

## Espionner les cellules avec des hybrides chémogénétiques

**Résumé** Les cellules et les organismes sont des machines complexes régulées par un ensemble d'événements dynamiques étroitement orchestrés dans l'espace et le temps. Notre compréhension de leur fonctionnement interne est intimement liée à notre capacité à observer comment leurs constituants s'organisent et interagissent. La microscopie optique permet d'observer le vivant à l'échelle submicrométrique. Le développement de marqueurs fluorescents performants rend possible de suivre de nos jours la dynamique des biomolécules avec une résolution spatio-temporelle sans précédent. Cet article présente comment la chimie et la biologie peuvent s'allier pour développer des marqueurs de nouvelle génération qui repoussent les limites de l'imagerie biologique.

**Mots-clés** Chémobiologie, fluorescence, bioimagerie, marqueurs fluorogéniques.

**Abstract** Spying on cells with chemical-genetic hybrids

Cells and organisms are complex machines regulated by a set of dynamic events orchestrated in space and time. Our understanding of their inner workings is intimately linked to our ability to observe how their constituents organize and interact. Optical microscopy allows to observe living systems at submicrometric scale. The development of high-performance fluorescent markers makes possible nowadays to monitor the dynamics of biomolecules with an unprecedented spatial and temporal resolution. This article presents how chemistry and biology can team up to develop next-generation markers that push the boundaries of biological imaging.

**Keywords** Chemical biology, fluorescence, bioimaging, fluorogenic markers.

### Voir ne suffit pas, il faut observer et suivre

Nous analysons la plupart des informations du monde qui nous entoure grâce à nos yeux. Cette perception directe de phénomènes trouve un prolongement naturel dans le domaine des sciences expérimentales. Au cœur de la pratique scientifique et de la construction de la connaissance, l'observation permet de découvrir de nouveaux phénomènes, de valider ou d'invalidier une théorie. L'invention d'instruments d'observation comme le télescope ou le microscope a révolutionné notre façon de voir le monde, nous permettant d'accéder à des éléments invisibles à l'œil nu. La microscopie optique nous permet par exemple de voir une cellule en activité, d'observer sa croissance, ses mouvements. Voir l'infiniment petit est cependant insuffisant pour comprendre des processus biologiques spécifiques tels que l'expression des gènes, la signalisation cellulaire ou l'activation des neurones. Comprendre de tels processus nécessite de voir également les acteurs impliqués – les molécules, les ions – et d'observer comment ils s'organisent et interagissent ensemble au sein des cellules et des tissus. Cette tâche n'est cependant pas simple : une cellule contient plusieurs millions de composés, certains de compositions chimiques similaires (par exemple les protéines ou les acides nucléiques), ce qui complique l'observation d'une molécule donnée. Ce défi analytique est de plus accentué par le fait que la plupart des composés biologiques sont présents à des concentrations physiologiques faibles (nM,  $\mu$ M).

Pour suivre une cible à distance, on emploie souvent un dispositif externe capable d'émettre un signal ; on peut citer comme exemples les traceurs GPS, qui utilisent des ondes radio pour suivre les animaux migrateurs, ou les balises Argos, qui utilisent des ondes acoustiques pour la surveillance environnementale. Les biologistes se servent d'une stratégie similaire pour suivre une molécule donnée au sein d'une cellule ou d'un organisme. Ils couplent leur molécule cible à un marqueur fluorescent, qui joue le rôle de « traceur » ou « sonde

moléculaire » ; le signal de fluorescence donne alors une information sur la distribution de la molécule, sa quantité et sa localisation. La fluorescence, c'est-à-dire l'émission de lumière par une substance ayant absorbé de la lumière, est l'un des phénomènes physiques les plus utilisés en imagerie biologique. Le succès de la fluorescence comme observable en biologie vient de la haute sensibilité de la microscopie de fluorescence et des techniques fluorimétriques. De plus, la fluorescence est un phénomène rare dans le vivant : très peu de molécules y sont fluorescentes, facilitant la détection sélective de marqueurs fluorescents. La microscopie de fluorescence est devenue incontournable en biologie, que cela soit pour étudier des questions majeures en immunologie ou en biologie du cancer, ou pour comprendre le développement d'un embryon ou le fonctionnement du cerveau.

