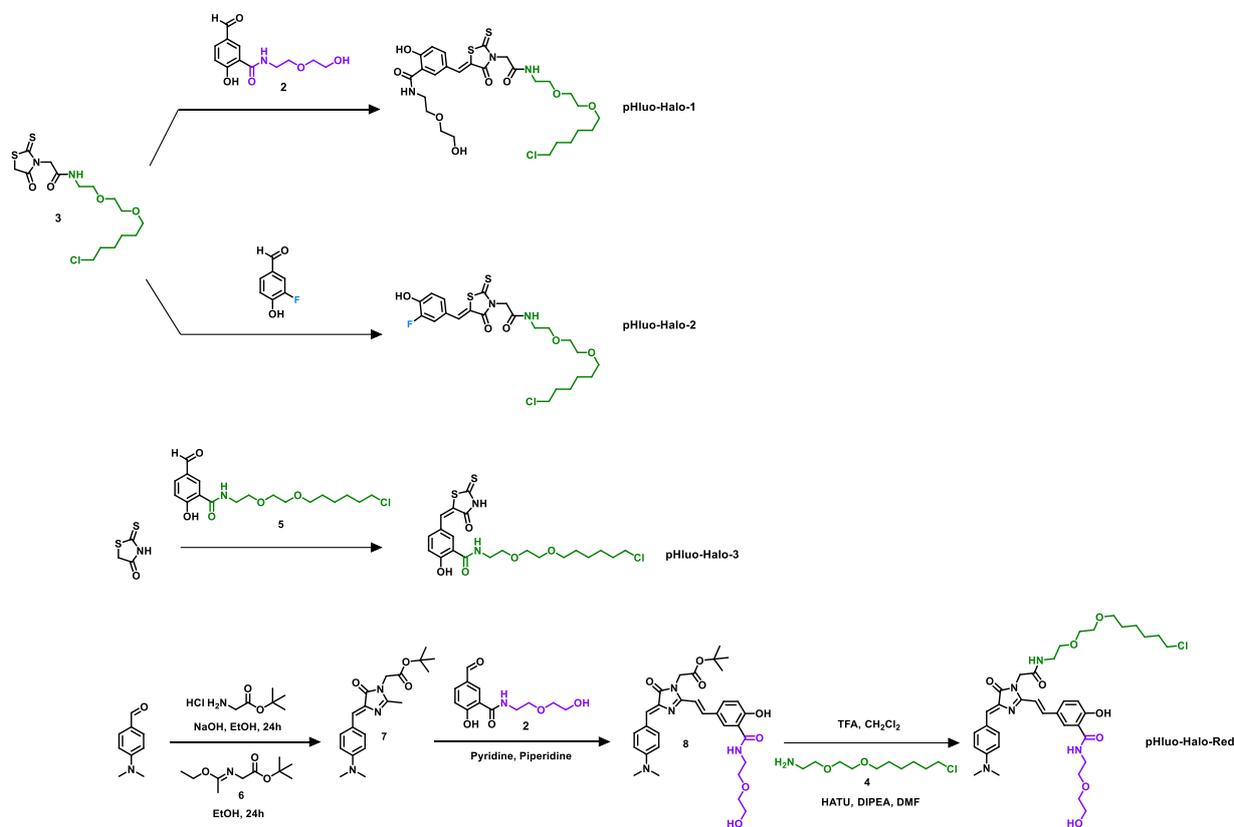
¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.98 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.31 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.23 – 8.12 (m, 3H), 7.91 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.96 – 6.87 (m, 2H), 6.83 – 6.76 (m, 2H), 4.44 (s, 2H), 3.64 – 3.41 (m, 21H), 3.05 (s, 7H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 1.50 – 1.40 (m, 2H), 1.38 – 1.25 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 170.08, 168.85, 167.47, 161.76, 157.43, 151.78, 137.76, 135.53, 134.56, 132.66, 129.57, 126.84, 122.67, 118.69, 116.18, 112.78, 112.25, 72.66, 70.66, 70.02, 69.85, 69.43, 69.09, 60.69, 45.82, 42.61, 40.82, 40.55, 40.27, 40.11, 39.99, 39.71, 39.44, 39.28, 39.16, 32.48, 29.50, 26.58, 25.37.

HRMS calculated for C₃₇H₅₀ClN₅O₈Na : 750.3240 Found : 750.3245; (Error: 0.7 ppm)

VII. Annexes

• Additional figures and data



Scheme S1. Synthesis scheme of pHluo-Halo-1, pHluo-Halo-2, pHluo-Halo-3 and pHluo-Halo-Red.

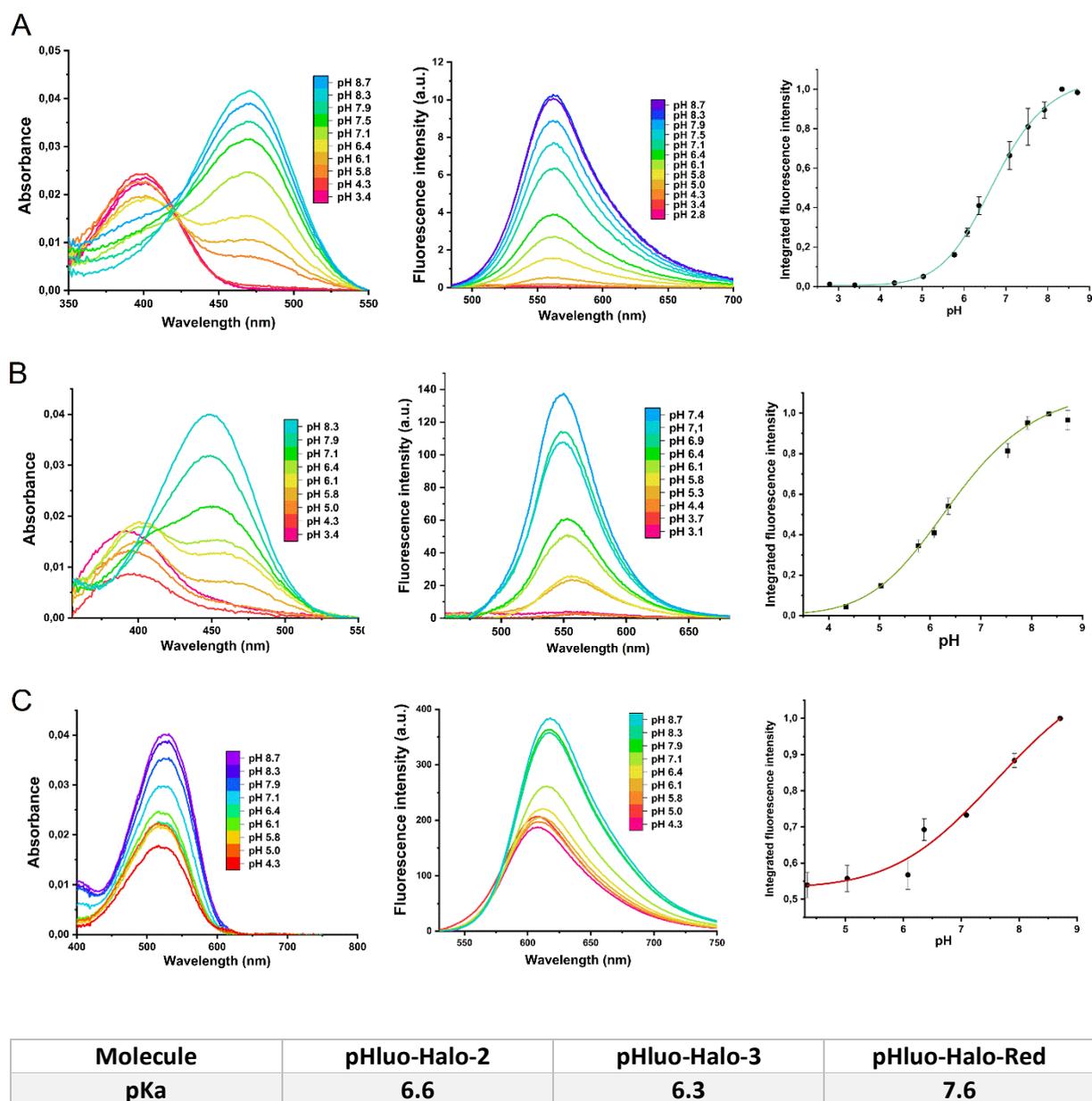


Figure S1. Characterization of pHluo-Halo probes in 40% glycerol buffers. (A) pH titrations of pHluo-Halo-2 (1 μ M) in 40% glycerol buffers; (B) pH titrations of pHluo-Halo-3 (1 μ M) in 40% glycerol buffers; (C) pH titrations of pHluo-Halo-Red (1 μ M) in 40% glycerol buffers.

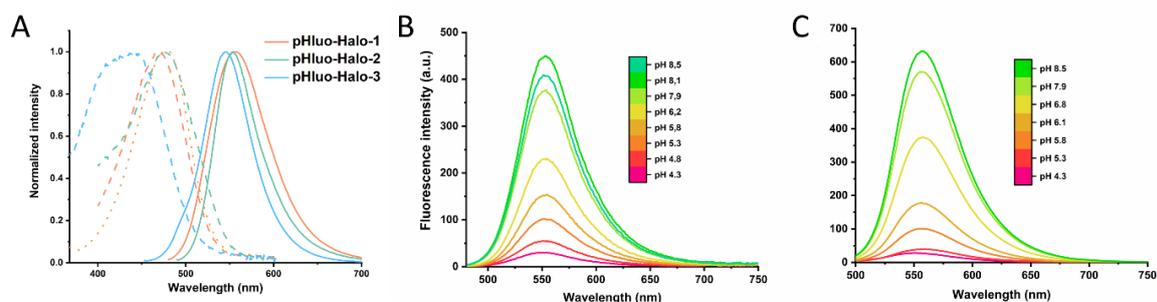


Figure S2. Characterization of the pH probes in HaloTag.

(A) Absorbance (*dashed lines*), excitation (*dotted line*) and fluorescence emission (*full lines*) spectrum of the pHluo-Halo probes after reaction with HaloTag. [probe] = 1 μ M, [HaloTag] = 1.5 μ M in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Fluorescence pH titration of **pHluo-Halo-1** (B) and **pHluo-Halo-2** (C) in HaloTag (1.5 eq.).

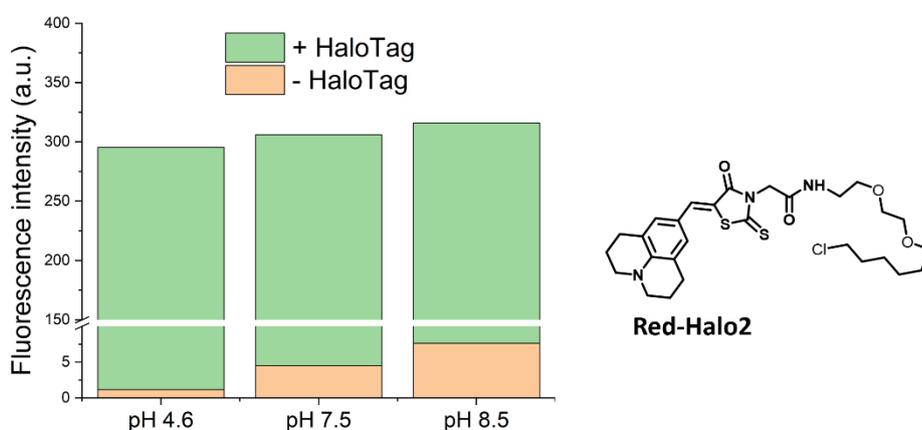


Figure S3. Control with a pH-insensitive dye.

Fluorescence intensity of **Red-Halo2** in the absence and after 1h of reaction with HaloTag at different pH. [Red-Halo2] = 1 μ M, [HaloTag] = 1.5 μ M.

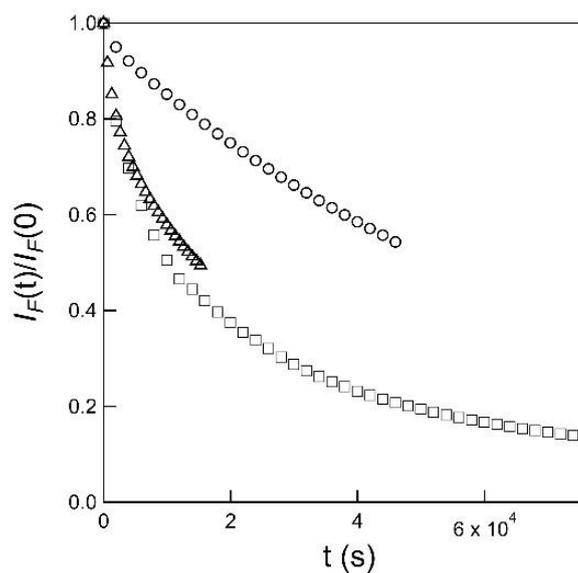


Figure S4. Evaluation of the photostability of the HaloTag complexes.

Fluorescence intensity of the HaloTag complexes of **pHluo-Halo-1** (square, $t_{1/2} = 10000$ s), **pHluo-Halo-2** (triangle, $t_{1/2} = 15000$ s) compared to eGFP (circle, $t_{1/2} = 53000$ s) under constant and homogeneous illumination with a 488 nm LED ($I = 2.26 \cdot 10^{-3} \text{ E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

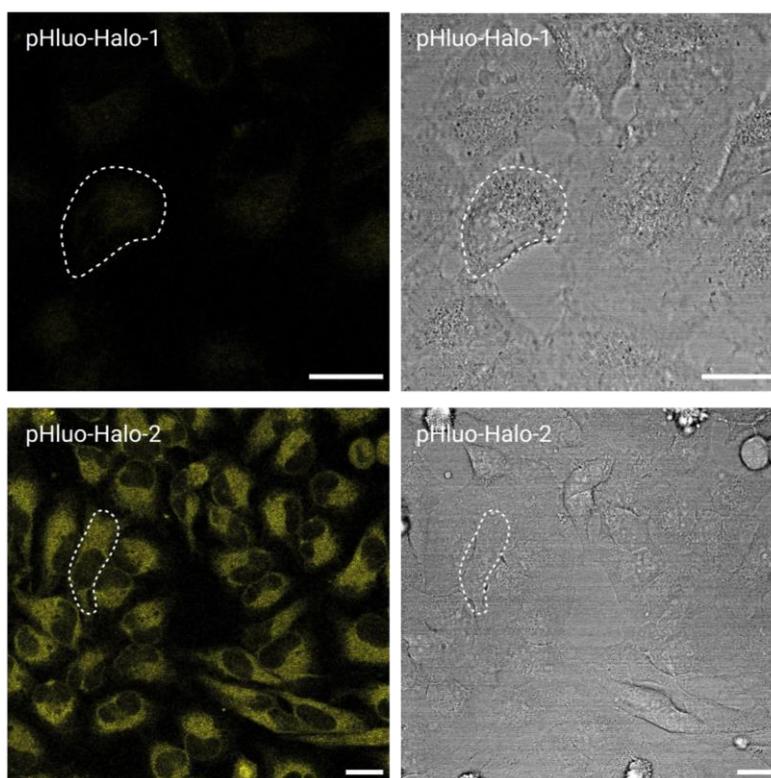


Figure S5. Evaluation of non-specific signal of pHluo-Halo probes in wtHeLa cells.

Live-cell confocal microscopy of wild-type HeLa cells incubated with 0.5 μ M of **pHluo-Halo-1&2**. For each set, the images were captured with the exact same microscope parameters and are presented with the same brightness and contrast settings (Scale bar = 20 μ m).

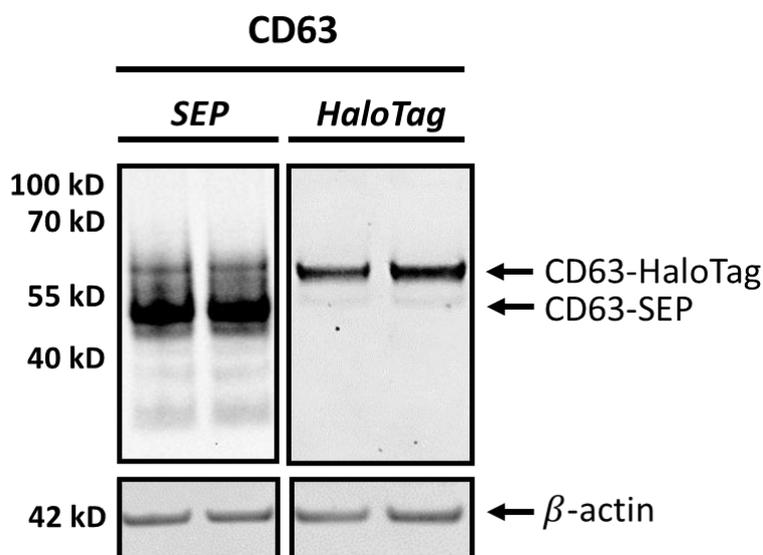


Figure S6. Protein expression of CD63-HaloTag7 and CD63-SEP in cell lysates of transfected HeLa cells.

Representative Western blot images for each condition are shown. (*Left*) CD63-SEP- transfected cell lysates were revealed with an anti-GFP antibody (*Right*) CD63-HaloTag- transfected cell lysates were revealed with an anti-HaloTag antibody. Blots were incubated with β -actin antibody for normalization. n = 2 per condition.

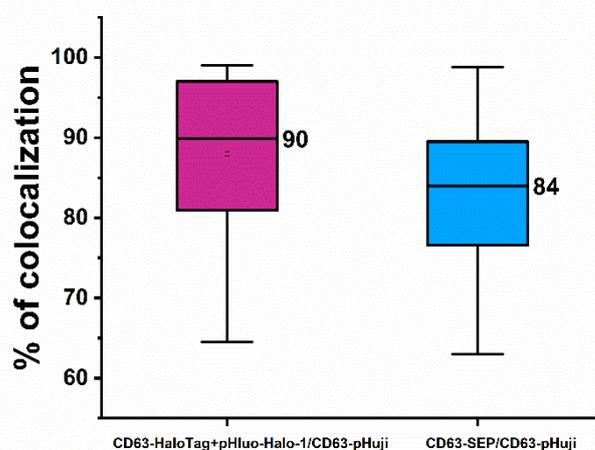
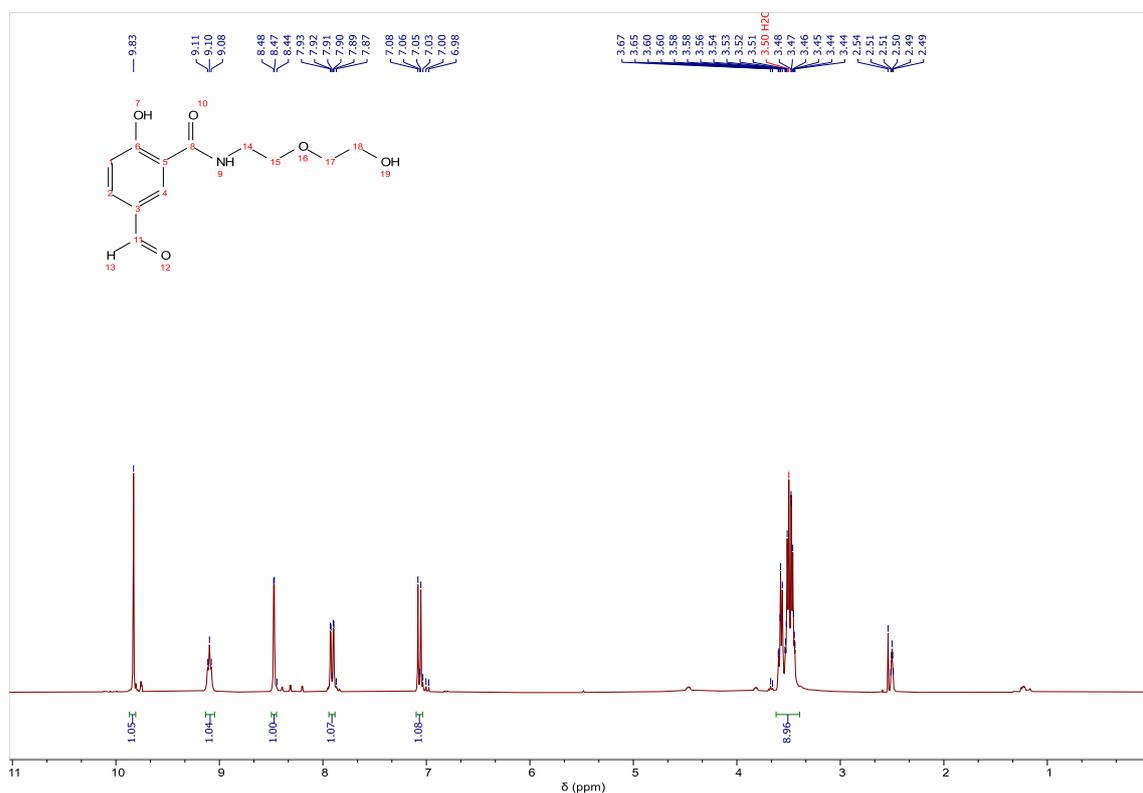


Figure S7. Colocalization of fusion events in HeLa cells cotransfected with CD63-pHuji and CD63-HaloTag7 incubated with pHluo-Halo-1.

