

UNIVERSITE DE LILLE 1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Biologie - Santé

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR EN BIOLOGIE

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

UTILISATION ET DEVELOPPEMENT DE BIOSENSEURS FRET POUR LA MESURE D'ACTIVITES KINASES *IN VIVO* AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

Pauline VANDAME

Le 9 octobre 2014

COMPOSITION DU JURY :

Rapporteurs	Docteur Franck CHESNEL Professeur Stéphane FLAMENT
Examineurs	Docteur Emanuele BIONDI Professeur Tony LEFEBVRE Docteur Sandrine POUVREAU Professeur Ruddy WATTIEZ
Directeurs de thèse	Professeur Jean-François BODART Docteur Coralie BOMPARD

EA4479, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division - UFR de Biologie –

Université Lille 1 (Villeneuve d'Ascq)

Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI)- USR3078 CNRS (Villeneuve d'Ascq)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier **Franck Chesnel** et **Stéphane Flament**, qui ont accepté la charge d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Un grand merci à **Sandrine Pouvreau**, **Ruddy Wattiez** et **Tony Lefebvre**, **Coralie Bompard**, **Emanuele Biondi** et **Jean-François Bodart** qui ont également accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie la Région Nord-Pas de Calais et l'Université Lille 1 qui ont financé ma thèse.

Plus particulièrement, je voudrais remercier les différents encadrants qui ont contribué à ce travail. J'exprime tout d'abord ma profonde gratitude à **Jean-François Bodart**, qui a été mon directeur de stage de Master 2 puis mon directeur de thèse. Je le remercie de m'avoir transmis sa passion et sa curiosité pour l'étude des mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire. J'ai énormément appris à ses côtés de par nos discussions scientifiques enrichissantes, mais aussi grâce aux confrontations d'idées que nous avons pu avoir au cours de ces quatre années. Je le remercie de la liberté et la confiance qu'il m'a témoignées dans la réalisation de ce projet, tout en restant attentif et en m'aiguillant dans les bonnes directions. Je le remercie également pour son soutien sans faille, lorsque ma thèse a traversé des moments difficiles, et pour sa gentillesse et sa sympathie.

Un grand merci également à **Coralie Bompard**, qui a accepté de prendre en charge la co-direction de ma thèse en cours du chemin. Son aide, sa bienveillance, ses conseils et surtout son amitié m'ont été (et sont toujours !) très précieux. C'est presque avec regret que vais terminer cette thèse car j'aurais bien aimé rester sa « sardisciple » un peu plus longtemps.

Grazie mille à **Emanuele Biondi** qui m'a offert la chance de participer au challenge que sont les mesures de FRET en bactérie. J'ai été très touchée par la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce projet. Ses conseils et son expérience m'ont été d'une grande aide pour mes débuts en microbiologie et j'ai énormément appris en le côtoyant. *Grazie mille to Emanuele Biondi, for the great and exciting opportunity to be part of the FRET-Caulobacter project. I'm really touched that he trusts me to successfully complete the FRET measurement in bacteria. His advices and experience helped me a lot to start microbiology and I have learned a lot by his side at all levels.*

Je tiens également à remercier **Corentin Spriet** qui m'a appris tout ce que je sais aujourd'hui sur la microscopie, le FRET, les macro-ImageJ. Je lui dois beaucoup et ce projet n'aurait pas pu devenir ce qu'il est aujourd'hui sans son aide et la patience de ses explications. Merci d'être le MacGyver de la manip, qui a toujours une astuce et qui est toujours prêt à donner un coup de main pour que quoi que ce soit marche. Et d'un point de vue plus personnel, je le remercie pour sa patience sans limites

lors de cette période de rédaction (et des diverses périodes de stress), pour son soutien et son affection au quotidien.

Un grand merci à **Katia Caillau**, pour ses relectures toujours pertinentes de mes papiers, mais également pour la richesse de ses arguments scientifiques qui m'ont poussé à explorer d'autres directions. Je la remercie également pour la gentillesse dont elle a fait preuve au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie également **Antonella Fioravanti**, ma collègue biochimiste pour nos échanges et notre travail commun sur le projet FRET dans *Caulobacter*. Elle est une formidable colocataire de paillasse et amie. *Grazie mille to Antonella Fioravanti, my colleague in biochemistry, for all our discussions and work on the FRET-Caulobacter project. She is a true friend and it was a real pleasure to be her lab mate.*

Merci à **Dave Trinel** pour « le soft optimisé rien que pour toi » lorsque mes compétences en analyse et en représentation d'images on atteint leurs limites, ainsi que pour toutes les sympathiques conversations qui nous ont animés autour d'un café.

Merci également à **Saswat Mohapatra**, de m'avoir guidée dans mes débuts de la manipulation de *Caulobacter*, et d'avoir supporté mes (très) nombreuses questions en y répondant toujours de manière avisée et avec gentillesse. *I would like to thank Saswat Mohapatra, for kindly helping and guiding me when I started to manipulate Caulobacter cells. I'm really grateful for the patience he showed when he answered my (very) multiple questions.*

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse **Renata Polakowska, Tony Lefebvre et May Morris**, pour leur remarques constructives et leurs encouragements.

Un grand merci à **Armance Gelaude** et à **Arlette Lescuyer** pour leur gentillesse, leur sympathie et leurs coups de mains lors de mes expériences de biochimie au SN3. Merci également d'avoir été là pour moi dans les moments difficiles.

Je voudrais également remercier **Laurence Labaeye** et **Inès Bonet** d'avoir toujours été là pour m'aider à résoudre les énigmes de l'administration, mais aussi pour leur sympathie et leur amitié.

Je remercie aussi les stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler : **Thibaut Hucheloup** et **Pauline Louvet**.

Un grand merci également à **Virginie Bodart**, pour sa relecture orthographique attentive.

De façon plus globale, merci encore à l'ensemble du personnel du laboratoire de Régulation des Signaux de Division, (**Jean-François Bodart, Katia Caillau, Alain Martoriati, Mathieu Marin, Armance**

Gelaude et Arlette Lescuyer) et de mon équipe au sein de l'IRI, (**Emanuele Biondi, Coralie Bompard, Elisa Giuntini, Antonella Fioravanti, Francesco Pini et Saswat Mohapatra**) pour leur aide, pour nos discussions scientifiques et pour leur sympathie. Cela a été un vrai plaisir de travailler à leurs côtés. Merci également à l'ensemble des membres de l'IRI (**Morkos Henen, Riccardo Peruzzini, Marie-André Fleurbaix, Haoling Qi et tous les autres....**). Merci à eux tous pour tous les moments scientifiques et sympathiques que nous avons partagé.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui, à leur façon, ont aussi contribué à l'aboutissement travail.

Mille mercis à mes parents chéris **Thierry et Patricia Vandame** qui m'ont toujours soutenu et poussé à donner le meilleur de moi-même. Ce pavé c'est grâce à vous ! Merci aussi à mon frère et ma belle-sœur adorés **Etienne Vandame** et **Céline Fosse**. Merci à ma super belle-famille **Alain, Christine et Mathilde Spriet, Even et Mahée Canis** de m'accueillir et de me soutenir comme ils le font. Merci à ma copine **Amandine Fournier**, pour son soutien, son amitié et nos fous rires. Un grand merci également à mes amis que j'adore **Erwan Moulin** et **Cassandre Vuillaume**, de me rappeler qu'il n'y a pas que la thèse dans la vie, il y'a la pâtisserie aussi ! Merci à **Maxime et Juliette Lagouge**, pour les apéros hebdomadaires, pour leur amitié, et étrangement pour leur capacité amusante à me terrifier à coups d'exercices de maths. Enfin merci à **Rachel Lagouge** et **Mahée Spriet** dont les sourires me mettent systématiquement de bonne humeur.

Table des matières

Liste des figures et tableaux	10
Résumé	14
Avant propos	16
Introduction	17
I. Le cycle cellulaire	17
1. Généralités	17
1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire	17
1.2. Les différentes phases de la mitose	18
1.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire	19
1.4. Des cycles cellulaires particuliers	21
2. Les principes moléculaires généraux contrôlant la division cellulaire et sa progression	21
2.1. La transition G2/M	21
2.1.1. Découverte des couples Cdk/Cycline	21
2.1.2. Mécanismes moléculaires à la base de la transition G2/M	23
2.2. La transition métaphase-anaphase	24
II. PKA et MAPK/ERK : deux kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire.....	27
1. PKA et la régulation du cycle cellulaire	27
1.1. La voie de signalisation AMPc/PKA	27
1.1.1. Généralités sur la voie de signalisation AMPc/PKA	27
1.1.2. PKA : Isoformes, structure et substrats	28
1.1.3. Régulation spatiale de la voie cAMP/PKA	30
1.2. Rôle de PKA dans la régulation du cycle cellulaire	32
1.2.1. Effet de l'AMPc sur la prolifération	32
1.2.2. Rôles et effecteurs de PKA lors de la transition G2/M dans les modèles méiotiques	32

1.2.3.	Rôles et effecteurs de PKA lors de la progression de la mitose	35
1.2.4.	Quelle est l'activité de PKA au cours de la mitose ?	37
2.	MAPK/ERK et la régulation du cycle cellulaire	38
2.1.	La voie de signalisation MAPK/ERK1/2	38
2.1.1.	Généralités sur la voie de signalisation MAPK/ERK1/2	38
2.1.2.	ERK1/2	41
2.1.3.	Régulation de MAPK/ERK	44
2.2.	Rôle de MAPK/ERK dans la régulation du cycle cellulaire	47
2.2.1.	MAPK/ERK et la régulation de la prolifération	47
2.2.2.	Rôle et effecteurs de MAPK/ERK dans la transition G2/M	48
2.2.3.	Rôle et effecteurs de MAPK/ERK lors de la progression de la mitose	50
2.2.4.	Quelle est l'activité de MAPK/ERK lors du cycle cellulaire ?	51
3.	Interactions entre les voies de signalisation PKA et MAPK/ERK	52
3.1.	Effets de PKA sur la signalisation MAPK/ERK	52
3.1.1.	Inhibition ou activation de la voie MAPK/ERK médiée par Rap-1	52
3.1.2.	Phosphorylation de Raf-1 par PKA	53
3.1.3.	Effets de PKA sur la voie MAPK/ERK <i>via</i> les phosphatases	54
3.1.4.	Effets de PKA sur la voie MAPK/ERK <i>via</i> les protéines d'échafaudage	54
3.2.	Effets de MAPK/ERK sur la signalisation PKA	55
3.3.	Effets du dialogue entre PKA et MAPK/ERK sur la vie cellulaire	55
III.	Les biosenseurs FRET pour la mesure d'activité kinase <i>in vivo</i>	57
1.	Principe de fonctionnement des biosenseurs FRET	57
1.1.	Généralités	57
1.2.	Les biosenseurs rapporteurs d'activité kinasique	57
1.3.	Introduction à la technique de FRET	59
2.	Evolution des bioenseurs PKA et MAPK/ERK	60
2.1.	Evolution des biosenseurs rapporteurs de l'activité PKA	61

2.2. Evolution des biosenseurs rapporteurs de l'activité MAPK/ERK	63
Objectifs	66
Résultats.....	68
PARTIE I : Etude de PKA et de MAPK/ERK lors du cycle cellulaire des cellules HeLa	68
1. Caractérisation du modèle cellulaire et de son cycle cellulaire.....	68
1.1. Choix de la lignée cellulaire HeLa	68
1.2. Caractéristiques du cycle de division des cellules HeLa	68
1.3. Synchronisation des cellules HeLa.....	69
2. Analyse de la phosphorylation de MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire des HeLa.....	72
2.1. Etude des niveaux de phosphorylation de MAPK/ERK.....	72
2.2. Etude de la localisation des formes phosphorylées de MAPK/ERK au cours du cycle.....	73
3. Analyse des effets et de la localisation de PKA au cours du cycle cellulaire des cellules HeLa ..	76
3.1. L'augmentation du taux d'AMPC entraîne un retard de prolifération	76
3.2. Localisation de PKA au cours du cycle.....	77
4. Limites de l'étude des activités MAPK/ERK et PKA dans des populations de cellules.....	80
PARTIE II : Mise en place d'une approche en cellules uniques utilisant les biosenseurs	
FRET	81
1. Mise en place technologique	81
1.1. Définition de l'intervalle dynamique.....	81
1.2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de mesures testées	82
2. Optimisation des outils préexistants : optimisation du biosenseur rapporteur d'activité MAPK/ERK	84
2.1. Comment optimiser un biosenseur ?.....	85
2.2. Optimisation du biosenseur MAPK/ERK.....	85
2.2.1. Stratégie d'optimisation	85

2.2.2. Mesures des intervalles dynamiques des biosenseurs MAPK/ERK	87
PARTIE III : Mesures des activités kinase PKA et MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire	92
1. Etude spatio-temporelle de l'activité de PKA	92
1.1. L'activité de PKA augmente lors de l'entrée en mitose	92
1.2. L'activité de PKA est sous-localisée pendant les différentes étapes de la mitose	95
1.3. L'augmentation d'activité PKA lors de la mitose est nécessaire à un alignement correct des chromosomes en métaphase.	98
2. Résultats préliminaires : les effets de PKA lors de la mitose résultent-ils d'une influence sur la signalisation MAPK/ERK ?	100
2.1. Comment varie l'activité de MAPK/ERK lors de la progression du cycle et lors de la mitose ?	100
2.2. PKA peut-elle modifier l'activité de MAPK/ERK ?	101
PARTIE IV : Extension du système de mesure d'activité/phosphorylation à un organisme modèle procaryote : étude du cycle cellulaire chez <i>Caulobacter crescentus</i>	103
1. Présentation du contexte de l'étude	103
1.1. <i>Caulobacter crescentus</i> et son cycle cellulaire	103
1.2. CtrA et la régulation du cycle cellulaire chez <i>C. crescentus</i>	104
1.3. Régulation spatiale et temporelle de CtrA	105
2. Développement et validation d'un biosenseur utilisant le FRET pour mesurer la phosphorylation de CtrA	107
2.1. Principe et construction du biosenseur	107
2.2. Validation du biosenseur rapporteur de la phosphorylation de CtrA <i>in vivo</i>	108
2.3. Etude de la phosphorylation de CtrA au cours du cycle cellulaire	111
2.4. Localisation subcellulaire de la phosphorylation de CtrA	113
Discussion générale et Perspectives.....	115
Matériel et Méthodes	125

I. Etude du cycle cellulaire eucaryote	125
II. Etude du cycle cellulaire procaryote.....	129
<i>Bibliographie</i>	<i>132</i>
<i>Publications</i>	<i>144</i>
<i>Annexes</i>	<i>149</i>

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Les phases du cycle cellulaire	18
Figure 2 : Les différentes phases de la mitose	20
Figure 3: Les principaux couples Cdk/Cycline dans la régulation du cycle cellulaire.	23
Figure 4 : Mécanismes d'activation du MPF.....	24
Figure 5 : Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau.....	26
Figure 6 : La voie de signalisation AMPc/PKA	28
Figure 7 : Les différents domaines composant les sous-unités de PKA	30
Figure 8 : Effets et cibles de PKA lors de la transition G2/M dans les modèles méiotiques	34
Figure 9 : Architecture de la cascade des MAPKs	39
Figure 10 : Représentation schématique de la voie MAPK/ERK activée par les facteurs de croissance	40
Figure 11 : Représentation schématique des modifications structurales lors de l'activation de MAPK/ERK	42
Figure 12 : Sites consensus de fixation retrouvés sur les substrats de MAPK/ERK.....	43
Figure 13 : Boucles de rétrocontrôle impliquées dans les décisions cellulaires, en réponse à la stimulation des cellules PC12 par différents facteurs de croissance	45
Figure 14 : Représentation schématique de l'activation de la voie MAPK/ERK grâce à la protéine d'échafaudage KSR-1.....	47
Figure 15 : Effets et cibles de ERK2 lors de la transition G2/M chez le Xénope.....	49
Figure 16 : Inhibition et activation de la voie MAPK/ERK par PKA médiées par Rap-1.....	53
Figure 17 : Récapitulatif des différents dialogues moléculaires possibles entre les voies MAPK/ERK et PKA	56
Figure 18 : Représentation schématique d'un biosenseur au sens générique	57
Figure 19 : Principe moléculaire et principe de fonctionnement d'un biosenseur FRET.....	58
Figure 20 : Exemple du chevauchement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur.....	60
Figure 21 : Détermination du temps de chaque phase du cycle cellulaire des cellules HeLa.....	69
Figure 22 : Progression du cycle des cellules HeLa après une synchronisation par la thymidine.....	70
Figure 23 : Aspect du double marquage ADN/microtubules au cours des différentes étapes de la mitose.....	71
Figure 24 : Gamme de concentration du nocodazole et efficacité sur l'arrêt des cellules.....	72
Figure 25 : Niveau de phosphorylation de MAPK/ERK dans une population synchronisée.	73

