

PROTEINES FLUORESCENTES POUR L'EXPLORATION CELLULAIRE

Catherine Leclerc, Chargée de recherche CNRS

Marc Moreau, Directeur de recherche CNRS

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse CEDEX 09

catherine.leclerc@univ-tlse3.fr

marc.moreau@univ-tlse3.fr

Les protéines fluorescentes peuvent être utilisées pour étudier des fonctions biologiques sur des cellules ou tissus fixés mais aussi pour réaliser des mesures dynamiques sur des cellules en culture ou organismes vivants. Ces protéines ou sondes fluorescentes permettent de suivre des modifications de concentration ionique (pH, Ca^{2+} ...), d'étudier des interactions protéines-protéines, des modifications de l'état de phosphorylation des protéines, de suivre des processus de translocations de protéines, d'activation de gènes...

Dans le cadre de ce cours nous ne présenterons que l'utilisation des protéines fluorescentes pour des mesures dynamiques.

1- Structures des protéines fluorescentes

1.1 La Green Fluorescent Protein (GFP) et les variants

L'histoire des protéines fluorescentes en biologie commence véritablement en 1962 avec O. Shimomura qui s'intéressait aux animaux bioluminescents. O. Shimomura a isolé et étudié les propriétés d'une protéine issue de la méduse *Aequorea victoria* émettant une fluorescence verte (la Green Fluorescent Protein ou GFP) (Shimomura et al., 1962). Cette histoire s'est poursuivie avec le clonage de la GFP en 1992 par D. Prasher (Prasher et al., 1992) et c'est à partir de cette date que l'utilisation de la GFP en biologie prend son envol avec M. Chalfie et R. Tsien. L'ensemble de ces travaux sera récompensé en 2008 par un prix Nobel de chimie décerné à O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien (Shimomura, 2009).

La GFP appartient à la superfamille des protéines contenant un tonneau β composé de 11-feuillets β et d'une hélice α (Fig. 1). Cette structure est compacte et très stable. Le chromophore de la GFP est codé dans la séquence primaire de la protéine, constitué par les acides aminés Ser65, tyr66 et glycine 67. Il est attaché à l'hélice et complètement enfoui dans le tonneau β .

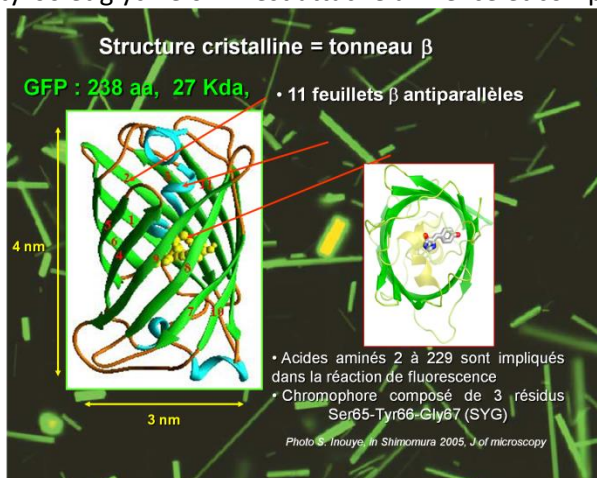


Fig. 1. Structure de la GFP

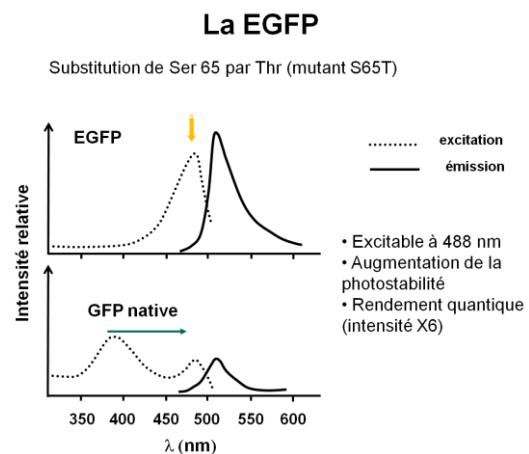


Fig. 2. Spectres de la GFP et de la EGFP

Une autre caractéristique de la GFP, les extrémités N-terminale et C-terminale sont accessibles pour la fusion avec d'autres protéines. La GFP est considérée comme un monomère mais peut former des dimères à forte concentration en protéines. Cette structure en tonneau β est conservée chez toutes les protéines fluorescentes découvertes jusqu'à présent, elle confère une très **grande photostabilité** à la protéine.