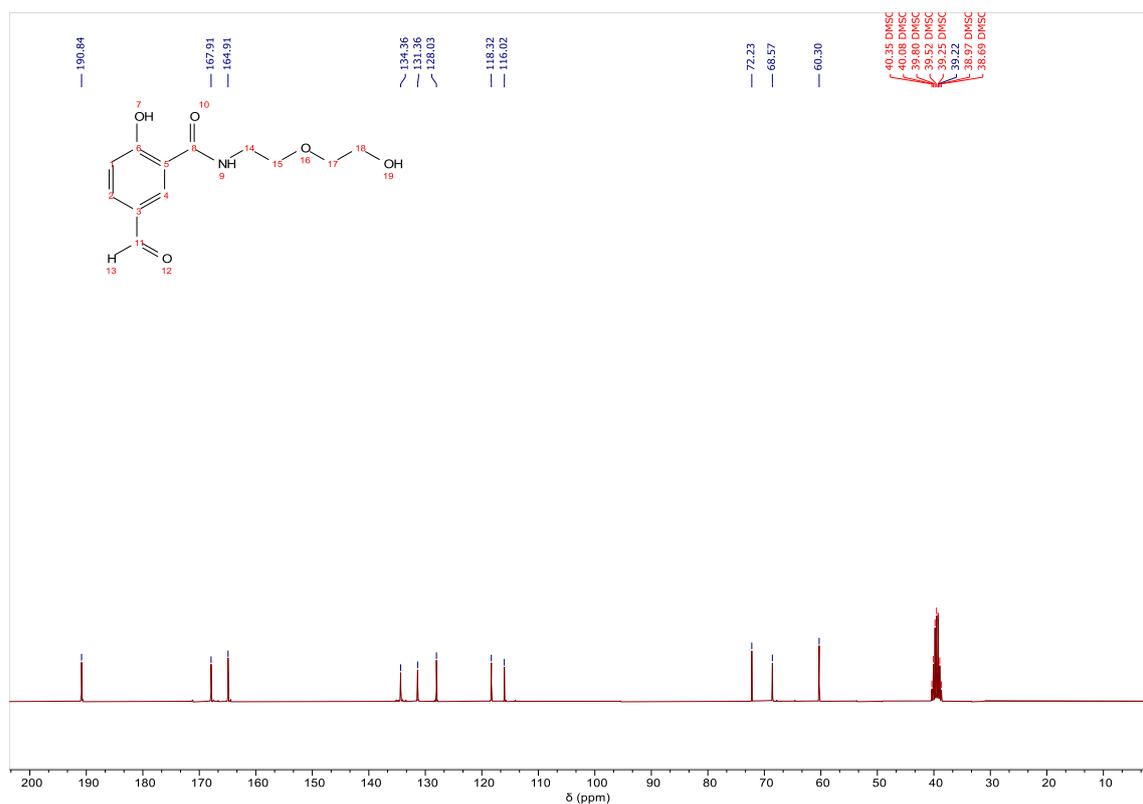
Pearson's coefficients obtained from JaCOP plugin on Fiji (N \geq 20 cells).

• NMR spectra.

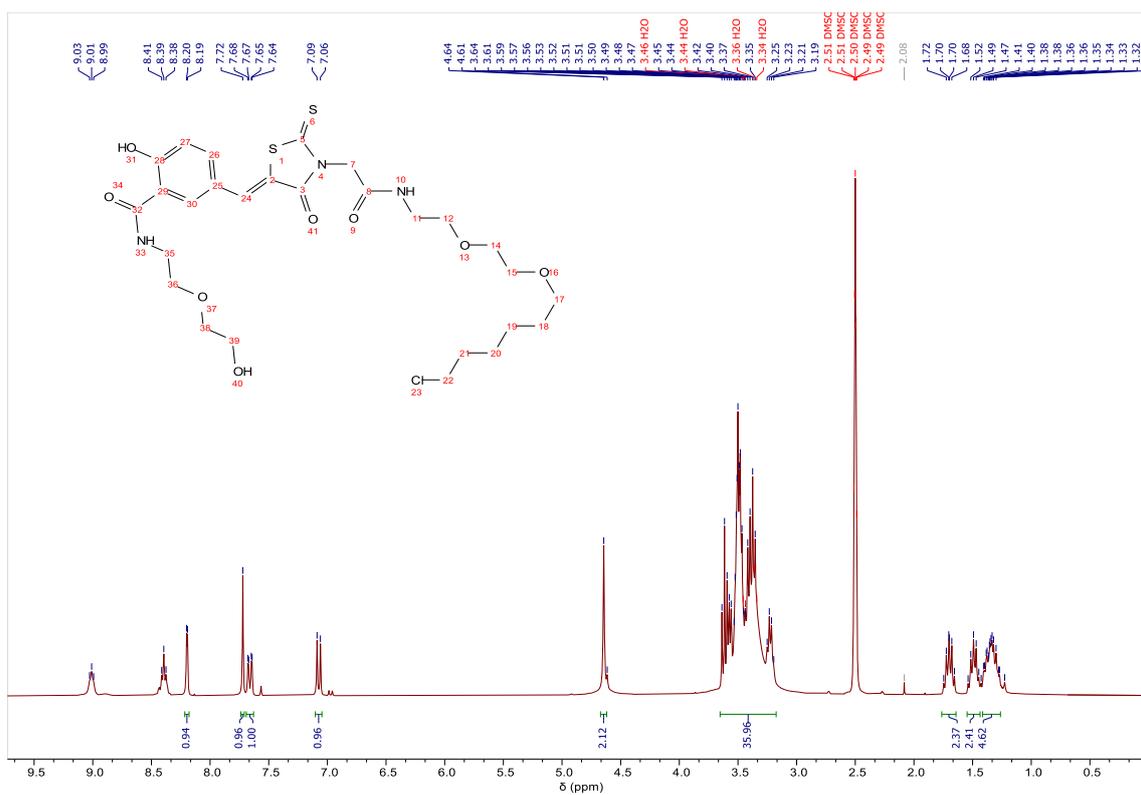
¹H NMR spectra of (2)



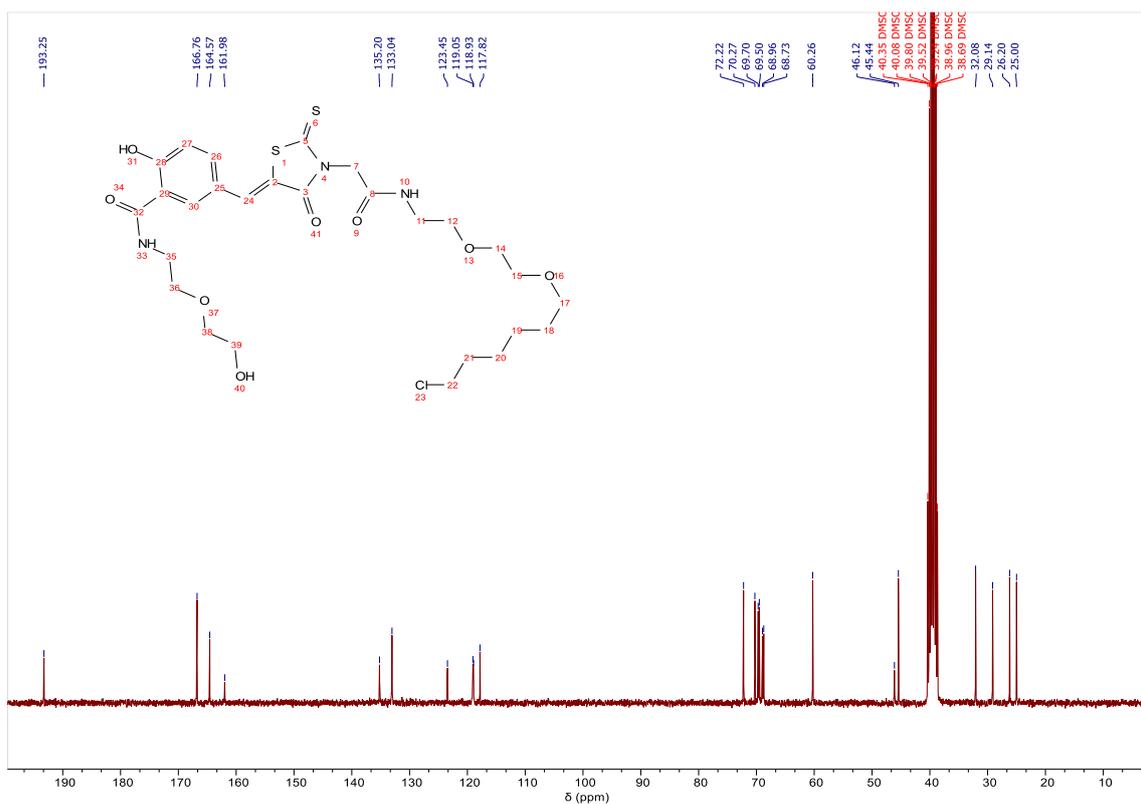
¹³C NMR spectra of (2)