Figure 26 : Localisation des MAPK/ERK phosphorylées lors des différentes phases du cycle cellulaire	74
Figure 27 : Taux de phosphorylation de MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire	75
Figure 28 : Comparaison des taux de phosphorylation des MAPK/ERK par compartiment au cours du cycle cellulaire	76
Figure 29 : Retard de prolifération des cellules HeLa soumises à un traitement par un analogue de l'AMPc.	77
Figure 30: Localisation des sous-unités catalytique de PKA lors des phases S, G2 et G1	78
Figure 31 : Localisation des sous-unités catalytiques de PKA lors des différentes étapes de la mitose.	79
Figure 32 : Localisation des centrosomes par le marquage γ -tubuline.....	80
Figure 33 : Illustration schématique de l'intervalle dynamique.....	82
Figure 34 : Exemple de mesure d'activité PKA par FD-FLIM.	83
Figure 35 : Stratégie d'optimisation du biosenseur MAPK	87
Figure 36 : Intervalles dynamiques des biosenseurs optimisés par rapport aux biosenseurs d'origine mesurés par FRET ratiométrique	88
Figure 37 : Intervalles dynamiques des biosenseurs optimisés par rapport aux biosenseurs d'origine mesurés par FD-FLIM	89
Figure 38 : Histogrammes des intervalles dynamiques obtenus en FRET ratio et en FD-FLIM.....	90
Figure 39 : Réversibilité de EKAR-TVV	91
Figure 40 : L'activité de PKA augmente lors de la mitose	93
Figure 41 : Validation fonctionnelle du biosenseur muté AKAREV T>A.....	94
Figure 42 : Comparaison statistique des variations de ratio FRET observées dans les cellules exprimant AKAREV et sa version mutée lors de la mitose.....	95
Figure 43 : Sous localisation de l'activité PKA en métaphase	96
Figure 44 : Contrôle de sous localisation de l'activité PKA.....	96
Figure 45 : Sous localisation de l'activité PKA en anaphase.....	97
Figure 46 : Progression de la mitose lors d'une inhibition de PKA.....	98
Figure 47: Phénotypes de cellules en métaphase lors de l'inhibition de PKA.....	99
Figure 48 : Proportion de cellules présentant un phénotype mitotique aberrant lors d'une inhibition PKA	100
Figure 49 : Variation d'activité MAPK/ERK lors de la mitose	101
Figure 50 : Analyse cellule par cellule des taux de phosphorylation nucléaire et cytoplasmique de MEPK/ERK.....	102
Figure 51 : Le cycle cellulaire de C.crescentus	104

Figure 52 : Localisation des composants du réseau de régulation de CtrA	106
Figure 53 : Représentation schématisée du gradient hypothétique de phosphorylation de CtrA	107
Figure 54 : Principe de fonctionnement du biosenseur de phosphorylation CtrA	108
Figure 55 : Lignée de <i>C. crescentus</i> exprimant CtrA-CFP et CtrA-YFP	109
Figure 56 : Dimérisation de CtrA in vivo.....	110
Figure 57 : Analyse statistique des ratios FRET mesurés in vivo entre CtrA-CFP et CtrA-YFP.....	110
Figure 58 : Ratio YFP/CFP mesuré au cours de la progression du cycle cellulaire de <i>C. crescentus</i> ...	111
Figure 59 : Taux de phosphorylation de CtrA endogène au cours du cycle cellulaire	112
Figure 60 : Niveaux de phosphorylation de CtrA aux deux pôles des cellules pré-divisionnelles.....	113
Figure 61 : Profils de phosphorylation de CtrA en cellules pré-divisionnelles.	114
Tableau 1 : Quelques exemples d'effets de l'AMPc sur la prolifération de différents types cellulaires	32
Tableau 2 : Concentration intracellulaire des différents membres de la cascade MAPK/ERK	41
Tableau 3 : Composition des biosenseurs AKAR1 à AKAR4	62
Tableau 4 : Répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à chaque temps après synchronisation par la thymidine.	70
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de FRET dans le cadre d'expérience de time-lapse utilisant les biosenseurs.	84
Tableau 6 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage du biosenseur de phosphorylation CtrA	129

Table des abréviations

AC	<i>Adénylate Cyclase</i>
AKAP	<i>A-Kinase Anchor Protein</i>
AKAR	<i>A Kinase Activity Reporter</i>
AKAREV	<i>A Kinase Activity Reporter in the EV backbone</i>
APC/C	<i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i>
cAMP	<i>Adénosine MonoPhosphate cyclique.</i>
Cdk	<i>Cycline Dependant protein Kinase</i>
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
CtrA	<i>Cell-cycle transcription regulator A</i>
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
EKAR	<i>Extracellular-regulated Kinase Activity Reporter</i>
EKAR-Cer/cpV	<i>EKAR-Crolean/CpVenus</i>
EKAREV	<i>Extracellular-regulated Kinase Activity Reporter in the EV backbone</i>
EKAREV-TVV	<i>EKAREV-Turquoise CpVenus Venus</i>
EKAR-TVV	<i>EKAR- Turquoise CpVenus Venus</i>
EPAC	<i>guanine nucleotide Exchange Protein activated by cAMP</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular Regulated Kinase 1 & 2</i>
FD-FLIM	<i>Frequency Domain-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GPCR	<i>Récepteur Couplé aux Protéines-G</i>
H-89	<i>H-89 dihydrochloride</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
KSR	<i>Kinase Suppressor of Ras</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPK/ERK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase 1 & 2</i>
MKP	<i>MAPK phosphatase</i>
MPF	<i>Meiosis Promoting Factor et M-phase Promoting Factor</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
PAABD	<i>phospho- aminoacid binding domain</i>
PDE	<i>PhosphDiEstérase</i>
PKA	<i>cAMP-dependant Protein Kinase</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photon Counting</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Résumé

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle conservée au cours de l'évolution, qui intervient dans de nombreux processus cellulaires. Elle est notamment au cœur de la progression du cycle cellulaire. L'activité des protéines kinases, enzymes responsables de la phosphorylation, doit être précisément régulée dans le temps et l'espace afin d'aboutir à la formation de deux cellules filles. Si les couples Cycline/Cdks sont des acteurs majeurs du contrôle du cycle cellulaire, d'autres protéines kinases sont impliquées, comme les Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase (MAPK/ERK) et la cAMP-dépendant Protein Kinase (PKA). L'implication et les rôles de ces dernières lors de la division cellulaire, ont fait l'objet de nombreuses études. Pourtant les profils spatio-temporels des activités de ces kinases au cours des différentes étapes du cycle et notamment lors de la mitose sont controversés et restent à éclaircir.

Le but de ce travail a été la détermination de ces profils grâce à l'utilisation et au développement d'outils moléculaires basés sur des propriétés de la fluorescence, capables de rapporter l'activité kinase *in vivo*, qui sont appelés biosenseurs FRET.

Leur utilisation nous a permis de révéler que l'activité de PKA augmente lors de la mitose pour ensuite chuter rapidement lors de la cytokinèse dans les cellules HeLa. Lors de la métaphase et de l'anaphase, l'activité de PKA est particulièrement élevée à proximité des chromosomes et ce, indépendamment d'une relocalisation de ses sous-unités catalytiques. De plus, l'utilisation d'inhibiteur de PKA conduit à l'apparition de phénotypes mitotiques aberrants (*i.e.* : migration précoce de certains chromosomes), ce qui indique le rôle essentiel de cette augmentation d'activité dans le maintien de l'intégrité du génome. Ces phénotypes sont similaires à ceux décrits pour des perturbations de l'activité de MAPK/ERK. Le développement d'un biosenseur FRET optimisé pour les mesures d'activité de MAPK/ERK nous a permis de déterminer que son activité globale ne varie pas lors de la mitose mais connaît en revanche une diminution forte et très brève lors de la cytokinèse. L'inhibition de PKA induit une augmentation sensible de la phosphorylation de MAPK/ERK, ce qui pourrait suggérer ainsi un lien entre les activités de ces deux protéines dans la répartition correcte du matériel génétique lors de la mitose.

Abstract

Phosphorylation is a post translational modification conserved across evolution that is involved in many cellular processes, including cell cycle progression. The activity of kinases, the enzymes responsible for the phosphorylation events, must be tightly regulated in space and time to allow the generation of two daughter cells. Whereas the Cyclin/Cdk pairs, are the main regulator of the cell cycle control, other kinases play an important role, such as the Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase (MAPK/Erk) and the cAMP-dependant Protein Kinase (PKA). Even if their roles and contribution in cell cycle have been the topic of several studies, the spatio-temporal profiles of their activities is still controversial and remain to be clarified.

The aim of my PhD was to highlight those activity profiles during the cell cycle in HeLa cells, by using or developing new molecular tools, based on fluorescence properties that are able to report kinase activity *in vivo* and named FRET-based biosensors.

The use of these biosensors allowed us to reveal that PKA activity increased at the onset of mitosis and stayed high until the completion of cytokinesis. During metaphase and anaphase, this activity was especially high in the close vicinity of the condensed chromosomes, independently of any concomitant relocation of PKA catalytic sub-units within the cell. Moreover inhibition of PKA activity during mitosis lead to improper mitotic phenotype (*i.e.* : misalignment of the DNA on the spindle, precocious segregation of part of the chromosomes), pointing out the essential role of the activity increase in genetic stability. Those observed phenotypes are similar to those described upon experimental modifications of the MAPK/Erk activity level. By means of the development of a new improved MAPK/Erk activity biosensor, we showed that its global activity does not change during mitosis, but goes through a brief and strong decrease during cytokinesis. As the inhibition of PKA induces a noticeable increase of MAPK/Erk phosphorylation, those results could suggest a link between those two kinases activities in the correct distribution of the DNA to daughter cells during mitosis.

Avant propos

Ce travail de thèse a été financé par l'Université Lille 1 et le Conseil Régional Nord-Pas de Calais. Il a été réalisé sous la co-direction du Professeur Jean-François Bodart et du Docteur Coralie Bompard au sein du Laboratoire de Régulation des Signaux de Division (EA4479) et de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, USR3078 CNRS). La majeure partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude des activités kinases de PKA et de MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire dans les cellules HeLa. Les résultats ayant souligné sur des effets de ces protéines au moment de la mitose, l'introduction au cycle cellulaire sera centrée sur les mécanismes responsables de la mitose, de la transition G2/M, et le point de contrôle du fuseau. Ce n'est qu'au cours de ma dernière année de thèse qu'a commencé le travail de développement de biosenseur pour l'étude de la phosphorylation au cours du cycle cellulaire dans le modèle procaryote *Caulobacter crescentus*. Aussi une introduction à cette partie du travail sera incluse dans la partie IV des résultats.

Ce travail de thèse a donné lieu à deux articles, une revue et deux chapitres d'ouvrages qui sont joints à ce manuscrit et listés ci-après :

- **The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation.**
Pauline Vandame, Corentin Spriet, Dave Trinel, Armance Gelaude, Katia Cailliau-Maggio, Coralie Bompard, Emanuele Biondi, & Jean-François Bodart. Cell Cycle. 2014. Sous presse.
- **Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements.**
Pauline Vandame, Corentin Spriet, Franck Riquet, Dave Trinel, Katia Cailliau-Maggio, & Jean-François Bodart. Sensors 14(1):1140-54. 2013.
- **Reporting Kinase Activities: Paradigms, Tools and Perspectives.**
Franck Riquet, Pauline Vandame, Pauline Vandame, Francois Sipietter, Katia Cailliau-Maggio, Corentin Spriet, Laurent Heliot, & Jean-Francois Bodart. Journal of Biological Medicine.2011.
- **From FRET Imaging to Practical Methodology for Kinase Activity Sensing in Living Cells.**
Pauline Vandame & François Sipietter, Corentin Spriet, Aymeric Leray, Pierre Vincent, Dave Trinel, Jean-François Bodart, Franck. B Riquet & Laurent Héliot. Fluorescence-Based Biosensors – from concepts to applications Progress in Molecular Biology and Translational Science, Academic Press, Elsevier.2013.
- **Ploidy in Mitosis and Meiosis: A Role of MAPK/Erk Network.**
Franck Riquet, Pauline Vandame, & Jean-Francois Bodart. Aneuploidy : etiology, disorders, and risk factors. Editors : Salvatore de Rossi and Filippo Bianchi. 2011.

Introduction

I. Le cycle cellulaire

C'est à Robert Hooke en 1665 que nous devons le terme de cellule, donné d'après les compartiments répétés ou « petites chambres » (*cellula* en latin) qu'il observa dans une coupe de liège au microscope. C'est 170 ans plus tard, en 1839, que les naturalistes Mathias Schleiden et Theodor Schwann découvrirent que la cellule est l'unité de base du vivant et énoncèrent que « *tous les êtres vivants, animaux et végétaux sont constitués de cellules* ». Enfin en 1858, le physiologiste Rudolf Virchow établit le postulat que toute cellule provient d'une autre cellule par le célèbre « *omni cellula e cellula* » introduisant ainsi le concept de multiplication cellulaire par division.

1. Généralités

1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un ensemble d'évènements coordonnés que subit une cellule depuis sa formation à partir de la division d'une cellule mère, jusqu'à sa propre division en deux cellules filles. Ce processus permet le développement de l'embryon depuis la cellule-œuf (ou zygote), mais également le maintien de l'homéostasie tissulaire dans les organismes adultes.

Chez les Eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en deux étapes : la **mitose**, qui correspond à la division proprement dite, et l'**interphase** qui consiste en une phase de préparation à la mitose et de réplication du matériel génétique. Ainsi deux mitoses sont séparées par l'intervalle d'une interphase, qui est elle-même subdivisée en 3 phases successives :

- La **phase G1** (Gap1) qui est une phase de croissance et de synthèse protéique.
- La **phase S** (Synthèse) qui est la phase de réplication du matériel génétique.
- La **phase G2** (Gap2) qui est une seconde phase de croissance pour préparer la mitose.

Dans un organisme, la majorité des cellules ne cycle pas. Ces cellules sont dites en **phase G0**, aussi appelée phase de quiescence, qui est un état non prolifératif lors duquel il n'y a plus de progression de G1 vers S. Ces cellules en G0, sous l'influence de signaux mitogènes, peuvent ré-entrer dans le cycle cellulaire et progresser en phase S pour répliquer leur ADN (figure 1).

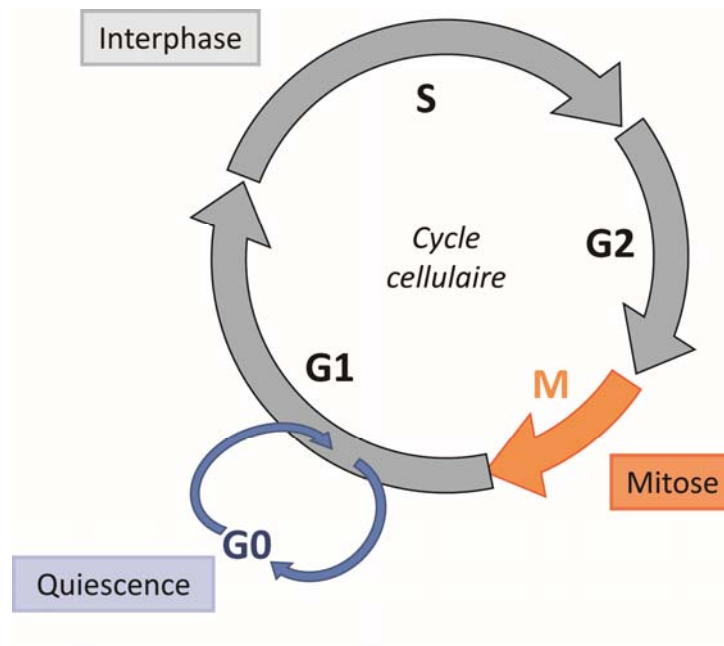


Figure 1 : Les phases du cycle cellulaire

Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase qui sépare chaque phase de mitose (M). Lorsque les cellules ne prolifèrent plus, elles sortent du cycle pour entrer dans un état dit de quiescence G0.

1.2. Les différentes phases de la mitose

La mitose permet la distribution équitable des chromatides sœurs, précédemment répliquées lors de la phase S, entre les deux cellules filles. Cette étape essentielle au maintien de l'intégrité du génome se divise en 5 phases (Morgan, 2010).

Lors de la première étape de la mitose, également appelée la **prophase**, la phosphorylation des histones (les protéines de compaction de la chromatine) induit la condensation de l'ADN. Cette étape est également caractérisée par des remaniements impliquant le cytosquelette. Les centrosomes (les centres organisateurs des microtubules), qui ont été dupliqués à la fin de l'interphase, se séparent et entament leur migration vers deux pôles opposés à la périphérie nucléaire. Enfin, on assiste également au début de la formation du fuseau mitotique.

L'étape suivante est la **prométaphase**. Elle se caractérise par la rupture de l'enveloppe nucléaire. La condensation des chromosomes se poursuit et le fuseau mitotique s'organise. Les chromosomes sont recrutés par le fuseau *via* des complexes protéiques présents au niveau des centromères qui sont appelés les kinétochores.

La **métaphase** marque le stade maximum de condensation des chromosomes. Ces derniers sont tous alignés sur un même plan formant ainsi la plaque métaphasique. Les deux chromatides sœurs qui composent chaque chromosome sont encore physiquement liées l'une à l'autre (*e.g.* : par les cohésines centromériques). Pour chaque paire de chromatides, l'une d'entre elles est ancrée aux microtubules émanant de l'un des pôles, tandis que l'autre est ancrée à ceux émanant du pôle opposé.

Après la métaphase a lieu l'**anaphase**, lors de laquelle les deux lots de chromosomes à une chromatide migrent vers les pôles opposés du fuseau.

Enfin lors de la **télophase**, les chromosomes se décondensent, les enveloppes nucléaires des deux cellules filles se reforment et le fuseau se dépolymérise (Rhind and Russell, 2012). À l'achèvement de la mitose se produit finalement la cytokinèse, c'est-à-dire le processus permettant la séparation physique des deux cellules filles. Cette étape dépend d'un anneau contractile constitué d'actine et de myosine, qui est lié à la face interne de la membrane cellulaire, et qui se forme sur un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau. Cet anneau se resserre progressivement afin de partager le cytoplasme par étranglement. Un passage étroit entre les deux cellules filles contenant les restes du fuseau de division se forme, et finit par disparaître lorsque les cellules filles se séparent complètement (figure 2) (Morgan, 2010).