Les propriétés de fluorescence de la GFP dépendent de l'ensemble de la séquence primaire de la protéine (Shimomura, 1979) ; cette caractéristique est due à sa structure compacte en tonneau β . Des approches de mutagenèse ont permis d'introduire des substitutions au niveau du chromophore et/ou dans la séquence loin du chromophore et ainsi de modifier les propriétés spectrales de la protéine et d'améliorer l'efficacité de maturation de la protéine, d'expression dans différents systèmes cellulaires, en particulier chez les mammifères, pour des températures physiologiques. Ainsi, la GFP utilisée actuellement en biologie est la EGFP (E pour Enhanced). La EGFP a été obtenue, en particulier, par substitution de la serine65 du chromophore par une thréonine ; cette substitution entraîne une modification des spectres d'excitation et d'émission (Fig. 2). 4 variants, indiqués par E (enhanced), ont été initialement construits, EGFP, EBFP, ECFP et EYFP. Depuis le début des années 2000 de nombreux variants ont été obtenus à partir de la GFP d'*Aequorea*, la plupart sont des monomères et couvrent le spectre d'émission du bleu au jaune soit de 424 à 530 nm (Day and Davidson, 2009).

Depuis la GFP, d'autres protéines fluorescentes (FP) ont été clonées à partir d'autres organismes marins appartenant aux Anthozoaires (coraux, hydres). En particulier une FP avec une émission dans le rouge: La DsRed avec un pic d'émission à 580 nm pour une excitation à 558 nm (Matz et al., 1999). La DsRed forme un tétramère très stable, chaque monomère a une structure similaire à celle de la GFP (Fig.3).

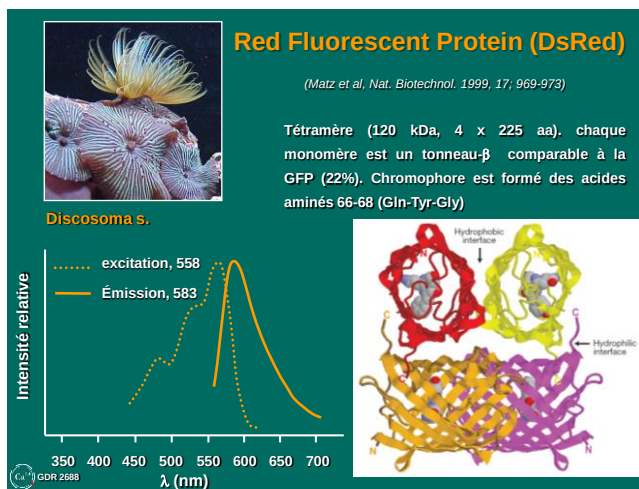


Fig. 3 Structure de la DsRed

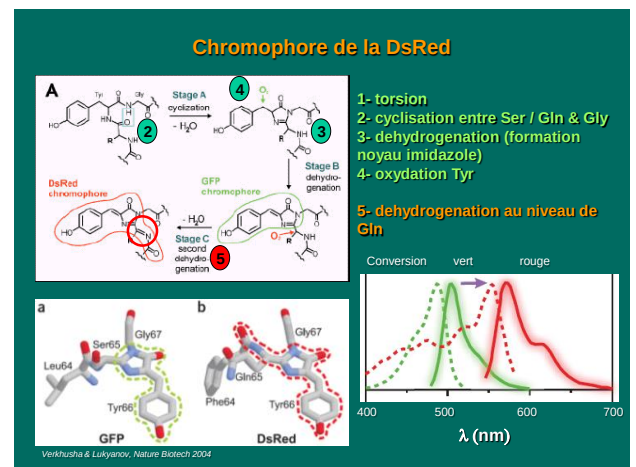


Fig. 4 Maturation de la GFP et de la DsRed

Actuellement une centaine de PFs dérivées soit de la GFP soit de la DsRed (red-FP, RFP) sont clonées, L'ensemble de ces FP donne accès à une palette de couleurs allant de 456 à 655 nm c'est-à-dire du violet au rouge lointain (Newman et al., 2011).

