

Lumières sur le vivant

Protéines fluorescentes et senseurs optogénétiques

Fabienne Mérola, Hélène Pasquier et Marie Erard

Résumé

Les protéines fluorescentes dérivées de la protéine fluorescente verte (« green fluorescent protein » ou GFP) ont permis la construction d'un vaste arsenal de senseurs optiques adressables qui jouent un rôle majeur dans l'exploration *in situ* de la chimie du vivant. Ces rapporteurs fluorescents biosynthétisés bénéficient d'une spécificité moléculaire et d'une intégration inégalées dans la machinerie cellulaire ; ils réunissent dans moins de 100 Å les trois fonctions essentielles d'un nanocapteur que sont la fonctionnalisation, la détection chimique et la conversion optique. Les réponses photodynamiques et photochimiques du chromophore porté par les GFP conditionnent directement leurs nombreuses applications et leurs performances. Grâce aux outils de la mutagenèse, de la spectroscopie et de la modélisation, on comprend mieux aujourd'hui comment les caractéristiques structurales et conformationnelles des GFP modulent ces propriétés optiques : cette approche mécanistique sera plus que jamais essentielle dans l'ingénierie rationnelle de nouvelles sondes pour l'imagerie.

Mots-clés

Protéine fluorescente verte, GFP, biosenseurs, imagerie, FRET, photochromisme, photochimie.

Abstract

Lighting up life: fluorescent proteins and optogenetic sensors

Fluorescent proteins of the green fluorescent protein (GFP) family have given birth to a vast array of targetable optical sensors that play a major role in the deciphering of live cell chemistry. These genetically encoded reporters benefit from unequalled specificity and integration into the cellular machinery, while they gather within less than 100 Å the three essential functions of a nanosensor, namely functionalization, chemical detection, and optical conversion. Their numerous applications and their performances directly stem from the photodynamics and photochemistry of the chromophore carried by GFPs. Owing to mutagenesis, spectroscopy and modeling tools, the way in which the GFP structural and conformational characteristics modulate their optical properties is better understood today. This mechanistic view will become ever more essential in the rational engineering of new probes for bioimaging.

Keywords

Green fluorescent proteins, GFP, biosensors, bioimaging, FRET, photochromism, photochemistry.

GFP et biosenseurs : structure, biosynthèse, diversité

Les protéines fluorescentes dérivées de la protéine fluorescente verte (« green fluorescent protein » ou GFP) ont révolutionné l'imagerie biologique en permettant le marquage fluorescent de protéines et de structures d'intérêt directement en cellule, tissu ou organisme vivant [1]. Grâce à l'universalité du code génétique, ces fluorophores peuvent en effet être introduits sous forme de gènes dans une grande variété d'organismes, où ils sont ensuite traduits, exprimés et éventuellement adressés à des compartiments spécifiques par la machinerie cellulaire elle-même. O. Shimomura, M. Chalfie et R.Y. Tsien ont reçu à ce titre le prix Nobel de chimie en 2008.

Les GFP sont de petites protéines de 240 acides aminés ($\approx 30\,000\text{ g mol}^{-1}$) extraites d'organismes marins et caractérisées par une structure en forme de tonneau constituée de onze brins β (figure 1). Leur chromophore est porté par une hélice α centrale enchâssée au cœur de la protéine. Sa biosynthèse met en jeu la cyclisation autocatalytique d'une

séquence de trois résidus X65-tyrosine66-glycine67 (où X est un acide aminé très variable, tel qu'une glycine, une sérine ou une méthionine...) (figure 2a). Cette biosynthèse ne nécessite que la présence de dioxygène et s'accompagne de la production d'eau oxygénée (une espèce qui peut s'avérer toxique si elle n'est pas éliminée rapidement par les peroxydases cellulaires). Elle conduit à une structure chimique (4-p-hydroxybenzylidène-5-imidazolinone) capable de propriétés d'absorption et d'émission dans le vert, grâce à une délocalisation des électrons s'étendant du cycle imidazolinone à la partie phénol. D'autres réactions autocatalytiques, mais aussi des mutations dans la séquence du chromophore ou dans son environnement immédiat sont à l'origine de la formidable diversité spectrale de ces protéines, qui s'étend de l'ultraviolet au rouge lointain (figure 2b).

Les GFP ont également donné naissance à un vaste arsenal de senseurs codés génétiquement (ou biosenseurs) pour l'analyse spatiotemporelle de la biochimie intracellulaire (figure 3). Il existe ainsi des biosenseurs pour mesurer le pH, détecter des ions, des métabolites et seconds messagers (tels que l'adénosine triphosphate ATP, le glucose ou les

nucléotides cycliques), des neurotransmetteurs ou des hormones, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des phosphoinositides, ou encore pour suivre l'activation de protéines G (qui activent ou inhibent les réactions biochimiques),

d'enzymes et de récepteurs, ou les variations du potentiel transmembranaire [3].