1.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus primordial, il se doit donc d'être finement régulé et contrôlé afin de minimiser les erreurs de répllication ou de ségrégation des chromosomes qui peuvent conduire à des catastrophes génétiques. Deux principes généraux régissent la progression du cycle cellulaire : i) une étape ne peut être engagée que si l'étape précédente est complétée et ii) les phases de mitose et de répllication doivent être alternées.

Un concept de point de contrôle a été introduit en 1989. Ces points de contrôle sont des mécanismes moléculaires dont le rôle est de s'assurer que la cellule est parfaitement préparée à passer à l'étape suivante et dans le cas contraire d'arrêter sa progression dans le cycle (Hartwell and Weinert, 1989). Trois points de contrôle existent au cours de la progression du cycle cellulaire : un à la transition G1/S, un autre à la transition G2/M et enfin un troisième à la transition métaphase-anaphase qui est également appelé point de contrôle du fuseau (SAC pour *Spindle Assembly Checkpoint*). Ce dernier a pour objectif d'inhiber la progression vers l'anaphase en cas de problème d'attachement des chromosomes au fuseau de division.

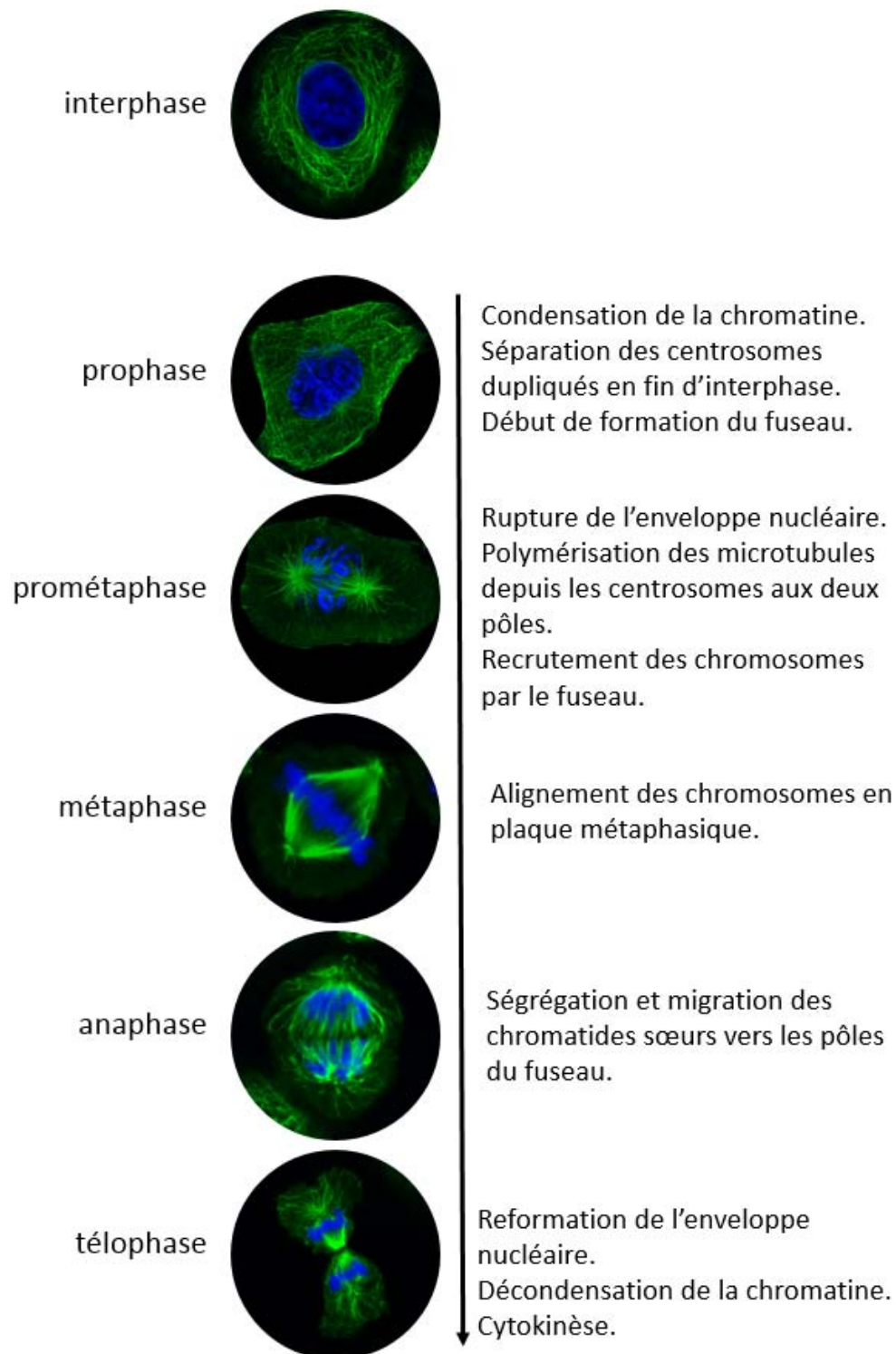


Figure 2 : Les différentes phases de la mitose

La mitose se décompose en 5 phases successives au cours desquelles on assiste à la condensation des chromosomes et la formation du fuseau de division. Les chromosomes migrent ensuite vers les deux pôles du fuseau avant la cytokinèse qui clôt ce processus de division. Pour les cellules représentatives de chacune des phases, l'ADN (en bleu) et les microtubules (en vert) ont été marqués par traitement par le Hoechst et par immuno-fluorescence indirecte.

De plus, un système de contrôle est présent tout au long de la progression de l'interphase, en réponse aux dommages à l'ADN. Ce processus appelé DDR (*DNA Damage Response*), entraîne un arrêt durable en G1, lorsque la cellule présente des dommages à l'ADN afin d'inhiber l'entrée en phase S et donc la réplication d'un ADN endommagé. Ce point de contrôle peut également s'enclencher en phase S si les fourches de réplication sont bloquées. Enfin, en phase G2, il a pour rôle de bloquer la transition G2/M en cas de dommage à l'ADN. Il fait en sorte que la mitose ne soit pas déclenchée si la réplication de l'ADN n'est pas correcte. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce système peut également bloquer la progression vers l'anaphase en cas de lésion de l'ADN (Morgan, 2010).

1.4. Des cycles cellulaires particuliers

Les phases et principes décrits précédemment sont respectés dans la majorité des types cellulaires. Les durées des phases du cycle peuvent varier, la phase G1 étant généralement la plus longue. Les cellules embryonnaires ne présentent pas de phases G1 et G2 au début de la segmentation. L'endoreplication permet des cycles successifs de réplication sans mitose. Enfin, la méiose constitue une suite de deux divisions sans réplication, aboutissant à la formation de cellules haploïdes.

2. Les principes moléculaires généraux contrôlant la division cellulaire et sa progression

2.1. La transition G2/M

2.1.1. Découverte des couples Cdk/Cycline

Les expériences réalisées sur le modèle ovocyte de *Xenopus laevis* ont permis de mettre en évidence l'existence d'un facteur de régulation de la transition G2/M. Chez cette espèce, les ovocytes sont tout d'abord bloqués en prophase de méiose I. Suite à une stimulation hormonale (progestérone), l'ovocyte effectue sa première division et progresse jusqu'en début de méiose II pour s'arrêter une seconde fois en métaphase. Cette reprise de méiose et la progression jusqu'en métaphase II forment une étape appelée la maturation. En 1971, des expériences d'injection de cytoplasme d'ovocytes matures (c'est-à-dire bloqués en métaphase II) dans des ovocytes en prophase I ont montré que cette injection permettait à elle seule d'induire la maturation des ovocytes en l'absence de toute stimulation hormonale. Cette observation a révélé l'existence d'un facteur cytoplasmique dont l'activité biologique permet la reprise méiotique. Ce facteur a été désigné sous le terme de MPF (*Meiosis Promoting Factor*) (Masui and Markert, 1971). Lors de l'émission d'une théorie unificatrice postulant l'universalité du rôle du MPF pour la progression en phase M, ce facteur est devenu le M-

phase Promoting Factor. Cette théorie repose sur la mise en évidence que ce facteur est un complexe constitué d'au moins deux protéines quel que soit le type cellulaire considéré. Il se compose d'une sous-unité catalytique dont l'activité kinase dépend de la présence d'une sous-unité régulatrice (Arion et al., 1988; Labbe et al., 1989; Lohka et al., 1988). Cette dernière, la Cycline B, appartient à la famille des Cyclines nommées d'après les oscillations de leurs niveaux d'expression qui dépendent du cycle cellulaire (Evans et al., 1983). La sous unité-catalytique est une serine-thréonine kinase qui a été nommée Cdk1 (pour *Cycline Dependant protein Kinase*).

Plus tard, d'autres couples Cycline/Cdk impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ont été découverts. De manière analogue au MPF, ces hétérodimères sont les principaux régulateurs de la progression au travers des différentes étapes et points de contrôle du cycle. En effet, les couples Cdk4/Cycline D et Cdk6/Cycline D sont impliqués dans la progression en G1 : en phosphorylant la protéine du rétinoblastome, elles permettent notamment la libération des facteurs de transcription E2F qui permettent la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S. C'est le couple Cdk2/Cycline A qui est responsable de la progression de la phase S *via* la phosphorylation de substrats qui sont requis pour compléter et sortir de la phase S. Enfin les couples Cdk2/Cycline E et Cdk1/Cycline B sont respectivement responsables des transitions G1/S et G2/M (Malumbres and Barbacid, 2005) (figure 3).

L'activité des Cdks est régulée i) par le cycle de synthèse/dégradation des cyclines associées et ii) par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation de résidus spécifiques. Cdk1, par exemple, est activée par la phosphatase à double spécificité Cdc25, tandis qu'elle est inhibée par l'activité des kinases Wee1 et Myt1 (Malumbres and Barbacid, 2005). Les kinases et phosphatases qui régulent l'activité des Cdks sont également soumises à différents niveaux de contrôle, incluant principalement des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. L'ensemble des mécanismes qui contrôlent la progression du cycle forme donc un réseau de régulation complexe. Nous en détaillerons les bases pour le cas de la transition G2/M.

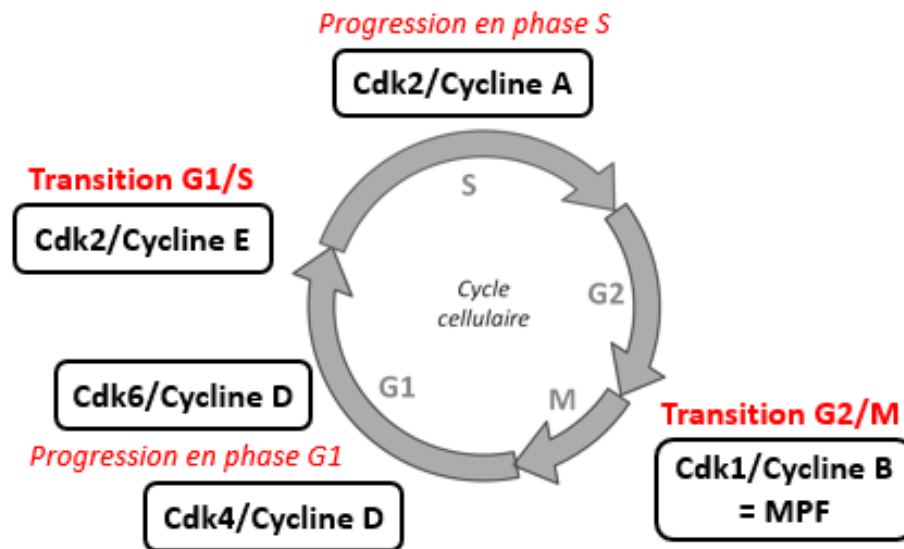


Figure 3: Les principaux couples Cdk/Cycline dans la régulation du cycle cellulaire.

Schéma des principaux couples Cdk/Cycline positionnés en fonction de leurs rôles au cours de la progression du cycle cellulaire.

2.1.2. Mécanismes moléculaires à la base de la transition G2/M

La transition G2/M est sous le contrôle du complexe Cdk1/Cycline B (MPF). La Cycline B est accumulée progressivement au long des phases S et G2. Elle s'associe avec Cdk1 pour former un pré-MPF inactif. Cdk1 est inactive dans ce complexe car elle est phosphorylée par les kinases Wee1 et Myt1 au niveau des résidus Thr14 et Tyr15. Ces résidus sont situés au niveau de la boucle d'activation de Cdk1 (Malumbres and Barbacid, 2005). L'activité de Cdk1 dépend également de la phosphorylation du résidu Thr161 par la CAK (*CDK-activating kinase*) qui permet l'association de Cdk1 à la Cycline B. (Porter and Donoghue, 2003).

La déphosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 permet l'activation du site catalytique de Cdk1. Cette déphosphorylation est réalisée par la phosphatase à double spécificité Cdc25, elle-même activée par PLK1 (Polo-like kinase 1) en fin de phase G2. Une partie du pré-MPF activé par Cdc25 phosphoryle Cdc25 et participe à l'inactivation de Wee1 et Myt1. Ce double mécanisme de rétrocontrôle positif constitue la boucle d'auto-amplification du MPF (figure 4). Une fois qu'il est activé, le MPF orchestre une série de modifications requises pour la progression en phase M, en phosphorylant différentes protéines substrats (Porter and Donoghue, 2003). Les cibles du MPF comprennent les histones H1 impliquées dans la condensation de l'ADN. Le MPF phosphoryle également les lamines, ce qui participe à la désorganisation de l'enveloppe nucléaire. Enfin, parmi

ses substrats, on retrouve également les protéines associées aux microtubules et l'APC/C dont l'activité est nécessaire à l'ubiquitinylation et la dégradation de la cycline B lors de la mitose (Errico et al., 2010).

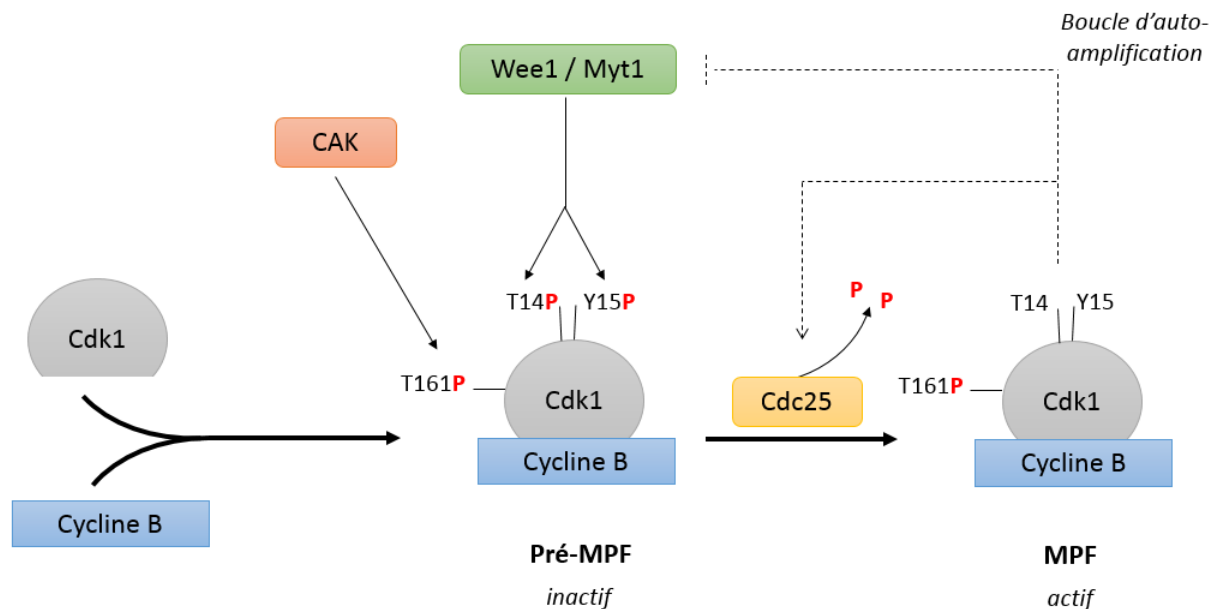


Figure 4 : Mécanismes d'activation du MPF

La cycline B synthétisée se fixe à Cdk1. Cdk1 est alors phosphorylée par la CAK (Thr161) et par Wee1 et Myt1 sur les résidus inhibiteurs Thr14 et Tyr15. En fin de phase G2, cdc25 activée déphosphoryle ces deux résidus et active le MPF. Ce dernier contribue à son activation massive par deux mécanismes de rétrocontrôle positif : l'inhibition de Wee1 et Myt1 et l'activation de Cdc25.

2.2. La transition métaphase-anaphase

Lors de la transition métaphase-anaphase, les chromosomes sont distribués de manière égale entre les deux cellules fille de façon à conserver le même génome. Le moyen d'y parvenir repose sur la cohésion des chromatides sœurs, qui s'opère dès leur réplication. Cette cohésion s'effectue par des interconnexions entre les deux chromatides, au niveau de leurs centromères et le long des bras chromosomiques, grâce à des complexes protéiques en forme d'anneau appelés cohésines. La cohésion le long des bras chromosomiques est rompue lors de la prophase. Au niveau des centromères, elle est maintenue jusqu'en métaphase, lorsque chacune des deux chromatides sœurs est attachée aux microtubules orientés vers les pôles opposés. En début d'anaphase, les anneaux de cohésines s'ouvrent, ce qui désunit les chromatides sœurs et permet leur migration vers les pôles opposés du fuseau.