1.2. Maturation de la GFP

Contrairement à d'autres types de pigments, Les GFP et GFP-like forment des chromophores sans nécessiter la présence de co-facteurs ou d'une activité enzymatique externe ou encore d'un substrat particulier autre que l'oxygène moléculaire. Le chromophore résulte d'une modification post-traductionnelle, il se forme spontanément. La structure du tonneau β peut être considérée comme une enzyme capable de modifier les acides aminés du chromophore. Il s'agit d'un mécanisme de repliement et de réarrangement intramoléculaire comprenant 4 étapes (Fig.4) : (1) réarrangement du chromophore par torsion, (2) cyclisation, (3) déshydratation, (4) oxydation. C'est à la fin de ce

processus que la protéine devient fluorescente. Dans le cas de la GFP native, l'ensemble de ces processus dure environ 2 heures (Brejc et al., 1997), par contre dans le cas de la EGFP, la fluorescence est détectable dès 8 minutes et maximale à 25 minutes (Cormack et al., 1996). La maturation de la DsRed est très lente (11hr), comme pour la EGFP des variants « rapides » ont été développés (Strack et al., 2008). Dans le cas de la DsRed, une étape supplémentaire (Fig. 4) conduit à la formation d'un chromophore « rouge ».

1.3. Autres caractéristiques des FPs

Le tableau de la figure 5 présente les propriétés des FPs les plus courantes. Ces propriétés conditionnent le choix de la FP en fonction du système biologique et des questions posées.

	Structure	$\lambda_{ex.}$ (nm)	$\lambda_{em.}$ (nm)	Q. Yield	Brillance (% EGFP)	pH sensible	Maturation	Photo- stabilité (s)
Variants GFP-Aequorine								
GFP wt	m'	395/475	509	0.77	48			stable
EGFP	m*	488	509	0.60	100	5.9 +/-	< 15 min	174
Emerald	m*	487	509	0.68	116			Très faible
ECFP	m*	439	476	0.40	39	stable		
Cerulean	m*	433	475	0.62	79	stable	ND	36
EYFP	m*	514	527	0.61	151	sensible	ND	60
mcitrine	m	516	529	0.76	174	5.7	ND	faible
Variants Protéines Fluorescentes								
mOrange	m	548	562	0.69	146	sensible	2.5 h	9
tdTomato	m	554	581	0.69	283	4.7	1 h	98
DsRed	t	558	583	0.79	178	4.7	~ 10 h	16
mRFP1	m	584	607	0.25	37	stable	< 1 h	8.7
mStraw.	m	574	596	0.29	78	stable	50 min	15
mCherry	m	587	610	0.22	47	stable	15 min	96
mPlum	m	590	649	0.10	12	< 4.5	53	53
mKate2	m	588	635	0.40	74	5.4	< 20 min	93

Fig. 5 Propriétés de certaines PFs. La brillance est définie comme le produit du rendement quantique (Q yield ; reflète l'efficacité de fluorescence) par le coefficient d'extinction (ϵ ; probabilité d'absorption d'un photon) de la molécule.

En particulier, le temps de maturation et la sensibilité au pH peuvent être des facteurs limitants. La photo-stabilité de la FP est aussi un critère important lors d'observation de longue durée ainsi que pour la quantification. Certaines FPs peuvent former des agrégats et présentent donc des problèmes de cyto-toxicité, en particulier pour les formes tétramériques (Strack et al., 2008). Le matériel d'observation conditionne aussi le choix d'une FP (filtres d'excitation et d'émission adaptés). Les FPs émettant dans le rouge (RFPs) présentent un certain nombre d'avantages en particulier, diminution de l'autofluorescence et de dispersion de la lumière, réduction de la photo-toxicité. Ces RFPs sont donc bien adaptées en imagerie in vivo et dans le cas d'observations profondes dans des tissus.