Le succès de l'imagerie par fluorescence s'explique aussi par le développement de méthodes capables de rendre fluorescents les tissus, les cellules, les organites et les molécules de manière sélective [1]. La révolution dans ce domaine a été sans conteste la découverte et le développement de la protéine fluorescente verte GFP (de l'anglais « green fluorescent protein ») [2]. Issue de la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*, cette protéine intrinsèquement fluorescente émet une lumière verte lorsqu'elle est excitée avec une lumière bleue. Les techniques de biologie moléculaire modernes permettent de recombiner le gène de la GFP avec un gène d'intérêt. Ce gène dit « de fusion » code pour une protéine artificielle portant maintenant un domaine GFP fluorescent (figure 1). L'encodage génétique assure une spécificité de marquage absolue : seule la protéine fusionnée à GFP fluoresce. Il existe de nos jours des protéines fluorescentes bleues, cyan, vertes, jaunes, orange et rouges, permettant de marquer plusieurs cibles dans un même échantillon et de les distinguer grâce à leurs propriétés spectrales distinctes [3]. Essentielles pour le développement de l'imagerie multi-couleur, ces protéines fluorescentes ont également permis le développement de biosenseurs capables de mesurer la concentration d'analytes

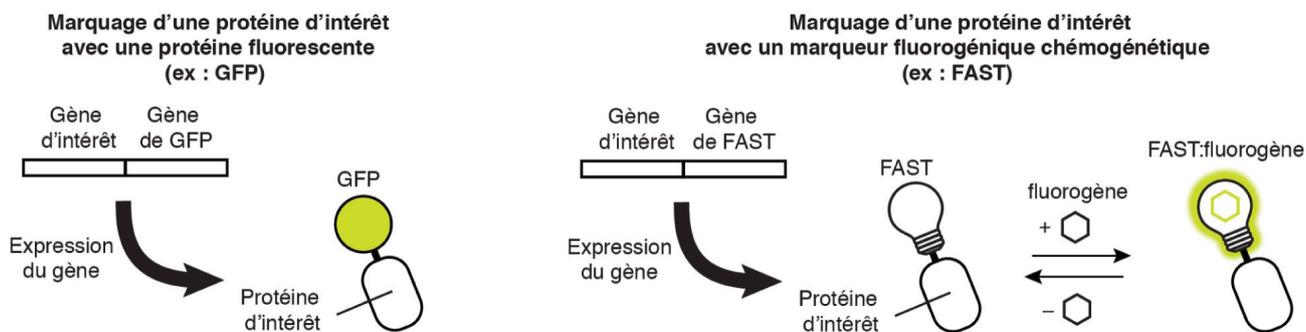


Figure 1 - Les protéines cellulaires sont classiquement visualisées par fusion à une protéine fluorescente. Une approche alternative récemment développée consiste à fusionner génétiquement la protéine d'intérêt à un protéique capable d'activer la fluorescence d'un fluorogène synthétique exogène.

intracellulaires ou l'activité d'enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire [4]. L'importance des protéines fluorescentes pour les sciences de la vie a été reconnue par l'attribution du prix Nobel de chimie 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien pour la découverte et le développement de la protéine fluorescente verte GFP.