D'un point de vue moléculaire, les complexes de cohésines sont formés par l'association d'un dimère Smc1-Smc3 (*Structural Maintenance of Chromosomes protein*) associé à l' α -kleisin, qui à son tour recrute les sous-unités Scc3/SA, Pds5 et Wapl (Nasmyth, 2011). La séparase est une endopeptidase capable de cliver la sous-unité α -kleisin de la cohésine, abolissant ainsi la cohésion des chromatides sœurs. Jusque la transition métaphase-anaphase, la séparase est prise en charge par la sécurine, une protéine chaperonne inhibitrice. L'activation de la séparase est dépendante du franchissement du point de contrôle du fuseau ; si l'attachement des kinétochores au fuseau mitotique est correct, il y a activation de l'APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*). L'APC/C, couplé à son régulateur cdc20, greffe alors un groupement ubiquitine sur la sécurine ce qui conduit à sa dégradation. La séparase qui n'est donc plus inhibée exerce alors son activité de clivage sur les cohésines et l'anaphase peut commencer (Lara-Gonzalez et al., 2012).

Lorsque l'attachement des chromosomes au fuseau est incorrect, le MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*), qui comprend Mad2, BubR1, Bub3 et cdc20, est assemblé. Ce complexe inhibe l'activité de l'APC/C et empêche ainsi la dissociation des chromatides sœurs *via* le clivage des cohésines (figure 5). Le point de contrôle du fuseau a donc pour rôle le maintien de l'intégrité du génome en retardant la division jusqu'à ce que soit garantie la ségrégation correcte des chromosomes (Bharadwaj and Yu, 2004). Ce point de contrôle est essentiel puisque la disjonction précoce de ces chromatides peut entraîner des aneuploïdies, lesquelles sont impliquées dans différentes pathologies. Elles peuvent, par exemple, conduire à un syndrome de Down (trisomie 21) lorsque ce problème a lieu lors de la méiose. Les aneuploïdies sont également fréquemment retrouvées dans les pathologies cancéreuses (Riquet et al., 2011).

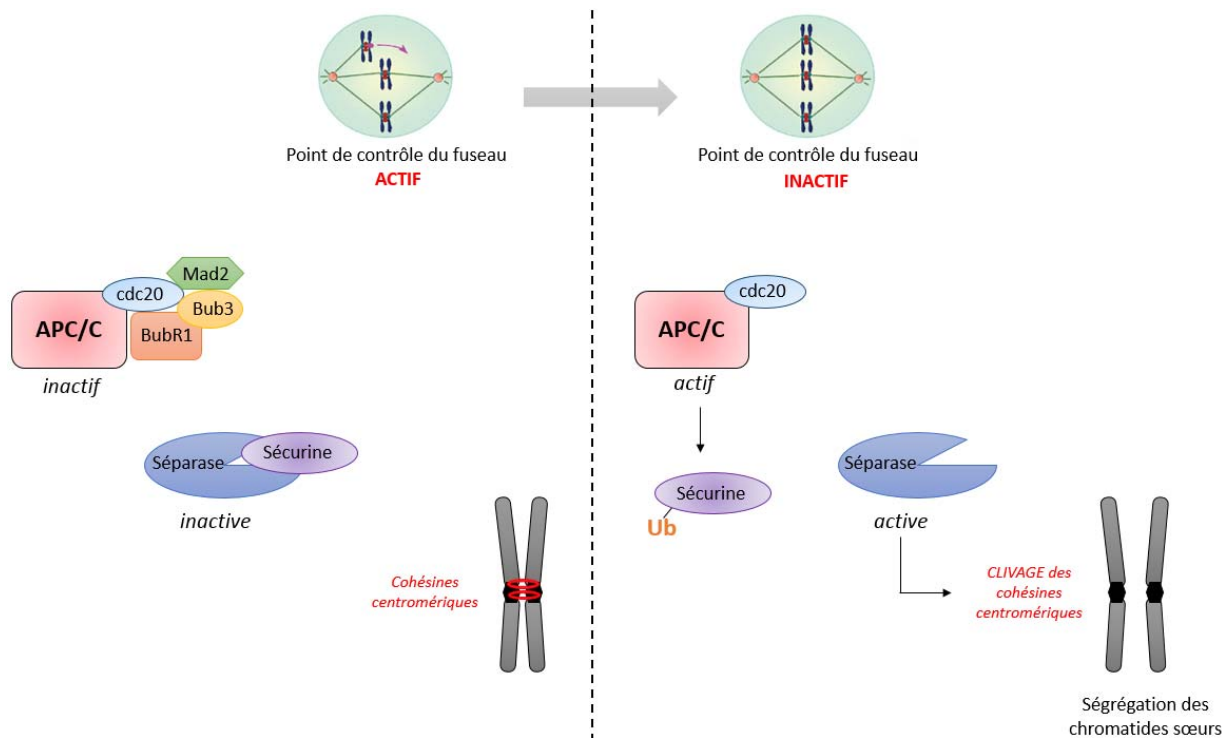


Figure 5 : Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau

Tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau, le point de contrôle du fuseau est actif et la cohésion entre les chromatides sœurs est maintenue. Une fois l'attachement terminé, l'APC/C est activé et conduit à la dégradation de la securine. La séparase est alors libre de cliver les cohésines centromériques, ce qui permet la ségrégation des chromatides sœurs. Adapté d'après : Bharadwaj and Yu 2004.

II. PKA et MAPK/ERK : deux kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire

Les principes moléculaires détaillés précédemment ne posent que les bases générales des mécanismes qui régulent les transitions G2/M et métaphase-anaphase. En effet, d'autres protéines comme les kinases impliquées dans les voies de signalisation peuvent moduler la régulation du cycle cellulaire. C'est le cas de la *Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase* (MAPK/Erk1/2) et de la *cAMP-dependant Protein Kinase* (PKA), deux protéines clés des processus de développement embryonnaire, de différenciation, et également de la prolifération (Chambard, et al. 2007; Lamb, et al. 1991; Roberts, et al. 2002; Zeilig, et al. 1976).

1. PKA et la régulation du cycle cellulaire

1.1. La voie de signalisation AMPc/PKA

1.1.1. Généralités sur la voie de signalisation AMPc/PKA

La voie canonique de la signalisation AMPc/PKA est activée par la fixation de ligands extracellulaires spécifiques sur les récepteurs couplés aux protéines-G (GPCRs) présents à la membrane. Ces protéines G appartiennent au groupe des GTPases et sont des hétérotrimères constitués de trois sous-unités : α (G_α), β (G_β) et γ (G_γ). Lorsque cette voie de signalisation est inactive, G_α est couplée au récepteur membranaire, liée à une molécule de GDP et associée à G_β et G_γ . La stimulation des GPCRs induit l'échange de la molécule de GDP pour une molécule de GTP, ce qui entraîne la dissociation de G_α -GTP. Celle-ci active alors l'adénylate cyclase (AC), qui catalyse l'ATP en AMPc (3'5' adénosine monophosphate cyclique).

L'AMPc se fixe sur 3 types d'effecteurs : les protéines EPAC (*guanine nucleotide Exchange Protein activated by cAMP*), les canaux ioniques CNG (*cyclic-nucleotide-gated ion channels*) et PKA. Cette dernière est une enzyme tétramérique composée à l'état inactif de 2 sous-unités catalytiques (C) et 2 sous-unités régulatrices (R). L'activation de cette enzyme requiert la fixation de 2 molécules d'AMPc sur chacune des sous-unités régulatrices, qui entraîne la dissociation d'un dimère de sous-unités catalytiques. Sous forme libre, les sous-unités catalytiques phosphorylent divers substrats au sein de la cellule (figure 6) (Pearce et al., 2010).

Cette voie de signalisation est impliquée dans de nombreux processus de la vie cellulaire tels que la transcription, la migration, la mort cellulaire ou encore la prolifération (Lefkimmiatis and Zaccolo, 2014)

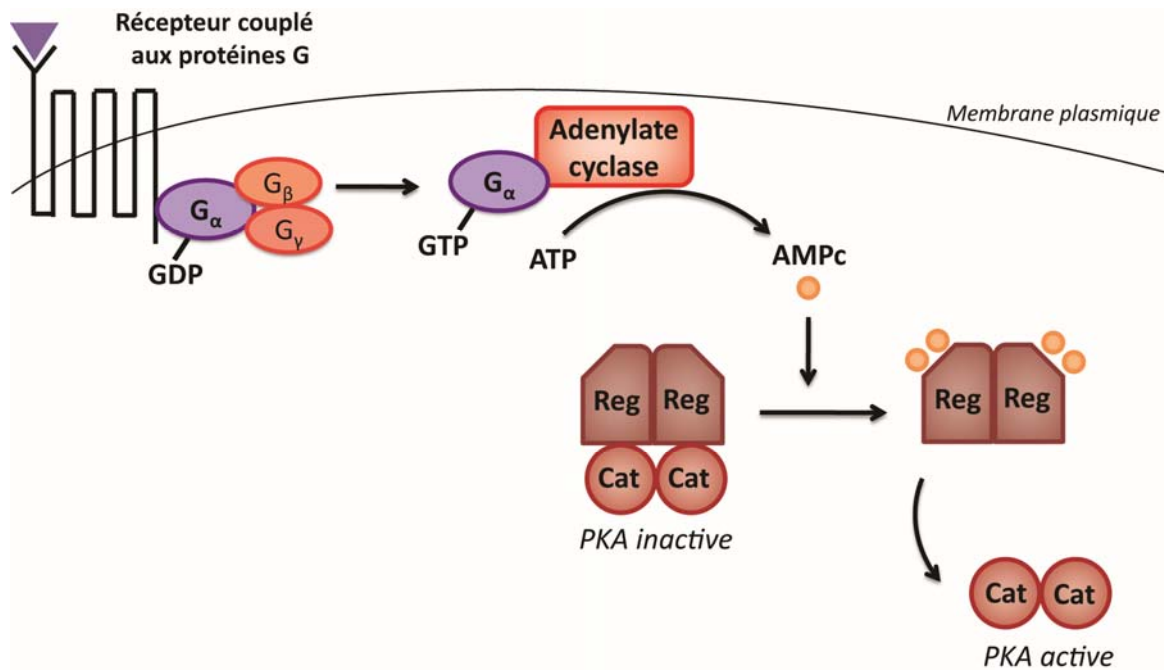


Figure 6 : La voie de signalisation AMPc/PKA

La fixation d'un ligand au GPCR induit l'activation de l'adénylate cyclase responsable de la production d'AMPc. Lorsque l'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices de PKA, cela entraîne la dissociation d'un dimère de sous-unités catalytiques qui constitue la forme active de PKA.

Chez les Eucaryotes supérieurs, il existe deux types d'ACs : une famille transmembranaire et régulée par les protéines G (9 membres) et une AC soluble (dont il existe des variants d'épissage) qui est localisée dans le cytoplasme ou retrouvée associée à des domaines subcellulaires (noyau, mitochondries, microtubules). Cette seconde famille est régulée par le bicarbonate et le calcium mais est insensible à certaines drogues comme la forskoline. L'AC soluble est exprimée dans certains types cellulaires comme les astrocytes, les ostéoblastes ou les cellules rénales (Dessauer, 2009; Tresguerres et al., 2011).

1.1.2. PKA : Isoformes, structure et substrats

Isoformes

Il existe quatre variants de la sous-unité régulatrice de PKA, codés par des gènes distincts et appelés RI α , RI β , RII α et RII β . Dépendamment des sous-unités régulatrices RI ou RII que contient PKA, celle-ci est définie comme PKA de type I ou PKA de type II. Dans ces différents types, les sous-unités RI ont des propriétés d'homo-ou d'hétéro-dimérisation tandis que les sous-unités RII sont des

homodimères exclusivement (Skalhegg and Tasken 2000). Les deux types d'holoenzyme présentent également des patrons de localisation différents : la PKA de type I est majoritairement cytosolique tandis que la PKA de type II est le plus souvent liée aux organelles. De plus, les profils d'expression des sous-unités régulatrices varient en fonction du type cellulaire et/ou tissulaire. RI α et RI α sont exprimées de façon ubiquitaire ; RI β est principalement exprimée dans les tissus adipeux, endocriniens, reproducteurs et cérébraux, tandis que RI β est surtout détectée dans le cerveau (Pidoux and Tasken, 2010). Ces différentes caractéristiques permettent de générer de nombreuses combinaisons, ce qui participe à la diversité des réponses liées aux variations du taux d'AMPc.

Chez l'humain, les sous-unités catalytiques sont codées par 3 gènes différents et sont appelées C α , C β et C γ . Il existe deux variants d'épissage de C α : C α 1 (exprimée de façon ubiquitaire) et C α 2 (uniquement retrouvée dans les spermatozoïdes). De nombreux variants issus de l'épissage alternatif de C β ont également été identifiés. C γ , quant à lui, semble spécifique des tissus testiculaires. De plus, la protéine kinase PRKX, dont le gène est situé sur le chromosome X, est également capable de s'associer avec les sous-unités régulatrices de PKA de façon dépendante au taux d'AMPc. Le gène codant PRKX présente 94% d'homologie avec un gène situé sur le chromosome Y qui code pour la protéine PRKY. Ces deux dernières formes sont considérées comme des sous-unités catalytiques de PKA bien que leurs fonctions restent inconnues (Soberg et al., 2013).

Structure

Les sous-unités régulatrices possèdent en N-terminal un domaine de dimérisation (*Dimerization/Docking Domain* (D/D)) responsable, comme son nom l'indique, de la liaison entre les deux sous-unités régulatrices et qui permet également la fixation aux protéines d'ancrage : les AKAPs (*A-Kinase Anchor Proteins*). Le domaine D/D est suivi d'une région flexible contenant une séquence IS (*Inhibitor Sequence*) qui se lie au site actif de la sous-unité catalytique et l'inhibe en absence d'AMPc. Enfin, les sous-unités régulatrices contiennent en C-terminal deux domaines A et B de fixation de l'AMPc (Kim et al., 2006). A l'état inactif, seul le site B de fixation à l'AMPc est exposé. Lorsque l'AMPc s'y fixe, la sous-unité régulatrice montre un changement de conformation qui facilite la fixation de l'AMPc sur le site A. Cela permet alors la dissociation du dimère de sous-unités catalytiques (Kim et al., 2007) (figure 7).

Les sous-unités catalytiques sont des protéines biglobulaires. Elles présentent un petit lobe en N-terminal qui sert de site de fixation pour l'ATP. Le grand lobe en C-terminal est impliqué dans la catalyse du transfert de phosphate, et fonctionne également comme domaine d'ancrage pour les substrats et les sous-unités régulatrices (Kim et al., 2007; Taylor et al., 2004). La phosphorylation du

résidu Thr197, situé dans la boucle d'activation de la sous-unité catalytique, est essentielle à la configuration optimale du site catalytique (Kim et al., 2006). Cette phosphorylation est effectuée par PDK-1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) et est suivie de l'autophosphorylation de PKA sur le résidu Ser338 (Iyer et al., 2005; Taylor et al., 2004) (figure 7).

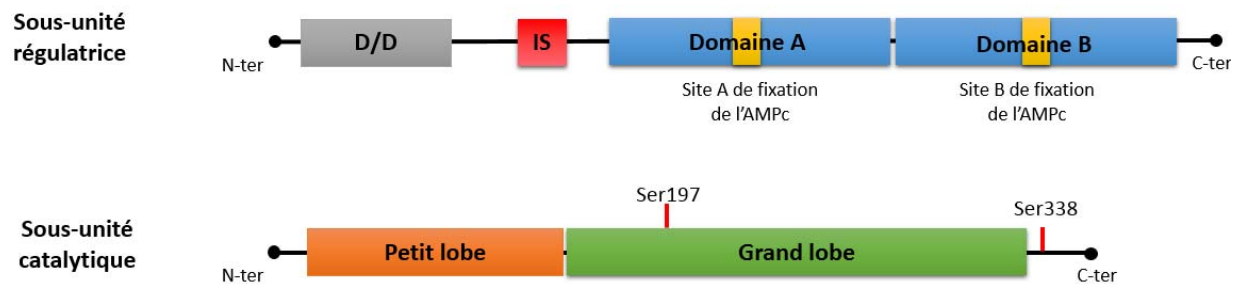


Figure 7 : Les différents domaines composant les sous-unités de PKA

Représentation schématique des différents domaines qui composent les sous-unités régulatrices et catalytiques de PKA. Les abréviations sur le schéma correspondent à : D/D pour domaine de dimérisation ; IS pour séquence inhibitrice.

Substrats

Les sous-unités catalytiques de PKA possèdent une activité sérine-thréonine kinase et phosphorylent leurs substrats sur une séquence consensus R/K-R/K-X-S/T. En 2001, plus de 100 substrats de PKA ont été répertoriés. Parmi eux sont retrouvées des protéines impliquées dans la signalisation de l'AMPc (e.g. : le récepteur β_2 adrénergique, les phosphodiesterases PDE43D et PDE3B), mais également dans la signalisation MAPK (e.g. : Raf-1). Des facteurs de transcription sont également phosphorylés par PKA. C'est le cas de CREB (*cAMP Response Element-binding protein*) et de NF κ B. Enfin, les cibles de PKA comprennent également certaines histones (e.g. : H3), des protéines impliquées dans la mort cellulaire (e.g. : BAD) ou encore dans la contraction des muscles striés (e.g. : Troponin 1) (Shabb, 2001).