1.4. Les PFs activables

Les études réalisées sur la structure et la formation des chromophores de la GFP et de la DsRed ont permis de construire des mutants particuliers qui peuvent être photo-activables (comme PA-GFP), photo-convertibles comme EosFP ou encore photo-commutables comme la protéine Dronpa, IRIS-FP (Fig. 6). La photo-conversion de PA-GFP permet de passer d'une forme non fluorescente vers une forme fluorescente, elle résulte de la décarboxylation du résidu Glu222, suivi d'une conversion du chromophore vers une forme anionique. La photo-conversion permet de passer

d'une forme qui fluoresce en vert (type GFP) vers une forme qui fluoresce en rouge (type DsRed). Cette photo-conversion est due au clivage d'une liaison au niveau de l'Histidine 62, qui conduit à la formation d'un noyau imidazole. Contrairement à la photoactivation, la photo-commutation est un mécanisme réversible, cette réaction implique la cis-trans photo-isomérisation du chromophore (Shaner et al., 2007).

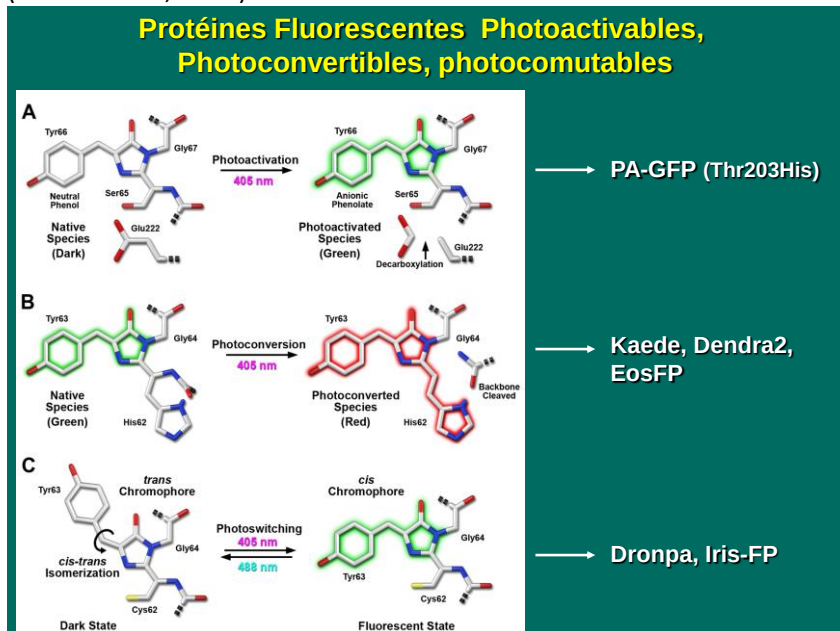


Fig.6. Mécanismes de photoactivation (A), Photoconversion (B) et de photocommutation (C). Adapté de Shaner et al, 2007.

2- Applications des Protéines fluorescentes en biologie

Les applications des FP constituent un domaine en continuelle expansion, il n'est pas question ici de traiter toutes les applications possibles des FPs. Nous aborderons seulement quelques exemples (Fig. 7).