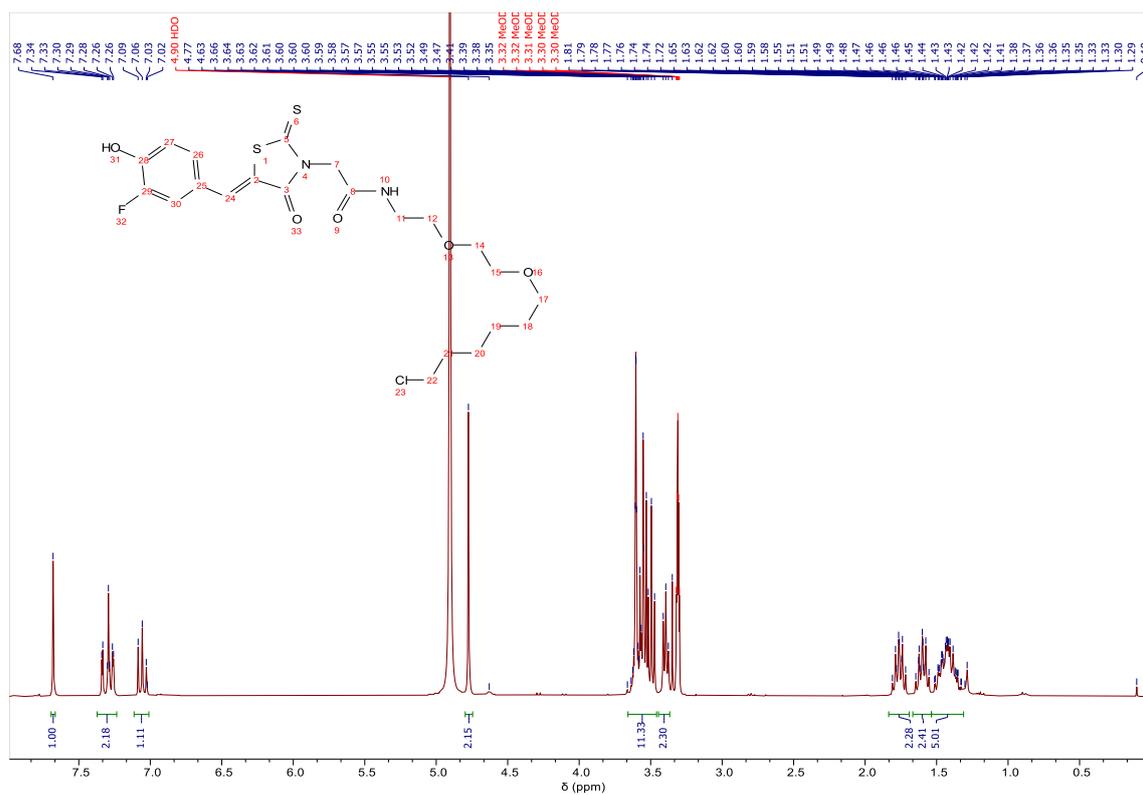
¹H NMR spectra of pHluo-Halo-1



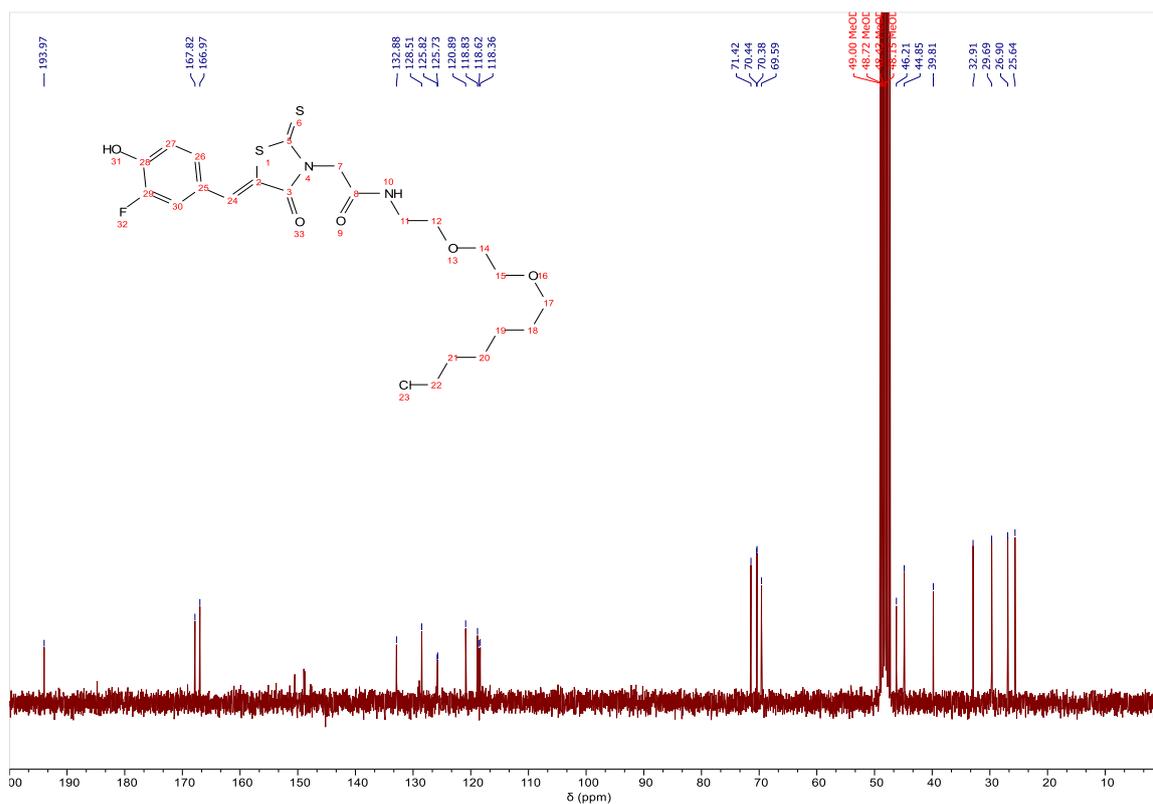
¹³C NMR spectra of pHluo-Halo-1



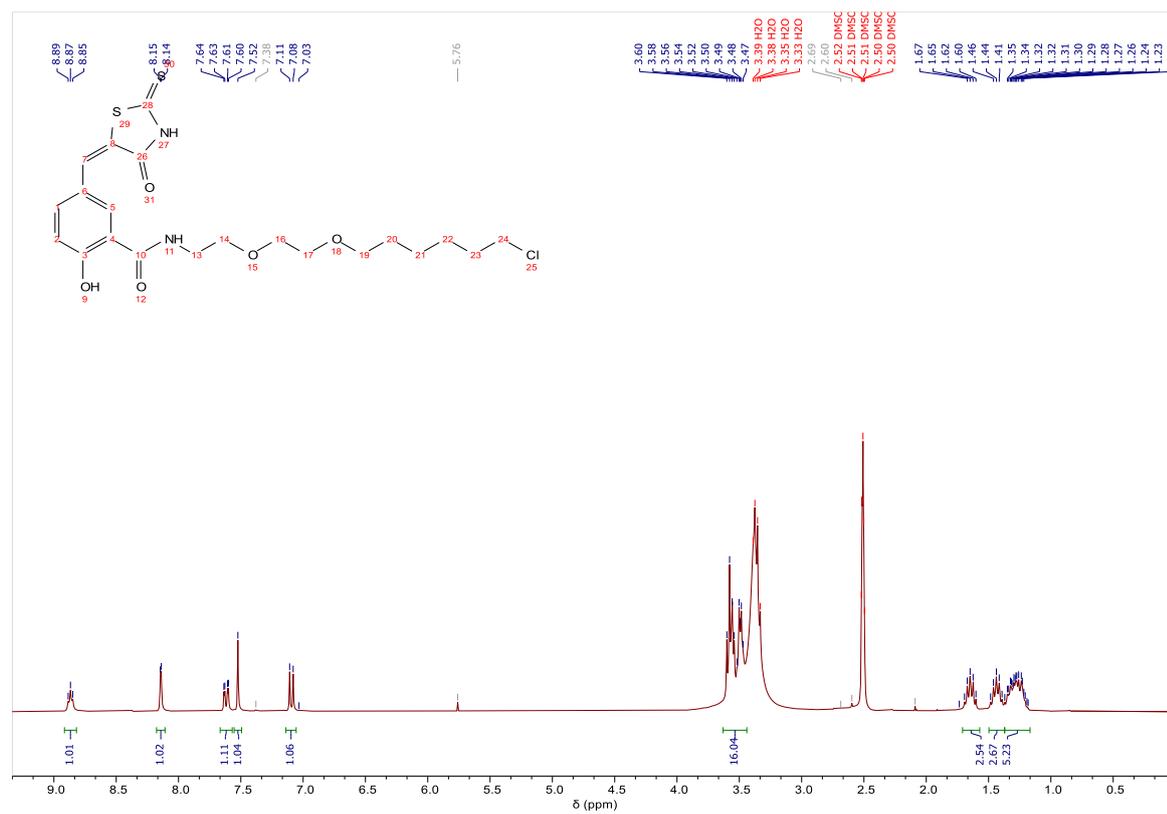
¹H NMR spectra of pHluo-Halo-2



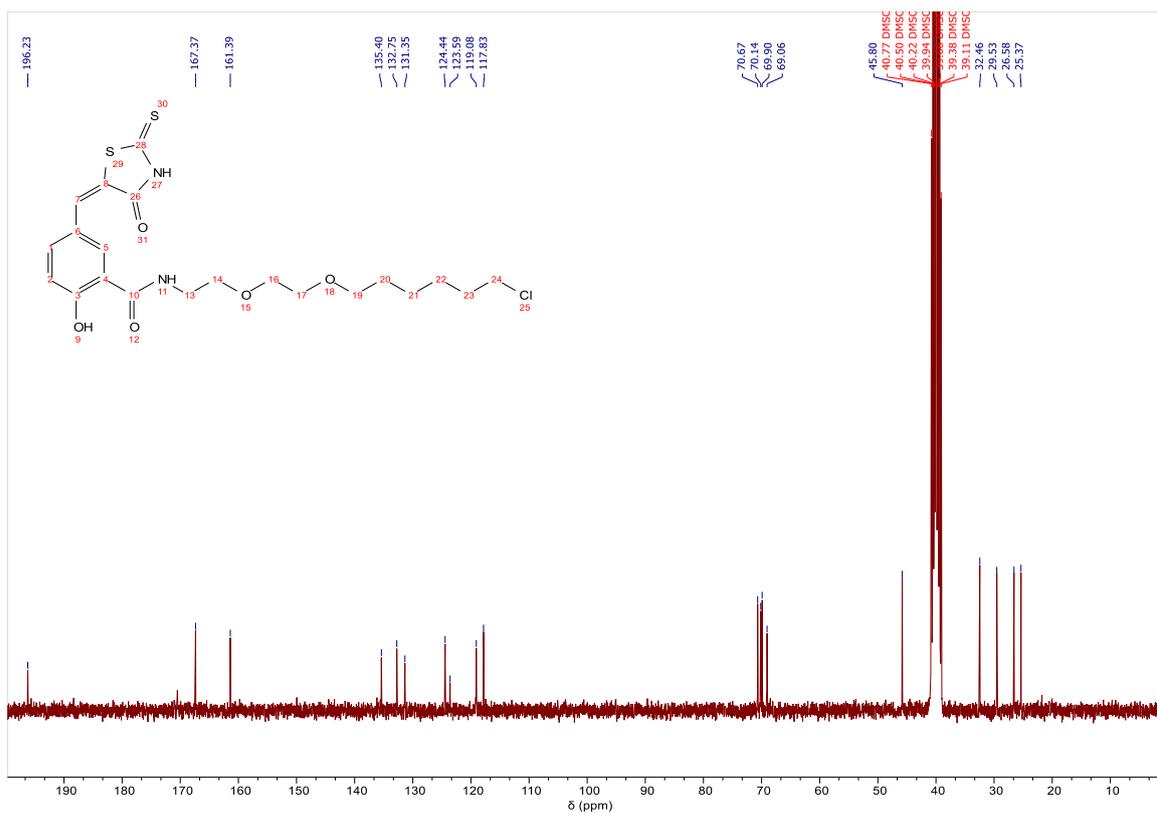
¹³C NMR spectra of pHluo-Halo-2



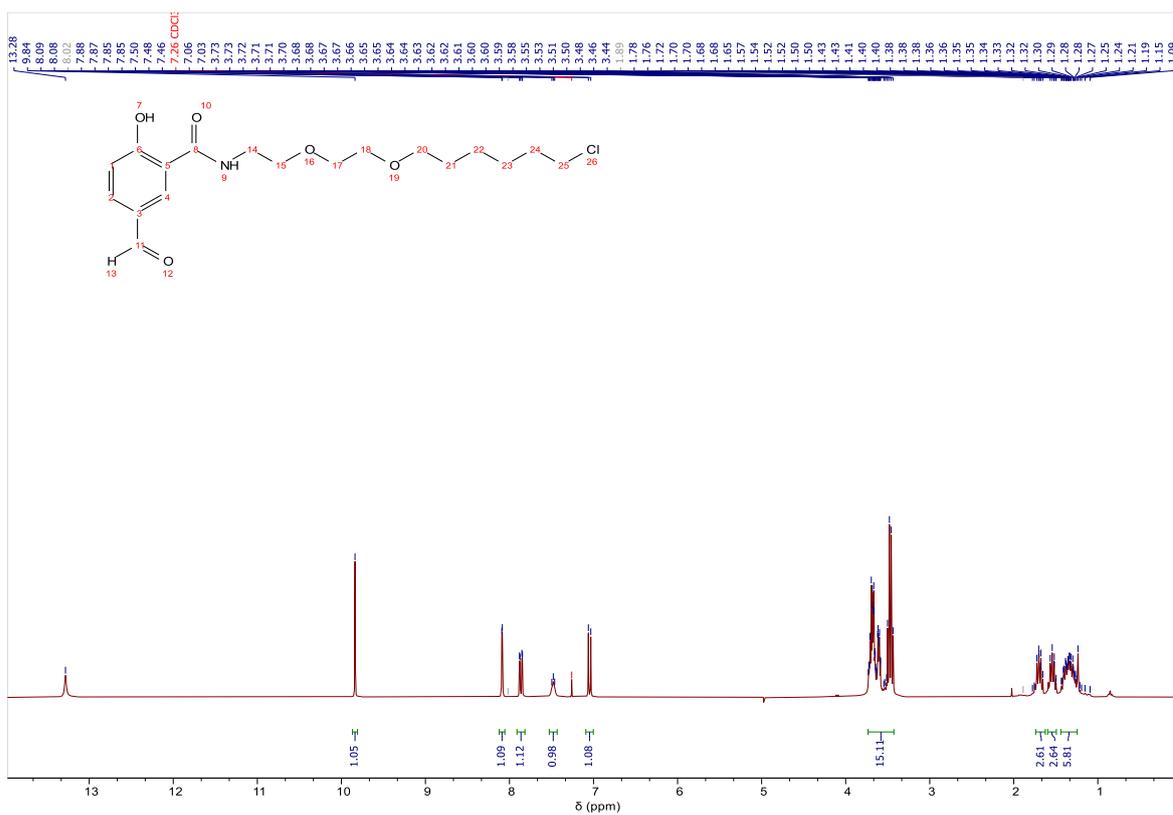
¹H NMR spectra of pHluo-Halo-3



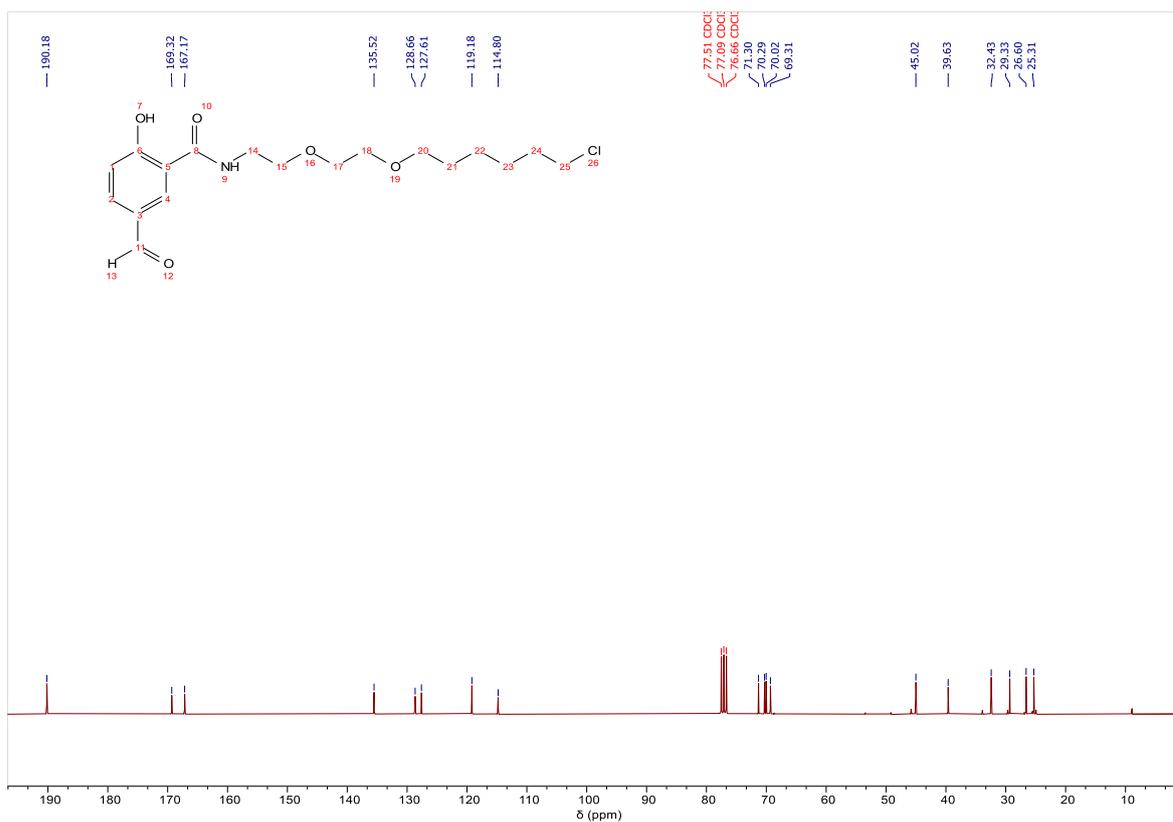
¹³C NMR spectra of pHluo-Halo-3



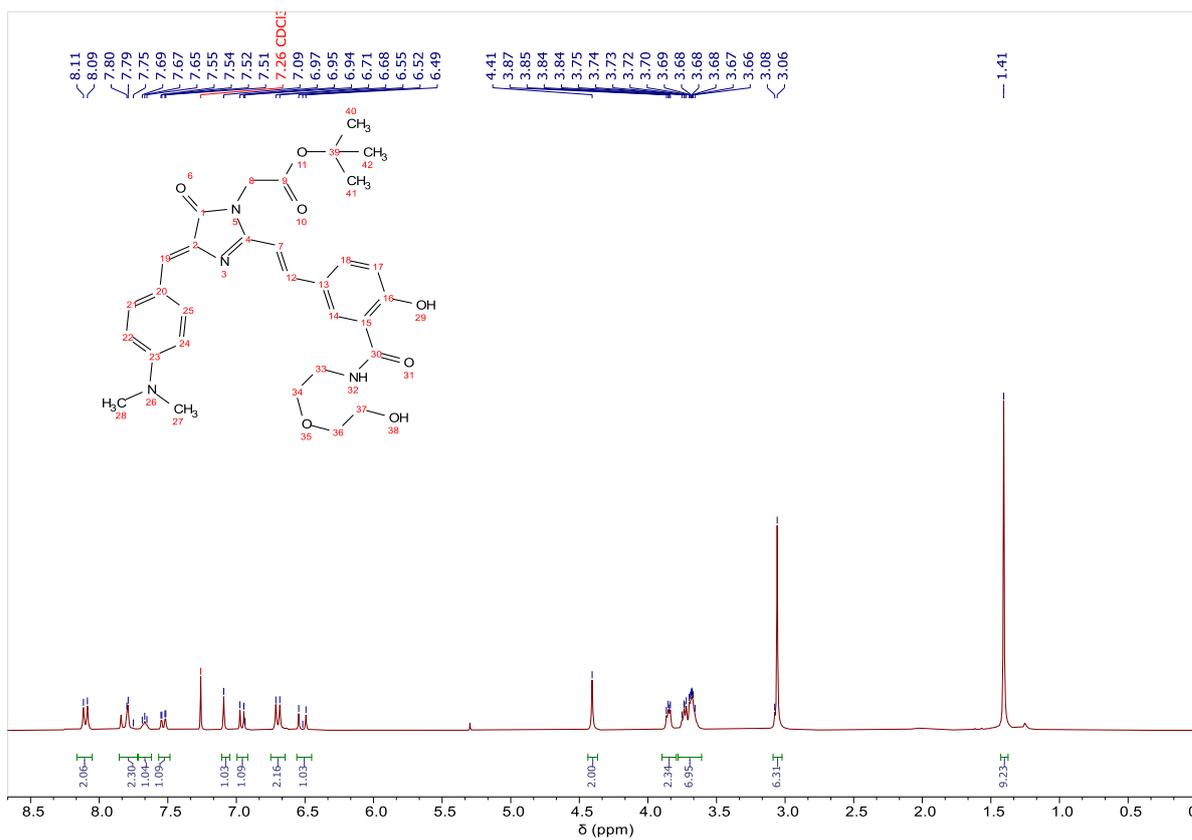
¹H NMR spectra of (5)



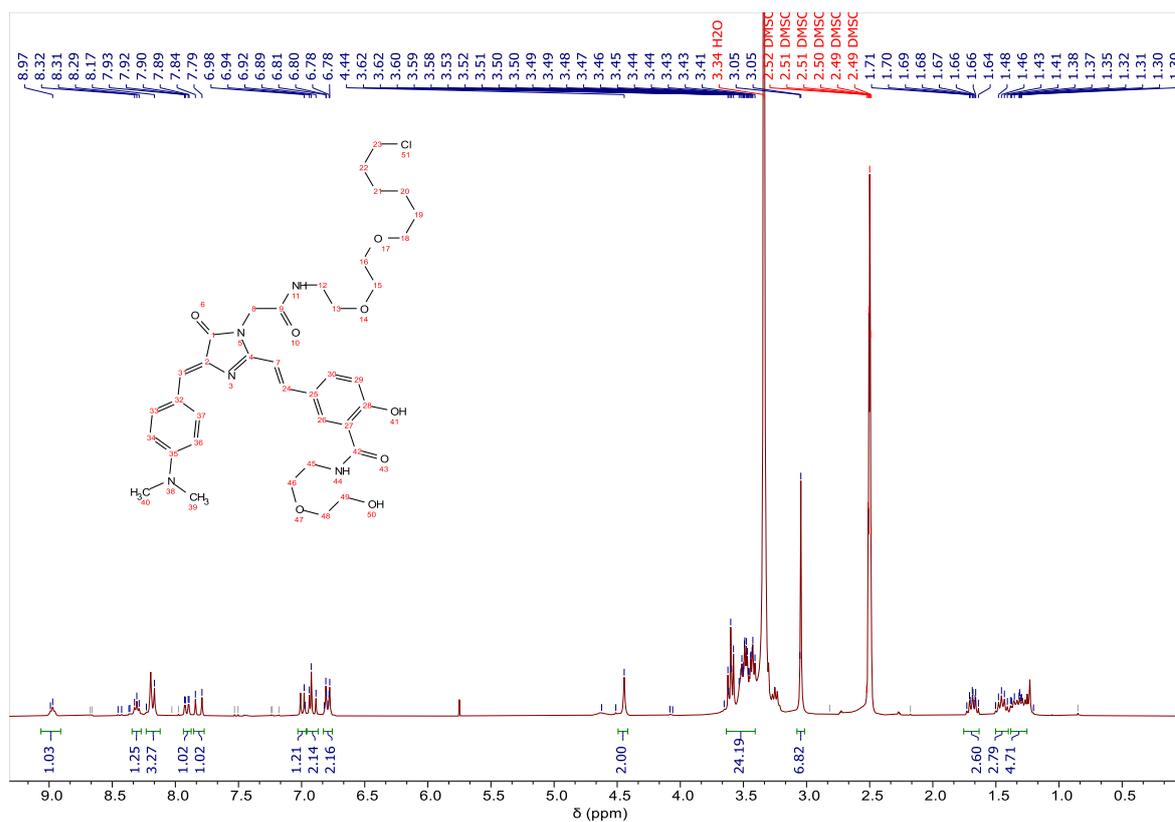
¹³C NMR spectra of (5)



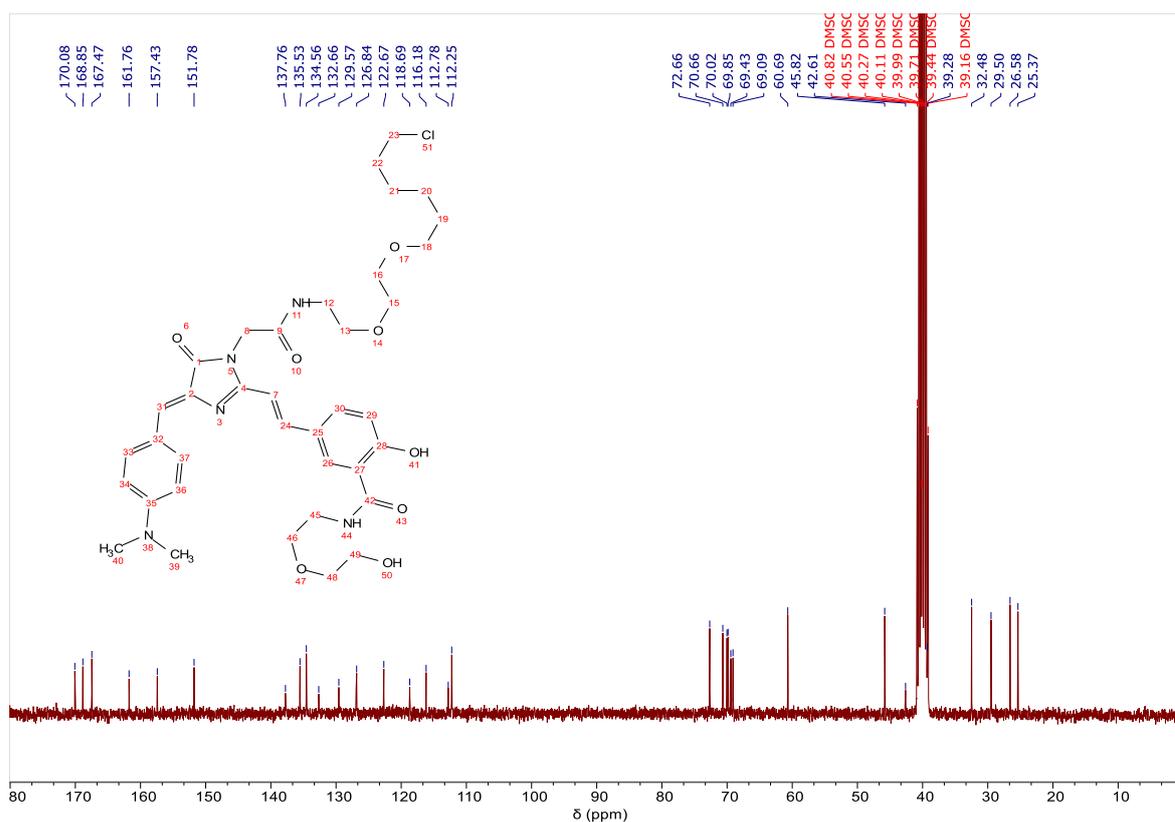
^1H NMR spectra of (8)



^1H NMR spectra of pHluo-Halo-Red



^{13}C NMR spectra of pHluo-Halo-Red



Chapitre IV

Application des sondes fluorescentes chimiogénétiques hybrides à l'étude de la protéine hev

Table des matières

I. Contextualisation	232
II. Résultats préliminaires	235
I.1. Quelles sont les voies de sécrétion de hevin ?	235
I.1.1. Construction de Hevin-HaloTag	235
I.1.2. Localisation subcellulaire de hevin	239
I.2. Mécanisme de sécrétion de hevin	244
III. Conclusion et perspectives	250
IV. Partie expérimentale	252

Un des objectifs de ma thèse est d'étudier une protéine appelée **hevin**, sécrétée par les **astrocytes** dans le système nerveux central et impliquée dans certaines maladies psychiatriques comme l'addiction aux drogues (Figure 71). Dans le cadre de ce chapitre, nous abordons les résultats relatifs à l'étude de cette protéine, qui fait l'objet des travaux de recherche de Vincent Vialou. L'objectif général de cette partie de mon travail est de réinvestir l'ensemble des outils chimiogénétiques hybrides développés précédemment (**Chapitres II et III**) pour observer et comprendre les processus cellulaires impliquant cette protéine, encore mal compris. En particulier, il s'agit dans un premier temps d'identifier les voies de sécrétion de hevin par le biais de colocalisation avec des marqueurs de compartiments cellulaires puis dans un deuxième temps, d'analyser son processus d'exocytose en temps réel par microscopie TIRF. Les résultats présentés dans cette partie décrivent des **études préliminaires** qui contribuent à la compréhension du cycle de vie de la protéine hevin à l'échelle subcellulaire.

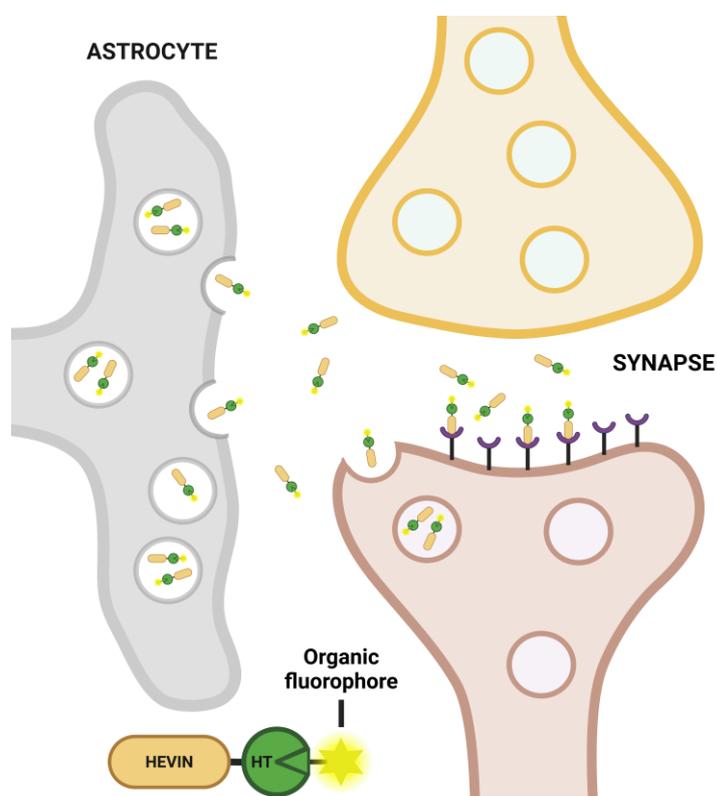


Figure 71. Schéma générale du principe de l'étude de la protéine hevin avec des sondes chimiogénétiques hybrides.

I. Contextualisation

L'équipe de recherche de biologie dans laquelle j'ai effectué ma thèse s'intéresse aux bases neurobiologiques des maladies psychiatriques et plus particulièrement aux mécanismes liés à la dépression et à l'addiction chez les humains.

L'addiction est une maladie chronique caractérisée par la compulsion de prendre ou de chercher à prendre des drogues, avec des répercussions considérables sur le plan clinique, social et économique considérables. Malgré l'existence de psychothérapies et de certaines thérapies médicamenteuses, il a été estimé que 60 % des patients atteints rechutent. Par conséquent, l'identification des mécanismes associés à la sensibilité et à la rechute de cette maladie est un défi majeur dans la recherche en santé.

À l'échelle cellulaire et moléculaire, l'addiction aux drogues est caractérisée par des modifications de la plasticité structurelle et synaptique au niveau du système limbique en particulier du noyau accumbens ou « centre de la récompense ». Les avancées dans l'étude et la compréhension des processus neurologiques qui régissent ces changements ont révélé petit à petit un rôle régulateur des astrocytes sur les fonctions neuronales.^[337] Les astrocytes sont des cellules gliales présentes dans le cerveau qui interagissent étroitement avec les neurones en jouant des rôles critiques dans le développement, la fonction et l'intégrité cérébrale. Ces cellules sécrètent une large gamme de neurotransmetteurs neuroactifs, de gliotransmetteurs, de facteurs métaboliques, trophiques et inflammatoires contribuant ainsi au fonctionnement cérébral et aux comportements adaptatifs. De plus, les cellules astrocytaires sécrètent des facteurs synaptogéniques solubles qui favorisent la formation, la maturation et le raffinement des synapses excitatrices pendant le développement du cerveau^[338-341] tels que les thrombospondines et la protéine **hevin**.^[342] De plus en plus de travaux suggèrent que les protéines matricellulaires sécrétées par les astrocytes dans la matrice extracellulaire régulent l'architecture et la fonction des synapses^[343,344]. Cependant, leur rôle dans la **neuroplasticité** à l'âge adulte et plus spécifiquement dans la physiopathologie des **addictions** commence tout juste à être exploré.^[338]

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons en particulier à la protéine **hevin**. Cette protéine fait partie de la famille des SPARC « secreted protein acidic and rich in cysteine » qui joue un rôle dynamique dans les mécanismes d'adaptation synaptique et en particulier elle joue un rôle dans la synaptogénèse des synapses

glutamatergiques (Figure 72).^[336] Contrairement aux autres protéines matricellulaires, hevin continue d'être exprimée dans le cerveau adulte, en majorité par les astrocytes et les interneurones parvalbumine. La protéine hevin est induite dans le noyau accumbens (NAc) par les abus de drogues et autres stimuli émotionnels comme le stress social. De plus, sa surexpression favorise la motivation, la résilience au stress et présente une activité similaire à celle d'un antidépresseur.^[345] Ces différentes observations suggèrent ainsi que cette protéine est impliquée dans la neuroplasticité cérébrale chez l'adulte.

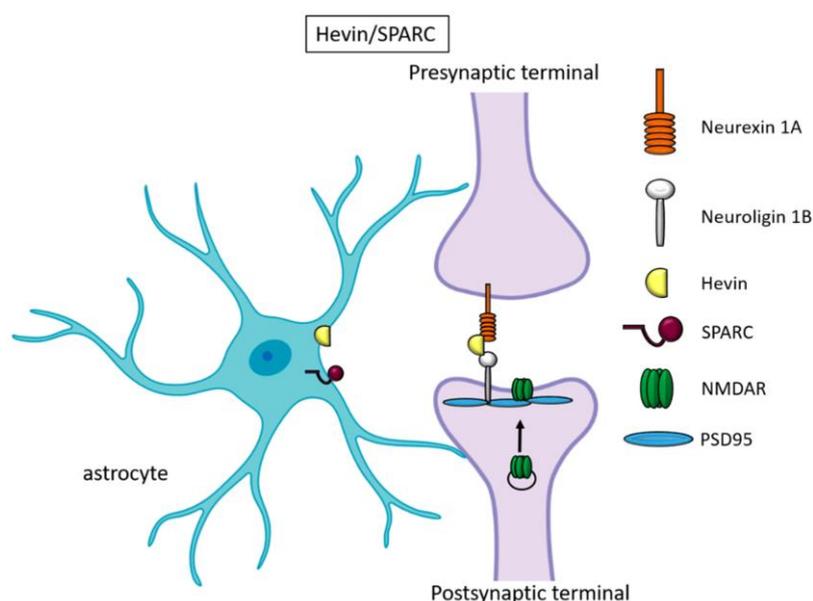


Figure 72. Principe général de la sécrétion de la protéine Hevin par les astrocytes et de son interaction en tant que facteur synaptogénique avec les neurones.