Ces biosenseurs sont l'objet d'une intense activité d'ingénierie, qui vise à adapter leur adressage, leur affinité et

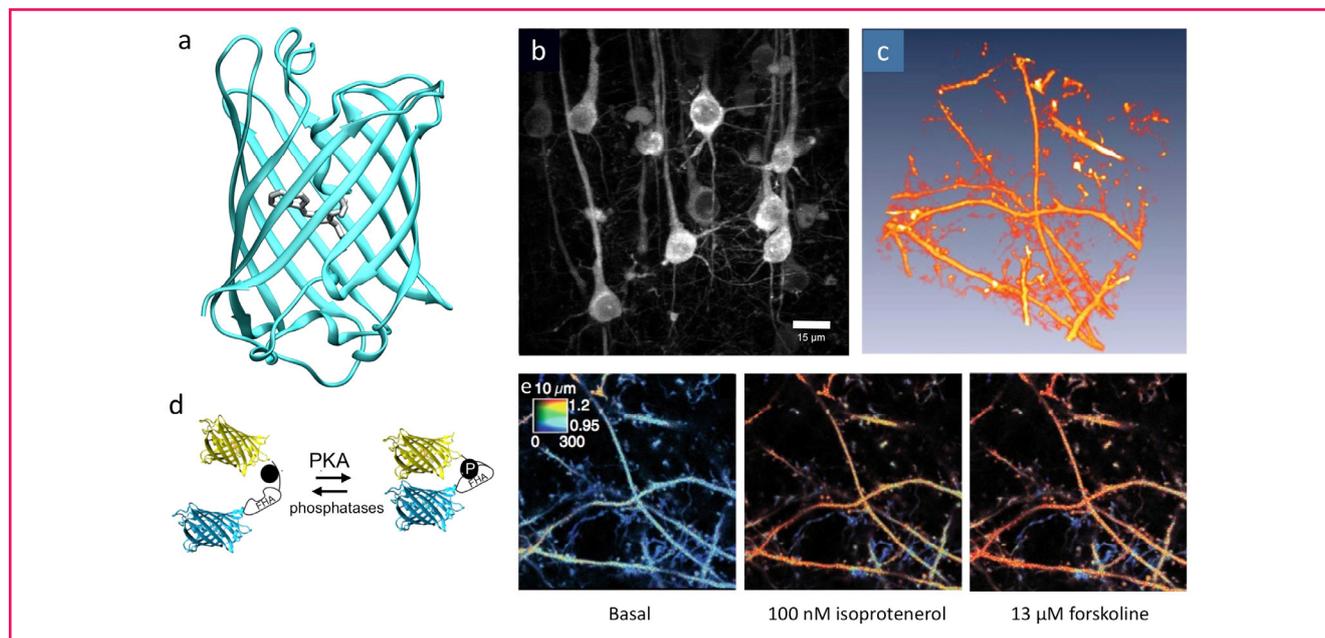


Figure 1 - **Structure et applications des protéines de la famille des GFP.** (a) Structure tridimensionnelle de l'Aquamarine, une protéine fluorescente cyan (CFP), montrant le chromophore enfoui dans la protéine. (b) et (c) Imagerie par microscopie biphotonique de neurones vivants de cortex de souris, exprimant un biosenseur d'activité kinase, AKAR. (c) Détail en 3D de dendrites apicales de ces neurones. (d) Principe de fonctionnement du biosenseur FRET AKAR, porteur d'une CFP et d'une YFP. (e) L'image ratiométrique (codée en fausses couleurs) obtenue à partir des intensités de fluorescence de la CFP et de la YFP et la haute résolution de la microscopie biphotonique donnent accès aux variations d'activité kinase AMPC dépendante jusque dans les dendrites de neurones corticaux *ex vivo* : l'isoprotenerol active les récepteurs β -adrénergiques ; la forskoline active directement la production d'AMPC. Reproduit avec autorisation de [2].