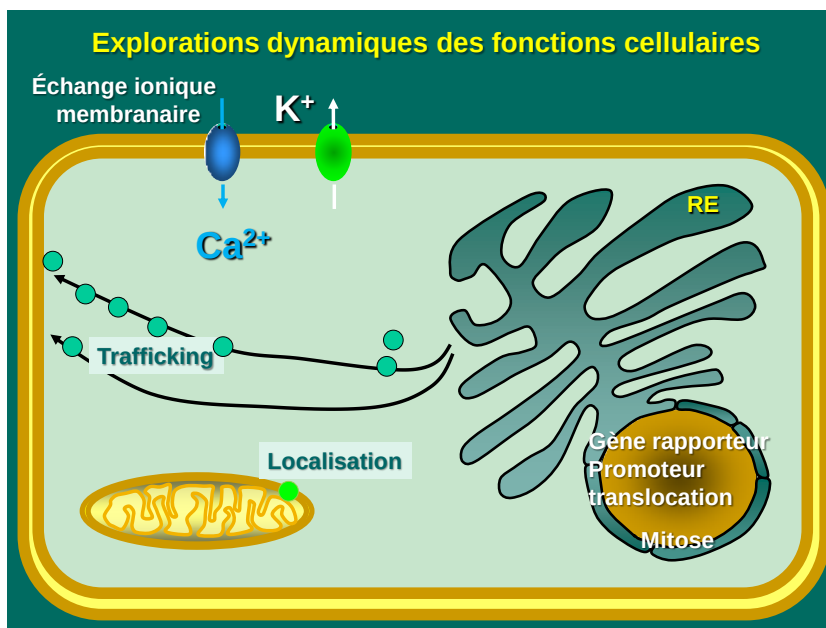


Fig. 7. Les applications des FPs sont multiples. Les applications les plus courantes concernent l'expression de protéines d'intérêts, leur localisation, interactions, les mécanismes de trafic intracellulaire, de translocation. Les FPs permettent de suivre l'activité d'un gène. Un aspect important concerne aussi le développement de bio-senseurs permettant d'étudier des échanges ioniques, le NO, les états de phosphorylations...

2.1. Localisations subcellulaires - adressages

L'exploration des différentes fonctions cellulaires nécessite de pouvoir adresser la FP à divers compartiments subcellulaires. La figure 8 donne quelques-uns des motifs utilisés. Dans certains cas il est nécessaire de dupliquer le signal de localisation pour avoir un adressage efficace. Ce type de protéine de fusion nécessite l'utilisation de FPs monomériques car l'oligomérisation peut interférer avec la fonction normale et la localisation de la protéine d'intérêt.

Motifs de localisation subcellulaire		
Localisation	motifs	Source
Noyau	Cterm: PKKKRKVEDA Cterm: DPKKKRKV Cterm: (DPKKKKV) 3-GSTGSR Séquence KR-rich en Cterm	NLS
Cytoplasme	Cterm: LALKLAGLDI	NES
Lumen RE	Nterm: MLLSVPLLLGLLGLAAAD Cterm: KDEL	calreticulin
Matrice mitochondriale	Nterm: MSVLTPLLRLGTGSARRLPVPRAKIHSLGDP En tandem	Cytochrome c oxidase
Membrane mitochondriale	Nterm: MVGRNSAIAAGVCGALFIGYCIYFDRKRSDPN MAIQLRSLFPLALPGMLALLGWWFFSRKK	Tom20 DAKAP1a
Lumen Golgi	Nterm: 81 aa de la h β 1,4 galactosyltransferase	
Membrane Golgi	Nterm: GNLSVAQEPGPPCGGLGLGLGLCGKQGP	eNOS
Membrane plasmique	Nterm: MGCIKSKRKNLNDGVDKMT Myristoylation et palmitoylation Cterm: KKKKSKTKCVIM Farnesylation Cterm: KLNPPDES GPGCMSCCKVLS Nterm: MLCCMRRTKQVEKNDEDKI	Lyn kinase K-ras4B V-Ha-Ras GAP-43
Matrice peroxisome	Cterm: SKL ou XKL	