Le succès des protéines fluorescentes et leur très large utilisation ont cependant mis en évidence certaines de leurs limites. Ces protéines sont par exemple faiblement fluorescentes dans un environnement pauvre en dioxygène ; la maturation de leur chromophore, qui implique la cyclisation, la déshydratation et l'oxydation d'un triplet d'acides aminés (Ser-Tyr-Gly en position 65-67 dans la GFP), dépend strictement de la présence de dioxygène comme cofacteur pour l'étape d'oxydation. Cette dépendance stricte empêche l'utilisation des protéines fluorescentes dans des conditions anaérobiques. Une autre restriction est liée à la maturation lente de leur chromophore : les protéines fluorescentes acquièrent leur fluorescence plusieurs dizaines de minutes (voire plusieurs heures) après leur synthèse et repliement, ce qui empêche, par exemple, de suivre par fluorescence la synthèse d'une protéine en temps réel. Leur taille (25-30 kDa) et leur tendance naturelle à oligomériser conduisent également dans certains cas à des protéines de fusion dysfonctionnelles. Enfin, certaines protéines fluorescentes présentent des propriétés photophysiques/photochimiques complexes qui compliquent l'interprétation quantitative de certaines expériences.

### Un tag chémogénétique comme espion alternatif

L'importance croissante de l'imagerie en biologie a motivé ces dernières années les chimistes et les biologistes à considérer l'utilisation de sondes moléculaires synthétiques pour l'imagerie cellulaire et *in vivo*. La diversité moléculaire offerte par la chimie moderne permet d'envisager de nouvelles façons d'interroger les systèmes biologiques de manière quantitative et contrôlée. Étant donné le nombre de protéines différentes dans une cellule, marquer sélectivement une protéine donnée avec un fluorophore synthétique reste cependant difficile et non trivial. Les méthodes de marquage sélectif reposent sur une approche hybride « chémogénétique » : un domaine peptidique ou protéique, appelé « tag », est fusionné génétiquement à une protéine d'intérêt et joue le rôle de point d'ancrage pour accrocher une sonde fluorescente synthétique [5-6]. Dans ce cas, la sélectivité résulte de l'encodage génétique du tag et de la spécificité unique avec laquelle une protéine reconnaît un ligand. Une paire « tag-chromophore » idéale comprend un tag fonctionnel dans divers compartiments cellulaires et un chromophore bioorthogonal. Un

moyen d'éviter tout signal de fluorescence aspécifique est d'utiliser des chromophores qui ne fluorescent que lorsqu'ils sont associés à leur tag complémentaire (figure 1) [7-9]. De tels chromophores fluorogéniques (appelés aussi fluorogènes) permettent d'obtenir un bon contraste, même lorsqu'ils sont présents en excès.

Ce principe générique nous a récemment permis de développer une méthode de marquage alternative à l'utilisation des protéines fluorescentes classiques. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un petit tag protéique monomère de 14 kDa, appelé FAST (« Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag »), qui s'associe sélectivement à des fluorogènes dérivés du 4-hydroxybenzylidène rhodanine (HBR) (figure 2A) [10]. La fluorogénicité des analogues de HBR provient de leur structure « push-pull » composée d'un phénol donneur d'électrons conjugué à un hétérocycle rhodanine électroattracteur. En solution, ces fluorogènes ne fluorescent pas ; ils dissipent l'énergie lumineuse de manière non radiative par rotation interne ou isomérisation *cis-trans*. L'immobilisation du fluorogène lors de l'association avec FAST augmente le rendement quantique de la fluorescence par ralentissement de ces processus non radiatifs (figure 2B). Lors de l'association, le fluorogène subit également un déplacement vers le rouge de sa bande d'absorption liée à la déprotonation du phénol (figure 2B). Comme le fluorogène libre n'absorbe pas (ou très peu) à la longueur d'onde d'excitation du complexe FAST:fluorogène, ce déplacement spectral exalte la réponse fluorogénique.