1.1.3. Régulation spatiale de la voie cAMP/PKA

La signalisation AMPc/PKA influence divers processus cellulaires *via* la phosphorylation de nombreuses protéines substrats (Shabb, 2001). Si les différentes isoformes existantes de PKA sont un

premier niveau de discrimination des substrats en réponse à un signal donné, la régulation spatiale et temporelle joue également un rôle clé.

L'AMPC, à cause de son caractère hydrophile, est une molécule diffusible. Les phosphodiésterases (PDEs) sont les enzymes responsables de sa dégradation. Les membres de cette famille possèdent une extrémité N-terminale variable qui confère aux différentes PDEs des propriétés de localisation vers différents compartiments cellulaires (*e.g.*: membrane plasmique, appareil de Golgi ou mitochondries)(Baillie, 2009). En dégradant l'AMPC à des endroits spécifiques, ces enzymes délimitent les contours de zones à fortes concentrations d'AMPC. Les PDEs ont donc pour rôle de contenir l'AMPC, pour l'empêcher de diffuser librement dans le cytosol. Il en résulte des microdomaines d'AMPC intracellulaire (Lefkimiatis and Zaccolo, 2014). Par exemple, des travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de PDE4D dans le maintien d'un gradient d'AMPC depuis la membrane vers le cytosol suite à la stimulation des GPCRs par la prostaglandine E1 (Terrin et al., 2006).

D'autres protéines, les AKAPs (*A-Kinase Anchor Proteins*) participent à la régulation spatiale de l'activité PKA. Les membres de cette famille (une cinquantaine) sont capables d'interagir PKA et de la cibler ainsi vers différents compartiments cellulaires. Toutes les AKAPs (excepté la péricentrine) contiennent en effet une courte séquence (14 à 18 acides aminés) qui permet l'interaction avec les sous-unités régulatrices de PKA. La majorité des AKAPs interagit avec PKA de type II. Certaines AKAPs se fixent à PKA de type I, qui est pourtant majoritairement soluble dans le cytoplasme. D'autres AKAPs présentant une double spécificité pour RI et RII ont également été identifiées (Pidoux and Tasken, 2010; Scott et al., 2013). Ces protéines peuvent ancrer les différentes isoformes de PKA au niveau des centrosomes (c'est le cas de AKAP350, AKAP450, CG-NAP et de la péricentrine), du cytosquelette (MAP2, AKAP12, AKAP78) mais également au niveau de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou de la membrane nucléaire (Diviani and Scott, 2001; Pidoux and Tasken, 2010). Par ailleurs, ces AKAPs peuvent interagir avec d'autres membres de la voie de signalisation de l'AMPC tels que les GPCRs ou l'adénylate cyclase. Elles peuvent également interagir avec des phosphatases, des phosphodiésterases ou avec les membres d'autres voies de signalisation. C'est le cas pour AKAP-Lbc qui interagit avec KSR, une protéine d'échafaudage de la voie de MAPK/ERK (Lefkimiatis and Zaccolo, 2014; Smith et al., 2010). Ces AKAPs jouent donc des rôles clés au niveau de la régulation spatio-temporelle de l'activité de PKA, en agissant comme des plateformes de recrutement moléculaire pour la signalisation.

1.2. Rôle de PKA dans la régulation du cycle cellulaire

1.2.1. Effet de l'AMPc sur la prolifération

L'AMPc exerce une action sur la prolifération. Cette molécule peut, dépendamment du type cellulaire, inhiber ou stimuler la croissance cellulaire. Le tableau 1 présente l'impact de l'AMPc sur quelques exemples de lignées cellulaires.

Type cellulaire	Effet d'une augmentation d'AMPc	Référence
Cellules pigmentées de l'épithélium rétinien	Inhibition de la prolifération	(Hecquet et al., 2002)
Cellules musculaires lisses	Inhibition de la prolifération	(Indolfi et al., 1997)
Cellules de kyste épithélial rénal	Stimulation de la prolifération	(Yamaguchi et al., 2000)
Fibroblastes 3T3	Inhibition de la prolifération	(Pastan et al., 1975)
Thyrocytes humains	Stimulation de la prolifération	(Kimura et al., 2001)

Tableau 1 : Quelques exemples d'effets de l'AMPc sur la prolifération de différents types cellulaires

Ces effets s'expliquent notamment par les différences d'expression des membres de la famille de PDEs et des AKAPs entre les types cellulaires. Par ailleurs, il a été montré que les effets de l'AMPc sur la prolifération peuvent également dépendre du cycle cellulaire. Dans les cellules HeLa, les travaux de Zeilig ont révélé que la concentration intracellulaire d'AMPc varie lors des différentes phases du cycle cellulaire : elle est maximale lors de la transition G1/S et chute jusqu'à atteindre son taux le plus bas en phase G2 et M. Ces travaux ont également montré que l'ajout d'un analogue de l'AMPc (le 8-Br-cAMP) en début de phase S allonge la durée des phases S, G2 et M. Enfin, lorsque le 8-Br-cAMP est ajouté lors de la mitose il accélère la sortie de division (Zeilig et al., 1976).

1.2.2. Rôles et effecteurs de PKA lors de la transition G2/M dans les modèles méiotiques

Une partie des actions de PKA sur le cycle cellulaire et notamment sur la transition G2/M ont été extraites d'après des données expérimentales obtenues sur le modèle ovocyte de *Xenopus laevis*. Chez ce modèle, après ajout de progestérone, l'activité de l'adénylate cyclase est inhibée tandis que celle des PDEs reste inchangée, ce qui conduit à une chute du taux intracellulaire d'AMPc lors du déclenchement de la reprise de méiose. Il a été montré que l'inhibition de PKA entraîne la

maturation des ovocytes en absence de progestérone. Au contraire, l'augmentation de son activité (par injection de sous-unité catalytique) inhibe la maturation induite par la présence de progestérone (Karaïskou, et al. 2001). L'inhibition de PKA induite par la progestérone est donc indispensable à l'activation du MPF. PKA phosphoryle cdc25 sur le résidu sérine en position 287, ce qui entraîne l'inactivation de cette phosphatase *via* sa séquestration par la protéine 14-3-3. Maintenue inactive, la phosphatase activatrice du MPF ne peut donc pas permettre la transition G2/M des ovocytes tant que PKA est active (Duckworth et al., 2002) (figure 8). Enfin, la synthèse protéique (qui est une étape clé de la maturation) semble également sous le contrôle de l'inhibition de PKA. En effet, dans les ovocytes ayant reçu une injection de sous-unité catalytique, la synthèse de p39mos, qui est essentielle à l'activation de la voie MAPK/ERK, est bloquée (Matten et al., 1994).

Dans les ovocytes de souris, l'inhibition de PKA est également essentielle à la reprise méiotique. Néanmoins, si l'on maintient un taux d'AMPc élevé en utilisant un inhibiteur des PDEs, mais que l'on déstabilise la sous-localisation de PKA grâce à un peptide abolissant l'interaction entre PKA et ses AKAPs, les ovocytes sont capables de reprendre le cours de la méiose. Cet élément indique que l'action de PKA lors de la reprise méiotique doit être sous-localisée (Solc et al., 2010). Dans ce modèle cellulaire également, la phosphatase Cdc25B est une cible de PKA. Cette phosphatase, lorsqu'elle est phosphorylée par PKA est, de la même façon que chez le xénope, inhibée et séquestrée par la protéine 14-3-3 (Pirino et al., 2009). Dans ces conditions, le MPF ne peut pas être déphosphorylé et activé, et la reprise méiotique est inhibée. Enfin, PKA est capable de phosphoryler et d'activer Wee1B (un homologue de Wee1 exprimé lors de la méiose murine), ce qui inhibe l'activité catalytique du MPF (Han et al., 2005) (figure 8).

En conclusion, dans les modèles de reprise méiotique, amphibiens et mammifères, qui miment la transition G2/M, PKA est un régulateur négatif du franchissement de ce point de contrôle puisqu'il exerce une action négative sur les mécanismes d'activation du MPF. Cette inhibition doit être contrôlée dans le temps et l'espace, ce qui souligne l'importance d'une régulation spatio-temporelle de l'activité PKA pour la progression du cycle.

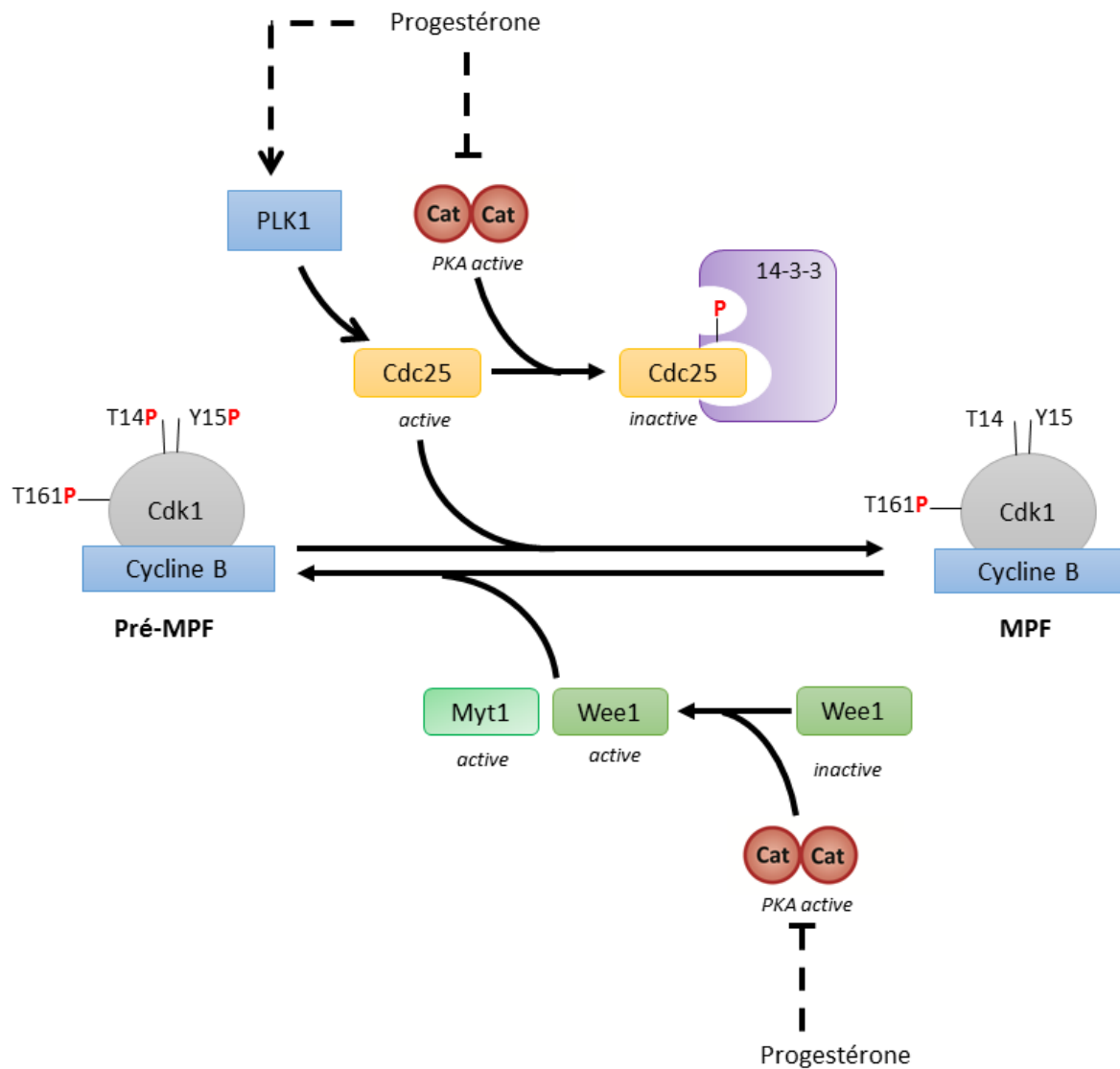


Figure 8 : Effets et cibles de PKA lors de la transition G2/M dans les modèles méiotiques

Dans les ovocytes, PKA phosphoryle Cdc25 ce qui entraîne sa séquestration par 14-3-3. PKA phosphoryle également Wee1 ce qui l'active. Lors de la reprise méiotique, la stimulation hormonale (progestérone) induit une inactivation de PKA. Cdc25 n'est plus inactivée par PKA et déphosphoryle le MPF. Wee1 n'est plus activée et ne phosphoryle plus Cdk1 sur les résidus inhibiteurs. Ces deux mécanismes permettent la reprise méiotique suite à l'inhibition de PKA.

1.2.3. Rôles et effecteurs de PKA lors de la progression de la mitose

Plusieurs études ont révélé que l'activité de PKA est indispensable lors de la mitose. Cette kinase peut notamment phosphoryler certains facteurs nécessaires à son déroulement et est impliquée à différents niveaux du processus de division cellulaire.

Régulation de l'entrée en mitose dans des extraits cyclants

Les extraits cyclants d'ovocytes de xénope sont des extraits acellulaires d'ovocytes fécondés qui miment les premières divisions embryonnaires. Dans ces extraits, les phases S et M s'enchainent sans la présence des phases G1 et G2. Dans ce modèle, des oscillations du taux intracellulaire d'AMPc et de l'activité PKA ont été observées. Ces paramètres sont maximums en début d'interphase, décroissent ensuite pour atteindre un minimum au début de la mitose et recommencent à s'élever lors de la métaphase. Lorsque l'on empêche la ré-augmentation d'activité PKA à ce moment, la sortie de mitose est inhibée (Grieco et al., 1996). De plus, toujours dans des extraits cyclants, l'inhibition de PKA conduit à une activation prématurée du MPF. A l'inverse, l'ajout d'un analogue de l'AMPc pour activer PKA induit un retard de l'activation du MPF (Grieco et al., 1994). Dans ce modèle, PKA est donc un régulateur négatif de l'entrée en mitose.

Implication dans la condensation de la chromatine

PKA est impliquée dans le processus de condensation de la chromatine. Les sous-unités de type RII α sont associées à AKAP95, protéine qui est localisée au niveau de la chromatine lors de la mitose dans les cellules HeLa. Il a été montré que cette interaction, et l'activité de PKA sont nécessaires au maintien de la condensation des chromosomes (Collas et al., 1999). L'interaction RII α -AKAP95 dépend de la phosphorylation de RII α sur la thréonine 54 (Landsverk et al., 2001). Ce résidu est phosphorylé *in vitro* par Cdk1, ce qui suggère un lien complexe entre l'activité de PKA et celle du MPF lors de la mitose (Keryer et al., 1998). De plus, PKA phosphoryle le principal variant de l'histone H1 (H1.4). Cette dernière est phosphorylée de la prophase à la cytokinèse, ce qui entraîne sa dissociation de la chromatine. Cette phosphorylation contribue à la progression de la mitose puisque l'expression de H1.4, mutée pour ce site de phosphorylation, entraîne une réduction du nombre de cellules en mitose. Par ailleurs, lorsque PKA est inhibée et que H1.4 ne se dissocie pas de la chromatine, on observe une forte augmentation de la compaction de l'ADN (Chu et al., 2011).

Implication au niveau du fuseau et des centrosomes

Les centrosomes, centres organisateurs des microtubules sont des organites cellulaires essentiels pour garantir la fidélité du processus de ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Des études de caractérisation du protéome du centrosome ont révélé la présence de différentes sous-unités de PKA (C α , C β , RII α et RII β) au niveau de cette structure (Andersen et al., 2003; Nogales-Cadenas et al., 2009). De plus, plusieurs AKAPs sont capables d'ancrer PKA à ces structures, telles que AKAP350, AKAP450, CG-NAP et la péricentrine, ce qui suggère que PKA pourrait avoir de multiples rôles et/ou cibles au niveau des centrosomes. D'ailleurs, l'abolition de l'interaction AKAP-PKA donne lieu à des anomalies de formations du fuseau (Diviani and Scott, 2001). Les travaux de Terrin, réalisés en cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) ont révélé que le niveau d'AMPc, ainsi que l'activité de PKA aux centrosomes augmentent lors de la mitose. En interphase, un faible niveau d'AMPc est localement maintenu grâce à PDE4D3, une phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc spécifiquement au niveau des centrosomes. Lorsque ce micro domaine à faible concentration d'AMPc est aboli suite à l'expression d'un mutant inactif de cette PDE, les cellules s'arrêtent en prophase. Cette observation suggère que la régulation du niveau d'AMPc et de l'activité PKA au niveau des centrosomes est indispensable à la progression de la mitose (Terrin et al., 2012).

Implication au niveau des kinétochores

Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, PKA joue un rôle au niveau des kinétochores. La réduction de l'activité PKA permet de restaurer la viabilité perdue lors de mutation de protéines kinétochoriennes, ce qui implique qu'une diminution de l'activité PKA est nécessaire pour les fonctions de ces complexes moléculaires (Ma et al., 2012; Magtanong et al., 2011).

Implication lors de la transition métaphase-anaphase

La régulation de l'activité de PKA semble essentielle au franchissement de la transition métaphase-anaphase. En effet, PKA phosphoryle deux sous-unités de l'APC/C, le complexe moléculaire responsable de la dégradation des cyclines et impliqué dans la ségrégation des chromatides sœurs. Ces sous-unités sont Cdc27, qui est impliquée dans le recrutement des protéines adaptatrices et Tsg24/APC1 qui est impliquée dans le maintien structural de l'APC/C. La phosphorylation de ces deux sous-unités a un effet inhibiteur sur le fonctionnement de l'APC/C, ce qui suggère qu'une chute d'activité PKA est nécessaire au franchissement de la transition métaphase-anaphase (Kotani et al., 1998; Matyakhina et al., 2002; Thornton and Toczyski, 2006).