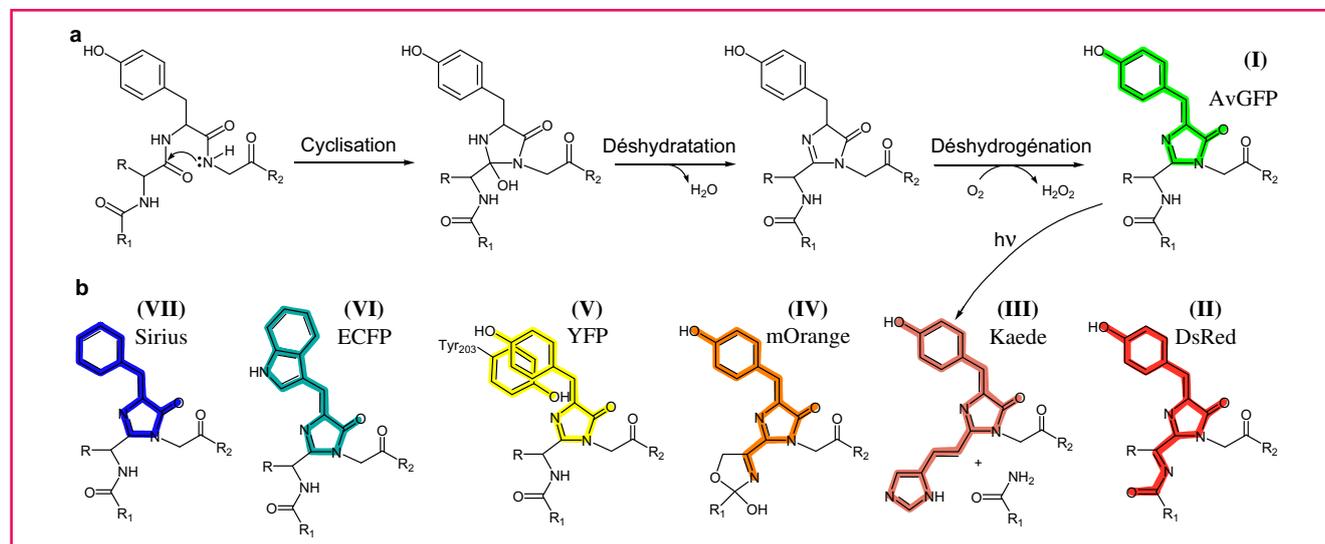


Figure 2 - **Biosynthèse et diversité structurale et spectrale du chromophore des GFP.** (a) Biosynthèse des chromophores émettant dans le vert comme la GFP d'*Aequorea victoria* (AvGFP) (I) : l'étape initiale de cyclisation implique l'attaque nucléophile de l'azote de l'amide de Gly67 sur le carbone électrophile du carbonyle du résidu 65 (petite flèche), catalysée par deux résidus strictement conservés, Arg96 et Glu222. (b) Quelques variants spectraux résultant de réactions auto-catalytiques ou de la mutagenèse de formes vertes : une déshydrogénation supplémentaire de la liaison C α -N du résidu 65 allongeant la délocalisation des électrons d'un groupe acylimine génère des protéines émettant dans le rouge comme la DsRed du corail *Discosoma* (II). L'illumination UV du précurseur vert de protéines photoconvertibles porteuses d'une histidine en position 65, comme Kaede, conduit à une autre forme rouge accompagnée d'une rupture de la chaîne peptidique (III). L'ingénierie de la DsRed a produit de nombreux variants spectraux tels que la mOrange (IV). L'environnement local peut également modifier les propriétés spectrales d'un chromophore de type I, comme dans le cas de la protéine fluorescente jaune YFP (V), qui dérive sa couleur d'une interaction π - π avec la tyrosine 203. Bien que systématiquement présente dans les protéines fluorescentes naturelles, la tyrosine au cœur du chromophore n'est pas essentielle pour sa biosynthèse : son remplacement par d'autres résidus aromatiques, un tryptophane dans la CFP (VI), ou une phénylalanine dans Sirius (VII), conduisent à des variants respectivement cyan et bleu.