Adapté de Chudakov, 2010

Fig.8 Motifs de localisation subcellulaire

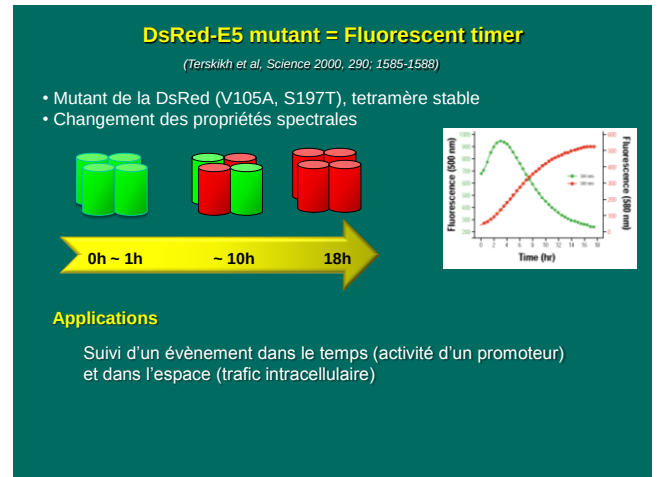


Fig. 9 Principe du Fluorescent Timer

Dans le cas d'études dynamiques, la grande stabilité et le temps de maturation de certaines FPs peuvent être des facteurs limitants (voir paragraphe 1.2 et fig. 5). La déstabilisation d'une FP est réalisée en construisant une protéine de fusion contenant un signal de protéolyse ; domaine PEST de l'ornithine decarboxylase et/ou domaine CDE (Cyclin Destruction Box) de la cyclin D1. Dans ce cas la demi-vie de la GFP passe de 26 h à environ 5 – 6 h (Corish and Tyler-Smith, 1999) voire 2h (Li et al., 1998) en fonction de la taille du domaine de protéolyse. Le mutant DsRed-E5 ou « fluorescent timer » est un mutant intéressant qui permet de dater un événement cellulaire, de suivre par exemple l'activité d'un promoteur (Tersikh et al., 2000) ou d'étudier la fonction de vésicules de sécrétion suivant leur âge (Duncan et al., 2003). Comme la DsRed ce mutant est un tétramère, il présente la particularité d'avoir des propriétés spectrales qui changent au cours du temps (Fig. 9). Ainsi, initialement les monomères ont une fluorescence verte puis au cours du temps il y a conversion du vert vers le rouge (Tersikh et al., 2000).

2.2. Biocapteurs fluorescents pour étudier la signalisation cellulaire

La grande majorité de ces biocapteurs fluorescents sont construits à partir d'un couple de FPs et utilise le phénomène de FRET (voir manuscrit de Serge Mazères dans ce fascicule). Le principe consiste à réaliser une protéine de fusion composée d'un domaine « sensible » en sandwich entre deux FPs répondant aux critères du FRET. Le domaine sensible doit à la fois être spécifique du signal étudié et répondre au signal en modifiant l'efficacité du FRET. Les Fig. 10 & 11 donnent quelques exemples de biocapteurs. Actuellement il existe une grande variété de constructions permettant de suivre des variations de pH et de Ca²⁺ intracellulaires, de potentiel membranaire, d'AMPc et GMPc, NO, ATP, phosphorylation... (Newman et al., 2011)