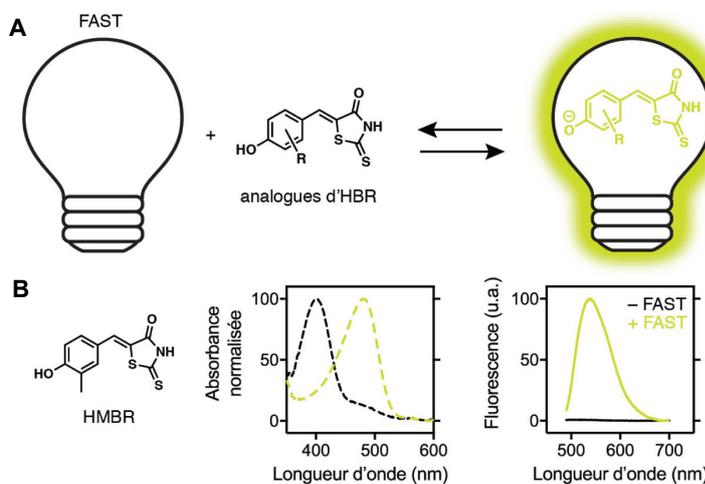


Figure 2 - FAST : un hybride chémogénétique pour l'imagerie biologique. (A) FAST s'associe sélectivement à des fluorogènes dérivés du 4-hydroxybenzylidène rhodanine (HBR) et active leur fluorescence. (B) Spectres d'absorption et d'émission du 4-hydroxy-3-méthylbenzylidène rhodanine (HMBR) en absence (noir) et en présence (vert) de FAST.

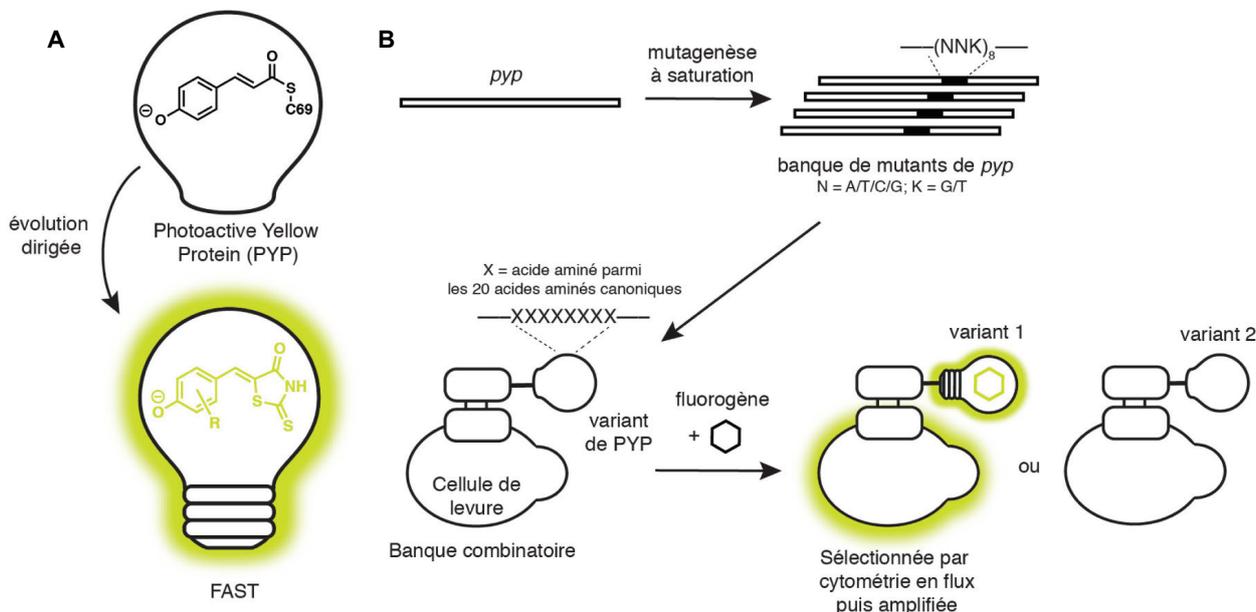


Figure 3 - (A) FAST est un variant de la protéine PYP (« photoactive yellow protein ») obtenu par évolution dirigée. (B) Des variants de PYP sont exprimés à la surface de cellules de levure. Chaque cellule de la banque exprime un variant unique (10 000 à 100 000 copies par cellule). La diversité de la banque est typiquement de l'ordre de dix à cent millions de clones différents. Les cellules fluorescentes en présence du fluorogène sont triées par cytométrie en flux, puis amplifiées. Des cycles itératifs de tri et d'amplification permettent d'enrichir la population en cellules exprimant des variants d'intérêt. Le séquençage de l'ADN de ces cellules permet ensuite d'obtenir la séquence des variants sélectionnés.