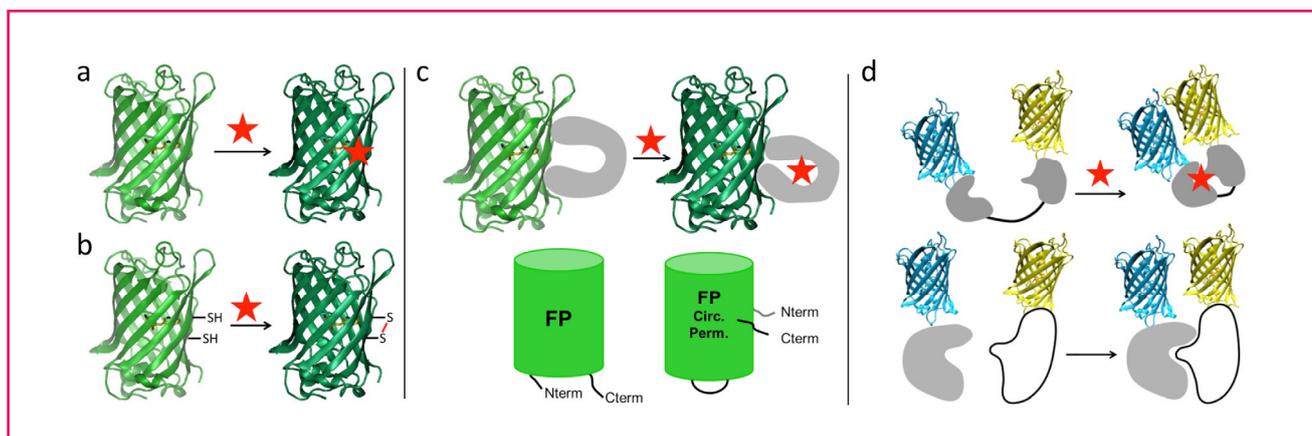


Figure 3 - **Architecture et fonctionnement des biosenseurs codés génétiquement.** (a) Des ions ou des petites molécules comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) modifient directement le signal de fluorescence de certaines GFP en perturbant leurs propriétés d'absorption ou d'émission. (b) La mutation de quelques acides aminés de surface peut rendre une protéine fluorescente sensible au potentiel redox (cystéines) ou à la chélation d'ions métalliques (histidines). (c) Un domaine senseur capable de répondre par des changements conformationnels à la liaison de substrats (ex : calcium, H_2O_2 , ATP, GMPc...) peut être greffé sur une protéine fluorescente circulairement perméée dont les extrémités de la séquence ont été amenées à proximité du chromophore. (d) Le FRET entre deux protéines fluorescentes permet de détecter les changements de conformation dans des biosenseurs multimodulaires, mais aussi de suivre les interactions protéine-protéine. Une grande majorité des biosenseurs FRET porte un couple de protéines cyan (CFP) et jaune (YFP).

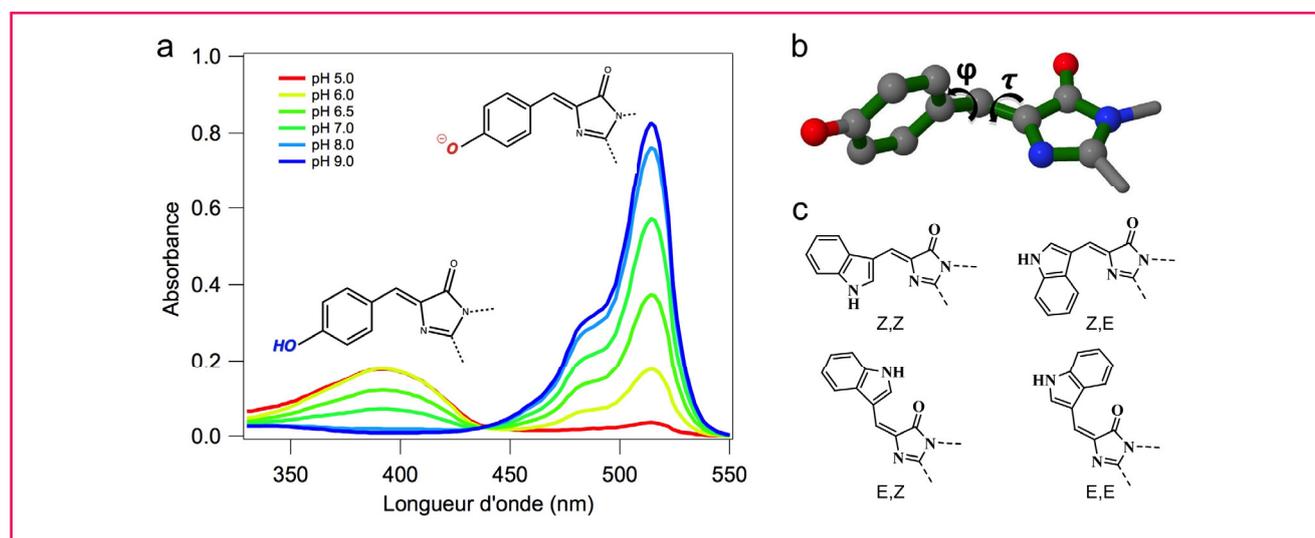


Figure 4 - **États de protonation, torsions et isomères du chromophore des GFP.** (a) Influence de l'équilibre de protonation sur les spectres d'absorption des GFP : exemple de la EYFP. (b) Angles de torsion des chromophores GFP autour des deux liaisons de leur pont éthylénique central. (c) Multiples isomères du chromophore de la CFP : pour des raisons stériques, l'isomère E,E est probablement très peu peuplé à température ambiante [14].

leurs cinétiques de réponse aux processus d'intérêt, à améliorer leur spécificité ou leur sensibilité, ou à adapter leurs performances à de nouvelles modalités d'imagerie. Le fonctionnement des biosenseurs repose sur une grande variété d'architectures (figure 3). Alors que nombre d'entre eux sont basés sur le principe du transfert résonant d'énergie de Förster (FRET), qui met en jeu un couple de protéines fluorescentes spectralement adaptées, d'autres utilisent la réponse photophysique directe d'une protéine fluorescente à des perturbations structurales ou environnementales. Le succès des protéines et biosenseurs fluorescents doit beaucoup à la remarquable plasticité photophysique des GFP, qui découle d'un petit nombre de mécanismes élémentaires impliquant leur chromophore dans son état fondamental ou excité, tels que transfert d'électron ou de proton et isomérisation *cis-trans*, ainsi que de réactions photochimiques hautement sélectives.

La protonation du chromophore et les mille et une façons de la moduler

Les chromophores GFP porteurs d'un noyau phénol peuvent exister dans un état neutre ou anionique, associés à des spectres d'absorption et d'émission différents (figure 4a). Le pH, ainsi que le réseau local d'interactions avec la protéine vont stabiliser l'une ou l'autre de ces formes et, dans certains cas, favoriser un transfert de proton à l'état excité [4]. Grâce aux modifications spectrales qui accompagnent ces changements de protonation, les GFP sont tout d'abord d'excellents senseurs du pH intracellulaire, avec des pK compris entre 6,2 et 8,5 suivant les variants [3]. Dans certains variants comme la YFP (« yellow fluorescent protein ») (forme V, figure 2b), la cavité du chromophore peut accueillir un anion monovalent de petite taille, dont la charge va influencer l'état

de protonation du chromophore, donnant des senseurs du chlorure et autres halogénures [3].