Adapté de Fossati et *al.*^[346]

L'équipe de Vincent Vialou a récemment montré que hevin est un médiateur de l'action de la cocaïne sur la récompense et la plasticité neuronale dans le NAc dans un modèle de souris exposées à des drogues.^[344] Plus particulièrement, ces travaux mettent en évidence l'action directe de la cocaïne sur l'activité des cellules astrocytaires et l'implication de la protéine hevin dans les effets de la cocaïne sur la plasticité structurelle et synaptique des neurones.

Une de nos principales **hypothèses** est que l'abus de drogues et le stress induisent une sécrétion de hevin dépendante du calcium par les astrocytes, qui modifie à son tour la plasticité au niveau des synapses glutamatergiques, régulant ainsi la

récompense, la motivation et l'humeur. Les astrocytes sont sensibles aux neurotransmetteurs par des récepteurs qui vont induire un signal calcique et entraîner à leur tour la sécrétion de gliotransmetteurs et de facteurs synaptogéniques. Cette communication bi-directionnelle est essentielle pour la plasticité neuronale. Les mécanismes et la nature des vésicules exprimant hevin dans les astrocytes sont encore peu connus. De façon générale, il existe différentes familles de vésicules de sécrétion astrocytaires telles que les microvésicules synaptiques, les vésicules à cœur dense, les lysosomes sécrétoires et les MVB.^[266] Toutes ces vésicules peuvent subir une exocytose régulée et ont été montrées comme étant essentielles pour la régulation de la plasticité synaptique dépendante de l'activité.^[348]

Par conséquent, l'objectif de ce projet est de tester diverses hypothèses concernant la localisation subcellulaire et de processus de sécrétion de la protéine hevin. Pour cela, l'idée est de mettre en place deux approches différentes sur des modèles cellulaires simples comme les cellulaires HeLa et les cellules U251. La première approche vise à déterminer la localisation subcellulaire de hevin grâce à des expériences de colocalisations avec d'autres protéines dont les voies de sécrétion sont connues. La deuxième approche concerne la compréhension du mécanisme de sécrétion de la protéine hevin en utilisant les mêmes outils que pour l'étude de CD63 (**Chapitre III**).

II. Résultats préliminaires

I.1. Quelles sont les voies de sécrétion de hevin ?

Hevin est une protéine sécrétée par les astrocytes. Les travaux de l'équipe suggèrent que sa sécrétion est dépendante de l'activité cellulaire. Cependant, ni sa localisation subcellulaire, ni ses voies de sécrétion et sa régulation ne sont réellement connues. Pour identifier la nature des vésicules dans lesquelles est exprimé hevin et déterminer son mode de sécrétion, nous avons choisi de suivre par microscopie à fluorescence hevin dans différents modèles de lignées cellulaires.

I.1.1. Construction de Hevin-HaloTag

Afin de pouvoir bénéficier de l'ensemble des RMFs élaborés en chimie, nous avons réalisé la construction de la protéine de fusion **hevin-HaloTag**. Plus précisément, l'idée est de combiner la protéine **hevin-HaloTag** à des senseurs « simples » (**Chapitre II**) mais aussi à des senseurs pH (**Chapitre III**) afin de suivre les processus cellulaires associés à hevin tels que sa sécrétion et sa régulation.

Hevin, comme toutes les protéines de la famille SPARC, contient un domaine C-terminal semblable à la follistatine et un domaine de liaison au calcium extracellulaire.^[349] Le domaine N-terminal contient le peptide signal de sécrétion de hevin. Grâce à son domaine extracellulaire de liaison au Ca^{2+} , hevin se lie à la protéine de la matrice extracellulaire qu'est le collagène. Par son domaine de type follistatine, hevin peut également se lier aux protéines d'adhésion cellulaire neurexine et neuroligine, qui stabilisent les synapses excitatrices *in vivo* (Figure 72).^[349]

Nous avons utilisé comme base pour la construction de **hevin-HaloTag**, le plasmide pAAV_CMV_GFP contenant le promoteur constitutif CMV qui assure l'expression des protéines de fusion dans divers types cellulaire (Figure 73). L'insertion correspondante à la protéine hevin ainsi que son « linker » a été obtenue par PCR sur le plasmide **hevin-GFP** et l'insert correspondant à la protéine HaloTag7 a été obtenu par PCR à partir du le plasmide **pET28_HaloTag** (Figure 73).

Name	Length	Produced by	5' end	3' end
pAAV_CMV_GFP	4619	Restriction digest	Sall	EcoRI
Hevin-linker	2040	PCR	Fwd Primer	Rev Primer
HaloTag	966	PCR	Fwd Primer	Rev Primer

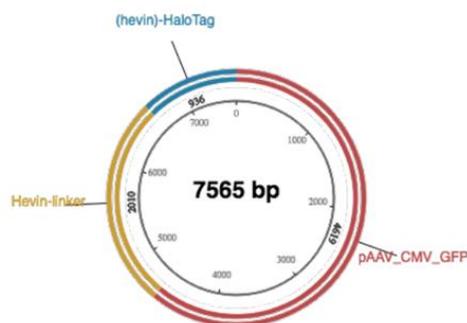


Figure 73. Construction du plasmide Hevin-HaloTag7 en biologie moléculaire par digestion enzymatique et PCR.

La séquence peptidique du linker relie le domaine C-terminal de la protéine hevin avec la protéine HaloTag. Cette séquence (-Leu Glu Cys Gly Arg Asn Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Arg Ser Arg-) a été utilisée précédemment pour la construction **hevin-GFP** ainsi que les protéines de fusion **hevin-SEP** et **hevin-pHuji**.

Les plasmides **hevin-SEP** et **hevin-pHuji** ont été construits au préalable au laboratoire. Nous avons ensuite évalué l'expression de ces différentes protéines de fusion par western-blot et par immunofluorescence dans deux types cellulaires différents: les cellules **BON** et les cellules **U251** (Figure 74). Les cellules BON sont des cellules carcinoïdes humaines qui sécrètent de la sérotonine (5-HT) et divers peptides. Les cellules U251 sont une lignée de gliome humain. Nous avons quantifié la présence des protéines de fusion dans le milieu extracellulaire, ce qui permet aussi de vérifier que la fusion de HaloTag au niveau C-terminal de la protéine hevin n'altère pas sa sécrétion.

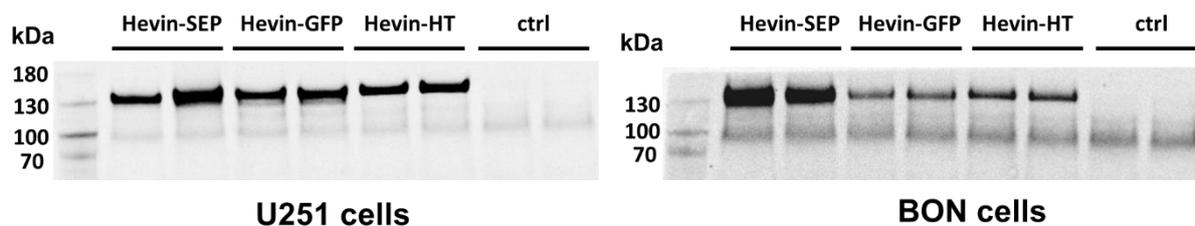


Figure 74. Western-blots d'extraits de milieux extracellulaires de cellules U251 et BON en culture exprimant des protéines de fusion contenant hevin.

(HT = HaloTag, ctrl = milieu extracellulaire de cellules non transfectées).

L'analyse de ces deux Western-blot montre une expression consistante du plasmide **hevin-HaloTag** au sein des cellules U251 et BON, avec une taille attendue autour de 140-150 kDa correspondant à la fusion de la protéine hevin (~ 115 kDa) et de la protéine HaloTag (~ 33 kDa). Les autres protéines correspondant à **hevin-GFP** et **hevin-SEP** ont également la taille attendue, autour de 140 kDa. En revanche, cette expérience permet de voir que le niveau d'expression est dépendant du type cellulaire. En effet, les plasmides **hevin-GFP** et **hevin-HaloTag** sont moins bien exprimés dans les cellules BON. Nous avons donc décidé d'utiliser uniquement les cellules **U251** pour réaliser les expériences de localisation subcellulaire de hevin.

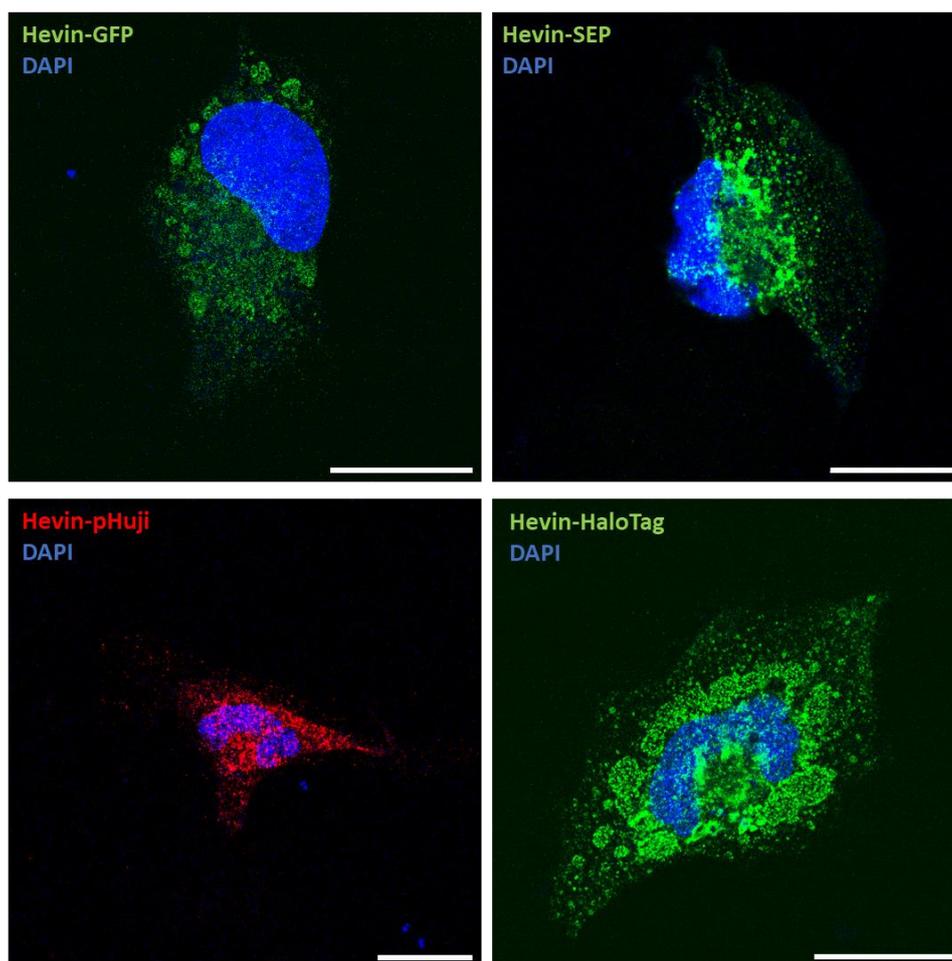


Figure 75. Immunofluorescence après transfection de différentes constructions contenant la protéine hevin.

Utilisation d'un anticorps primaire anti-Hevin et des anticorps secondaires Alexa 488 (**hevin-GFP**, **hevin-SEP** et **hevin-HaloTag**) et Cy3 (**hevin-pHuji**). $\lambda_{exc} = 488$ nm (**hevin-GFP**, **hevin-SEP** et **hevin-HaloTag**) et $\lambda_{exc} = 561$ nm (**hevin-pHuji**). Marquage du noyau par du DAPI (en bleu). Barre d'échelle = 20 μ m.

Deux jours après la transfection de cellules U251 avec **hevin-GFP**, **hevin-SEP**, **hevin-pHuji** et **hevin-HaloTag**, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence contre hevin et validé l'expression de ces constructions en microscopie confocale.

Nous avons observé un marquage similaire pour toutes les formes de hevin qui est punctiforme et qui s'apparente à des vésicules ainsi qu'un marquage intense au niveau du réticulum endoplasmique, à proximité du noyau des cellules. Cette première

observation semble conforter l'hypothèse de la présence de hevin dans des vésicules de sécrétion.

Il existe une variété de types de vésicules, quelques soient les cellules considérées. Ces vésicules, qui assurent des fonctions très diverses, se différencient par la nature des molécules présentes à leur membrane ainsi que par leur contenu (Figure 76). On retrouve par exemple les « synaptic-like microvesicles » qui expriment la protéine VAMP2 (ou synaptobrevine), les « Dense-core vesicles », qui libèrent le neuropeptide Y, les lysosomes qui expriment la protéine LAMP1 ou encore les MVB qui expriment CD63. Ces vésicules se caractérisent aussi par leur maturation et leur mode de sécrétion. La prochaine partie se consacre à l'identification subcellulaire de la protéine hevin au sein des cellules U251 par colocalisation avec ces différents marqueurs vésiculaires.



Figure 76. Représentation des différentes familles de vésicules existantes et de quelques marqueurs associés (VAMP2, NPY, LAMP1 et CD63).

Image adaptée de Verkhratsky et al.^[350]

I.1.2. Localisation subcellulaire de hevin

-Ces manipulations ont été réalisées par **Séverine Robert** que j'ai co-encadrée dans le cadre de son stage de M2.

-Les analyses de données sur les colocalisations ont été réalisées par **Franck Louis**.

Des travaux de microscopie électronique ont montré que la protéine hevin était présente dans des vésicules rassemblées qui correspondent à des corps multivésiculaires ou MVB. Comme nous l'avons vu dans le **chapitre III**, ces MVB sont constitués d'exosomes qui expriment la protéine **CD63**.

L'objectif de cette partie est de vérifier si la protéine hevin est exprimée par des vésicules de sécrétion et potentiellement des MVB comme CD63. La diversité et le niveau de résolution requis pour identifier les vésicules dans les fins prolongements astrocytaires sur coupe de cerveau rendent cette étape compliquée et les résultats difficiles à interpréter. Nous avons donc décidé de procéder par étape et de répondre à cette question en commençant par une approche cellulaire par criblage des principales voies de sécrétion associées au processus de plasticité synaptique. Nous avons ainsi co-transfecté la protéine hevin avec des plasmides exprimant différents marqueurs vésiculaires couplés à des protéines fluorescentes: VAMP2, NPY, et CD63. Les marqueurs VAMP2 et NPY sont présents dans les vésicules de type synaptique et les vésicules à cœur dense qui sont deux voies de sécrétion intervenant dans la plasticité synaptique. CD63 est un marqueur présent dans les vésicules MVB qui contiennent potentiellement la protéine hevin. Cette approche permet de marquer des vésicules avec des protéines qui ne sont pas nécessairement exprimées dans la lignée cellulaire utilisée, et évite la nécessité de mettre au point une immunocytochimie pour chaque protéine étudiée.

Tout d'abord, pour confirmer que la protéine hevin est présente dans des vésicules (et non cytoplasmique), nous avons transfecté la protéine de fusion **hevin-GFP** avec la protéine de fusion **ssGNB-mCherry** correspondante à un Nanobody dirigé contre la protéine GFP et ayant un peptide signal d'adressage vers les voies de sécrétion (ssGNB) fusionné à la protéine fluorescente mCherry. La présence d'un co-marquage entre **hevin-GFP** et **ssGNb-mCherry** confirme l'hypothèse que hevin est bien une protéine sécrétée (Figure 77A). Pour déterminer si le degré de colocalisation observé est significatif, nous avons utilisé comme contrôle, une colocalisation entre les protéines vésiculaires **VAMP2-GFP** et **ssGNB-mCherry**. La quantification de cette colocalisation permet d'avoir une valeur de référence dans nos analyses d'imagerie. Ensuite, nous avons testé la colocalisation de hevin avec la protéine NPY (Figure 77B), avec CD63 (Figure 77C) et avec VAMP2 (expérience en cours). Enfin, la bonne spécificité des sondes chimiogénétiques hybrides vis-à-vis du marquage de hevin en

culture a été validée avec une colocalisation entre **hevin-HaloTag** et **hevin-SEP**. La sonde qui a été utilisé ici est la sonde **Red-Halo3** identifiée comme la sonde la plus brillante (**chapitre II**) (Figure 78). Les images de microscopie confocale du contrôle de la spécificité des systèmes chimiogénétiques hybrides pour l'étude de la protéine hevin montrent la présence d'une colocalisation entre la sonde **Red-Halo3** et la protéine **GFP**. Cette première analyse visuelle semble valider le marquage spécifique de la sonde.

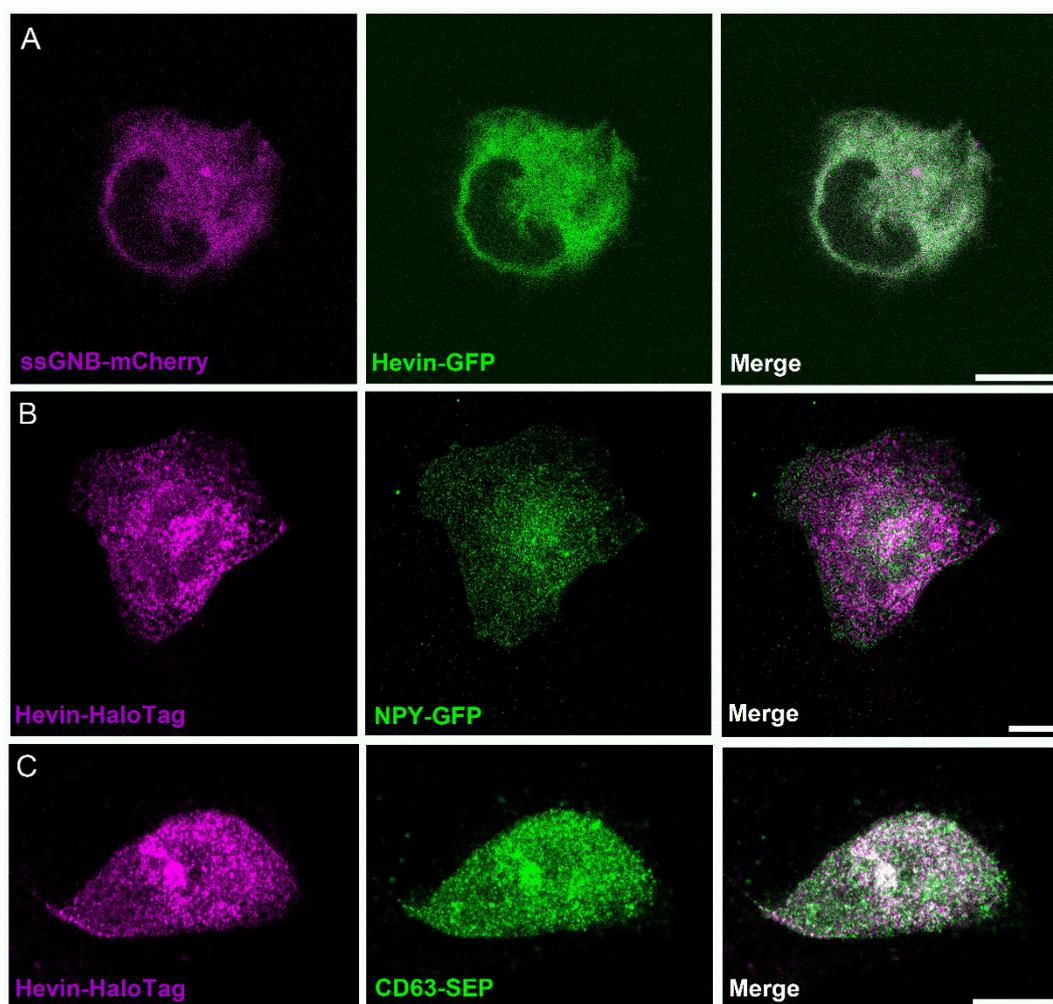


Figure 77. Images de microscopie confocale de fluorescence des colocalisations de hevin.

(A) Détection par fluorescence de ssGNB (*magenta*) et hevin (*vert*) dans les cellules U251 transfectées avec les plasmides **ssGNB-mCherry** et **hevin-GFP**. (B) Détection par immunofluorescence de hevin (*magenta*) et NPY (*vert*) dans les cellules U251 transfectées avec les plasmides **hevin-HaloTag** et **NPY-GFP**. (C) Détection par immunofluorescence de hevin (*magenta*) et CD63 (*vert*) dans les cellules U251 transfectées avec les plasmides **hevin-HaloTag** et **CD63-SEP**. (B,C) Fluorochromes : Alexa 488 (NPY, CD63, *vert*) et Cy3 (Hevin, *magenta*). Barre d'échelle : 10 μ m.

Ces images de microscopie rendent compte visuellement de la présence ou non de potentielles colocalisations entre hevin et d'autres protéines. Nous avons observé une forte colocalisation entre CD63 et hevin (Figure 77C), ce qui semble confirmer l'expression de hevin dans les exosomes. Concernant la protéine NPY, la première observation montre une faible colocalisation avec hevin ce qui pourrait confirmer des différences dans la nature des vésicules impliquées dans la sécrétion de ces deux protéines, vésicules à cœur dense et MVB (Figure 77B).

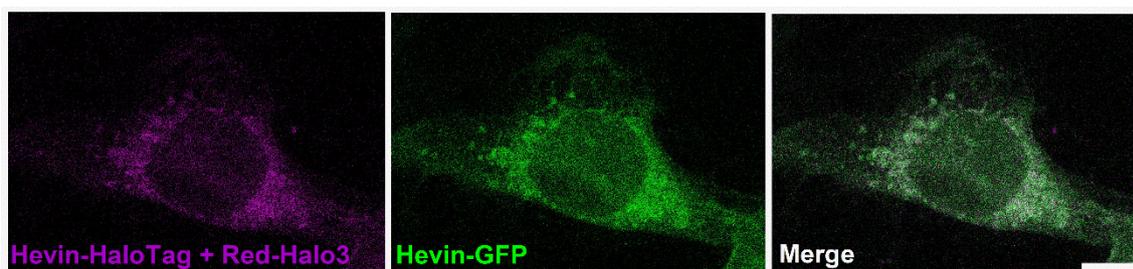


Figure 78. Images de microscopie confocale de fluorescence de colocalisation de hevin-HaloTag + Red-Halo3 (magenta) et hevin-GFP (vert) en cellules fixées.
Barre d'échelle: 10 μ m.