Rôle sur l'activité de Aurora A

Aurora A kinase constitue également une cible de PKA. Aurora A est une protéine clé pour la progression de la mitose : elle est impliquée dans la maturation des centrosomes, la formation du fuseau et participe à l'activation du complexe Cdk1/Cycline B (Nikonova et al., 2013). Aurora A est également requise, lors de l'anaphase, pour l'assemblage du fuseau central (structure qui se forme au centre du fuseau de division et qui participe à la cytokinèse) (Reboutier et al., 2013). Il a été montré que PKA phosphoryle Aurora A en position Thr288, ce qui conduit à une augmentation de son activité (Walter et al., 2000).

Implication dans la stabilité chromosomique

Plusieurs travaux ont établi un lien entre PKA et la stabilité chromosomique (Matyakhina et al., 2002). Par exemple, dans les cellules BW1J (cellules d'hépatome murines), les sous-unités RI ainsi que les sous-unités catalytiques sont co-localisées avec la tubuline (α et β) du fuseau mitotique. De plus la surexpression de RI α ou l'expression d'un dominant négatif de PKA conduisent à une augmentation de la proportion de cellules possédant un fuseau multipolaire (c'est à dire possédant plus de 2 pôles) (Imaizumi-Scherrer et al., 2001). De plus, PKA phosphoryle l'oncoprotéine 18 (stathmine). Cette protéine déstabilise les microtubules et son activité est régulée négativement par phosphorylation au début de la mitose pour permettre la formation du fuseau (Larsson et al., 1997; Rubin and Atweh, 2004).

1.2.4. Quelle est l'activité de PKA au cours de la mitose ?

La régulation de l'activité PKA semble agir à de nombreux niveaux, à la fois pour déclencher la mitose lors de la transition G2/M mais également afin de permettre le déroulement de cette étape de division. Plusieurs éléments indiquent que l'activité de cette kinase semble être très finement régulée dans le temps et l'espace afin de permettre la combinaison de ses différentes actions *via* différents effecteurs sous-localisés au sein de la cellule. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse à l'activité globale de PKA à ce moment du cycle, il est difficile d'avoir une vision claire.

Nous avons mentionné précédemment les travaux précurseurs de Zeilig, qui s'est intéressé au taux d'AMPc intracellulaire et a observé que ce taux est au plus faible lors de la mitose des cellules HeLa (Zeilig et al., 1976). Pourtant, l'activité de PKA est nécessaire lors de la mitose, notamment pour l'inhibition de l'APC/C, étape clé de la progression vers l'anaphase (Kotani et al., 1998). Parallèlement aux travaux de Zeilig et collaborateurs, une étude en cellules CHO, observait en revanche une augmentation de l'activité de PKA lors de la mitose (Costa et al., 1976). Une augmentation similaire

de l'activité de PKA du début de la mitose jusqu'en métaphase, a été rapportée en cellules NIH3T3 (Kotani et al., 1998).

Les fluctuations d'activité de PKA lors de la mitose et des phases qui la précèdent ou la suivent restent donc difficiles à évaluer. L'une des raisons est la dépendance au type cellulaire de ces variations qui sont affectées par les patrons d'expression de certains régulateurs de la voie AMPc/PKA tels que les PDEs ou les AKAPs. Par ailleurs, l'aspect spatio-temporel de la régulation PKA implique également que les variations globales, c'est-à-dire dans toute la cellule, du niveau d'AMPc ou d'activité de PKA peuvent être le reflet d'une large gamme de variations (augmentation ou inhibition plus ou moins fortes) sous-localisées au sein de la cellule. Les variations détectées pourraient ne représenter ainsi que la moyenne des différentes modifications intracellulaires. Cet effet de « moyennage » peut avoir un impact encore plus important sur une population de cellules à cause des variations naturelles intercellulaires. Par exemple, même dans une population synchronisée, les cellules n'entrent pas en mitose au même instant précis, les différentes étapes n'ont pas non plus la même durée exacte d'une cellule à une autre. Chaque prélèvement effectué à un temps donné ne reflète donc que la moyenne de ces variations temporelles intercellulaires.

Une question clé qui reste à élucider, est donc de déterminer précisément de quelles façons les différentes variations d'activité PKA interviennent dans le temps et l'espace afin d'agir sur ses multiples cibles et effecteurs nécessaires à la progression de la mitose.

2. MAPK/ERK et la régulation du cycle cellulaire

2.1. La voie de signalisation MAPK/ERK1/2

2.1.1. Généralités sur la voie de signalisation MAPK/ERK1/2

Les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituent une famille de protéines conservée au cours de l'évolution chez les eukaryotes. Cette famille comprend plusieurs sous-familles telles que ERK1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2*), JNKs (*c-Jun N-terminal Kinases*), p38 (*stress-activated kinase of 38 kDa*) ou ERK5/BMK1 (*Big Mitogene-activated Kinase*) (MacCorkle and Tan, 2005). D'autres sous-familles de MAPKs, telles que ERK3/4, ERK7/8 ainsi que NLK, ont été décrites comme atypiques (Cargnello and Roux, 2011; Coulombe and Meloche, 2007).

Ces enzymes sont des sérine/thréonine kinases qui sont organisées en cascades composées de plusieurs niveaux. La kinase en amont est appelée la MAP3K/MAPKKK (*MAP-Kinase Kinase Kinase*). Sous l'effet d'un stimulus, elle phosphoryle et active une MAP2K/MAPKK (*MAP-Kinase Kinase*),

laquelle à son tour phosphoryle et active une MAPK. Ces cascades protéiques jouent un rôle crucial dans la transduction du signal et permettent d'orienter ou de moduler les décisions cellulaires en réponse à des stimuli (Bodart, 2010) (figure 9).

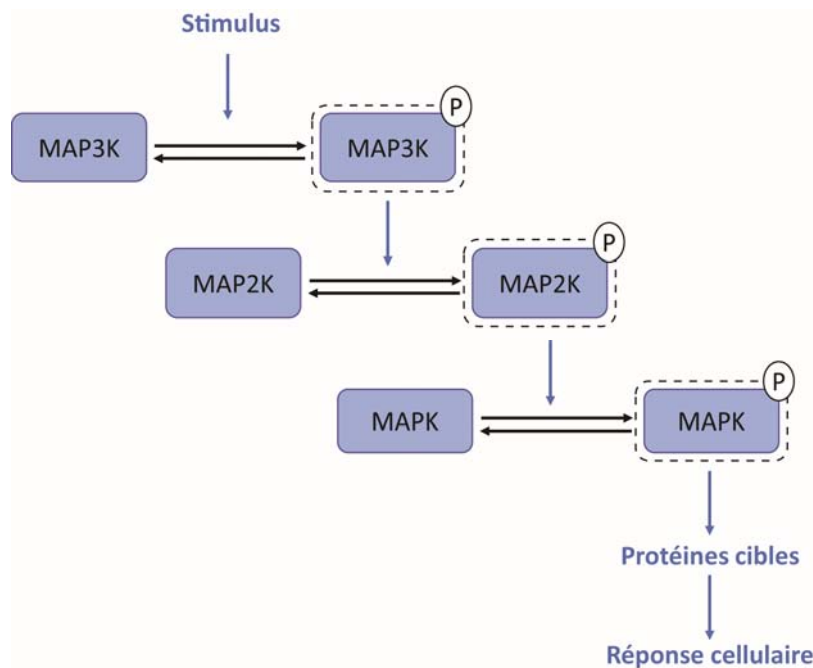


Figure 9 : Architecture de la cascade des MAPKs

En réponse à un stimulus, la MAP3K est phosphorylée et active à son tour la MAP2K, laquelle en retour phosphoryle la MAPK. Cette dernière, alors active, phosphoryle divers substrats pour moduler la réponse cellulaire.

Dans le reste de ce manuscrit nous nous intéresserons spécifiquement à MAPK/ERK (qui réfère ici à ERK1/2). La voie de signalisation qui aboutit à l'activation de ERK1/2, est activée en réponse aux signaux extracellulaires qui stimulent des récepteurs tyrosine kinase, des intégrines ou encore des récepteurs couplés aux protéines-G.

La voie canonique MAPK/ERK est activée par la fixation d'un facteur de croissance, tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) sur leur récepteurs tyrosine kinase membranaire respectifs. Cette interaction conduit à la dimérisation de ces récepteurs, qui est suivie de leur autophosphorylation. Cette dernière étape permet le recrutement de la protéine adaptatrice Grb-2 (*growth factor receptor binding Homology 2*), qui est liée au facteur d'échange de guanine SOS (*Son of sevenless*). Le recrutement de SOS à la membrane permet son interaction avec la petite GTPase Ras (*Rat sarcoma*) qui est liée au GDP. SOS active ensuite le relargage du GDP en

faveur du GTP. Ras-GTP recrute alors RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), la MAP3K, au niveau de la membrane où elle est notamment activée par des événements de phosphorylation et de déphosphorylation. Elle peut alors phosphoryler la MAP2K, MEK (1 et 2) qui à son tour active phosphoryle la MAPK/ERK. Les kinases ERK1 et ERK2 phosphorylent ensuite de nombreux substrats à la fois cytoplasmiques et nucléaires (Cseh et al., 2014; Ramos, 2008; Yoon and Seger, 2006) (figure 10).

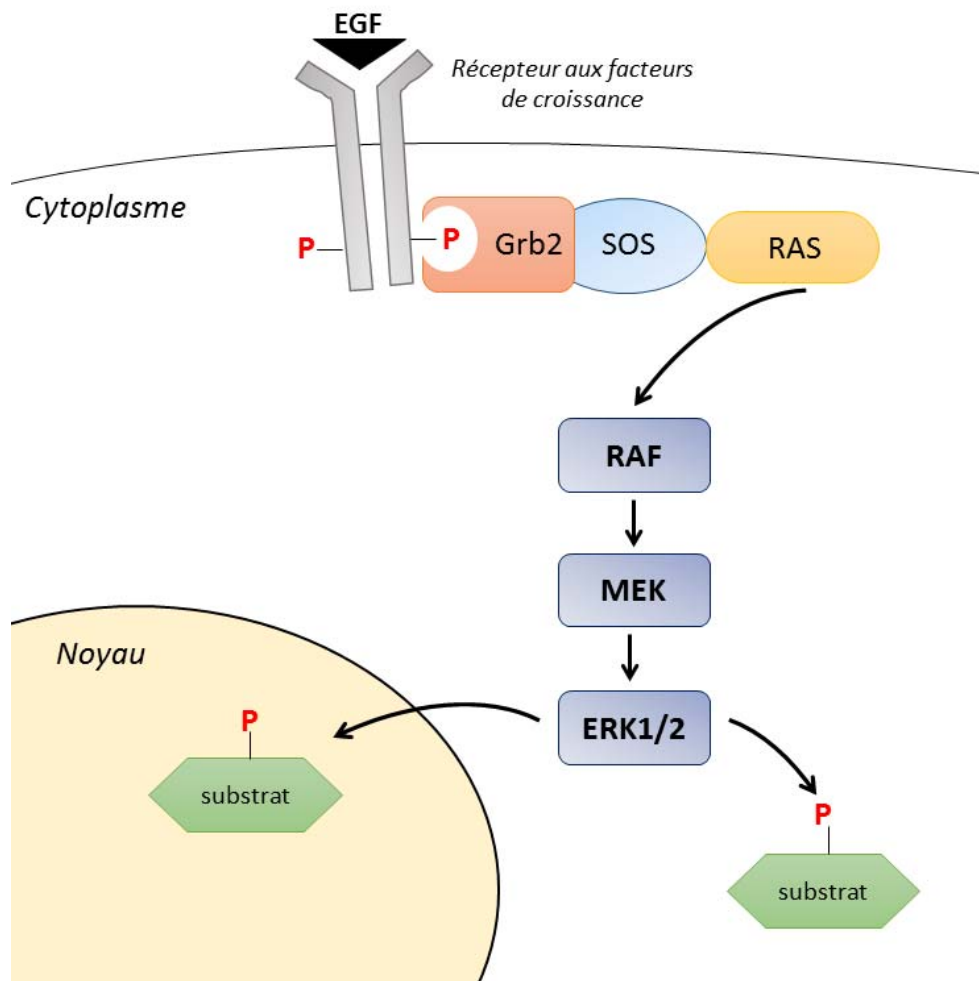


Figure 10 : Représentation schématique de la voie MAPK/ERK activée par les facteurs de croissance

La fixation d'un ligand entraîne la dimérisation et l'autophosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance. Le recrutement de Grb2 et SOS permet leur interaction avec Ras, qui active ensuite Raf. Raf phosphoryle ensuite MEK qui à son tour phosphoryle ERK1/2. Cette dernière alors active phosphoryle ses substrats nucléaires et cytoplasmiques.

Les protéines Rafs forment un groupe de sérine/thréonine kinase constitué de 3 isoformes chez les mammifères (A-Raf, B-Raf et C-Raf également appelé Raf-1). Il existe deux isoformes de MEK : MEK1

et MEK2, qui sont des kinases à double spécificité. MEK1/2 peut en effet phosphoryler son substrat ERK1/2 sur des résidus serine, thréonine ou tyrosine (Shaul and Seger, 2007).

Dans les cellules HeLa et dans les cellules COS-7 les concentrations des différents membres de la voies de signalisation MAPK/ERK ont été déterminées et sont reportées dans le tableau 2 (Fujioka et al., 2006). En HeLa, il existe au sein de la cellule cent fois plus de MEK que Raf, tandis que la concentration de ERK représente deux tiers de celle de MEK. De plus, suite à une stimulation par l'EGF, il a été mesuré que seules 5% des MEK sont phosphorylées contre 60% des ERK. Enfin, dans l'ovocyte de xénope, la concentration de Mos (la MAP3K dans ce modèle) est 400 fois inférieure à celle de MEK, sa cible en aval (Huang and Ferrell, 1996). Ces éléments révèlent qu'une forte amplification du signal peut au sein de la cascade (Fujioka et al., 2006; Roskoski, 2012).

	HeLa	COS-7	Ovocytes de xénope
	<i>En nM</i>		
Ras	400	530	<i>Non déterminé</i>
Raf	13	5.4	(ici Mos) : 3
MEK	1400	1800	1200
ERK	960	810	1200

Tableau 2 : Concentration intracellulaire des différents membres de la cascade MAPK/ERK

Les concentrations des différents membres de la cascade son exprimées en nM. Pour les cellules HeLa et COS-7, ces valeurs sont extraites d'après : Fujioka et al., 2006. Pour l'ovocyte de xénope, elles sont extraites d'après : Huang and Ferrell, 1996.

2.1.2. ERK1/2

Isoformes et structure

Chez les vertébrés, deux isoformes sont exprimées: ERK1 et ERK2, respectivement 44 et 42 kDa, qui possèdent 84% d'homologie, sont exprimées de façon ubiquitaire et partagent de nombreuses fonctions. Elles sont notamment impliquées dans la régulation de la transcription, de la différenciation, de la sénescence mais également dans la prolifération et la progression du cycle cellulaire. Elles sont activées par des phosphorylations, effectuées par MEK1/2 sur les résidus thréonine et tyrosine (Thr202 et Tyr204 pour ERK1 et Thr184 et Tyr186 pour ERK2) présents au niveau de leur boucle d'activation. MEK1/2 dans sa forme active phosphoryle d'abord le résidu

tyrosine, ce qui entraîne la dissociation de MAPK/ERK. MAPK/ERK interagit ensuite à nouveau avec MEK1/2 (la même ou une autre protéine) qui catalyse alors la phosphorylation du résidu thréonine en amont (Ferrell and Bhatt, 1997).

Comme toutes les protéines kinases, MAPK/ERK possède un petit lobe en N-terminal, qui contient la boucle de fixation de l'ATP, appelé aussi la *P-loop*. En C-terminal, elles possèdent un lobe plus grand, qui comprend les résidus catalytiques associés au transfert de l'ATP vers les substrats. D'un point de vue tridimensionnel, le site catalytique se trouve au niveau de la poche entre les deux lobes. Lorsque la kinase est à l'état inactif, les lobes sont plus éloignés l'un de l'autre qu'à l'état actif, où ils se rapprochent (Roskoski, 2012)(figure 11).

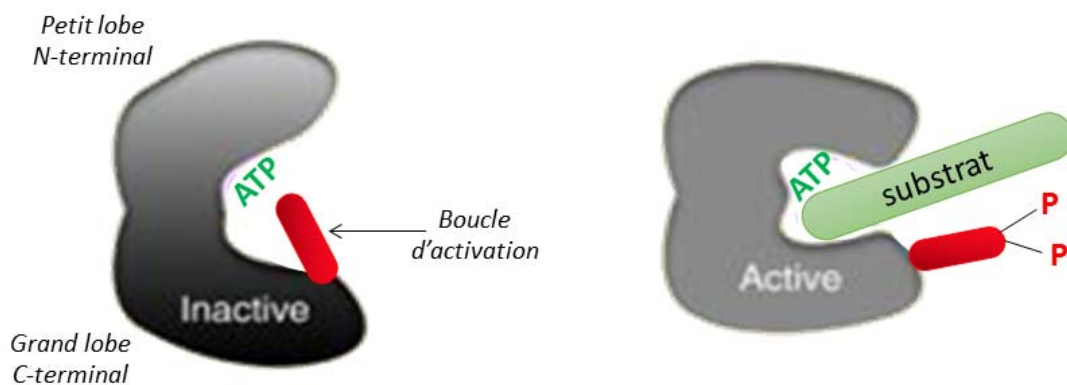


Figure 11 : Représentation schématique des modifications structurales lors de l'activation de MAPK/ERK

Lors de l'activation de MAPK/ERK, les deux lobes se rapprochent, et les résidus du site catalytique sont repositionnés pour permettre la fixation et l'orientation des substrats pour la phosphorylation. Modifié d'après : Futran et al., 2013.