Des perturbations conformationnelles dans la GFP sont également susceptibles de moduler cet équilibre de protonation, qui pourra alors être couplé à la détection d'entités chimiques de toutes natures. Par exemple, les roGFP (« redox sensitive GFP ») sont des senseurs redox générés en introduisant deux cystéines exposées en surface, à proximité de la poche du chromophore [3]. Divers senseurs de métaux de transition ont été construits en créant des cavités de liaison internes, ou en introduisant des groupements chélatants en surface de la protéine [5]. Des domaines protéiques de grande taille, apportant des fonctions de reconnaissance plus complexes, peuvent être greffés sur les extrémités Nter et Cter de la GFP. Un décalage de la séquence par permutation circulaire est souvent opéré, afin d'amener ces extrémités à proximité du chromophore. Ainsi, des senseurs de calcium GCaMP ont été obtenus par greffage de la calmoduline et du peptide M13 de la myosine sur une cpGFP (« circularly permuted GFP ») [3]. De très nombreux senseurs fonctionnent ainsi sur la base des changements de protonation du chromophore de la GFP et des perturbations spectrales qui y sont associées.

Torsions du chromophore à l'état excité

L'excitation électronique du chromophore des GFP conduit à une perte de conjugaison au niveau du pont éthylénique exocyclique, favorisant des torsions très rapides (picoseconde) entre ses deux cycles (*figure 4b*). Dans le chromophore isolé, ces torsions sont à l'origine d'une désactivation non radiative très efficace par conversion interne, conduisant à une quasi-absence d'émission de fluorescence à température ambiante [6]. Dans une protéine fluorescente telle que la EGFP (« enhanced GFP », ou S65T-AvGFP), des simulations de dynamique moléculaire ont montré que des torsions importantes du chromophore excité peuvent se produire, sur une échelle de temps de quelques nanosecondes, et donc entrer en compétition avec son émission de fluorescence [7]. L'intensité de fluorescence émise par une GFP sera ainsi fortement tributaire de sa capacité à empêcher ces torsions à l'état excité.

Sur le plan expérimental, le rôle critique de la flexibilité et de la dynamique conformationnelle des protéines fluorescentes a été particulièrement bien mis en évidence dans le cas des CFP (« cyan fluorescent protein », forme VI, *figure 2b*). Ainsi, la ECFP (« enhanced cyan fluorescent protein »), encore aujourd'hui très utilisée comme donneur en imagerie FRET, présente non seulement un rendement quantique de fluorescence médiocre ($\Phi_f = 0,4$) assorti d'une photophysique complexe (déclins et spectres de fluorescence hétérogènes), mais également une forte sensibilité environnementale : une variation de température, un changement de pH, des réactions photochimiques ou l'oxydation sélective de quelques acides aminés situés à plus de 8 Å du chromophore vont modifier sa durée de vie de fluorescence en impactant vraisemblablement la rigidité de la protéine [8-10].

Alors que le chromophore des CFP ne porte pas de groupement protonable (*figure 2*), nous avons montré que le pH joue sur des équilibres entre états conformationnels de durées de vie de fluorescence distinctes, permettant à la ECFP d'être un excellent senseur de pH intracellulaire par imagerie FLIM (« fluorescence lifetime imaging microscopy ») [11]. La mutation d'un ou deux résidus clés contrôlant la flexibilité du chromophore permet d'un côté de générer des

variants cyan de durées de vie très différentes, utilisables pour faire du multimarquage intracellulaire par FLIM [12], mais peut tout aussi bien conduire, lorsqu'elles restaurent une rigidité maximum du chromophore, à des formes de rendement quantique proche de l'unité et insensibles à l'environnement, comme la protéine cyan Aquamarine [13] (*figure 1*). En introduisant les deux mutations clés de l'Aquamarine (T65S, H148G), il est possible aujourd'hui d'équiper les nombreux biosenseurs FRET porteurs d'une CFP avec un donneur spectralement identique, mais beaucoup plus brillant et robuste.