Nous avons ensuite utilisé le plugin JaCOP sur ImageJ2/Fiji afin de calculer les pourcentages de colocalisation ou **coefficient de Pearson** pour chacune de ces expériences, sur plusieurs cellules (Figure 79).

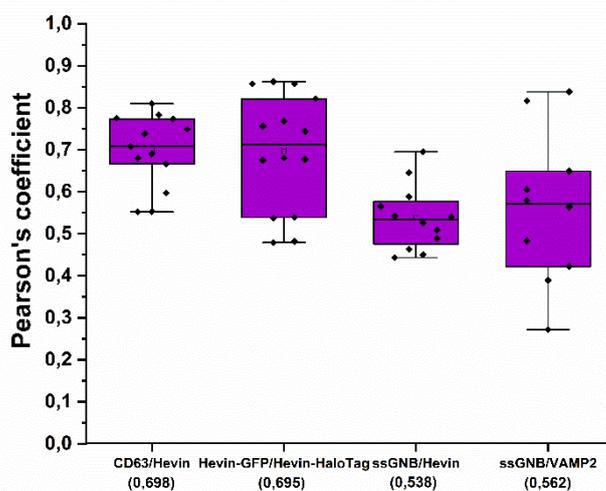


Figure 79. Coefficients de Pearson obtenus pour les différentes colocalisations de hevin.

Valeur des moyennes indiquées entre parenthèses.

Chaque calcul de colocalisation a été lancé sur une cellule entière pour les différentes conditions. Les résultats obtenus pour les deux protéines ssGNB et hevin mettent en évidence la présence d'une colocalisation avec un coefficient de Pearson de 54 %. Le contrôle positif réalisé avec ssGNB/VAMP2 montre un coefficient de Pearson similaire suggérant la présence de hevin dans les voies de sécrétion. Le coefficient de Pearson obtenu pour CD63 et hevin (70 %) semble confirmer l'hypothèse d'une forte colocalisation entre ces deux protéines et donc la présence de hevin dans des vésicules de type exosomes et MVB. Notre dernier contrôle concernant la bonne sélectivité des sondes chimiogénétiques (ici **HaloTag-Red-Halo3**) vis-à-vis de la protéine hevin présente également un coefficient de Pearson élevé de 70 %. Cette valeur permet de confirmer la viabilité des outils développés pour l'étude de cette nouvelle protéine peu étudiée et ouvre la voie pour l'utilisation des sondes hybrides dans le contexte de cette étude. Enfin, pour la colocalisation entre hevin et NPY, des analyses sont encore en cours mais les premiers résultats obtenus sur quelques cellules semblent confirmer la faible corrélation observée visuellement.

Cependant, il s'agit ici de résultats **préliminaires** et il est primordial de continuer et dupliquer les expériences pour solidifier les analyses. De plus, l'interprétation des valeurs des coefficients de Pearson obtenus doit être soumise à la comparaison avec ceux obtenus pour un contrôle négatif, entre deux protéines dont aucune colocalisation n'est attendue comme la GFP cytoplasmique et ssGNb-mCherry par exemple. Ces études sont actuellement en cours et permettront ainsi de déterminer avec précision de la localisation subcellulaire de hevin en cellules U251 fixées.

Compte-tenu des résultats prometteurs obtenus pour la colocalisation entre **CD63** et **hevin** sur cellules fixées associée à la bonne spécificité du plasmide **hevin-HaloTag**, nous avons ainsi décidé de continuer l'étude sur le mécanisme de sécrétion et la régulation du trafic de hevin par microscopie TIRF en se plaçant dans des conditions identiques à celles utilisées pour CD63. En effet, cette stratégie nous permettra de comparer directement les caractéristiques intrinsèques mesurées, comme le rayon des vésicules impliquées.

I.2. Mécanisme de sécrétion de hevin

Les analyses de données TIRF ont été réalisées par **Marie-Laure Niepon**.

Pour évaluer le processus de sécrétion de la protéine hevin en temps réel, nous avons utilisé la microscopie TIRF de façon analogue aux travaux présentés dans le **chapitre III**. L'objectif de cette partie est de pouvoir suivre et analyser l'exocytose de hevin à l'échelle subcellulaire. Nous avons utilisé la même lignée cellulaire, les cellules HeLa, pour cette étude, ce qui nous permet de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour CD63.

L'idée est d'utiliser les deux constructions **hevin-SEP** et **hevin-HaloTag** + **pHluo-Halo-1** pour étudier l'exocytose de hevin. Contrairement au marquage vésiculaire obtenu avec CD63, les protéines de fusion **hevin-SEP** et **hevin-HaloTag** sont fortement exprimées dans des organelles intracellulaires, probablement le **réticulum endoplasmique** (Figure 80). En effet, un profil de fluorescence similaire a également été observée avec la protéine sensible au pH pHMScarlet fusionnée à une protéine spécifique du réticulum endoplasmique, CytERM-pHMScarlet.^[285] De plus, la présence de hevin dans le réticulum endoplasmique a également été observée sur coupe de cerveau de souris (données de l'équipe, non publiées), ce qui indique que la distribution des protéines de fusions Hevin-SEP et Hevin-HaloTag est correcte.

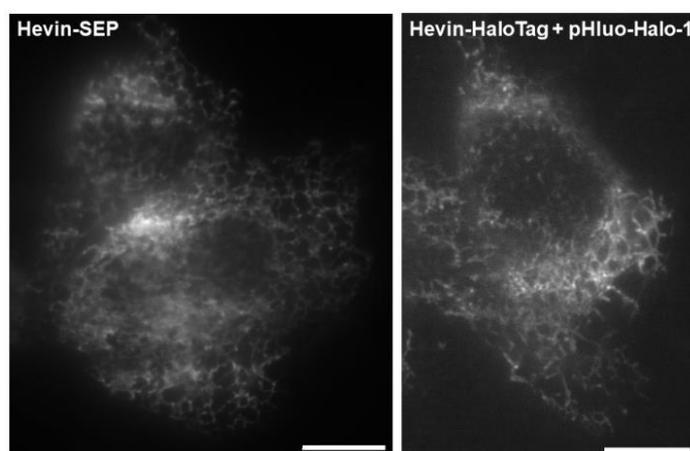


Figure 80. Images de microscopie TIRF de cellules HeLa transfectées par hevin-SEP (2 cellules, gauche) et hevin-HaloTag + pHluo-Halo-1 (1 cellule, droite).

Barre d'échelle: 10 μm .

En plus de ce marquage, on distingue un signal punctiforme dans des régions plus distantes par rapport au noyau et qui semble correspondre à des vésicules de sécrétion. Nous avons enregistré des vidéos de 2 min à une fréquence d'acquisition de 5 Hz pour caractériser ces événements de sécrétion de cellules HeLa exprimant la protéine de fusion **hevin-HaloTag** conjuguée à la sonde pH **pHluo-Halo-1** précédemment validée dans le **chapitre III** (Figure 81). Toutefois, la nature des événements est différente de celle observée avec CD63: les puncta qui sont rattachés au réticulum endoplasmique sont plus difficiles à visualiser et à détecter avec le plugin ExoJ car le fond (F_0) est plus important. Par conséquent, le traitement des vidéos brutes limite fortement la détection des événements avec une valeur seuil de détection $\Delta F/F_0$ beaucoup plus faible dans le cas de hevin que dans le cas précédent de CD63 (Figure 82A).

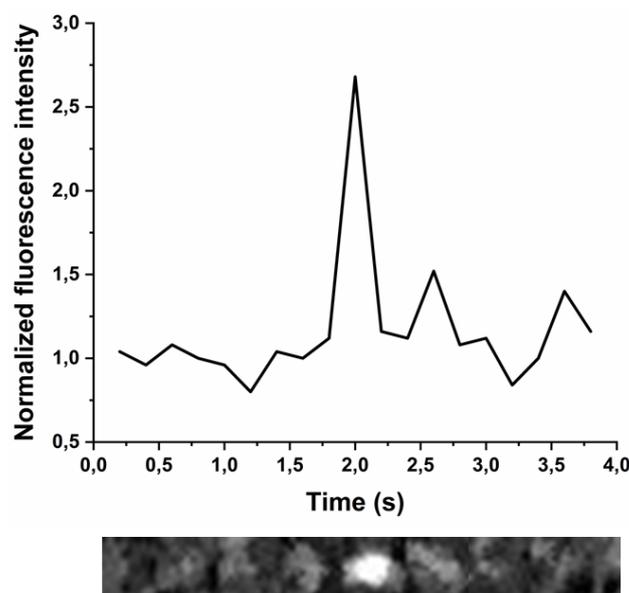


Figure 81. Profil d'intensité d'un événement détecté dans une cellule HeLa exprimant la protéine de fusion hevin-HaloTag et incubée avec 1 μM de la sonde pHluo-Halo-1.

Pour améliorer la qualité de l'analyse des vidéos, nous nous sommes affranchis de ce fond F_0 en utilisant la fonction « transform to dF movie » du plugin ExoJ. Cette fonction permet de soustraire à chaque image, l'image précédente et ainsi supprimer le réseau du réticulum endoplasmique gênant la détection des événements d'exocytose. De plus, nous avons également appliqué un filtre médian à 2 sur l'ensemble des vidéos

afin de contraster les événements. Ce traitement préliminaire des vidéos nous a ainsi permis de caractériser les événements d'exocytose de la protéine hevin dans les cellules HeLa (Figure 82).

Les résultats après traitement et analyses des vidéos de TIRF montrent que les vésicules détectées pour l'exocytose de hevin ont un rayon autour de 130 nm (Figure 82B). Ce rayon semble comparable à ce que nous avons obtenu pour la protéine CD63 (~ 150 nm) dans le **chapitre III**. Cependant, compte tenu de la limite de résolution du microscope (~ 200 nm), on ne peut pas exclure que hevin soit présent dans des vésicules de plus petit rayon. Des expériences supplémentaires de colocalisation avec les différents marqueurs vésiculaires permettraient de déterminer la nature exacte des vésicules contenant hevin. La durée des événements mesurée est d'environ 0,3 ns ce qui est plus rapide que celle obtenue pour CD63 qui était d'environ 0,8 ns. Toutefois, cette caractéristique est difficilement comparable car les deux protéines sont de nature très différente et même si elles sont sécrétées par le même type de vésicules (ici MVB), leur dynamique de sécrétion peut être très variable.

Les études précédentes de l'équipe sur la protéine hevin ont montré que la sécrétion de cette dernière était régulée par la concentration calcique au sein des astrocytes.^[347] En parallèle, les travaux du groupe de Pegtel ont mis en évidence que l'histamine était responsable d'une activation de certains récepteurs (H1HR) provoquant une augmentation de la concentration calcique intracellulaire des cellules HeLa.^[316] Par conséquent, nous avons stimulé les cellules HeLa par de l'histamine (100 μ M) et mesuré son effet sur le nombre d'événements d'exocytose détectés par minute (Figure 82D). Les analyses montrent une augmentation par 2 de l'activité de fusion pour les vésicules de sécrétion de hevin après ajout d'histamine. Ce résultat est en accord avec les hypothèses d'une exocytose régulée de la protéine hevin.^[347] Nous avons également contrôlé l'intensité de fluorescence des événements détectés ($\Delta F/F_0$) en condition basale et après stimulation avec l'histamine comme contrôle confirmant

que l'origine de cette augmentation est uniquement liée à la régulation de l'activité cellulaire et donc de l'exocytose de hevin au sein des cellules HeLa (Figure 82E).

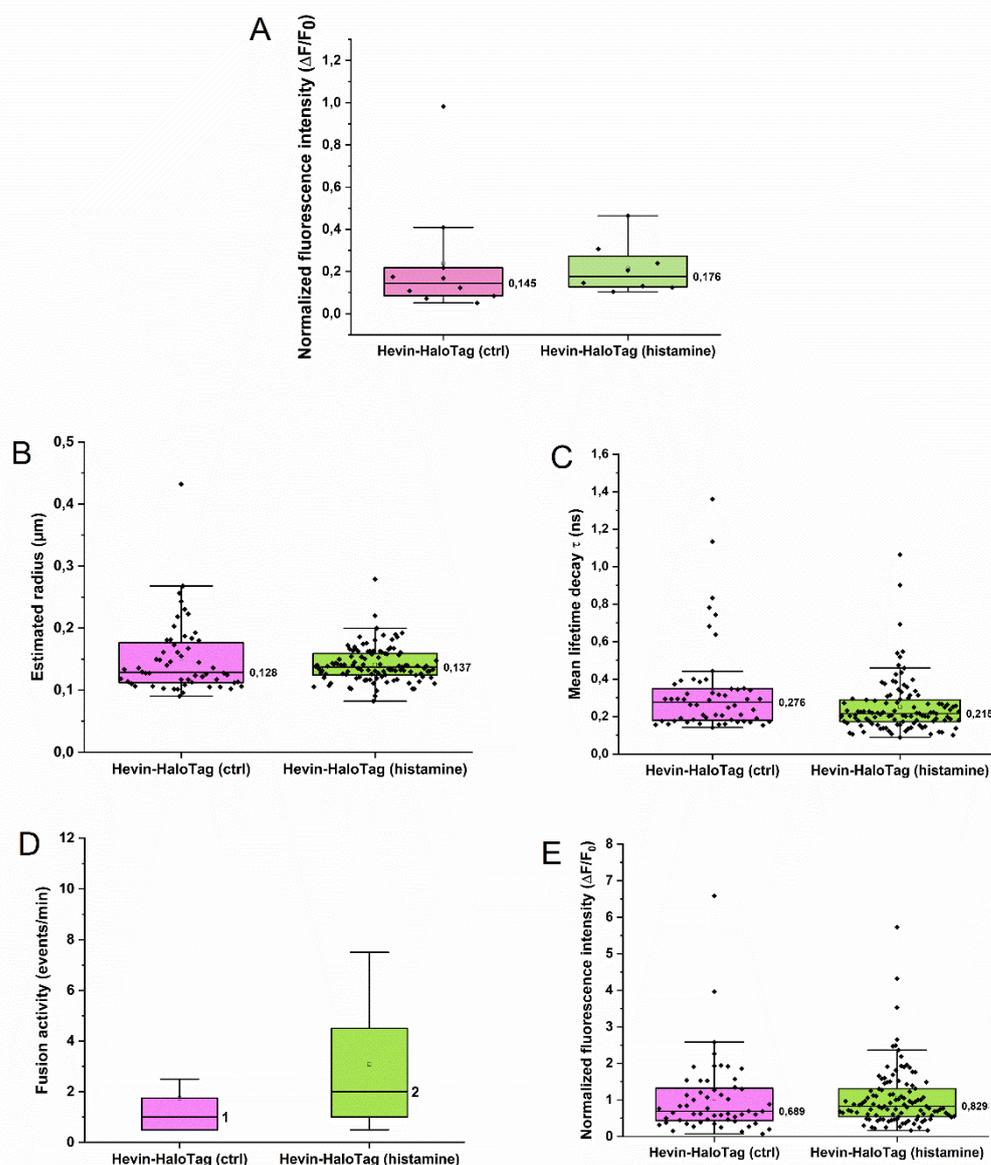


Figure 82. Analyse du processus de sécrétion de hevin dans les cellules HeLa avec la sonde hybride HaloTag/pHluo-Halo-1.

(A) Intensité de fluorescence normalisée des événements détectés dans les cellules HeLa exprimant Hevin-HaloTag et incubées avec $1 \mu\text{M}$ de **pHluo-Halo-1** avant filtrage. (B) Rayon apparent des populations des vésicules marquées avec Hevin-HaloTag + **pHluo-Halo-1** en condition basale (ctrl) et après stimulation par l'histamine ($100 \mu\text{M}$). (C) Durée τ (ns) des événements τ de fusion membranaire détectées dans les cellules HeLa exprimant Hevin-HaloTag + **pHluo-Halo-1** en condition basale (ctrl) et après stimulation par l'histamine ($100 \mu\text{M}$). (D) Comparaison de l'activité de fusion des cellules HeLa stimulées avec de l'histamine ($100 \mu\text{M}$). $n \geq 15$ par condition. (E) Comparaison de l'intensité normalisée ($\Delta F/F_0$) des événements de fusion de Hevin-HaloTag + **pHluo-Halo-1** en condition basale (ctrl) et après stimulation par l'histamine ($100 \mu\text{M}$).

Dans un souci de validation de nos résultats, nous avons également souhaité comparer ces observations avec celles obtenues pour le plasmide **hevin-SEP** dans les mêmes conditions que pour **hevin-HaloTag** avec la sonde **pHluo-Halo-1**. Les événements détectés avec la protéine fluorescente SEP présentent un profil d'intensité similaire à ceux détecté avec la sonde pH hybride (Figure 83).

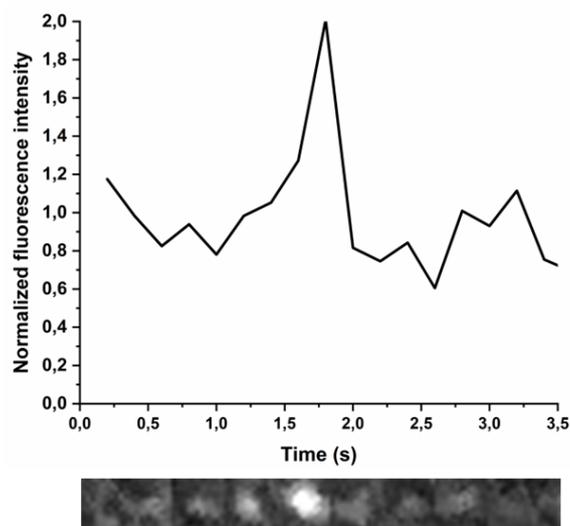


Figure 83. Profil d'intensité d'un événement détecté dans une cellule HeLa exprimant la protéine de fusion hevin-SEP.

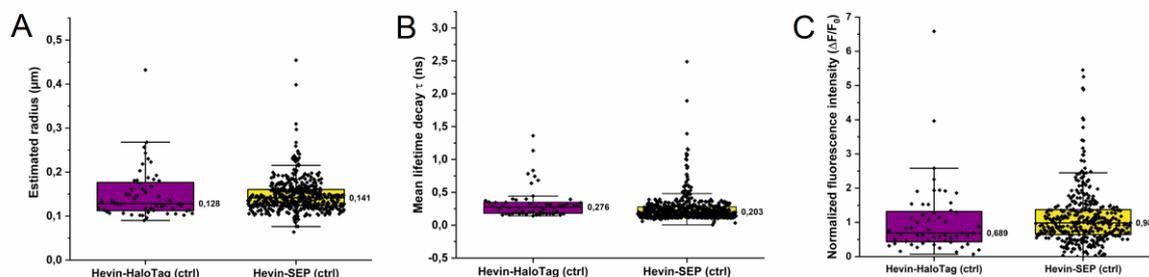


Figure 84. Analyses du processus de sécrétion de hevin dans les cellules HeLa avec la protéine fluorescente SEP.

(A) Comparaison du rayon estimé des vésicules des cellules HeLa exprimant **hevin-HaloTag** (*violet*) et **hevin-SEP** (*jaune*) respectivement en condition basale. (B) Comparaison de la durée des événements d'exocytose dans les cellules HeLa exprimant **hevin-HaloTag** (*violet*) et **hevin-SEP** (*jaune*) respectivement en condition basale (C) Comparaison de l'intensité de fluorescence normalisée des événements des cellules HeLa exprimant **hevin-HaloTag** (*violet*) et **hevin-SEP** (*jaune*) respectivement en condition basale.

Le rayon apparent des vésicules dans les cellules HeLa est de 140 nm environ en milieu basal exprimant la protéine de fusion **hevin-SEP** (Figure 84A). Comme précédemment, cette valeur est tout à fait comparable à celle obtenue pour les protéines **hevin-HaloTag** et **CD63-HaloTag** mais compte-tenu une nouvelle fois de la limite de résolution du microscope, nous ne pouvons pas conclure de façon définitive sur la nature des vésicules impliquées pour hevin. La comparaison de la durée des événements et de l'intensité de fluorescence associées au processus d'exocytose de **hevin-SEP** et **hevin-HaloTag** valident les résultats obtenus avec la sonde pH chimiogénétique hybride **pHluo-Halo-1** (Figure 84B&C).

Par conséquent, cette étude préliminaire du phénomène de sécrétion et de régulation de la protéine hevin dans les cellules HeLa par microscopie TIRF semble confirmer l'hypothèse de la présence de cette protéine dans des vésicules de type MVB.

III. Conclusion et perspectives

Ce chapitre porte sur l'étude de la localisation subcellulaire et du processus de sécrétion de hevin grâce à l'ensemble des outils (hybrides et protéines fluorescentes) disponibles. Nos premiers résultats de colocalisation entre hevin et des marqueurs de vésicules dans la lignée U251 semblent confirmer la présence de la protéine hevin dans des vésicules de sécrétion de type MVB. Les caractéristiques de l'exocytose de hevin dans des conditions identiques à celles utilisées pour CD63 démontrent une taille de vésicules comparables. Cependant, la durée des événements semble plus courte pour la protéine hevin. Une interprétation possible serait que hevin est une protéine soluble qui va pouvoir diffuser plus rapidement dans le milieu extracellulaire alors que la protéine CD63 est une protéine transmembranaire présente dans les exosomes qui vont rester plus longtemps regroupés durant le processus d'exocytose.

L'analyse de la colocalisation repose sur la superposition des puncta de chaque fluorophore. Sachant que deux protéines qui ne colocalisent pas peuvent néanmoins être colocalisées de manière aléatoire, il est essentiel de réaliser des expériences avec des contrôles négatifs, en l'occurrence, avec des protéines qui ne colocalisent pas ou peu comme la GFP cytoplasmique et ssGNb-mCherry. Ces expériences sont en cours. De même, il faudra confirmer ces résultats préliminaires obtenus en répliquant les expériences réalisées sur les cellules U251 et HeLa.

Une autre limite importante est le modèle utilisé. En effet, les lignées de cellules utilisées (U251 et HeLa) sont des modèles assez éloignés des structures dans lesquelles hevin agit physiologiquement (astrocytes et neurones). C'est pourquoi, la prochaine étape sera de réaliser ces mêmes expériences sur des cultures primaires d'astrocytes et de neurones. Et enfin, de valider sur des coupes de cerveau, par immunohistochimie, la colocalisation de hevin avec les protéines endogènes.