Pour développer FAST, nous avons recherché une protéine capable de s'associer de manière sélective avec des analogues de HBR. FAST est dérivé de la protéine photoactive jaune (PYP, « photoactive yellow protein »), un photorécepteur naturel présent chez *Halorhodospira halophila*, une bactérie anaérobie, halophile et phototrophe vivant dans des milieux hypersalins (figure 3A) [11]. Ce photorécepteur réagit à la lumière bleue grâce à la présence d'une molécule d'acide para-hydroxycinnamique attachée au résidu cystéine 69 via une liaison covalente thioester (figure 3A) [12-13]. L'acide para-hydroxycinnamique possède une structure moléculaire proche de celle de HBR et ses analogues. Afin que PYP interagisse spécifiquement avec les analogues de HBR, nous avons modifié sa séquence/structure par évolution dirigée (figure 3A). L'évolution dirigée est une technique d'ingénierie des protéines qui consiste à tester un grand nombre de variations pour identifier une protéine ayant une nouvelle fonction. De manière analogue à un processus d'évolution darwinien, cette méthode utilise des étapes de diversification, de sélection et d'amplification pour faire émerger une nouvelle fonction. Dans notre cas, la fonction souhaitée était la reconnaissance d'analogues de HBR et l'activation de leur fluorescence. FAST a été isolé dans une banque de plusieurs dizaines de millions de variants de l'apo-PYP<sup>C69G</sup> générée par mutagenèse à saturation [10] : une banque de cellules, chacune synthétisant un variant différent, a été triée par cytométrie en flux pour identifier les cellules les plus fluorescentes en présence du fluorogène (figure 3B). La cytométrie en flux permet d'analyser la fluorescence de plus de 50 000 cellules individuelles par seconde, et ainsi de trier plusieurs centaines de millions de cellules par jour. Les cellules les plus fluorescentes ont été amplifiées sélectivement par des cycles itératifs de sélection et d'amplification. Le séquençage de leur ADN a permis *in fine* d'obtenir la séquence/identité des variants sélectionnés. Au final, FAST a été généré par introduction de neuf mutations.

Nous avons pu montrer que FAST et ses fusions étaient fonctionnels dans différents types de cellules (bactéries, levures,

cellules de mammifères) (figure 4A-C) et dans diverses localisations subcellulaires (figure 4D-G) [10]. En cellules, quelques secondes d'incubation avec le fluorogène suffisent pour obtenir un marquage total. La facilité avec laquelle les analogues