Photochromisme et photochimie des GFP

En favorisant les torsions du chromophore des GFP, l'interaction avec la lumière permet également son passage d'un diastéréoisomère à l'autre (*figure 4c*). À l'obscurité, le retour à l'isomère d'équilibre prend quelques heures, voire quelques jours pour le chromophore isolé, mais cette réaction retour peut être, elle aussi, photoactivée [14]. On sait aujourd'hui que les mêmes mécanismes interviennent dans les protéines fluorescentes, où la photoisomérisation du chromophore a pu être démontrée dans certains cas par radiocristallographie [15]. Cependant, dans les GFP, ces différents isomères peuvent être stabilisés, suivant leur environnement protéique local, dans des états respectifs de protonation et/ou de rigidité distincts, ce qui va conduire à nouveau à d'importantes modifications de forme ou d'intensité de leurs spectres d'absorption [16] ou de fluorescence [17]. Dans les protéines fluorescentes dites « photocommutables », ce photochromisme peut être déclenché à certaines longueurs d'onde avec des rendements élevés. Ceci permet alors d'allumer ou d'éteindre leur signal de fluorescence ou d'en changer la couleur de façon répétée à l'aide d'intensités lumineuses modérées (quelques W/cm^2), et donc pratiquement sans « photofatigue », c'est-à-dire avec un niveau négligeable de photochimie irréversible.

Sous illumination intense ou prolongée, les protéines fluorescentes vont en effet subir des modifications covalentes irréversibles. Ici encore, l'environnement protéique du chromophore conditionne des mécanismes réactionnels très particuliers et sélectifs. Ainsi, il existe des variants naturellement photoconvertibles, tels que Kaede (extraite du corail *Trachyphyllia*) ou EosFP (extraite du corail *Lobophyllia*), capables de se transformer sous illumination d'une forme verte à une forme rouge, par β -élimination suivie d'une rupture de la chaîne polypeptidique (forme III, *figure 2b*). Dans de nombreuses GFP, l'irradiation UV déclenche un transfert d'électron suivi d'une décarboxylation de l'acide glutamique 222 voisin, par un mécanisme de Kolbe [18]. Dans certains variants dits « photoactivables » tels que la PA-GFP (« photoactivable GFP »), ceci peut conduire à une exaltation du signal de fluorescence, par stabilisation de la forme anionique fluorescente du chromophore [19].

Dans les GFP comme dans tous les fluorophores organiques, le stade ultime de ces diverses photoréactions est la disparition irréversible du signal de fluorescence ou « photoblanchiment ». Les mécanismes du photoblanchiment et leurs conséquences moléculaires dans les GFP sont encore très mal connus. Ils impliquent une multiplicité de voies et d'intermédiaires dont les efficacités et les populations vont dépendre de l'intensité et du régime temporel d'excitation, ainsi que de la composition du milieu. Ainsi, sous faible illumination stationnaire en microscopie plein champ ($0,2 W/cm^2$),

l'intensité de fluorescence des CFP décroît plus rapidement que leur durée de vie, témoignant de la formation simultanée d'espèces peu fluorescentes et d'espèces « noires » ne contribuant plus au signal de fluorescence [13]. Dans des cristaux d'IrisFP (un mutant photocommutable de EosFP), deux régimes de photoblanchiment ont été mis en évidence [20] : sous excitation lumineuse intense (100 W/cm^2), la décarboxylation du glutamate proximal s'accompagne de la réduction et du changement d'hybridation de sp^2 à sp^3 du carbone central du pont éthylénique du chromophore. Sous illumination plus modérée (10 W/cm^2), un mécanisme dépendant de l'oxygène domine : l'oxygène singulet formé par interaction avec l'état triplet du chromophore va réagir avec des résidus voisins, telle la méthionine 159 qui est transformée en méthionine sulfoxyde, ce qui entraîne la stabilisation d'une forme neutre et non fluorescente du chromophore. Si l'oxygène singulet ou les autres espèces primaires réactives générées par le chromophore excité diffusent hors de la protéine, ils seront responsables de phototoxicité : c'est le principe du fonctionnement des GFP développées comme photosensibilisateurs, telles que la protéine KillerRed [21].

Applications et inconvénients des photoréactions des GFP

Les photoréactions réversibles ou irréversibles des GFP ont de nombreuses applications en imagerie biologique. La PA-GFP et ses analogues permettent des expériences d'imagerie dynamique analogues au FRAP (« fluorescence recovery after photobleaching »), dans lesquelles le devenir de protéines d'intérêt marquées par des GFP préalablement photoactivées dans une sous-région cellulaire est suivi au cours du temps [19]. Les capacités de phototransformation des GFP ont aussi été décisives dans le succès des techniques de super-résolution [22] (voir aussi l'article de N. Bourg *et coll.* dans ce numéro [23]).

Ainsi, les protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles ont tout d'abord permis le développement en biologie des microscopies PALM (« photoactivated localization microscopy »), dans lesquelles des molécules fluorescentes uniques sont successivement photoactivées, localisées, puis blanchies. D'un autre côté, la photocommutation réversible des protéines fluorescentes a été utilisée pour réaliser à bas niveau de lumière le confinement optique du volume observé dans les techniques de super-résolution à balayage laser de type RESOLFT (« reversible saturable optical linear fluorescence transition »). Cette même photocommutation réversible va permettre de combiner l'imagerie à super-résolution avec la microscopie plein champ, par des techniques comme le pcSOFI, basées sur les fluctuations d'émission des fluorophores [24]. Enfin, elle ouvre la voie à la quantification dynamique du FRET *in situ*, par la modulation contrôlée de l'absorbance de l'accepteur [25].