Nos résultats préliminaires suggèrent que la sécrétion de la protéine hevin est régulée par l'activité cellulaire en présence d'histamine. Il sera nécessaire de poursuivre ces analyses sur un échantillon plus important de cellules HeLa. De plus, il faudra poursuivre l'identification des molécules extracellulaires déclenchant la sécrétion de hevin également dans les astrocytes. En effet, les astrocytes expriment une multitude de récepteurs et peuvent être activés par des neurotransmetteurs et des cytokines. Il a été démontré que ces facteurs augmentent tous les signaux calciques des

astrocytes dans des tranches et des cultures d'astrocytes, ce qui indique qu'ils pourraient jouer un rôle dans la sécrétion de hevin. Nous rechercherons les molécules extracellulaires déclenchant la sécrétion de hevin en utilisant les mêmes approches que celles présentées ici mais sur cultures astrocytaires primaires.

Finalement, les outils développés au cours de cette thèse devraient nous permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes dynamiques associés à l'activité de hevin mais aussi des bases moléculaires de la **plasticité synaptique**.

 **À retenir:**

- ✓ Colocalisation positive entre **hevin** et **CD63** en cellules U251.
- ✓ Étude de la **sécrétion de hevin** avec la nouvelle sonde **pHluo-Halo-1** sur cellules HeLa.
- ✓ **Régulation** de l'exocytose de hevin par l'histamine sur cellules HeLa.
- ➔ Identification précise du type de vésicules contenant hevin et de sa sécrétion dans des **astrocytes**.

IV. Partie expérimentale

Plasmid construction of Hevin-HaloTag

The HaloTag7 cDNA and the Hevin cDNA were amplified by PCR and cloned into the pAAV_CMV_GFP plasmid (VPK-418, Cell Biolabs) and removing GFP with SalI and EcoRI enzymatic restriction. The oligonucleotides used for HaloTag7 and Hevin amplification and cloning (Eurofins) were designed using NEBuilder Assembly Tool. PCR reactions were performed using RedExtract-N-Amp (Sigma), and PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Assembly reaction was performed using NEBuilder kit (HiFi DNA Assembly®, New England Biolabs). Ligation products were transformed in C2987H cells (New England BioLabs). Plasmid constructs were first selected by restriction mapping and validated by SANGER sequencing (GATC) with appropriate sequencing primers (Eurofins).

CD63-SEP (Addgene ID#130901), ssGNB-mCherry (Addgene ID#128788) and VAMP2-GFP (Addgene ID#42308). Hevin-GFP (this study), Hevin- SEP (this study), Hevin-pHuji (this study) and NPY-GFP (this study) were previously generated in the team.

Cell culture and transfections of U251 cells.

U251 cells (gift from Dr. Marie-Pierre Junier and Dr. Elias El-Habr, Neuroscience Paris-Seine and from the ATCC) were grown in DMEM containing 4 mM L-glutamine, supplemented with 10% fetal bovine serum, and 5% penicillin/streptomycin, at 37 °C in 5% CO₂.

For **confocal microscopy** experiments, U251 cells were plated for 24 h on sterile glass coverslips of 18mm diameter at 100 k cells/well in 12 wells plates in 1,5 mL of DMEM (Corning) supplemented with 10 % fetal calf serum. Cells were washed twice with PBS and then transfected with the desired plasmid using lipofectamine 2000 (ThermoFisher) according to the manufacturer's protocol. Cells were imaged 24 h after transfection.

Immunohistochemistry.

Immunohistochemistry on cells was performed either on 18 mm coverslips. U251 cells were incubated in blocking solution (1X Saponin containing 4% normal goat serum)

for 30 min at 37°C to saturate non-specific sites. Co detections were carried out by incubation in a mixture of primary antibodies recognizing each of the proteins of interest, diluted in a solution of 1X Saponin-1% normal goat serum 2 hrs at 37°C. The cells were washed in 1X PBS then incubated for 1 hr with the secondary antibodies coupled to Alexa-488 and Cy3 fluorophores (Jackson ImmunoResearch). U251 cells transfected with Hevin-HaloTag and Hevin-GFP were incubated with 1 µM of Red-Halo3 for 30 min. Fixation was then followed by 3 washes with PBS 1X. Cells were finally washed in 1X PBS, fixed in 2 % PFA for 5 min, washed and then mounted on slides with Fluoromount G (0100-01, Clinisciences). Stainings were observed and acquired in a Confocal Zeiss LSM 710 inverted.

Cell culture and transfections of HeLa cells.

HeLa (CCL-2) cells (ATCC) were grown in DMEM containing 4 mM L-glutamine, supplemented with 10% fetal bovine serum, and 5% penicillin/streptomycin, at 37 °C in 5% CO₂.

For **TIRF** experiments, HeLa cells were plated onto 18-mm round poly-L-lysine-coated glass cover-slips and transfected ~24–48h later with 1 µg Hevin-HaloTag and Hevin-SEP using a mix of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ThermoFisher) and OptiMEM 1X Reduced Serum Medium (Gibco) following the manufacturer's protocol. Cells were imaged 24 h after transfection.

Western blotting.

Cells were harvested in Lysis Buffer (150 mM sodium chloride, 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Nonidet P-40 in PBS 1X for 30 min on ice. Cell debris was pelleted by centrifuging the lysate at 16 000 g for 20 min at 4°C. Samples were stored at -70°C until processing for Western blot. Protein samples (16 µl) were prepared with NuPage LDS sample buffer (Invitrogen, NP0008) and DTT 1 M 10%. Samples were loaded and separated by Bis-Tris sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (4-12% gels) and transferred onto nitrocellulose membranes (LC2000, ThermoFisher). Transfer efficacy was controlled by Ponceau staining. Unspecific binding sites were blocked with phosphate-buffered saline containing 5% nonfat milk and 0.1% Tween-20, and membranes were immunoprobed with primary antibodies (o/n at 4°C). Membranes were incubated with infrared-labeled secondary antibodies in phosphate buffer containing 5% nonfat milk and scanned using BioRad Imaging System.

Antibodies and reagents.

Primary antibody. Primary antibody for Western blot were goat anti-Hevin (1/1000, AF2836, R&D systems).

Secondary antibody. Secondary antibody for Western-blot were donkey anti-goat 680 nm (IRDye 680DX; 1/2000; LI-COR Biosciences).

Confocal microscopy.

The coverslips were mounted in Fluoromount G for viewing with confocal microscope (LSM 710 inverted) with the objective 63X under oil immersion. 405 nm, 488 nm and 587nm are the wavelength of excitation of the lasers that were used for the experiments. Stack of around 30 images were taken each 0,20 nm.

JaCOP analysis for colocalization

3 independent experiments were performed and 5 images of each condition per experiment were taken. Deconvolution was performed using Volocity and the JaCoP plugin in ImageJ was used to determined Pearson's coefficients for each cell.^[351]

TIRF microscopy.

Twenty-four hours after transfection, HeLa cells were incubated with 1 μ M of pHluo-Halo-1 for 5 min and directly imaged on an inverted microscope (Axio Observer 7, Zeiss) equipped with a TIRF module and a top stage imaging chamber (Tokai Hit STX-CO2) ensuring a constant temperature at 37°C. All imaging experiments were carried out with a 63x 1.4 NA oil objective (Zeiss) with a TIRF angle set for 300-400 nm penetration depth. Images were acquired with Zen Black (SP2.3, Zeiss) onto a PCO.edge sCMOS camera (Excelitas Technologies) at a frame rate of 5 Hz for 1 to 2 minutes. An additional optovar 1.6x was added on the optical path to reach a pixel size of 64 nm. Excitation was carried out using an air-cooled 488 nm at 10% power and a diode pumped solid state 561 nm laser lines. Collection of emission light was done using a BP 495-575 + LP 750 (resp. LBF 488/561) filter for single (resp. dual) color imaging. Fluorescent time series were saved as czi files. Image analysis was performed using Image-J with the plugin Exo-J.

Analysis of TIRF images using the ExoJ plugin in imageJ.

After a few rounds of optimization, we set the detection threshold values `kowavelet` to 2.0 for both fusion events reported by Hevin-SEP and Hevin-HaloTag. We set minimal (resp. maximal) vesicle radius to 2 pixels (resp. 4 pixels) ensuring the detection of the majority of exocytic events. We imposed a minimal signal duration of two frames. We completed the detection of candidate events with additional frames corresponding to 1.6 s before and after the maximal peak fluorescence at `t0` (expanding frames). We limited the temporal window to 0.6 s (resp. 2-3 s) before (resp. after) the maximal peak. The fluorescence profiles were fitted with a minimal number of 5 points and a minimal goodness-of-fit R^2 of 0.75 were set as the fitting threshold. We only selected events that corresponded to a duration between 0.2 and 10 ns.

Conclusion générale et perspectives

Le développement concomitant de techniques d'imagerie avancées et de sondes fluorescentes de plus en plus élaborées permet désormais d'observer des processus biologiques en cellules vivantes avec une grande résolution spatio-temporelle, jusqu'à l'échelle de la molécule. L'effervescence associée à la découverte des protéines fluorescentes et de leur modification génétique a révolutionné notre approche concernant le suivi des protéines en permettant leur couplage avec des protéines cibles. Néanmoins, les protéines fluorescentes ont également montré leurs limites qui sont associées à leur développement complexe et leur faible versatilité. Les systèmes chimiogénétiques hybrides basés sur des sondes fluorogéniques ont alors vu le jour comme alternative attractive pour l'imagerie cellulaire permettant notamment d'obtenir de plus forte brillances et une photostabilité accrue. Au sein de notre équipe, nous avons choisi d'utiliser la protéine de marquage HaloTag car elle permet d'établir des liaisons covalentes de façon rapide avec des fluorogènes qui possèdent un linker chloroalcane chimiquement simple. HaloTag a été initialement optimisée pour les fluorogènes de type rhodamines car cette classe de molécules est reconnue pour avoir des brillances très élevées avec une forte photostabilité et des émissions dans le rouge voire le proche IR. Cependant, la synthèse de ces fluorogènes est longue et fastidieuse. Dans ce contexte, notre équipe a décidé de se tourner vers la famille des RMFs avec des structures de type dipolaires « push-pull » composées d'un groupement donneur d'électrons conjugué à un groupement électroattracteur. Principalement utilisées pour obtenir des sondes de viscosité en raison de leur fluorescence activée lorsque leur conformation est plane/bloquée, ces petites molécules présentent l'avantage d'être facilement synthétisables et offrent un large choix de stratégies de diversification de leur propriétés photophysiques et biochimiques. La liaison de ces RMFs à la protéine de marquage HaloTag a démontré son efficacité pour l'obtention de sondes fluorogéniques hybrides avec de très bons contrastes en imagerie cellulaire même sans étape de lavage. Notre équipe a développé une première série de sondes fluorogéniques combinant la protéine HaloTag et des RMFs permettant le marquage de protéines cibles en cellules vivantes avec une grande spécificité.

Dans ce contexte, les **objectifs** de cette thèse étaient:

- ➔ La conception de nouveaux senseurs fluorogéniques hybrides pour la visualisation de protéines en cellules vivantes.
- ➔ Le développement d'une sonde pH chimiogénétique hybride pour le suivi et l'étude de l'exocytose de protéines d'intérêts.
- ➔ La caractérisation à l'échelle subcellulaire de la protéine matricellulaire hevin impliquée dans les mécanismes de plasticité synaptique.

Les **chapitres II** et **III** décrivent l'ingénierie de nouveaux rotors moléculaires fluorescents pour le développement de nouvelles sondes fluorogéniques hybrides.

Le **chapitre II** illustre les travaux concernant l'optimisation de ces sondes fluorogéniques hybrides par l'ingénierie concertée de la protéine HaloTag et de rotors moléculaires. Cette stratégie nous a permis d'obtenir par synthèse divergente une nouvelle série de rotors moléculaires présentant des propriétés photophysiques très modulables et des brillances dans la protéine HaloTag globalement améliorées par rapport à la première série. En parallèle, différents exemples récents de la littérature ont mis en évidence la possibilité d'optimisation de la brillance et de la photostabilité des sondes hybrides via l'ingénierie des protéines de marquage. Ainsi, par le biais de la mutagenèse dirigée, nous avons produit un mutant de HaloTag, mHT, qui a permis une amélioration supplémentaire de la brillance du rotor **Red-Halo3** de 64 %. Cependant, ce mutant n'améliore pas la brillance de nos autres RMFs. Dans le but de développer un mutant universel capable d'accroître la brillance de l'ensemble de nos RMFs, nous avons également exploré la possibilité d'associer nos RMFs à des protéines HaloTag permutées circulairement (cpHT). La protéine **cpHT4** développée par l'équipe de Gautier a permis d'améliorer significativement la fluorescence de plusieurs RMFs dont **Red-Halo3** (67 %). Toutefois, cette approche s'est révélée être dépendante de la structure moléculaire et il semble donc complexe de bénéficier d'une augmentation globale de la fluorescence de l'ensemble des RMFs. Une perspective serait de mettre à profit l'expansion actuelle des techniques de modélisation dynamique et d'intelligence artificielle pour générer de nouveaux variants de HaloTag spécifiquement optimisés pour le blocage conformationnel des RMFs de notre équipe.

Le **chapitre III** repose sur l'extension de ce design de sondes fluorogéniques à la formation de **sondes pH** permettant de suivre le processus d'exocytose de protéines

en temps réel et sans étape de lavage. Au sein de notre équipe, une sonde calcique **Ca-DIP** basée sur la combinaison d'un RMF décoré du chélateur BAPTA et de la protéine HaloTag a été précédemment développée. Ce senseur calcique hybride repose sur une double condition d'activation de fluorescence -dual-input- correspondante au blocage conformationnel du rotor par la protéine HaloTag et à la chélation d'ions Ca^{2+} . Ce design a alors pour avantage de combiner le bon contraste obtenu par les fluorogènes de type RMF avec la sensibilité des senseurs par ajout d'un groupe BAPTA. En s'appuyant sur ce même principe, nous avons développé la sonde **pHluo-Halo-1**. La sonde **pHluo-Halo-1** possède une structure similaire au chromophore de la GFP et bénéficie d'une double condition d'activation « dual-input » de sa fluorescence à la fois par sa liaison avec la protéine HaloTag et par sa déprotonation à pH physiologique. De ce fait, cette sonde pH chimiogénétique hybride n'est fluorescente qu'en présence de HaloTag et à pH neutre, exposant ainsi un signal non spécifique négligeable même sans étape de lavage. Il s'agit de la première sonde pH « dual-input » permettant de visualiser le phénomène d'exocytose comme cela a été montré avec l'exemple de la protéine transmembranaire CD63 sécrétée par des MVB en cellules HeLa. Ces deux exemples de sondes chimiogénétiques hybrides pour sonder respectivement le pH et le calcium en cellules vivantes pourraient bénéficier également du développement d'un mutant permettant d'améliorer leur brillance mais ils montrent que la stratégie est prometteuse et pourrait donc être généralisée au développement de divers senseurs hybrides (Zn^{2+} , ROS, etc.) afin de répondre à la variété des questions biologiques concernant les processus dynamiques cellulaires..

Le **chapitre IV** présente une application concrète de ce travail d'ingénierie de nouvelles sondes pour l'étude et la caractérisation de la protéine **hevin**. Les travaux récents de l'équipe de Vincent Vialou sur cette protéine montrent qu'elle joue un rôle dans la plasticité neuronale liée aux effets des drogues d'abus et suggèrent que sa sécrétion pourrait être régulée par l'activité neuronale et astrocytaire. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé nos sondes hybrides sur la protéine hevin fusionnée avec HaloTag dans un modèle cellulaire. Par des études de colocalisation entre hevin et CD63 en microscopie confocale, nous avons montré que la sécrétion de hevin se fait potentiellement par les MVB. L'analyse de l'exocytose de hevin-HaloTag avec **pHluoHalo-1** en microscopie TIRF nous a ensuite permis d'observer des événements d'exocytose ayant les mêmes caractéristiques structurales que celles mesurées avec CD63 (rayon des vésicules). Cependant, la limite de résolution du microscope ne nous

permet pas d'exclure que la protéine hevin soit sécrétée par d'autres types de vésicules. Par ailleurs, l'augmentation des événements d'exocytose après addition d'histamine suggère une régulation de la sécrétion de hevin par le calcium. Il s'agit ici de résultats préliminaires sur des modèles cellulaires (U251 et HeLa) qui nécessitent d'être répliqués. De plus, pour se rapprocher de la réalité physiologique dans le cerveau, il sera crucial de passer à un modèle de culture primaire d'astrocytes. Les résultats prometteurs obtenus sur hevin à l'aide des outils chimiogénétiques hybrides permettent d'envisager des expériences avec de nouvelles sondes hybrides pour comprendre le trafic intracellulaire de hevin, caractériser son site d'action et son endocytose dans les cellules cibles.

Références

- [1] S. A. Liddel, B. A. Barres, *Immunity* **2017**, *46*, 957–967.
- [2] M. S. Helm, T. M. Dankovich, S. Mandad, B. Rammner, S. Jähne, V. Salimi, C. Koerbs, R. Leibbrandt, H. Urlaub, T. Schikorski, S. O. Rizzoli, *Nature Neuroscience* **2021**, *24*, 1151-1162.
- [3] O. Lawal, F. P. Ulloa Severino, C. Eroglu, *Glia* **2022**, *70*, 1467–1483.
- [4] D. Choquet, M. Sainlos, J.-B. Sibarita, *Nat. Rev. Neurosci.* **2021**, *22*, 237–255.
- [5] A. Ettinger, T. Wittmann, *Methods in Cell Biology* **2014**, *123*, 77-94.
- [6] A. Jabłoński, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [7] D. Sribu, PhD thesis, *Université d'Orléans* **2016**, p. 21.
- [8] Y. Wu, H. Shroff, *Histochem. Cell Biol.* **2022**, *158*, 301–323.
- [9] D. J. Webb, C. M. Brown, in *Methods Mol. Biol.*, **2012**, p. 29–59.
- [10] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M. D. Bootman, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, p. 1042-1065.
- [11] D. Shotton, N. White, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 435–439.
- [12] A. Nwaneshiudu, C. Kuschal, F. H. Sakamoto, R. Rox Anderson, K. Schwarzenberger, R. C. Young, *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132*, 1–5.
- [13] J. Jonkman, C. M. Brown, G. D. Wright, K. I. Anderson, A. J. North, *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 1585–1611.
- [14] K. N. Fish, *Curr. Protoc.* **2022**, *2*, 73–85.
- [15] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780.
- [16] A. F. L. Schneider, C. P. R. Hackenberger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *48*, 61–68.
- [17] C. P. Toseland, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 85–95.
- [18] D. Choquet, *Neuron* **2014**, *84*, 1116–1119.
- [19] K. M. Dean, A. E. Palmer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 512–523.
- [20] M. J. Saxton, K. Jacobson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 373–399.

- [21] M. P. Bruchez, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 775–780.
- [22] G. Balasubramanian, A. Lazarev, S. R. Arumugam, D. wen Duan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 69–77.
- [23] T. Schlichthaerle, M. T. Strauss, F. Schueder, J. B. Woehrstein, R. Jungmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *39*, 41–47.
- [24] J. K. Jaiswal, E. R. Goldman, H. Mattoussi, S. M. Simon, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 73–78.
- [25] S. H. Lee, C. Jin, E. Cai, P. Ge, Y. Ishitsuka, K. W. Teng, A. A. De Thomaz, D. Nall, M. Baday, O. Jeyifous, D. Demonte, C. M. Dundas, S. Park, J. Y. Delgado, W. N. Green, P. R. Selvin, *Elife* **2017**, *6*, 1–26.
- [26] A. G. Godin, J. A. Varela, Z. Gao, N. Danné, J. P. Dupuis, B. Lounis, L. Groc, L. Cognet, *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 238–243.
- [27] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science (80-.)*. **2006**, *312*, 217–224.
- [28] J. B. Grimm, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 149–158.
- [29] L. D. Lavis, *Biochemistry* **2017**, *56*, 5165–5170.
- [30] L. M. Wysocki, L. D. Lavis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 752–759.
- [31] J. Bucevičius, R. Gerasimaitė, K. A. Kiszka, S. Pradhan, G. Kostiuk, T. Koenen, G. Lukinavičius, *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1–14.
- [32] H. M. Fahmy, N. A. Negm, A. H. M. Elwahy, M. T. H. Abou Kana, *J. Mol. Liq.* **2017**, *229*, 31–44.
- [33] X. Yan, X. Chen, Z. Shan, L. Bi, *ACS Omega* **2024**, *9*, 2585–2596.
- [34] X. Y. Sun, T. Liu, J. Sun, X. J. Wang, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 10826–10847.
- [35] T. Kowada, H. Maeda, K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953–4972.
- [36] D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7105–7123.
- [37] D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1103–1163.

- [38] E. A. Rodriguez, R. E. Campbell, J. Y. Lin, M. Z. Lin, A. Miyawaki, A. E. Palmer, X. Shu, J. Zhang, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 111–129.
- [39] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
- [40] R. Rizzuto, M. Brini, P. Pizzo, M. Murgia, T. Pozzan, *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 635–642.
- [41] K. A. Lukyanov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *633*, 29–32.
- [42] F. S. Wouters, P. J. Verveer, P. I. H. Bastiaens, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 203–211.
- [43] A. Miyawaki, Y. Niino, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 632–643.
- [44] D. Saimi, Z. Chen, *Smart Mol.* **2023**, *1*, e20230002.
- [45] B. Albert Griffin, S. R. Adams, J. Jones, R. Y. Tsien, *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 565–578.
- [46] J. Lotze, U. Reinhardt, O. Seitz, A. G. Beck-Sickinger, *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 1731–1745.
- [47] C. A. Hoelzel, X. Zhang, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1935–1946.
- [48] M. A. Plamont, E. Billon-Denis, S. Maurin, C. Gauron, F. M. Pimenta, C. G. Specht, J. Shi, J. Quérard, B. Pan, J. Rossignol, N. Morellet, M. Volovitch, E. Lescop, Y. Chen, A. Triller, S. Vriza, T. Le Saux, L. Jullien, A. Gautier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 497–502.
- [49] A. Juillerat, C. Heinis, I. Sietlaff, J. Barnikow, H. Jaccard, B. Kunz, A. Terskikh, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1263–1269.
- [50] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
- [51] K. A. Saal, F. Richter, P. Rehling, S. O. Rizzoli, *ACS Nano* **2018**, *12*, 12247–12254.
- [52] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498–500.