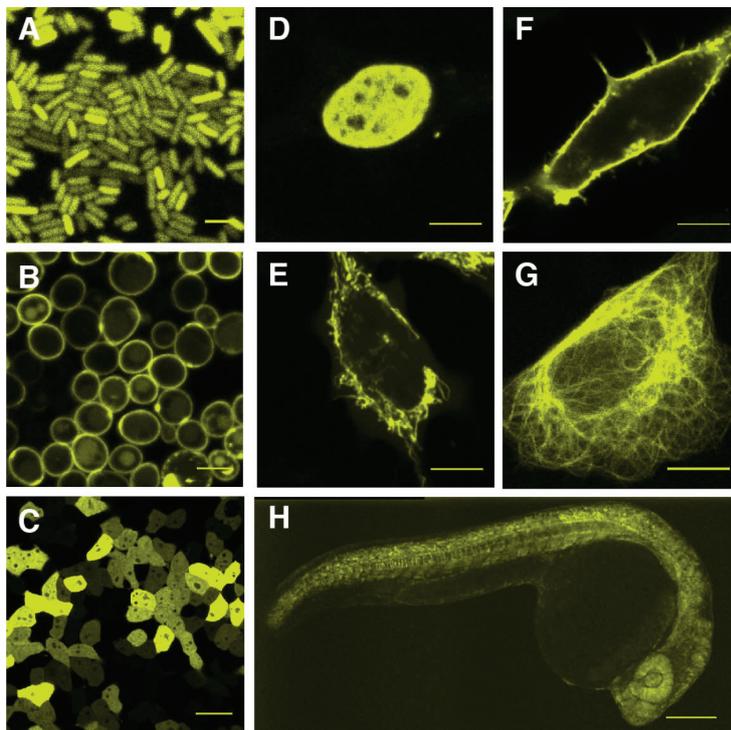
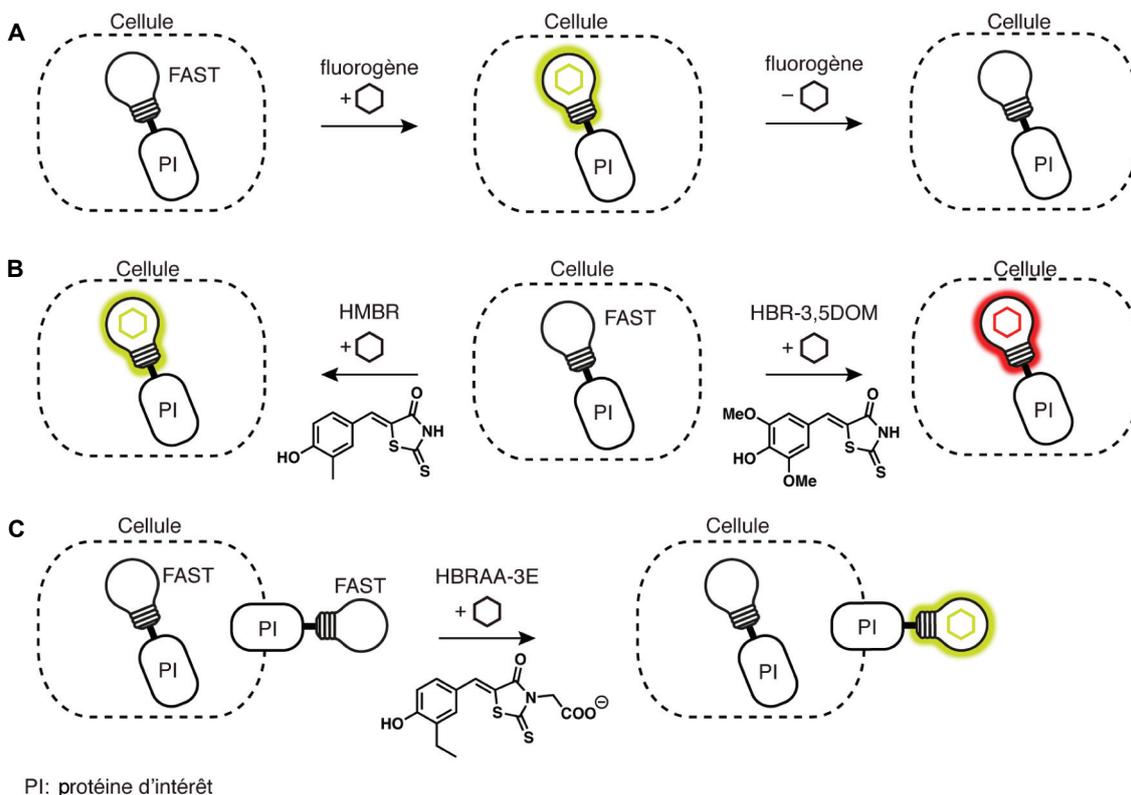


Figure 4 - FAST en action : (A) bactéries *E. coli* exprimant FAST dans le cytoplasme (barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ ) ; (B) levures *S. cerevisiae* exprimant FAST fusionné à la protéine de surface Aga2p (barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ ) ; (C) cellules HEK293T exprimant FAST dans le cytoplasme (barre d'échelle : 35  $\mu\text{m}$ ) ; (D) cellule HeLa exprimant FAST fusionné à l'histone H2B, une protéine nucléaire (barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ ) ; (E) cellule HeLa exprimant FAST fusionné à une séquence d'adressage mitochondrial (barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ ) ; (F) cellule HeLa exprimant FAST fusionné à une séquence d'adressage membranaire (barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ ) ; (G) cellule HeLa exprimant FAST fusionné à l'ensconsine, une protéine interagissant avec les microtubules (barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ ) ; (H) embryon de poisson zèbre âgé d'un jour exprimant FAST (barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ ). Les images A, B, D, E, F, G et H sont adaptées de [10].