La maîtrise des photoréactions des GFP est donc cruciale en imagerie de fluorescence, qu'il s'agisse de vidéomicroscopie nécessitant de longs temps d'acquisition, pour l'observation de signaux peu intenses (études sur molécules uniques ou impliquant des niveaux d'expression proches des conditions endogènes), ou lorsqu'on doit utiliser des conditions drastiques d'illumination, en microscopie à balayage laser par exemple (kW/cm^2). La résolution ultime de techniques comme le RESOLFT ou le pcSOFI est directement liée au nombre maximum de cycles d'observation « on-off » des protéines photocommutables utilisable avant que la photofatigue intervienne. *A contrario*, le FRAP ou le PALM

constituent des exploitations « positives » du photoblanchiment et de la photoconversion, mais sont compliqués par l'existence de mécanismes retour liés à la photocommutation réversible [17, 26].

Avenir des senseurs optogénétiques

Vingt ans après l'article pionnier de Martin Chalfie et ses collaborateurs dans la revue *Science* [1], les protéines fluorescentes et les biosenseurs codés génétiquement ont permis un développement spectaculaire des techniques d'imagerie de fluorescence en milieu vivant, qui ont largement contribué au renouveau ou à l'émergence de domaines entiers de recherche tels que la biologie du développement ou la biologie des systèmes. À l'avenir, la progression des connaissances fondamentales sur la photophysique et la photochimie des protéines fluorescentes sera plus que jamais nécessaire. Alors que l'on comprend bien aujourd'hui les mécanismes de conversion interne qui contrôlent le rendement quantique des GFP, il serait utile de trouver des pistes pour augmenter leur section efficace d'absorption, stabiliser à volonté des isomères ou des états de protonation bien définis de leur chromophore, ou encore améliorer leur photorésistance. Ceci permettrait de disposer de variants répondant pleinement aux exigences de techniques aussi différentes que la vidéomicroscopie FRET, la microscopie multiphotonique *in vivo* ou les imageries à super-résolution.

Les prochaines années verront sans doute la convergence de ces outils d'imagerie avec d'autres technologies avancées telles que la chimie bioorthogonale (techniques de marquages chimiques pouvant être réalisés *in cellulo* sans interférer avec l'activité biologique) [27], les nouvelles méthodes de transgénèse (intégration de gènes exogènes) et d'édition génique (modification à façon des gènes existants) [28], ou encore les actuateurs optogénétiques, utilisant les propriétés de photoactivation naturelle de certaines protéines pour intervenir sur les processus cellulaires de façon contrôlée dans le temps et l'espace [29]. Grâce aux techniques de fusion de gène, ces diverses avancées ouvrent la voie à la mise au point de nanoplateformes protéiques modulaires et multifonctionnelles, pouvant être ensuite manipulées et imagées suivant différentes modalités (par exemple, à la fois optique et magnétique). Ces constructions protéiques, spécifiquement adressées et exprimées *in vivo* sous le contrôle de promoteurs endogènes, permettront non seulement de déchiffrer dans leur détail spatiotemporel, mais aussi de moduler l'ensemble des processus moléculaires à l'œuvre en physiologie et physiopathologie, par exemple au cours de la progression tumorale [30]. Dans cette perspective, la contribution du chimiste et du photochimiste sera cruciale pour l'ingénierie de rapporteurs et d'actuateurs optiques à la fois performants et parfaitement intégrés dans leur environnement biologique.

Références

- [1] Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, **1994**, 263, p. 802.
- [2] Polito M., Vincent P., Guiot E., Biosensor imaging in brain slice preparations, In *Methods Mol. Biol.*, J. Zhang, Q. Ni, R.H. Newman (eds), **2014**, 1071, p. 175.
- [3] Newman R.H., Fosbrink M.D., Zhang J., Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, p. 3614.
- [4] Chatteraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G., Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, 93, p. 8362.