- [53] Y. Zheng, P. S. Addy, R. Mukherjee, A. Chatterjee, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7211–7217.
- [54] A. Chatterjee, J. Guo, H. S. Lee, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12540–12543.
- [55] K. J. Lee, D. Kang, H. S. Park, *Mol. Cells* **2019**, *42*, 386–396.
- [56] J. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738–8739.
- [57] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239.
- [58] R. K. Niedenthal, L. Riles, M. Johnston, J. H. Hegemann, *Yeast* **1996**, *12*, 773–786.
- [59] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1246–1251.
- [60] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [61] S. J. Remington, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1509–1519.
- [62] R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **1995**, *373*, 663–664.
- [63] R. A. G. Cinelli, A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, F. Beltram, *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 771.
- [64] R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 12501–12504.
- [65] R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 178–182.
- [66] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 969–973.
- [67] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572.
- [68] M. Zimmer, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2823.
- [69] E. Herzog, F. Nadrigny, K. Silm, C. Biesemann, I. Helling, T. Bersot, H. Steffens, R. Schwartzmann, U. Valentin Nägerl, S. El Mestikawy, J. S. Rhee, F. Kirchhoff, N. Brose, *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 15544–15559.
- [70] H. Kim, J. Ju, H. N. Lee, H. Chun, J. Seong, *Sensors (Switzerland)* **2021**, *21*, 1–

- 18.
- [71] W. B. Frommer, M. W. Davidson, R. E. Campbell, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2833–2841.
- [72] M. Wang, Y. Da, Y. Tian, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 1189–1214.
- [73] Y. Nasu, Y. Shen, L. Kramer, R. E. Campbell, *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 509–518.
- [74] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. Michael McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, *Nature* **1997**, *388*, 882–887.
- [75] V. A. Romoser, P. M. Hinkle, A. Persechini, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13270–13274.
- [76] G. Miesenböck, D. A. De Angelis, J. E. Rothman, *Nature* **1998**, *394*, 192–195.
- [77] G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11241–11246.
- [78] F. Broch, A. Gautier, *Chempluschem* **2020**, *85*, 1487–1497.
- [79] R. L. Strack, D. E. Strongin, D. Bhattacharyya, W. Tao, A. Berman, H. E. Broxmeyer, R. J. Keenan, B. S. Glick, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 955–957.
- [80] A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- [81] T. Péresse, A. Gautier, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6142.
- [82] C. Deo, A. S. Abdelfattah, H. K. Bhargava, A. J. Berro, N. Falco, H. Farrants, B. Moeyaert, M. Chupanova, L. D. Lavis, E. R. Schreiter, *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 718–723.
- [83] R. N. Day, M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2887–2921.
- [84] E. C. Greenwald, S. Mehta, J. Zhang, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11707–11794.
- [85] J. L. Kolanowski, F. Liu, E. J. New, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 195–208.
- [86] D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7105–7123.

- [87] N. Trinh, K. A. Jolliffe, E. J. New, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59*, 20290–20301.
- [88] D. I. Danylchuk, P. H. Jouard, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 912–924.
- [89] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- [90] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136.
- [91] Y. Hori, K. Nakaki, M. Sato, S. Mizukami, K. Kikuchi, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 5611–5614.
- [92] S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017.
- [93] L. W. Miller, Y. Cai, M. P. Sheetz, V. W. Cornish, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 255–257.
- [94] C. Szent-Gyorgyi, B. A. Schmidt, Y. Creeger, G. W. Fisher, K. L. Zakel, S. Adler, J. A. J. Fitzpatrick, C. A. Woolford, Q. Yan, K. V. Vasilev, P. B. Berget, M. P. Bruchez, J. W. Jarvik, A. Waggoner, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 235–240.
- [95] M. L. Zastrow, Z. Huang, S. J. Lippard, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 396–406.
- [96] R. Liu, T. Kowada, Y. Du, Y. Amagai, T. Matsui, K. Inaba, S. Mizukami, *ACS Sensors* **2022**, *7*, 748–757.
- [97] E. Tomat, E. M. Nolan, J. Jaworski, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15776–15777.
- [98] L. Daliang, L. Lin, L. Wen-Hong, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1054–1063.
- [99] M. Bannwarth, I. R. Corrêa, M. Sztretye, S. Pouvreau, C. Fellay, A. Aebischer, L. Royer, E. Ríos, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 179–190.
- [100] M. Kamiya, K. Johnsson, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6472–6479.
- [101] M. Best, I. Porth, S. Hauke, F. Braun, D. P. Herten, R. Wombacher, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5606–5611.

- [102] T. Hirata, T. Terai, H. Yamamura, M. Shimonishi, T. Komatsu, K. Hanaoka, T. Ueno, Y. Imaizumi, T. Nagano, Y. Urano, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 2693–2700.
- [103] D. Asanuma, Y. Takaoka, S. Namiki, K. Takikawa, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano, K. Hirose, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 6085–6089.
- [104] M. Martineau, A. Somasundaram, J. B. Grimm, T. D. Gruber, D. Choquet, J. W. Taraska, L. D. Lavis, D. Perrais, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1412.
- [105] C. Wang, X. Song, Z. Han, X. Li, Y. Xu, Y. Xiao, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2033–2040.
- [106] J. Wang, Y. Zhao, C. Wang, Q. Zhu, Z. Du, A. Hu, Y. Yang, *PLoS One* **2015**, *10*, 1–11.
- [107] M. Kubánková, J. E. Chambers, R. G. Huber, P. J. Bond, S. J. Marciniak, M. K. Kuimova, *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7*, 044004.
- [108] K. Strakova, J. Lopez-Andarias, N. Jimenez-Rojo, J. E. Chambers, S. J. Marciniak, H. Riezman, N. Sakai, S. Matile, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1376–1385.
- [109] P. E. Deal, P. Liu, S. H. Al-Abdullatif, V. R. Muller, K. Shamardani, H. Adesnik, E. W. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 614–622.
- [110] A. G. Tebo, F. M. Pimenta, M. Zoumpoulaki, C. Kikuti, H. Sirkia, M. A. Plamont, A. Houdusse, A. Gautier, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2392–2397.
- [111] F. Broch, L. El Hajji, N. Pietrancosta, A. Gautier, *ACS Sensors* **2023**, *8*, 3933–3942.
- [112] Y. Zhang, L. L. Looger, *J. Physiol.* **2024**, *602*, 1595–1604.
- [113] A. Cook, F. Walterspiel, C. Deo, *ChemBioChem* **2023**, *24*, e202300022.
- [114] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–72.
- [115] L. He, B. Dong, Y. Liu, W. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6449–6461.
- [116] W. Sun, S. Guo, C. Hu, J. Fan, X. Peng, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768–7817.
- [117] L. Wu, C. Huang, B. P. Emery, A. C. Sedgwick, S. D. Bull, X. P. He, H. Tian, J. Yoon, J. L. Sessler, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 5110–5139.
- [118] O. A. Bozdemir, R. Guliyev, O. Buyukcakir, S. Selcuk, S. Kolemen, G. Gulseren,

- T. Nalbantoglu, H. Boyaci, E. U. Akkaya, **2010**, 8029–8036.
- [119] W. C. Silvers, B. Prasai, D. H. Burk, M. L. Brown, R. L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 309–314.
- [120] B. Daly, J. Ling, A. P. de Silva, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203–4211.
- [121] D. Aigner, S. A. Freunberger, M. Wilkening, R. Saf, S. M. Borisov, I. Klimant, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9293–9300.
- [122] W. Chi, J. Chen, W. Liu, C. Wang, Q. Qi, Q. Qiao, T. M. Tan, K. Xiong, X. Liu, K. Kang, Y. T. Chang, Z. Xu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 6777–6785.
- [123] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 600–608.
- [124] Y. Shiraishi, C. Ichimura, S. Sumiya, T. Hirai, *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 8324–8332.
- [125] G. Zhang, H. Li, S. Bi, L. Song, Y. Lu, L. Zhang, J. Yu, L. Wang, *Analyst* **2013**, *138*, 6163.
- [126] A. P. de Silva, N. D. McClenaghan, *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8*, 4935–4945.
- [127] K. Gu, Y. Xu, H. Li, Z. Guo, S. Zhu, S. Zhu, P. Shi, T. D. James, H. Tian, W. H. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5334–5340.
- [128] O. Tour, S. R. Adams, R. A. Kerr, R. M. Meijer, T. J. Sejnowski, R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 423–431.
- [129] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. a Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063–76.
- [130] T. Fujii, Y. Shindo, K. Hotta, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, K. Oka, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2374–2381.
- [131] L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 825–843.
- [132] Q. Zheng, A. X. Ayala, I. Chung, A. V. Weigel, A. Ranjan, N. Falco, J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, C. Wu, J. Lippincott-Schwartz, R. H. Singer, L. D. Lavis, *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1602–1613.
- [133] L. Wang, M. Tran, E. D’Este, J. Roberti, B. Koch, L. Xue, K. Johnsson, *Nat. Chem.*

- 2020**, *12*, 165–172.
- [134] J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, L. Xie, H. Choi, B. Mohar, N. Falco, K. Schaefer, R. Patel, Q. Zheng, Z. Liu, J. Lippincott-Schwartz, T. A. Brown, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2020**, *17*, 815–821.
- [135] J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, R. Patel, S. T. Hennigan, A. Gutu, P. Dong, V. Gandin, A. M. Osowski, K. L. Holland, Z. J. Liu, T. A. Brown, L. D. Lavis, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 23000–23013.
- [136] G. Lukinavičius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Z. G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139.
- [137] G. Lukinavičius, L. Reymond, K. Umezawa, O. Sallin, E. D’Este, F. Göttfert, H. Ta, S. W. Hell, Y. Urano, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9365–9368.
- [138] J. Zhang, H. Shi, C. Huang, L. Mei, Q. Guo, K. Cheng, P. Wu, D. Su, Q. Chen, S. Gan, C. K. Wing Chan, J. Shi, J. L. Chen, C. H. Jonathan Choi, S. Q. Yao, X. Chen, B. Z. Tang, J. He, H. Sun, *ACS Nano* **2023**, *17*, 3632–3644.
- [139] N. Lardon, L. Wang, A. Tschanz, P. Hoess, M. Tran, E. D’Este, J. Ries, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 14592–14600.
- [140] L. P. Encell, R. F. Ohana, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, M. G. Wood, G. V Los, M. G. Mcdougall, C. Zimprich, N. Karassina, R. D. Learish, R. Hurst, J. Hartnett, S. Wheeler, P. Stecha, J. English, K. Zhao, J. Mendez, H. A. Benink, N. Murphy, D. L. Daniels, M. R. Slater, M. Urh, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *Curr. Chem. Genomics* **2012**, *6*, 55–71.
- [141] C. Deo, S. H. Sheu, J. Seo, D. E. Clapham, L. D. Lavis, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13734–13738.
- [142] R. Y. Tsien, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2396–2404.
- [143] N. Mertes, M. Busch, M. C. Huppertz, C. N. Hacker, J. Wilhelm, C. M. Gürth, S. Kühn, J. Hiblot, B. Koch, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 6928–6935.
- [144] M. Collot, C. Loukou, A. V. Yakovlev, C. D. Wilms, D. Li, A. Evrard, A. Zamaleeva, L. Bourdieu, J.-F. F. Léger, N. Ropert, J. Eilers, M. Oheim, A. Feltz, J.-M. Mallet,

- J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14923–14931.
- [145] S. Emmert, G. Quargnali, S. Thallmair, P. Rivera-Fuentes, *Nat. Chem.* **2023**, *15*, 1415–1421.
- [146] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669–1678.
- [147] A. S. Klymchenko, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366–375.
- [148] S. C. Lee, J. Heo, H. C. Woo, J. A. Lee, Y. H. Seo, C. L. Lee, S. Kim, O. P. Kwon, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 13706–13718.
- [149] D. Zhang, Z. Chen, Z. Du, B. Bao, N. Su, X. Chen, Y. Ge, Q. Lin, L. Yang, Y. Hua, S. Wang, X. Hua, F. Zuo, N. Li, R. Liu, L. Jiang, C. Bao, Y. Zhao, J. Loscalzo, Y. Yang, L. Zhu, *Cell Discov.* **2023**, *9*, 56.
- [150] S. P. J. T. Bachollet, Y. Shpinov, F. Broch, H. Benaissa, A. Gautier, N. Pietrancosta, J.-M. Mallet, B. Dumat, *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 3619–3628.
- [151] W. T. Yu, T. W. Wu, C. L. Huang, I. C. Chen, K. T. Tan, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 301–307.
- [152] K. H. Jung, M. Fares, L. S. Grainger, C. H. Wolstenholme, A. Hou, Y. Liu, X. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1906–1915.
- [153] S. A. Clark, V. Singh, D. Vega Mendoza, W. Margolin, E. T. Kool, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2839–2843.
- [154] S. P. J. T. Bachollet, C. Addi, N. Pietrancosta, J. M. Mallet, B. Dumat, *Chem. - A Eur. J.* **2020**, *26*, 14467–14473.
- [155] H. Benaissa, K. Ounoughi, I. Aujard, E. Fischer, R. Goïame, J. Nguyen, A. G. Tebo, C. Li, T. Le Saux, G. Bertolin, M. Tramier, L. Danglot, N. Pietrancosta, X. Morin, L. Jullien, A. Gautier, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6989.
- [156] W. Song, R. L. Strack, N. Svensen, S. R. Jaffrey, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1198–1201.
- [157] J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642–646.
- [158] C. A. Telmer, R. Verma, H. Teng, S. Andreko, L. Law, M. P. Bruchez, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1239–1246.

- [159] A. Grover, B. F. Schmidt, R. D. Salter, S. C. Watkins, A. S. Waggoner, M. P. Bruchez, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 4838–4842.
- [160] L. A. Perkins, Q. Yan, B. F. Schmidt, D. Kolodieznyi, S. Saurabh, M. B. Larsen, S. C. Watkins, L. Kremer, M. P. Bruchez, *Biochemistry* **2018**, *57*, 861–871.
- [161] S. P. J. T. Bachollet, N. Pietrancosta, J. Mallet, B. Dumat, *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 6594–6597.
- [162] C. Miró-Vinyals, A. Stein, S. Fischer, T. R. Ward, A. Deliz Liang, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 3398–3401.
- [163] J. C. Klima, L. A. Doyle, J. D. Lee, M. Rappleye, L. A. Gagnon, M. Y. Lee, E. P. Barros, A. A. Vorobieva, J. Dou, S. Bremner, J. S. Quon, C. M. Chow, L. Carter, D. L. Mack, R. E. Amaro, J. C. Vaughan, A. Berndt, B. L. Stoddard, D. Baker, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 856.
- [164] L. A. Perkins, M. P. Bruchez, *Traffic* **2020**, *21*, 333–348.
- [165] W. Song, G. S. Filonov, H. Kim, M. Hirsch, X. Li, J. D. Moon, S. R. Jaffrey, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1187–1194.
- [166] P. S. Huang, S. E. Boyken, D. Baker, *Nature* **2016**, *537*, 320–327.
- [167] N. Xu, Q. Qiao, Y. Tao, P. Bao, Y. Zhang, W. Zhou, J. Li, Z. Li, Z. Xu, *Sensors Actuators B Chem.* **2024**, *398*, 134744.
- [168] S. Leng, Q. Qiao, L. Miao, W. Deng, J. Cui, Z. Xu, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6448–6451.
- [169] W. Zhu, S. Takeuchi, S. Imai, T. Terada, T. Ueda, Y. Nasu, T. Terai, R. E. Campbell, *Nat. Chem. Biol.* **2023**, *19*, 38–44.
- [170] M. K. Kuimova, G. Yahioğlu, J. A. Levitt, K. Suhling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6672–6673.
- [171] I. A. Karpenko, Y. Niko, V. P. Yakubovskiy, A. O. Gerasov, D. Bonnet, Y. P. Kovtun, A. S. Klymchenko, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 3002–3009.
- [172] A. Vyšniauskas, M. Balaz, H. L. Anderson, M. K. Kuimova, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 7548–7554.
- [173] M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L.

- Anderson, K. Suhling, P. R. Ogilby, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 69–73.
- [174] D. Su, C. L. Teoh, L. Wang, X. Liu, Y. T. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4833–4844.
- [175] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2707–2718.
- [176] M. K. Kuimova, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12671–12686.
- [177] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563–4601.
- [178] M. A. Haidekker, M. Nipper, A. Mustafic, D. Lichlyter, M. Dakanali, E. A. Theodorakis, *Dyes with Segmental Mobility: Molecular Rotors*, in *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I* (Springer) **2010**. Online ISBN 978-3-642-04702-2.
- [179] W. Rettig, R. Lapouyade, *Top. Fluoresc. Spectrosc.* **2006**, *4*, 109–149.
- [180] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899–4031.
- [181] S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G. I. Konishi, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2731–2743.
- [182] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *J. Biol. Eng.* **2010**, *4*, 11.
- [183] S. Toliautas, J. Dodonova, A. Žvirblis, I. Čiplys, A. Polita, A. Devižis, S. Tumkevičius, J. Šulskus, A. Vyšniauskas, *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 10342–10349.
- [184] Y. Liu, C. H. Wolstenholme, G. C. Carter, H. Liu, H. Hu, L. S. Grainger, K. Miao, M. Fares, C. A. Hoelzel, H. P. Yennawar, G. Ning, M. Du, L. Bai, X. Li, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7381–7384.
- [185] R. O. Loutfy, B. A. Arnold, **1982**, *1627*, 4205–4211.
- [186] S. Howell, M. Dakanali, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker, *J. Fluoresc.* **2012**, *22*, 457–465.
- [187] S. C. Lee, J. Heo, H. C. Woo, J. A. Lee, Y. H. Seo, C. L. Lee, S. Kim, O. P. Kwon, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 13706–13718.
- [188] S. Ye, H. Zhang, J. Fei, C. H. Wolstenholme, X. Zhang, *Angew. Chemie - Int. Ed.*

- 2021**, *60*, 1339–1346.
- [189] C. E. Kung, J. K. Reed, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6678–6686.
- [190] W. L. Goh, M. Y. Lee, T. L. Joseph, S. T. Quah, C. J. Brown, C. Verma, S. Brenner, F. J. Ghadessy, Y. N. Teo, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6159–6162.
- [191] K. Suhling, J. A. Levitt, P. H. Chung, M. K. Kuimova, G. Yahioglu, *J. Vis. Exp.* **2012**, 7–11.
- [192] K. Maleckaitė, J. Dodonova, S. Toliautas, R. Žilėnaitė, D. Jurgutis, V. Karabanovas, S. Tumkevičius, A. Vyšniauskas, *Chem. - A Eur. J.* **2021**, *27*, 16768–16775.
- [193] M. You, S. R. Jaffrey, *Annu. Rev. Biophys.* **2015**, *44*, 187–206.
- [194] M. Sebastiao, N. Quittot, S. Bourgault, *Anal. Biochem.* **2017**, *532*, 83–86.
- [195] J. Shao, S. Ji, X. Li, J. Zhao, F. Zhou, H. Guo, *European J. Org. Chem.* **2011**, 6100–6109.
- [196] L. S. Kocsis, K. M. Elbel, B. A. Hardigree, K. M. Brummond, M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2965–2973.
- [197] T. Mukherjee, R. J. Martinez-Sanchez, K. T. Fam, S. Bou, L. Richert, D. Garnier, Y. Mély, S. Kanvah, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 2459–2469.
- [198] W. L. Goh, M. Y. Lee, T. L. Joseph, S. T. Quah, C. J. Brown, C. Verma, S. Brenner, F. J. Ghadessy, Y. N. Teo, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6159–6162.
- [199] W. T. Yu, T. W. Wu, C. L. Huang, I. C. Chen, K. T. Tan, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 301–307.
- [200] A. S. Klymchenko, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366–375.
- [201] W. T. Yu, T. W. Wu, C. L. Huang, I. C. Chen, K. T. Tan, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 301–307.
- [202] M. Fares, Y. Li, Y. Liu, K. Miao, Z. Gao, Y. Zhai, X. Zhang, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 215–224.
- [203] K. H. Jung, M. Fares, L. S. Grainger, C. H. Wolstenholme, A. Hou, Y. Liu, X.

- Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1906–1915.
- [204] A. Gautier, A. G. Tebo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *57*, 58–64.
- [205] C. Li, M. A. Plamont, H. L. Sladitschek, V. Rodrigues, I. Aujard, P. Neveu, T. Le Saux, L. Jullien, A. Gautier, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5598–5605.
- [206] C. Chen, S. R. Tachibana, N. S. Baleeva, I. N. Myasnyanko, A. M. Bogdanov, A. S. Gavrikov, A. S. Mishin, K. K. Malyshevskaya, M. S. Baranov, C. Fang, *Chem. - A Eur. J.* **2021**, *27*, 8946–8950.
- [207] K. A. Zachariasse, M. Grobys, T. Von Der Haar, A. Hebecker, Y. V. Il'ichev, Y. B. Jiang, O. Morawski, W. Kühnle, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1996**, *102*, 59–70.
- [208] C. Li, M. A. Plamont, I. Aujard, T. Le Saux, L. Jullien, A. Gautier, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9253–9261.
- [209] M.-G. Kang, H. Lee, B. H. Kim, Y. Dunbayev, J. K. Seo, C. Lee, H.-W. Rhee, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9226–9229.
- [210] R. Chen, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 13–14.
- [211] M. S. Frei, M. Tarnawski, M. J. Roberti, B. Koch, J. Hiblot, K. Johnsson, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 65–70.
- [212] X. Sun, A. Zhang, B. Baker, L. Sun, A. Howard, J. Buswell, D. Maurel, A. Masharina, K. Johnsson, C. J. Noren, M. Q. Xu, I. R. Corrêa, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2217–2226.
- [213] P. Dvorak, PhD thesis, **2014**, Masaryk Univeristy, p. 4.
- [214] J. Bachman, *Methods in Enzymology* **2013**, *529*, 241–248.
- [215] J. Nøhr, K. Kristiansen, *Methods Mol. Biol.* **2003**, *232*, 127–131.
- [216] C. Strain-Damerell, N. A. Burgess-Brown, *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2025*, 281–296.
- [217] Z. B. Nagy, F. Felföldi, L. Tamás, L. G. Puskás, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 301–303.
- [218] L. Zheng, U. Baumann, J. L. Reymond, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e115.