**Figure 5 - FAST : une palette de possibilités pour le marquage à la demande.** (A) FAST peut être activé à la demande. L'ajout du fluorogène allume la fluorescence instantanément. L'interaction FAST:fluorogène étant non covalente et réversible, un simple lavage des cellules élimine le fluorogène et permet d'éteindre la fluorescence. (B) La couleur de la fluorescence du complexe FAST:fluorogène est modulable du vert-jaune au orange-rouge en changeant la structure moléculaire du fluorogène, permettant de changer la couleur de FAST à la demande. (C) Des analogues de HBR portant sur la tête rhodanine un groupe carboxyméthyle chargé négativement à pH physiologique présentent une capacité réduite à traverser la membrane plasmique, permettant de marquer sélectivement des protéines de surface fusionnées à FAST sans marquer les protéines intracellulaires.

traversent les membranes cellulaires assure un marquage rapide et efficace dans des organismes multicellulaires complexes tels que l'embryon de poisson zèbre (figure 4H).

FAST présente plusieurs avantages par rapport aux protéines fluorescentes. C'est une protéine monomère de seulement 14 kDa, c'est-à-dire deux fois plus petite que les protéines fluorescentes classiques, permettant de réduire les risques de fusions dysfonctionnelles. Comme de plus l'association avec le fluorogène est très rapide, en présence du fluorogène, FAST fluoresce dès qu'il est replié, permettant de suivre en temps réel des processus rapides tels que la synthèse protéique. Enfin, comme il ne nécessite pas de dioxygène, FAST fonctionne quel que soit le niveau de dioxygène.

FAST possède de plus des propriétés uniques (figure 5). Comme le fluorogène se fixe de manière non covalente et totalement réversible, le marquage peut être inversé et la fluorescence éteinte en quelques secondes avec un simple lavage des cellules (figure 5A). FAST agit ainsi comme une ampoule qui peut être allumée ou éteinte à volonté par ajout ou retrait du fluorogène.

### Le marquage fluorogénique n'a pas dit son dernier mot

La nature modulaire de FAST permet de plus d'utiliser la puissance de la chimie moderne pour modifier ses propriétés par ingénierie du fluorogène. Dans sa version originale, FAST émet une lumière vert-jaune. Récemment, nous avons étendu sa couleur d'émission à l'orange-rouge en modifiant la structure des analogues de HBR utilisés (figure 5B) [14]. La couleur de FAST peut ainsi être adaptée aux contraintes spectrales

de l'expérience par un simple changement de fluorogène (figure 5B). Cette propriété sans précédent offre une polyvalence expérimentale inexistante avec les protéines fluorescentes classiques.

La possibilité de moduler les propriétés de FAST par ingénierie moléculaire nous a également permis de concevoir des fluorogènes incapables de traverser la membrane plasmique, permettant le marquage sélectif des protéines résidentes à la membrane plasmique. Des analogues de HBR portant sur la tête rhodanine un groupe carboxyméthyle chargé négativement à pH physiologique présentent une capacité réduite à traverser la membrane plasmique, permettant de marquer sélectivement des protéines de surface fusionnées à FAST sans marquer les protéines intracellulaires (figure 5C) [15]. Cette propriété permet de localiser une protéine membranaire par une simple mesure de fluorescence, sans microscopie ni analyse d'image. Cette approche ouvre des perspectives uniques pour l'étude de la sécrétion, le transport et le recyclage des protéines membranaires, ainsi que pour le développement de nouvelles méthodes de criblage de molécules thérapeutiques capables de réparer un trafic défectueux.