- [5] Vinkenborg J.L., Koay M.S., Merckx M., Fluorescent imaging of transition metal homeostasis using genetically encoded sensors, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, p. 231.
- [6] Meech S.R., Excited state reactions in fluorescent proteins, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, p. 2922.
- [7] Jonasson G., Teuler J.M., Vallverdu G., Mérola F., Ridard J., Lévy B., Demachy I., Excited state dynamics of the green fluorescent protein at the nanosecond timescale, *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, *7*, p. 1900.
- [8] Berthelot V., Steinmetz V., Alvarez L.A., Houée-Levin C., Mérola F., Rusconi F., Erard M., An analytical workflow for the molecular dissection of irreversibly modified fluorescent proteins, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, p. 8789.
- [9] Tramier M., Zahid M., Mevel J.-C., Masse M.-J., Coppey-Moisan M., Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells, *Microsc. Res. Tech.*, **2006**, *69*, p. 933.
- [10] Villioing A., Ridhoir M., Cinquin B., Erard M., Alvarez L., Vallverdu G., Pernot P., Grailhe R., Mérola F., Pasquier H., Complex fluorescence of the cyan fluorescent protein: comparisons with the H148D variant and consequences for quantitative cell imaging, *Biochemistry*, **2008**, *47*, p. 12483.
- [11] Poes-Guyon S., Ammar M.R., Erard M., Amar M., Moreau A.W., Fossier P., Gleize V., Vitale N., Morel N., The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery, *J. Cell Biol.*, **2013**, *203*, p. 283.
- [12] Kim J., Kwon D., Lee J., Pasquier H., Grailhe R., The use of cyan fluorescent protein variants with a distinctive lifetime signature, *Mol. Biosyst.*, **2009**, *5*, p. 151.
- [13] Erard M., Fredj A., Pasquier H., Betolngar D.-B., Bousmah Y., Derrien V., Vincent P., Mérola F., Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging, *Mol. Biosyst.*, **2013**, *8*, p. 258.
- [14] Voliani V., Bizzarri R., Nifosi R., Abbruzzetti S., Grandi E., Viappiani C., Beltram F., Cis-trans photoisomerization of fluorescent-protein chromophores, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, p. 10714.
- [15] Brakemann T., Weber G., Andresen M., Groenhof G., Stiel A.C., Trowitzsch S., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Wahl M.C., Jakobs S., Molecular basis of the light-driven switching of the photochromic fluorescent protein pEYFP, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, p. 14603.
- [16] Ando R., Mizuno H., Miyawaki A., Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting, *Science*, **2004**, *306*, p. 1370.
- [17] Sinnecker D., Voigt P., Hellwig N., Schaefer M., Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins, *Biochemistry*, **2005**, *44*, p. 7085.
- [18] Van Thor J.J., Gensch T., Hellingwerf K.J., Johnson L.N., Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222, *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, *9*, p. 37.
- [19] Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J., A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells, *Science*, **2002**, *297*, p. 1873.
- [20] Duan C., Adam V., Byrdin M., Ridard J., Kieffer-Jaquinod S., Morlot C., Arcizet D., Demachy I., Bourgeois D., Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, p. 15841.
- [21] Wojtovich A.P., Foster T.H., Optogenetic control of ROS production, *Redox Biol.*, **2014**, *2*, p. 368.
- [22] Nienhaus K., Nienhaus G.U., Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, p. 1088.
- [23] Bourg N., Sivankutty S., Dupuis G., Levêque-Fort S., De la microscopie à la nanoscopie de fluorescence, *L'Act. Chim.*, **2015**, *397-398*, p. 35.
- [24] Dedecker P., Mo G.C.H., Dertinger T., Zhang J., Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2012**, *109*, p. 10909.
- [25] Subach F.V., Zhang L., Gadella T.W.J., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Verkhusha V.V., Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET, *Chem. Biol.*, **2010**, *17*, p. 745.
- [26] Durisic N., Cuervo L.L., Lakadamyali M., Quantitative super-resolution microscopy: pitfalls and strategies for image analysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, *20*, p. 22.
- [27] Dean K.M., Palmer A.E., Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, p. 512.
- [28] Gersbach C.A., Genome engineering: the next genomic revolution, *Nat. Methods*, **2014**, *11*, p. 1009.
- [29] Shui B., Lee J.C., Reining S., Lee F.K., Kotlikoff M.I., Optogenetic sensors and effectors: CHROMus at the Cornell Heart Lung Blood Institute Resource for Optogenetic Mouse Signaling, *Front. Physiol.*, **2014**, *5*, p. 428.
- [30] Conway J.R.W., Carragher N.O., Timpson P., Developments in preclinical cancer imaging: innovating the discovery of therapeutics, *Nat. Rev. Cancer*, **2014**, *14*, p. 314.



F. Mérola



H. Pasquier



M. Erard

Fabienne Mérola est directrice de recherche au CNRS, **Hélène Pasquier**, maître de conférences à l'IUT d'Orsay, et **Marie Erard**, maître de conférences à l'UFR des Sciences d'Orsay. Elles font partie de l'équipe de Photobiologie, au sein du groupe de Biophysique du Laboratoire de Chimie Physique*.

* Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000 CNRS, Université Paris-Sud, Bât. 349, F-91405 Orsay.
Courriels : fabienne.merola@u-psud.fr ;
helene.pasquier@u-psud.fr ; marie.erard@u-psud.fr

depuis 1988,
l'expérience
au service
de l'édition.

nous organisons
votre communication

- éditeur conseil
- régie publicitaire
- événements professionnels
- ...

RÉGISSEUR
DE
L'ACTUALITÉ
CHIMIQUE

la gratuité de
vos ouvrages

un studio de
design intégré

maquette, mise en page,
fabrication, impression,
édition, routage...

edif
les éditions d'orsay

102 av Georges Clemenceau 94700 Maisons-Alfort
TEL : 01 43 53 64 00 - FAX : 01 43 53 48 00
edition@edif.fr - www.edif.fr