Motifs d'interactions

MAPK/ERK contient deux sites de fixation (ou *docking domain*) : le DRS (*D recruitment site*) qui reconnaît les motifs D sur les protéines substrats et le FRS (*F recruitment site*) qui reconnaît les motifs F. Les séquences consensus de ces motifs sont représentées figure 12. Ces sites de fixations augmentent la spécificité de MAPK/ERK et permettent souvent d'améliorer l'efficacité de la phosphorylation (Futran et al., 2013).

F-sites:	
Elk1	GESQV FQ FPP
SAP1	PAKLS FQ FPS
Ksr1	HQPSQ FN FPN
DUS4	TSQFV FS FPV
MKP1	STTTV FN FPV
Araf	RDQEH FS FPA
Consensus	----- F-FP -
D-sites:	
Elk1	PQ KGRK PRD- LE LPLS
cJun	NP KILK QSMT LN LADP
MKP3	ML RR LQKGN- LP VRAL
MKP1	IV RRRA KGA- MG LEHI
MEK1	MP KKK PTP-- IQL NPA
MKK2	KS KRKK D-- LKL SCM
Consensus	-- ++++ ----- φ-φ ---

Figure 12 : Sites consensus de fixation retrouvés sur les substrats de MAPK/ERK

Avec + correspondant à un acide aminé chargé positivement, et φ à un acide aminé hydrophobe.
D'après : Futran, et al. 2013.

Epissage alternatif

Il existe une version ERK1c qui résulte d'un épissage alternatif de ERK1 (insertion de l'intron 7 dans la région codante). Cette insertion génère un codon stop et produit une protéine de 41 kDa contenant 18 acides aminés modifiés en C-terminal. Ce variant d'épissage est impliqué dans la fragmentation de l'appareil de Golgi lors de la mitose. ERK1c est préférentiellement phosphorylée par le variant d'épissage de MEK1 (appelé MEK1b) (Roskoski, 2012; Shaul et al., 2009). Une seconde forme issue de l'épissage alternatif nommée ERK1b a été décrite chez le rat (Roskoski, 2012).

Les substrats de MAPK/ERK

ERK1/2 phosphoryle préférentiellement ses substrats au niveau de sites riches en proline, dont la séquence consensus est Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro. En 2006, plus de 160 substrats de ERK1/2 ont été dénombrés (Yoon and Seger, 2006). On retrouve dans cette liste des facteurs de transcription (*e.g.* : Elk1, c-Jun ou c-Myc...), des protéines du cytosquelette (*e.g.* : lamine B2, stathmine, Tau...) mais également des kinases et des phosphatases impliquées dans la régulation de la voie MAPK/ERK1/2 (*e.g.* Raf1, B-Raf, MKP3), ainsi que d'autres protéines impliquées dans la signalisation (*e.g.* : récepteur à l'EGF, PDE4, PLCγ) (Yoon and Seger, 2006).

2.1.3. Régulation de MAPK/ERK

En tant que protéine clé de la signalisation, MAPK/ERK est activée en réponse à de nombreux stimuli et peut en retour phosphoryler une grande variété de substrats spécifiques. Pour discriminer entre les cibles et orienter la réponse cellulaire MAPK/ERK est très finement régulée dans le temps et l'espace. L'amplitude et la durée du signal jouent également un rôle dans le destin cellulaire. C'est par exemple le cas pour les cellules PC12 (Phéochromocytome de rat) où la stimulation par l'EGF conduit à une activation transitoire de MAPK/ERK et à la prolifération cellulaire, tandis que la stimulation par le NGF (*Nerve Growth Factor*) conduit à une activation soutenue qui mène à la différenciation et au développement de neurites (Marshall, 1995; Santos et al., 2007).

Régulation par les boucles de rétrocontrôle : quelques exemples

Parmi les différents substrats de MAPK/ERK, certains d'entre eux sont capables d'agir sur la cascade MAPK, afin d'augmenter (rétrocontrôle positif) ou de diminuer (rétrocontrôle négatif) l'activité de MAPK/ERK. Si l'on reprend l'exemple des réponses EGF/NGF dans les cellules PC12 : lors d'une stimulation EGF, le réseau MAPK présente un rétrocontrôle négatif exercé de MAPK/ERK vers Raf-1. Cependant, suite à une stimulation NGF, MAPK/ERK exerce une action de rétrocontrôle positif sur Raf-1 (figure 13). Dans le cas du NGF, il a été proposé que le rétrocontrôle positif dépende de la phosphorylation de RKIP (une protéine inhibitrice de Raf) par PKC (Protéine Kinase C). RKIP, dans sa forme phosphorylée, permettrait en effet la phosphorylation de Raf-1 par ERK1/2, en diminuant l'affinité de RKIP pour Raf-1 (Santos, et al. 2007).

MAPK/ERK phosphoryle Raf sur différents résidus. Ces phosphorylations peuvent conduire à une inhibition de l'activité de Raf. En effet, la phosphorylation de ces sites inhibe l'interaction entre Raf et Ras, promeut la déphosphorylation (par PP2A) et l'inactivation de Raf (Dougherty et al., 2005). A l'inverse, il a été montré que la phosphorylation de Raf par MAPK/ERK peut favoriser son activité (Balan et al., 2006). MEK1/2 est également une cible de MAPK/ERK. Une inhibition de MEK1/2 a été reportée suite à sa phosphorylation par MAPK/ERK sur des résidus Thr292 et Thr212 (Ramos, 2008).

En phosphorylant ses substrats, MAPK/ERK contribue donc à sa propre régulation en agissant de façon positive ou négative à différents niveaux de la cascade.

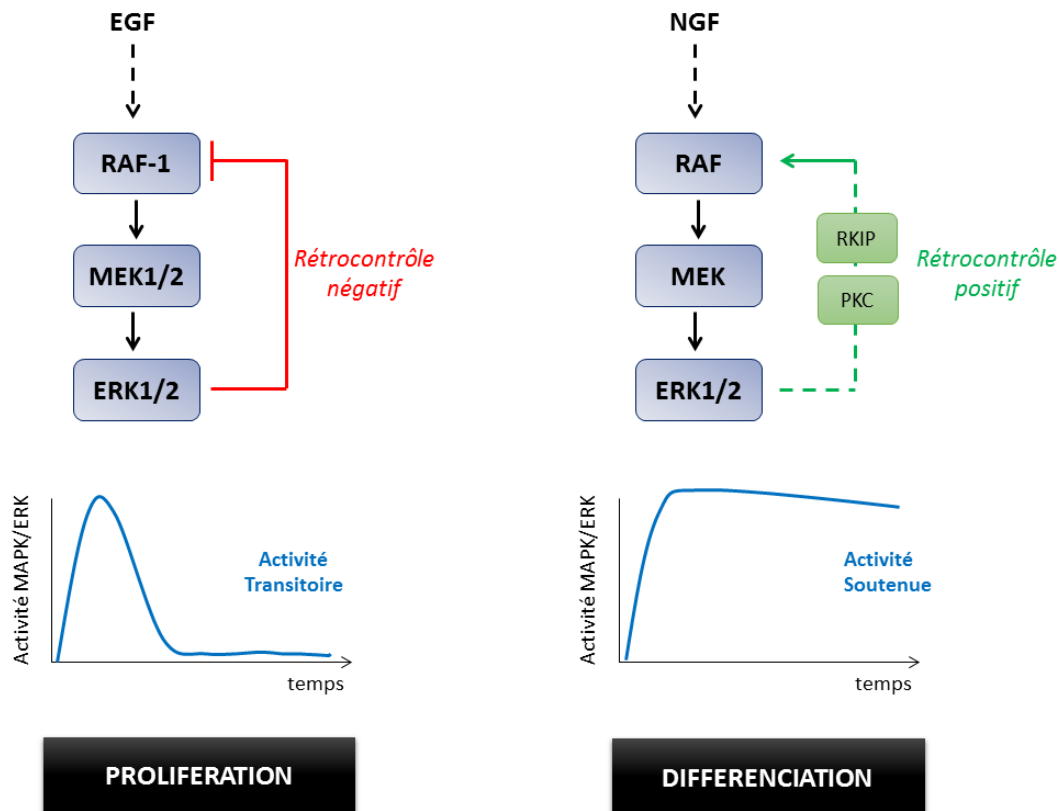


Figure 13 : Boucles de rétrocontrôle impliquées dans les décisions cellulaires, en réponse à la stimulation des cellules PC12 par différents facteurs de croissance

En réponse à une stimulation par l'EGF, l'activité de MAPK/ERK exerce un effet de rétrocontrôle négatif sur l'activation de la cascade. Cela conduit à une activation transitoire de MAPK/ERK et à la prolifération des cellules PC12. En réponse à une stimulation par le NGF, l'activité de MAPK/ERK a un effet de rétrocontrôle positif (via PKC et RKIP) sur l'activation de la cascade. Cela conduit à une activation soutenue de MAPK/ERK et à la différenciation des cellules PC12.

Régulation par les protéines phosphatases

Les MAPKs, MAP2Ks et MAP3Ks sont activées par phosphorylation. De plus l'inhibition ou la modulation des fonctions des MAP2Ks et MAP3Ks implique aussi des processus de phosphorylation. Les phosphatases jouent donc un rôle clé dans la régulation positive et négative de la cascade MAPK/ERK (Raman et al., 2007). La première phosphatase identifiée comme inactivant ERK1/2 est PP2A, une phosphatase spécifique des résidus serine/thréonine. D'autres protéines tyrosine phosphatases présentent également une bonne spécificité pour ERK : c'est le cas de PTP-SL, STEP ou encore HE-PTP (Pouyssegur et al., 2002).

Il existe également une famille de phosphatases à double spécificité capable de déphosphoryler et d'inactiver ERK1/2, à la fois sur les résidus tyrosine et thréonine. Ces protéines sont appelées les

MKPs (*MAPK phosphatases*). Ces enzymes sont composées de deux domaines : un domaine de fixation des MAPKs en N-terminal et un domaine responsable de l'activité phosphatase en C-terminal. Cette famille est divisée en trois groupes. Les MKPs de type I sont localisées dans le noyau et sont activées en réponses à de nombreux stimuli qui activent également la voie MAPK/ERK. Il a donc été suggéré que cette sous-famille (qui comprend MKP-1, MKP-2 ou encore PAK1,) joue un rôle dans les processus de rétrocontrôle de l'activité de MAPK/ERK au niveau du noyau. Les membres de la seconde sous-famille (qui inclut MKP-3, MKP-4 et MKP-X) possèdent un signal d'export nucléaire et sont donc localisés dans le cytoplasme. Ces MKPs sont exprimées de façon tissu-spécifique. La troisième sous-famille (qui comprend MKP-5, MKP-7 et M3/6) est spécifique de JNK et p38 (Kondoh and Nishida, 2007).

Régulation par les protéines d'échafaudage

Dans de nombreux contextes, la spécificité de la signalisation MAPK est facilitée par la présence de protéines d'échafaudage. Ces protéines rassemblent différents membres de la voie de la signalisation et favorisent la transmission du signal en mettant en proximité les composants de la cascade. Ces protéines ont donc un rôle dans la modulation de la signalisation MAPK/ERK (Dhanasekaran et al., 2007). Parmi ces protéines, on trouve KSR (*Kinase Suppressor of Ras*), MP-1 (*MEK partner 1*) ou la paxilline.

En absence de stimulation, KSR-1 (l'un des deux membres de la famille des protéines KSR), est séquestré dans le cytosol *via* la protéine 14-3-3, dépendamment de sa phosphorylation sur deux résidus (Ser297 et Ser392). Dans cet état, KSR-1 interagit constitutivement avec MEK et ERK. Lors d'une stimulation par les facteurs de croissance, Ras provoque la déphosphorylation de KSR-1 par PP2A, ce qui abolit l'interaction entre KSR-1 et 14-3-3. KSR migre alors vers la membrane plasmique où il forme un complexe incluant Raf, MEK et ERK. Dans cette configuration KSR facilite l'activation de la voie MAPK (Zhang et al., 2013) (figure 14) .

Pour citer un autre exemple, la paxilline est une protéine du cytosquelette impliquée dans l'adhésion focale. Cette protéine est liée à MEK en absence de stimulus. Après une stimulation par l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), la paxilline est phosphorylée, ce qui conduit au recrutement de MAPK/ERK. La forme active de Raf est ensuite recrutée, ce qui permet d'activer MEK et MAPK/ERK qui sont placés en proximité (Dhanasekaran et al., 2007).

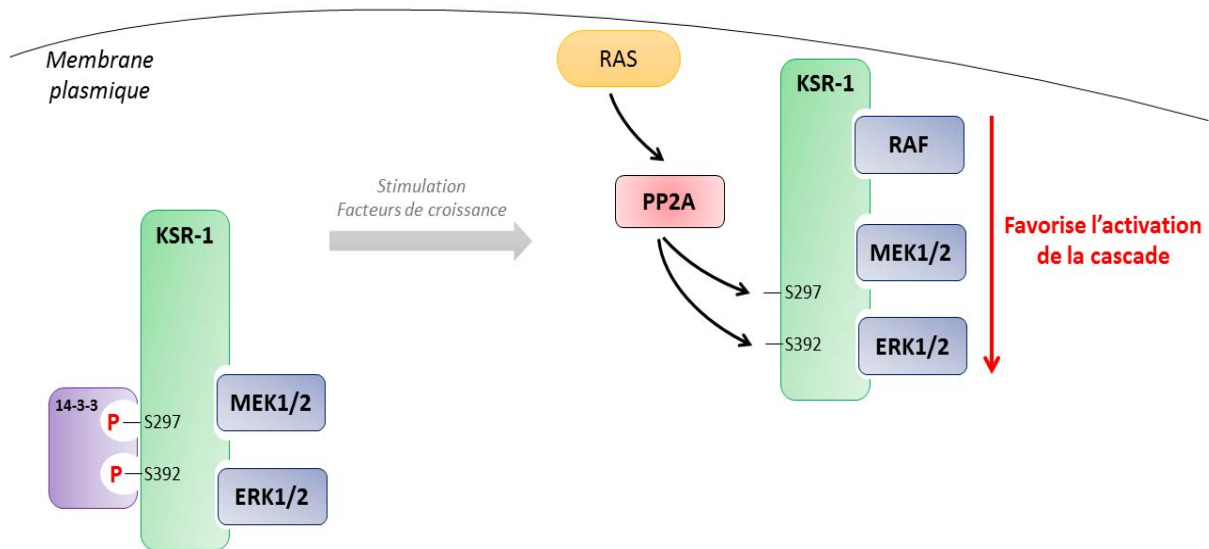


Figure 14 : Représentation schématique de l'activation de la voie MAPK/ERK grâce à la protéine d'échafaudage KSR-1

En absence de stimulation, KSR-1, liée à MEK et ERK, est séquestrée dans le cytosol par 14-3-3. Lors d'une stimulation par des facteurs de croissance, Ras induit la déphosphorylation de KSR-1 par PP2A. KSR61 migre à la membrane, se fixe à Raf et facilite alors l'activation de la cascade en plaçant RAF, MEK et ERK en proximité.

Ces protéines d'échafaudage servent aussi de plateformes de recrutement pour de nombreuses protéines telles que des phosphatases (exemple : interaction KSR-PP2A), mais également des membres d'autre voie de signalisation (exemple : interaction KSR et AKAP-Lbc) afin de permettre la modulation de l'activité de MAPK dans le temps et l'espace (Ory et al., 2003; Smith et al., 2010).

2.2. Rôle de MAPK/ERK dans la régulation du cycle cellulaire

2.2.1. MAPK/ERK et la régulation de la prolifération

Comme précédemment mentionné dans l'exemple de la régulation de la décision cellulaire dans les cellules PC12, l'activité transitoire de MAPK/ERK participe à la prolifération lors d'une stimulation par l'EGF (Marshall, 1995; Santos et al., 2007). La stimulation de l'activité MAPK/ERK rehausse la prolifération, tandis que l'utilisation de dominant négatif ou d'ARN antisens contre les membres de la voie de signalisation MAPK/ERK induit une inhibition de la prolifération (Zhang and Liu, 2002). Il a été montré dans plusieurs modèles cellulaires (cellules épidermiques, de la vessie ou du foie) que

l'inhibition de MAPK/ERK était corrélée à un blocage ou un ralentissement significatif de la progression de la phase G2 en mitose (Dumesic et al., 2009; Factor et al., 2010; Kumar et al., 2009).

L'activité de MAPK/ERK régule les complexes Cdk/Cycline responsables de la transition G1/S (Cdk4/Cycline D ; Cdk6/Cycline D ; Cdk2/Cycline E). En effet, MAPK/ERK régule la transcription de la Cycline D1, mais également la translocation nucléaire de Cdk2 et l'assemblage du complexe Cdk2/Cycline E (Chambard et al., 2007). MAPK/ERK est également impliquée dans la régulation positive de la phosphorylation activatrice de Cdk2 (résidu thr160) (Lents et al., 2002). MAPK/ERK participe de plus à la régulation négative de 173 gènes (dont 29 sont des gènes antiprolifératifs) en phase G1 (Yamamoto et al., 2006). Enfin de nombreuses dérégulations de la voie MAPK/ERK, sont retrouvées associées à des lésions cancéreuses. C'est notamment le cas pour B-Raf qui est muté, cette mutation entraînant une activation constitutive, dans 66% des mélanomes (Dhillon et al., 2007).