La biologie moderne nécessite des sondes et des technologies de plus en plus avancées pour répondre à la complexité croissante des questions étudiées. Le marquage fluorogénique est un concept général et prometteur pour observer les molécules du vivant avec un contraste élevé. L'ajout d'une molécule exogène synthétique permet un contrôle spatio-temporel sans précédent, avec des perspectives prometteuses pour des applications à la demande. FAST présente des caractéristiques uniques – protéine monomère de petite taille ; fluorescence instantanée, indépendante de l'oxygène et

réversible ; propriétés spectrales accordables – qui en font une alternative intéressante aux protéines fluorescentes classiques pour explorer le vivant. De manière générale, les marqueurs fluorogéniques chémogénétiques n'ont pas encore dit leur dernier mot ; d'autres avancées passionnantes et imprévisibles dans les domaines des biosenseurs, de l'imagerie multiplaxée et de l'imagerie haute résolution sont à attendre.

- [1] Dean K.M., Palmer A.E., Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, p. 512.
- [2] Tsien R.Y., The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, p. 509.
- [3] Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y., A guide to choosing fluorescent proteins, *Nat. Meth.*, **2005**, *2*, p. 905.
- [4] Frommer W.B., Davidson M.W., Campbell R.E., Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, p. 2833.
- [5] O'Hare H., Johnsson K., Gautier A., Chemical probes shed light on protein function, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, p. 488.
- [6] Hinner M.J., Johnsson K., How to obtain labeled proteins and what to do with them, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2010**, *21*, p. 766.
- [7] Bruchez M.P., Dark dyes-bright complexes: fluorogenic protein labeling, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2015**, *27*, p. 18.
- [8] Jullien L., Gautier A., Fluorogen-based reporters for fluorescence imaging: a review, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, *3*, p. 042007.
- [9] Li C., Tebo A.G., Gautier A., Fluorogenic labeling strategies for biological imaging, *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, p. 1473.
- [10] Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M. *et al.*, Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2016**, *113*, p. 497.

- [11] Meyer T.E., Kyndt J.A., Memmi S., Moser T., Colón-Acevedo B. *et al.*, The growing family of photoactive yellow proteins and their presumed functional roles, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2012**, *11*, p. 1495.
- [12] Baca M., Borgstahl G.E.O., Boissinot M., Burke P.M., Williams D.R. *et al.*, Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry, *Biochemistry*, **1994**, *33*, p. 14369.
- [13] Borgstahl G., Williams D., Getzoff E.D., 1.4 Å Structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore, *Biochemistry*, **1995**, *34*, p. 6278.
- [14] Li C., Plamont M.-A., Sladitschek H.L., Rodrigues V., Aujard I. *et al.*, Dynamic multicolor protein labeling in living cells, *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, p. 5598.
- [15] Li C., Mourton A., Plamont M.-A., Rodrigues V., Aujard I. *et al.*, Fluorogenic probing of membrane protein trafficking, *Bioconj. Chem.*, **2018**, *29*, p. 1823.

### Arnaud GAUTIER,

maître de conférences, Laboratoire PASTEUR, Département de chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, F-75005 Paris, membre junior de l'Institut de France 2018-2023.

**Il a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2017.**

\* arnaud.gautier@ens.fr



## Solvants CPG

### Précision et Fiabilité à votre Service



#### ■ Gamme GC-MS

+ Tests GC-MS spécifiques

#### ■ Gamme Headspace

+ Testé en GC-Headspace pour la détermination de ces impuretés organiques volatiles (OVI) selon ICH, USP et la Pharmacopée Européenne

+ Transmission UV élevée

#### ■ ATRASOL®, pour la détection de traces d'OVI et d'hydrocarbures

+ Impuretés critiques testées par GC-ECD et GC-FID

#### ■ PESTIPUR®, pour l'analyse des résidus de pesticides

+ Impuretés critiques testées par GC-ECD et GC-NPD

+ Test selon la norme NF EN ISO 17993:2002 de la teneur en HAP du dichlorométhane



Votre partenaire de choix  
pour vos **Solvants**

www.carloerbareagents.com