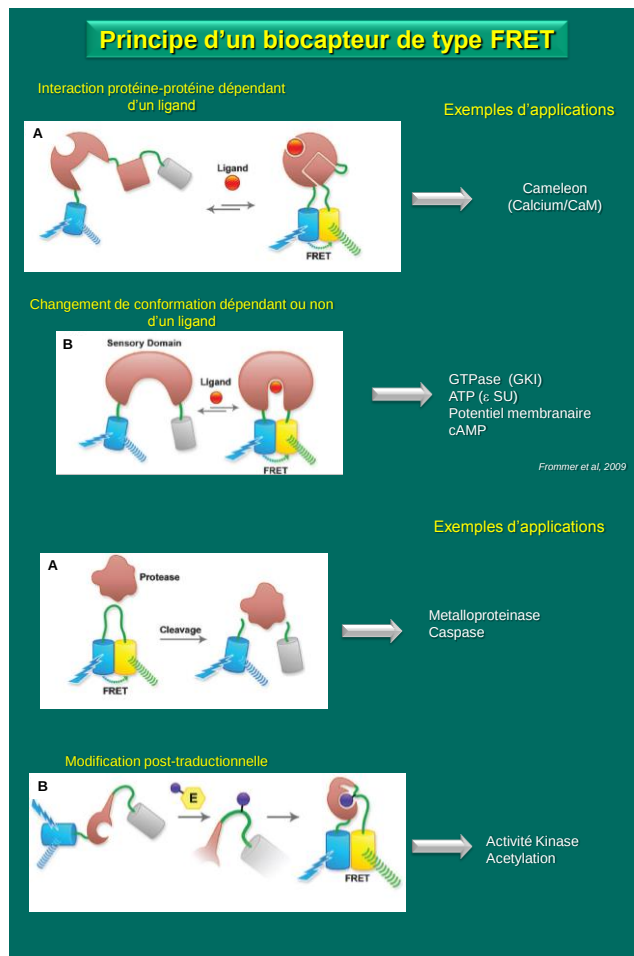


Fig. 10. Biocapteurs de type FRET. **A-** Modification de l'interaction entre 2 protéines par fixation d'un ligand. La sonde cameleon (type YC6) permet de mesurer des variations de Ca^{2+} intracellulaire. Le domaine sensible est composé du peptide CKKp et des domaines N et C-term de la calmoduline (Truong et al., 2001). **B-** La fixation du ligand sur le domaine sensible induit directement le changement de conformation. GKI= cGMP binding domain de la cGMP-Kinase (Nikolaev et al., 2006). Cas particulier du capteur de potentiel ; il n'y a pas de fixation de ligand, c'est la répartition des charges électriques qui induit le changement de conformation (Sakai et al., 2001).

Fig. 11. **A-** Le domaine sensible est la cible de protéase (Ouyang et al., 2008, Xu et al., 1998). **B-** Capteurs sensibles à des modifications post-traductionnelles permettant de suivre des états de phosphorylation (Violin et al., 2003), de méthylation ou d'acétylation (Sasaki et al., 2009).

D'autres biocapteurs sont uniquement composés d'une seule FP associée au domaine sensible. Dans cette situation la stimulation induit généralement un changement de l'intensité de fluorescence du capteur avec des dynamiques plus importantes que dans le cas des capteurs de type FRET. Par exemple dans le cas des capteurs calciques les dynamiques varient de 1 à 5 entre les capteurs basés sur le FRET (cameleon type YC) et ceux construits avec une seule FP (type pericam) mais restent très faibles en comparaison des dynamiques obtenues avec les sondes organiques type Fluo3 (Fig.12).

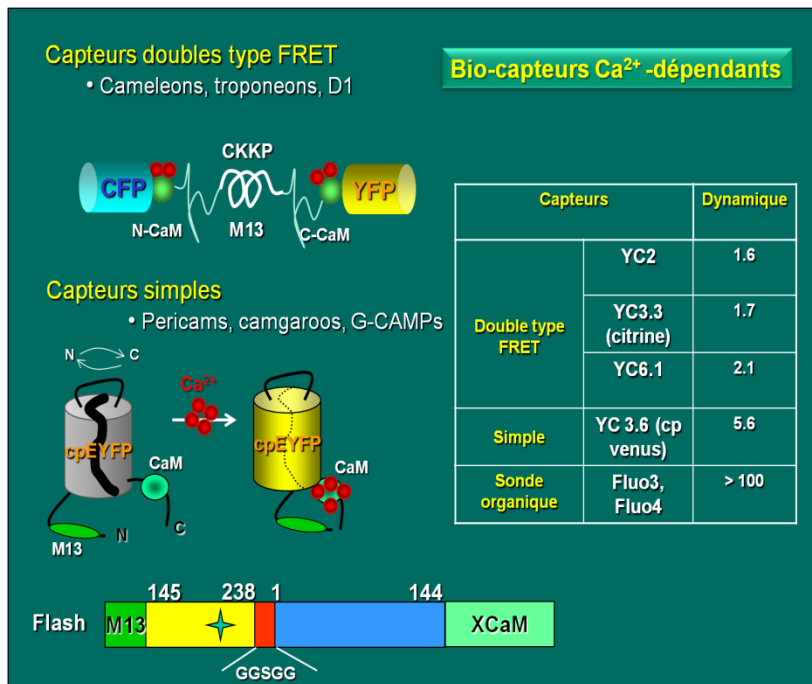


Fig.12 Structure générales des capteurs Calciques double (cameleon) et simple (pericam) tonneau et comparaison de leur dynamique avec une sonde calcique organique type Fluo.