- [219] A. Seyfang, J. Huaqian Jin, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 285–291.
- [220] Y. An, J. Ji, W. Wu, A. Lv, R. Huang, Y. Wei, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 774–778.
- [221] W. C. Tseng, J. W. Lin, T. Y. Wei, T. Y. Fang, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 376–378.
- [222] X. Li, Y. Qiu, Y. Shen, C. Ding, P. Liu, J. Zhou, Z. Ma, *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 398–400.
- [223] N. Chapnik, H. Sherman, O. Froy, *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 255–257.
- [224] C. Jin, X. Cai, H. Ma, Y. Xue, J. Yao, X. Yao, *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 151–153.
- [225] A. Hemsley, N. Arnheim, M. D. Toney, G. Cortopassi, D. J. Galas, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6545–6551.
- [226] Z. Xu, A. Colosimo, D. C. Gruenert, *Methods Mol. Biol.* **2003**, *235*, 203–207.
- [227] S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, L. R. Pease, *Gene* **1989**, *77*, 51–59.
- [228] M. P. Weiner, G. L. Costa, *Genome Res.* **1994**, *4*, S131–S136.
- [229] B. Z. Zhang, X. Zhang, X. P. An, D. L. Ran, Y. Sen Zhou, J. Lu, Y. G. Tong, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2009**, *10*, 479–482.
- [230] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow, *Gene* **1996**, *173*, 33–38.
- [231] M. D. Girón, R. Salto, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2011**, *39*, 309–315.
- [232] N. Aliye, A. Fabbretti, G. Lupidi, T. Tsekoa, R. Spurio, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1205–1216.
- [233] B. H. Sung, A. von Lersner, J. Guerrero, E. S. Krystofiak, D. Inman, R. Pelletier, A. Zijlstra, S. M. Ponik, A. M. Weaver, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2092.
- [234] T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Gene* **1993**, *125*, 111–114.
- [235] Y. Yu, S. Lutz, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 18–25.
- [236] R. Graf, H. K. Schachman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11591–11596.
- [237] J. Hennecke, P. Sebbel, R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 1197–1215.

- [238] M. Iwakura, T. Nakamura, C. Yamane, K. Maki, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 580–585.
- [239] J. Carey, S. Lindman, M. Bauer, S. Linse, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 2317–2333.
- [240] Y. Lindqvist, G. Schneider, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 422–427.
- [241] S. Topell, J. Hennecke, R. Glockshuber, *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 283–289.
- [242] A. I. Kostyuk, A. D. Demidovich, D. A. Kotova, V. V. Belousov, D. S. Bilan, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4200.
- [243] J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 137–141.
- [244] C. Jing, V. W. Cornish, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 784–792.
- [245] S. M. Usama, S. C. Marker, D. Li, D. R. Caldwell, M. Stroet, N. L. Patel, A. G. Tebo, S. Hernot, J. D. Kalen, M. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 14647–14659.
- [246] H. Ohno, E. Sasaki, S. Yamada, K. Hanaoka, *Org. Biomol. Chem.* **2024**, *22*, 3099–3108.
- [247] J. B. Grimm, T. A. Brown, A. N. Tkachuk, L. D. Lavis, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 975–985.
- [248] T. Mukherjee, R. J. Martinez-sanchez, K. T. Fam, S. Bou, L. Richert, D. Garnier, Y. Me, S. Kanvah, A. S. Klymchenko, Y. Mély, S. Kanvah, A. S. Klymchenko, M. Collot, *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 2459–2469.
- [249] L. P. Encell, *Curr. Chem. Genomics* **2012**, *6*, 55–71.
- [250] B. J. Lampkin, J. A. Kritzer, *Chem. Commun.* **2024**, *60*, 200–203.
- [251] Y. Liu, K. Miao, N. P. Dunham, H. Liu, M. Fares, A. K. Boal, X. Li, X. Zhang, *Biochemistry* **2017**, *56*, 1585–1595.
- [252] B. J. Lampkin, B. J. Goldberg, J. A. Kritzer, *bioRxiv* **2023**, DOI 10.1101/2023.10.29.564634.
- [253] T. Iwaki, C. Torigoe, M. Noji, M. Nakanishi, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7589–7592.
- [254] N. Shanker, O. Dilek, K. Mukherjee, D. W. McGee, S. L. Bane, *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 2173–2184.

- [255] M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, K. Ito, H. Mori, M. Nakayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *361*, 116–121.
- [256] M. Y. Guo, L. G. Wei, J. W. Shen, X. J. Liu, M. Abbas, Y. S. Yang, C. Xu, B. Z. Wang, H. L. Zhu, *Dye. Pigment.* **2022**, *202*, 110261.
- [257] S. M. Marques, M. Slanska, K. Chmelova, R. Chaloupkova, M. Marek, S. Clark, J. Damborsky, E. T. Kool, D. Bednar, Z. Prokop, *JACS Au* **2022**, *2*, 6, 1324-1337.
- [258] Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12360–12365.
- [259] T. K. Neklesa, H. S. Tae, A. R. Schneekloth, M. J. Stulberg, T. W. Corson, T. B. Sundberg, K. Raina, S. A. Holley, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543.
- [260] W. Almers, *Annu. Rev. Physiol.* **1990**, *52*, 607–624.
- [261] P. Thorn, R. Zorec, J. Rettig, D. J. Keating, *J. Neurochem.* **2016**, 849–859.
- [262] S. Sugita, *Acta Physiol.* **2008**, *192*, 185–193.
- [263] R. Jahn, T. C. Südhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 219–246.
- [264] A. N. Van den Pol, *Neuron* **2012**, *76*, 98–115.
- [265] A. Verkhratsky, M. Matteoli, V. Parpura, J. Mothet, R. Zorec, *EMBO J.* **2016**, *35*, 239–257.
- [266] L.-G. Wu, E. Hamid, W. Shin, H.-C. Chiang, *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76*, 301–331.
- [267] R. Jahn, D. C. Cafiso, L. K. Tamm, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2024**, *25*, 101–118.
- [268] D. J. Colacurcio, R. A. Nixon, *Ageing Res. Rev.* **2016**, *32*, 75–88.
- [269] A. L. M. Caldwell, L. Sancho, J. Deng, A. Bosworth, A. Miglietta, J. K. Diedrich, M. N. Shokhirev, N. J. Allen, *Nat. Neurosci.* **2022**, *25*, 1163–1178.
- [270] J. M. Kita, R. M. Wightman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 491–496.
- [271] J. M. Fernandez, E. Neher, B. D. Gomperts, *Nature* **1984**, *312*, 453–455.
- [272] J. M. Masch, H. Steffens, J. Fischer, J. Engelhardt, J. Hubrich, J. Keller-

- Findeisen, E. D'Este, N. T. Urban, S. G. N. Grant, S. J. Sahl, D. Kamin, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, e8047–e8056.
- [273] W-H. Li, D. Li, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 672–681.
- [274] W. J. Betz, F. Mao, C. B. Smith, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 365–371.
- [275] P. C. Rodriguez, D. B. Pereira, A. Borgkvist, M. Y. Wong, C. Barnard, M. S. Sonders, H. Zhang, D. Sames, D. Sulzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 870–875.
- [276] M. A. Gaffield, W. J. Betz, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2916–2921.
- [277] S. Sankaranarayanan, D. De Angelis, J. E. Rothman, T. A. Ryan, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2199–2208.
- [278] M. J. Mahon, *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2011**, *2*, 132–137.
- [279] M. Reifenrath, E. Boles, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11985.
- [280] Y. V. Morimoto, S. Kojima, K. Namba, T. Minamino, *PLoS One* **2011**, *6*, e19598.
- [281] T. Bozza, J. P. McGann, P. Mombaerts, M. Wachowiak, *Neuron* **2004**, *42*, 9–21.
- [282] R. Sarker, C. M. Tse, R. Lin, G. McNamara, V. Singh, M. Donowitz, *Cell. Physiol. Biochem.* **2022**, *56*, 39–49.
- [283] Y. Li, R. W. Tsien, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 1047–1053.
- [284] Y. Shen, M. Rosendale, R. E. Campbell, D. Perrais, *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 419–432.
- [285] A. Liu, X. Huang, W. He, F. Xue, Y. Yang, J. Liu, L. Chen, L. Yuan, P. Xu, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1413.
- [286] W. H. Li, *Cell Calcium* **2017**, *64*, 65–71.
- [287] I. Cuchillo-Ibáñez, P. Michelena, A. Albillos, A. G. García, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 22–26.
- [288] J. Panyam, V. Labhasetwar, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 212–220.
- [289] H. C. Chiang, W. Shin, W. D. Zhao, E. Hamid, J. Sheng, M. Baydyuk, P. J. Wen, A. Jin, F. Momboisse, L. G. Wu, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3356.

- [290] R. W. Holz, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1988**, *8*, 259-268.
- [291] R. W. Holz, D. Axelrod, *Acta Physiol.* **2008**, *192*, 303-307.
- [292] D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thompson, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 247-268.
- [293] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, J. Z. Rappoport, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3621-3628.
- [294] M. Oheim, *Lasers Med. Sci.* **2001**, *16*, 149-158.
- [295] A. Yildiz, R. D. Vale, *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top086348.
- [296] M. A. Ravier, T. Tsuboi, G. A. Rutter, *Methods* **2008**, *46*, 233-238.
- [297] J. Schmoranzner, M. Goulian, D. Axelrod, S. M. Simon, in *J. Cell Biol.*, **2000**, *149*, 23-32.
- [298] M. Lee, N. G. Gubernator, D. Sulzer, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8828-8830.
- [299] H. Y. Lin, L. A. Chu, H. Yang, K. J. Hsu, Y. Y. Lin, K. H. Lin, S. W. Chu, A. S. Chiang, *iScience* **2019**, *14*, 164-170.
- [300] P. Y. Lam, R. S. Fischer, W. D. Shin, C. M. Waterman, A. Huttenlocher, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1124*, 219-233.
- [301] T. Wilson, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, *5*, 1208-1214.
- [302] M. Petráň, M. Hadravský, A. Boyde, *Scanning* **1985**, *7*, 97-108.
- [303] A. Masedunskas, N. Porat-Shliom, R. Weigert, *Traffic* **2012**, *13*, 627-634.
- [304] M. Mietkowska, C. Schuberth, R. Wedlich-Söldner, V. Gerke, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 1218-1229.
- [305] S. Ebrahim, D. Chen, M. Weiss, L. Malec, Y. Ng, I. Rebutini, E. Krystofiak, L. Hu, J. Liu, A. Masedunskas, E. Hardeman, P. Gunning, B. Kachar, R. Weigert, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 933-939.
- [306] J. Oreopoulos, R. Berman, M. Browne, *Methods Cell Biol.* **2014**, *123*, 153-175.
- [307] Q. Zhang, Y. Q. Cao, R. W. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*,

- 17843–17848.
- [308] J. Jankovičová, P. Sečová, K. Michalková, J. Antalíková, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–30.
- [309] J. Huotari, A. Helenius, *EMBO J.* **2011**, *30*, 3481–3500.
- [310] G. Van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228.
- [311] M. P. Bebelman, M. J. Smit, D. M. Pegtel, S. R. Baglio, *Pharmacol. Ther.* **2018**, *188*, 1–11.
- [312] H. Peinado, M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. M. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B. A. Garcia, M. K. Callahan, J. Yuan, V. R. Martins, J. Skog, R. N. Kaplan, M. S. Brady, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, D. Lyden, *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891.
- [313] A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, *Traffic* **2011**, *12*, 1659–1668.
- [314] B. Costa-Silva, N. M. Aiello, A. J. Ocean, S. Singh, H. Zhang, B. K. Thakur, A. Becker, A. Hoshino, M. T. Mark, H. Molina, J. Xiang, T. Zhang, T.-M. Theilen, G. García-Santos, C. Williams, Y. Ararso, Y. Huang, G. Rodrigues, T.-L. Shen, K. J. Labori, I. M. B. Lothe, E. H. Kure, J. Hernandez, A. Doussot, S. H. Ebbesen, P. M. Grandgenett, M. A. Hollingsworth, M. Jain, K. Mallya, S. K. Batra, W. R. Jarnagin, R. E. Schwartz, I. Matei, H. Peinado, B. Z. Stanger, J. Bromberg, D. Lyden, *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826.
- [315] F. J. Verweij, M. P. Bebelman, C. R. Jimenez, J. J. Garcia-Vallejo, H. Janssen, J. Neefjes, J. C. Knol, R. de Goeij-de Haas, S. R. Piersma, S. R. Baglio, M. Verhage, J. M. Middeldorp, A. Zomer, J. van Rheenen, M. G. Coppolino, I. Hurbain, G. Raposo, M. J. Smit, R. F. G. Toonen, G. van Niel, D. M. Pegtel, *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1129–1142.
- [316] M. P. Bebelman, P. Bun, S. Huveneers, G. van Niel, D. M. Pegtel, F. J. Verweij, *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 102–121.
- [317] A. Anantharam, J. Knight, *Exocytosis From Mol. to Cells* **2022**, 1–129.
- [318] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, F. Lemaître, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2585–

- 2621.
- [319] N. R. Gandasi, K. Vestö, M. Helou, P. Yin, J. Saras, S. Barg, *PLoS One* **2015**, 10 (6), e0127801.
- [320] F. Chai, D. Cheng, Y. Nasu, T. Terai, R. E. Campbell, *Biochem. Soc. Trans.* **2023**, 51, 1585–1595.
- [321] H. A. Benink, M. G. McDougall, D. H. Klaubert, G. V. Los, *Biotechniques* **2009**, 47 (3), 769–774.
- [322] J. L. B. Giancola, J. B. Grimm, J. V. Jun, Y. D. Petri, L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2024**, 19 (4), 908–915.
- [323] K. Santra, I. Geraskin, M. Nilsen-Hamilton, G. A. Kraus, J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 2536–2545.
- [324] G. Despras, A. I. Zamaleeva, L. Dardevet, C. Tisseyre, J. G. Magalhaes, C. Garner, M. De Waard, S. Amigorena, A. Feltz, J. M. Mallet, M. Collot, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 5928–5937.
- [325] M. Paez-Perez, M. K. Kuimova, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2024**, 63, e20231123.
- [326] J. Coïs, S. P. J. T. Bachollet, L. Sanchez, N. Pietrancosta, V. Vialou, J.-M. Mallet, B. Dumat, *Chem. – A Eur. J.* **2024**, DOI 10.1002/chem.202400641.
- [327] A. Miyawaki, D. M. Shcherbakova, V. V. Verkhusha, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, 22, 679–688.
- [328] A. Lahlou, H. S. Tehrani, I. Coghill, Y. Shpinov, M. Mandal, M. A. Plamont, I. Aujard, Y. Niu, L. Nedbal, D. Lazar, et al., *Nat. Methods*, **2023**, 20 (12), 1930–1938.
- [329] M. Mathieu, N. Névo, M. Jouve, J. I. Valenzuela, M. Maurin, F. J. Verweij, R. Palmulli, D. Lankar, F. Dingli, D. Loew, E. Rubinstein, G. Boncompain, F. Perez, C. Théry, *Nat. Commun.* **2021**, 12, 4389.
- [330] J. G. Burchfield, J. A. Lopez, K. Mele, P. Vallotton, W. E. Hughes, *Traffic* **2010**, 11, 429–439.
- [331] J. Liu, F. J. Verweij, G. Van Niel, L. Danglot, P. Bun, *bioRxiv* **2022**, 2022.09.05.506585.

- [332] Y. Xu, L. Jin, D. Toomre, *In Methods in Molecular Biology*, **2022**; Vol. 2473, pp 157–164.
- [333] J. R. Edgar, P. T. Manna, S. Nishimura, G. Banting, M. S. Robinson, *Elife* **2016**, *5*, 1–19.
- [334] X. Luo, H. Yang, H. Wang, Z. Ye, Z. Zhou, L. Gu, J. Chen, Y. Xiao, X. Liang, X. Qian, Y. Yang, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5803–5809.
- [335] S. Munan, R. Yadav, N. Pareek, A. Samanta, *Analyst* **2023**, 4242–4262.
- [336] A. Kruyer, P. W. Kalivas, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2021**, *56*, 1–6.
- [337] K. S. Christopherson, E. M. Ullian, C. C. A. Stokes, C. E. MULLowney, J. W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D. F. Mosher, P. Bornstein, B. A. Barres, *Cell* **2005**, *120*, 421–433.
- [338] H. Kucukdereli, N. J. Allen, A. T. Lee, A. Feng, M. I. Ozlu, L. M. Conatser, C. Chakraborty, G. Workman, M. Weaver, E. H. Sage, B. A. Barres, C. Eroglu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, e440-e449.
- [339] N. L. Hevin, S. K. Singh, J. A. Stogsdill, N. S. Pulimood, H. Dingsdale, Y. Ho, L. Pilaz, I. H. Kim, A. C. Manhaes, W. S. Rodrigues-junior, A. Pamukcu, E. Enustun, Z. Ertuz, P. Scheiffele, S. Soderling, D. L. Silver, R. Ji, A. E. Medina, C. Eroglu, *Cell* **2017**, *164*, 183–196.
- [340] K. J. Gan, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 12524–12533.
- [341] J. Nagai, A. K. Rajbhandari, M. R. Gangwani, A. Hachisuka, G. Coppola, S. C. Masmanidis, M. S. Fanselow, B. S. Khakh, *Cell* **2019**, *177*, 1280-1292.
- [342] J. E. Murphy-Ullrich, E. H. Sage, *Matrix Biol.* **2014**, *37*, 1–14.
- [343] N. J. Allen, C. Eroglu, *Neuron* **2017**, *96*, 697–708.
- [344] C. Eroglu, *J. Cell Commun. Signal.* **2009**, *3*, 167–176.
- [345] V. Vialou, A. J. Robison, Q. C. Laplant, H. E. Covington, D. M. Dietz, Y. N. Ohnishi, E. Mouzon, A. J. Rush, E. L. Watts, D. L. Wallace, S. D. Íguez, Y. H. Ohnishi, M. A. Steiner, B. L. Warren, V. Krishnan, C. A. Bolões, R. L. Neve, S. Ghose, O. Berton, C. A. Tamminga, E. J. Nestler, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 745–752.

- [346] G. Fossati, M. Matteoli, E. Menna, *Cells* **2020**, *9*, 1–20.
- [347] R. Mongrédién, A. Anesio, G. J. D. Fernandes, A. L. Eagle, S. Maldera, C. Pham, A. Vilette, P. Bianchi, C. Falco, F. Louis, C. Gruszczynski, C. Betancur, A. M. Erdozain, A. J. Robison, A. A. Boucard, D. Li, F. C. Cruz, S. Gautron, N. Heck, V. Vialou, *BioRxiv* **2023**, 0–2.
- [348] M. D. Scofield, H. A. Boger, R. J. Smith, H. Li, P. G. Haydon, P. W. Kalivas, *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 441–451.
- [349] S. Fan, S. P. Gangwar, M. Machius, G. Rudenko, *Structure* **2021**, *29*, 664–678.
- [350] A. Verkhratsky, M. Matteoli, V. Parpura, J. Mothet, R. Zorec, *EMBO J.* **2016**, *35*, 239–257.
- [351] S. Bolte, F. P. Cordelières, *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232.

Over the past two decades, our understanding of nervous system proteins and their role in the normal and pathological functioning of psychiatric diseases has significantly progressed thanks to major advances in protein imaging and targeting techniques. Fluorescence imaging, a non-invasive and highly resolutive method, allows for the visualization of proteins at the subcellular scale and the study of fine cellular mechanisms in real-time, such as the secretion and regulation of protein trafficking. These studies were initially made possible through the development of fluorescent proteins, albeit of moderate brightness and low photostability. More recently, the development of hybrid chemogenetic sensors, benefiting both from the selectivity of genetic encoding and the versatility of organic fluorophores, has greatly increased the diversity of fluorescent reporters with enhanced brightness and photostability. The design of new hybrid tools for cellular imaging is crucial to obtaining more modulable and versatile characteristics to address the diversity of biological questions concerning the trafficking of target proteins.

During my PhD, I initially developed novel chemogenetic fluorescent probes based on the combination of HaloTag labeling protein and molecular rotors that emit fluorescence only after covalent binding to it. We devised a new divergent synthesis method to more rapidly diversify the spectral properties of these hybrid fluorogenic probes. Additionally, we created new variants of HaloTag to improve their brightness for imaging. These new probes, tested in living cells, showed promising sensitivity towards the HaloTag protein with specific fluorescence activation, allowing for imaging without the need for washing steps. Combined with a protein of interest, these new fluorescent reporters offer precise control of subcellular localization and real-time tracking with excellent contrast.

Continuing with this approach, I developed pH probes based on the combination of fluorescent molecular rotors containing a pH-sensitive phenol group and the HaloTag protein. These new hybrid fluorogenic pH probes benefit from a dual fluorescence activation condition based on both their conformational locking in the HaloTag protein pocket and the deprotonation of the phenol group at neutral pH. Thus, we exploited this local fluorescence activation according to pH to track dynamic cellular processes such as protein secretion in living cells without the need for washing and with excellent contrast.

In the final stage of my PhD, I used these new chemogenetic tools to elucidate the trafficking of the matricellular protein hevin. This protein is of major interest for understanding psychiatric diseases, particularly addiction and the effects of stress, but its subcellular localization and regulation remain unclear. We demonstrated significant colocalization of hevin with the transmembrane protein CD63, expressed in exosomes. Furthermore, the use of the new pH probe I developed confirmed the regulation of hevin secretion by cellular activity in the HeLa cell line