Conclusion

Une trentaine d'années sont passées entre la découverte de la protéine GFP par O. Shimomura et le clonage du gène par D. Prasher. Ce n'est que depuis la fin des années 90 que les protéines fluorescentes sont devenues des outils clés pour l'imagerie du vivant en particulier grâce à l'inventivité de R. Tsien qui a transformé les FP de reporteurs en biocapteurs. L'utilisation de ces biocapteurs a suivi l'évolution des techniques d'imagerie en biologie (voir le manuscrit de Marc Moreau dans ce fascicule). Devant la grande diversité des FP disponibles actuellement, la question se pose ; Quelle FP choisir, quels sont les critères de choix ? Les paramètres importants à considérer sont multiples :

- La couleur (λ d'excitation/émission)
 - Photostabilité
 - Brilliance
 - Maturation (lente vs rapide)
 - Sensibilité au pH
 - FRET ou non
-mais le plus important reste « Quelle est la question biologique ? »

Bibliographie

- BREJC, K., SIXMA, T. K., KITTS, P. A., KAIN, S. R., TSIENT, R. Y., ORMÖ, M. & REMINGTON, S. J. 1997. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2306-11.
- CORISH, P. & TYLER-SMITH, C. 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, 12, 1035-40.
- CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H. & FALKOW, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 33-8.

- DAY, R. N. & DAVIDSON, M. W. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 38, 2887-2921.
- DUNCAN, R. R., GREAVES, J., WIEGAND, U. K., MATSKEVICH, I., BODAMMER, G., APPS, D. K., SHIPSTON, M. J. & CHOW, R. H. 2003. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*, 422, 176-80.
- LI, X., ZHAO, X., FANG, Y., JIANG, X., DUONG, T., FAN, C., HUANG, C. C. & KAIN, S. R. 1998. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 273, 34970-5.
- MATZ, M. V., FRADKOV, A. F., LABAS, Y. A., SAVITSKY, A. P., ZARAIKY, A. G., MARKELOV, M. L. & LUKYANOV, S. A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17, 969-73.
- NEWMAN, R. H., FOSBRINK, M. D. & ZHANG, J. 2011. Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem Rev*, 111, 3614-66.
- NIKOLAEV, V. O., GAMBARYAN, S. & LOHSE, M. J. 2006. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nat Methods*, 3, 23-5.
- OUYANG, M., SUN, J., CHIEN, S. & WANG, Y. 2008. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14353-8.
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G. & CORMIER, M. J. 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-33.
- SAKAI, R., REPUNTE-CANONIGO, V., RAJ, C. D. & KNOPFEL, T. 2001. Design and characterization of a DNA-encoded, voltage-sensitive fluorescent protein. *Eur J Neurosci*, 13, 2314-8.
- SASAKI, K., ITO, T., NISHINO, N., KHOCHBIN, S. & YOSHIDA, M. 2009. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16257-62.
- SHANER, N. C., PATTERSON, G. H. & DAVIDSON, M. W. 2007. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*, 120, 4247-60.
- SHIMOMURA, O. 1979. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.*, 104, 220-222.
- SHIMOMURA, O. 2009. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 5590-602.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-39.
- STRACK, R. L., STRONGIN, D. E., BHATTACHARYYA, D., TAO, W., BERMAN, A., BROXMEYER, H. E., KEENAN, R. J. & GLICK, B. S. 2008. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods*, 5, 955-7.
- TERSKIKH, A., FRADKOV, A., ERMAKOVA, G., ZARAIKY, A., TAN, P., KAJAVA, A. V., ZHAO, X., LUKYANOV, S., MATZ, M., KIM, S., WEISSMAN, I. & SIEBERT, P. 2000. "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science*, 290, 1585-8.
- TRUONG, K., SAWANO, A., MIZUNO, H., HAMA, H., TONG, K. I., MAL, T. K., MIYAWAKI, A. & IKURA, M. 2001. FRET-based in vivo Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Biol*, 8, 1069-73.
- VIOLIN, J. D., ZHANG, J., TSIEN, R. Y. & NEWTON, A. C. 2003. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol*, 161, 899-909.
- XU, X., GERARD, A. L., HUANG, B. C., ANDERSON, D. C., PAYAN, D. G. & LUO, Y. 1998. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 26, 2034-5.