2.2.2. Rôle et effecteurs de MAPK/ERK dans la transition G2/M

Dans l'ovocyte de xénope, la micro-injection de la forme active de MEK, de ERK2 (seule isoforme exprimée chez le xénope) ou encore de RSK (*Ribosomal protein S6 subunit Kinase*) (l'une des cibles de ERK) permet la reprise de méiose (Bodart, 2010; Bodart et al., 2002; Dupre et al., 2011; Gross et al., 2001; Huang et al., 1995). Lors de la reprise méiotique, ERK2 active RSK qui en retour phosphoryle et inhibe Myt1, une des kinases qui régule négativement le MPF (Palmer et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que RSK phosphoryle directement Cdc25 (Wu et al., 2014). ERK contribue donc ainsi à l'activation du MPF *via* deux mécanismes distincts : l'inhibition de Myt1 et l'activation de Cdc25. Toujours chez le xénope mais en extraits cyclants, il a été montré que ERK2 phosphoryle deux des quatre sites de phosphorylation présents au niveau de la séquence de rétention cytoplasmique de la Cycline B1. Or la phosphorylation de ces sites est nécessaire à la localisation nucléaire du complexe Cdk1/Cycline B1 et donc à l'initiation de la mitose (Walsh et al., 2003). Lorsque ERK2 est inhibée, la Cycline B est retenue dans le cytosol, ce qui empêche le MPF d'accéder à ses substrats : un retard d'entrée en mitose est alors observé dans ces conditions (Chambard et al., 2007). De plus, dans les extraits cyclants, il a été montré que ERK2 interagit avec la phosphatase Cdc25, la phosphoryle directement, ce qui augmente son activité et contribue à l'activation du MPF (Wang et al., 2007). Chez le xénope, que ce soit au niveau de la méiose ou des premières mitoses embryonnaires, ERK2 participe donc à la transition G2/M en favorisant l'activité du complexe Cdk1/Cycline B1. Néanmoins, la reprise de méiose peut s'effectuer en absence d'activité ERK2, cette dernière étant requise

principalement pour la formation du fuseau méiotique, l'inhibition de la réplication entre les deux divisions méiotiques et l'arrêt en métaphase II (Bodart et al., 2005; Dupre et al., 2002).

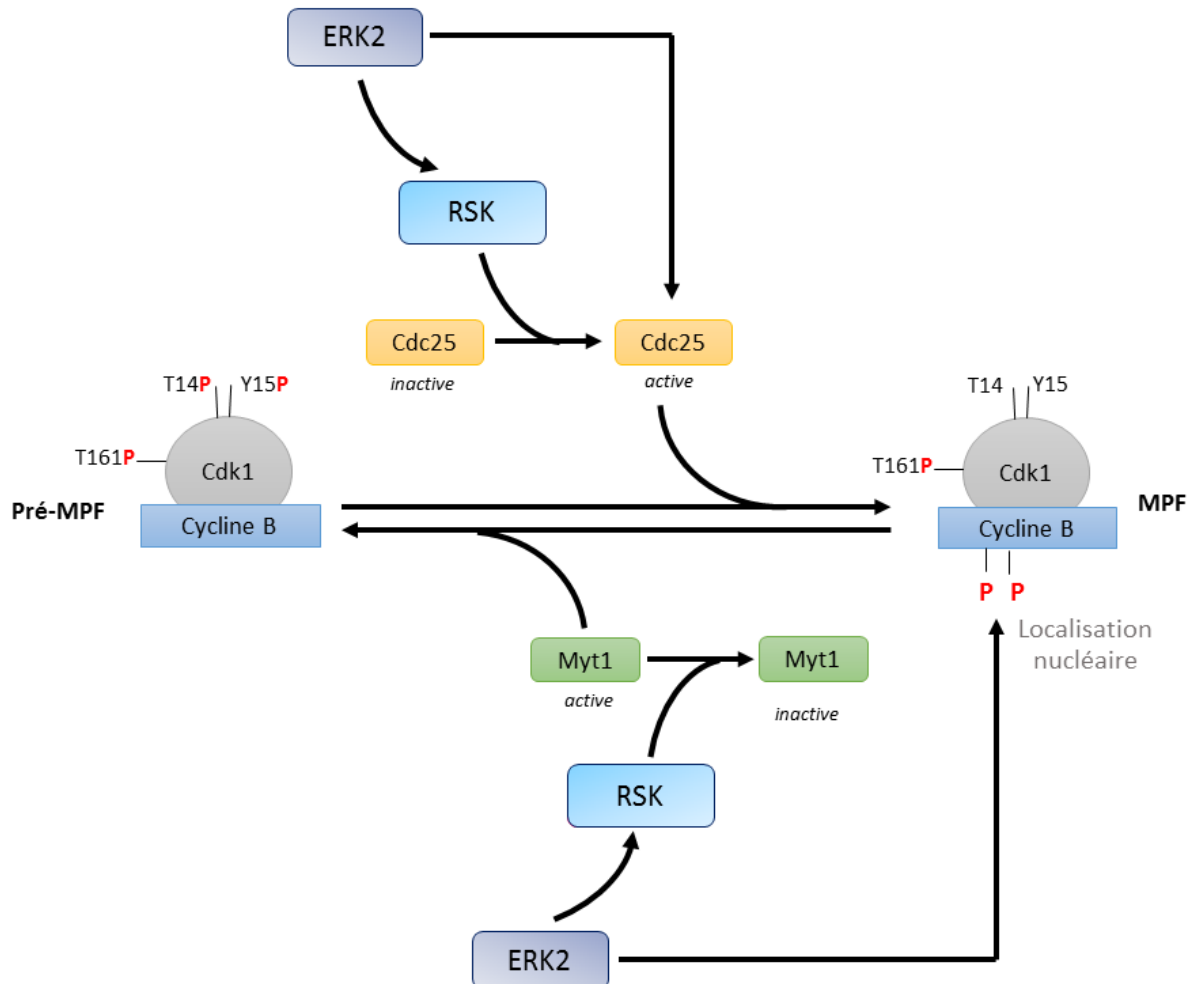


Figure 15 : Effets et cibles de ERK2 lors de la transition G2/M chez le Xénope

ERK2 et son substrat RSK sont capables d'activer cdc25. RSK phosphoryle et inhibe également Myt1. Ces deux mécanismes contribuent à l'activation du MPF. De plus ERK2 phosphoryle la cycline B au niveau de la séquence de rétention cytoplasmique ce qui permet la translocation nucléaire du MPF.

MAPK/ERK est également impliquée lors de la transition G2/M des cellules somatiques mammifères puisque l'expression d'un dominant négatif de ERK retarde la progression en G2/M (Wright et al., 1999). Chez l'humain, ERK2 interagit également avec Cdc25C, l'un des isoformes responsables de l'inhibition du complexe Cdk1/Cycline B, et le phosphoryle (Wang et al., 2007). Néanmoins, l'effet de l'inhibition de MAPK/ERK sur l'entrée en mitose reste controversé. En effet, aucun retard n'a été observé en cellules NIH3T3 suite à l'inhibition de MAPK/ERK par l'U0126 (Horne and Guadagno,

2003). De même, aucun retard n'a été observé dans les mêmes conditions en cellules Ptk (*rat kangaroo cells*), RPE1 (*human retinal pigment epithelia 1*) ou en cellules HeLa (Shinohara et al., 2006).

Si l'activité de MAPK/ERK est nécessaire à la transition G2/M, celle-ci doit toutefois être régulée puisque la suractivation de MAPK/ERK, conséquence d'une déplétion d'une des phosphatases à double spécificité capable de déphosphoryler MAPK/ERK (VHR/Dusp3), peut entraîner un arrêt dans le cycle cellulaire en G2/M (Rahmouni et al., 2006). De plus, dans les cellules HeLa, l'activation de MAPK/ERK, par une stimulation EGF ou par l'ajout de 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, entraîne un retard d'entrée en mitose. Ce retard est corrélé avec une dégradation de Cdc25B, ce qui bloque donc l'activation du complexe Cdk1/cycline B (Astuti et al., 2009). Ces éléments semblent indiquer que pour le franchissement de la transition G2/M, l'activité de MAPK/ERK doit être comprise dans un intervalle permissif, c'est-à-dire ni trop faible ni trop élevée.

2.2.3. Rôle et effecteurs de MAPK/ERK lors de la progression de la mitose

MAPK/ERK joue également un rôle lors de la progression de la mitose en agissant sur plusieurs événements. Le premier d'entre eux est la condensation de l'ADN. La phosphorylation de l'histone H3 en position Ser10 est associée à la condensation des chromosomes lors de la mitose. Cette phosphorylation, qui est catalysée par les kinases MSK1 et 2 (*mitogen- and stress-activated kinase*), débute en prophase, est maximale au moment de la métaphase, puis décroît jusque en télophase (Nowak and Corces, 2004). Les kinases MSKs sont activées par la voie MAPK/ERK. L'activité de MAPK/ERK est nécessaire en début de mitose car la phosphorylation en Ser10 de l'histone H3 est requise pour l'initiation de la division (Van Hooser et al., 1998). De plus, MAPK/ERK phosphoryle également la protéine CENP-E. Cette dernière est impliquée dans l'attachement des chromosomes sur le fuseau et joue donc un rôle critique lors de la transition métaphase-anaphase. MAPK/ERK phosphorylée est retrouvée au niveau des kinétochores. Comme MAPK/ERK phosphoryle CENP-E sur les sites qui régulent l'interaction avec les microtubules, MAPK/ERK pourrait jouer un rôle dans l'association chromosomes-microtubules lors de la mitose (Chambard et al., 2007; Zecevic et al., 1998).

MAPK/ERK phosphorylée et donc activée a également été observée au niveau de la tubuline dans les cellules en mitose (Chambard et al., 2007). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK, l'U0126 inhibe la formation du fuseau de division en extraits mitotiques de xénope. Par ailleurs, dans les ovocytes de xénope, l'utilisation d'U0126 conduit à l'apparition de fuseaux méiotiques aberrants (Bodart et al., 2005). Dans des cellules NIH3T3, cette inhibition conduit également à l'apparition de fuseaux

anormaux et de défauts d'alignements des chromosomes sur la plaque métaphasique (Horne and Guadagno, 2003). En revanche dans la même lignée cellulaire, d'autres travaux n'ont détecté aucune anormalité de mitose dans les mêmes conditions expérimentales (Shinohara et al., 2006).

Enfin, en activant RSK, MAPK/ERK jouerait également un rôle lors de la cytokinèse. En effet la déplétion de RSK1 par ARN antisens, conduit à une augmentation du nombre de cellules binucléées. Ces défauts de cytokinèse résultent de problèmes lors de la formation du sillon de clivage et de sa progression. Les protéines Rho A et anilline, des régulateurs de la cytokinèse, sont délocalisées dans ces conditions de déplétions, ce qui suggère que l'effet de RSK sur la cytokinèse serait médié par ces protéines (Nam et al., 2014) .

2.2.4. Quelle est l'activité de MAPK/ERK lors du cycle cellulaire ?

En cellules CHO, des expériences de mesure d'activité basées sur la phosphorylation de la MBP (*myelin basic protein*) réalisées sur des extraits de cellules synchronisées ont révélé que l'activité de ERK1 oscille au cours du cycle avec un pic en phase G1 et un second pic autour de la mitose (Tamemoto et al., 1992). En cellules NIH3T3, il a été observé que la phosphorylation de ERK1/2 augmente lors de la phase S puis diminue en G2, avant de ré-augmenter lorsque les cellules effectuent la mitose et retournent en G1. Dans la même étude, mais cette fois-ci concernant les cellules HeLa, le même type de profil a été observé (Roberts et al., 2002). Si ces études mettent en évidence une augmentation de l'activité MAPK/ERK lors de la transition G2/M, d'autres études ont montré que le niveau d'activité MAPK/ERK est au contraire réduit lors de la mitose (Harding et al., 2003; Shinohara et al., 2006).

De la même façon que pour PKA, ces résultats contradictoires peuvent en partie s'expliquer par une spécificité liée au type cellulaire. Mais une fois encore, l'aspect spatio-temporel de la régulation et de l'activité MAPK/ERK peut également contribuer aux contradictions décelées quant au profil d'activité de cette kinase au cours de la transition G2/M et de la mitose.

3. Interactions entre les voies de signalisation PKA et MAPK/ERK

Un dialogue moléculaire entre les voies MAPK/ERK et PKA est mis en évidence par un ensemble de travaux sur différents modèles cellulaires (e.g. : NIH3T3, HEK 293, COS-7...). PKA peut i) activer la cascade MAPK/ERK, ii) l'inhiber ou encore iii) retarder son activation, en agissant à différents niveaux de la cascade et en fonction du type cellulaire (Stork and Schmitt, 2002). Réciproquement, la voie de signalisation MAPK/ERK peut activer ou inhiber la signalisation PKA (Houslay, 2006). Néanmoins, certaines de ces interactions sont spécifiques de certains types cellulaires. Un dialogue entre PKA et MAPK/ERK n'est pas observé dans toutes les lignées (exemple : cultures primaires immatures de neurones de rat). Enfin, ce dialogue moléculaire peut également être restreint dans l'espace à un compartiment cellulaire spécifique (Gerits et al., 2007).

3.1. Effets de PKA sur la signalisation MAPK/ERK

3.1.1. Inhibition ou activation de la voie MAPK/ERK médiée par Rap-1

Rap-1 appartient à la famille des petites GTPases. Il a été montré que cette protéine, lorsqu'elle est activée, empêche la fixation entre Ras et Raf-1, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activation de cette dernière et donc de la cascade MAPK/ERK. Cette action dépend de PKA, qui phosphoryle Rap-1 sur le résidu Ser179. Cette phosphorylation augmente le chargement du GTP de Rap-1 et donc son activation (Gerits et al., 2007). C'est également la phosphorylation par PKA qui régule la localisation de Rap1 en membrane, ce qui participe à son activation (Takahashi et al., 2013). L'activation de Rap-1, conduisant à l'inhibition de la voie MAPK/ERK, peut également avoir lieu *via* la tyrosine kinase Src, laquelle est phosphorylée et activée par PKA (Gerits et al., 2007; Stork and Schmitt, 2002).

Si Rap-1 permet l'inhibition de la cascade MAPK/ERK activée par Raf-1, elle peut en revanche activer cette voie de signalisation lorsqu'elle est déclenchée par B-Raf. En effet Rap-1 exerce une activation sur B-Raf (Stork and Schmitt, 2002) (figure 16). Cette isoforme de Raf est notamment exprimée dans le cerveau, les cellules endocrines, ou les cellules de prostate. Il a été montré que la transfection de B-Raf dans des types cellulaires qui ne l'expriment pas de façon endogène, transforme l'AMPc en un activateur de MAPK/ERK (Vossler et al., 1997).

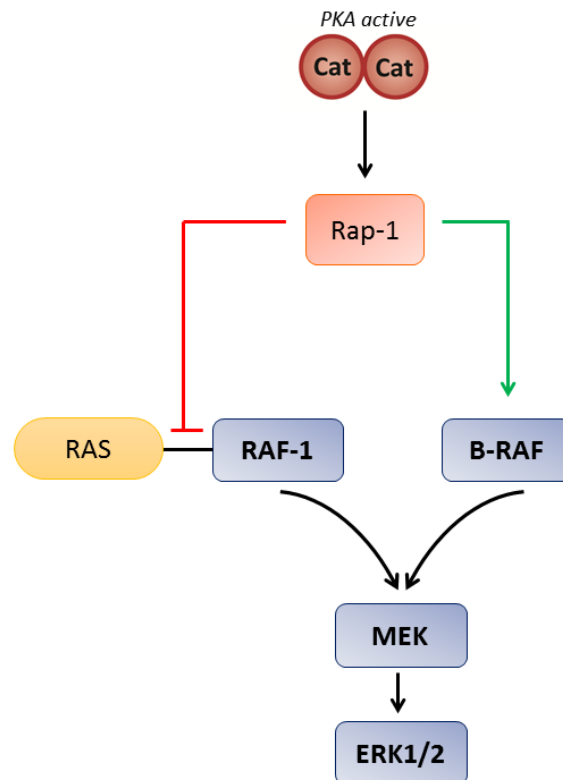


Figure 16 : Inhibition et activation de la voie MAPK/ERK par PKA médiées par Rap-1

En fonction de l'isoforme de Raf exprimée, l'activité PKA a une action différente. En phosphorylant Rap-1, PKA active B-Raf et donc la cascade MAPK/ERK. A l'inverse, Rap-1 phosphorylé inhibe l'interaction entre Ras et Raf-1 ce qui inhibe la cascade MAPK/ERK.

3.1.2. Phosphorylation de Raf-1 par PKA

L'activation de Raf nécessite son recrutement membranaire et implique plusieurs événements de phosphorylation. A l'état inactif, Raf-1 est phosphorylée sur plusieurs résidus, ce qui permet sa séquestration par 14-3-3. En cellules COS-7, lorsque le taux intracellulaire d'AMPc augmente, PKA phosphoryle Raf-1 sur trois résidus sérine en position 43, 233 et 259. La phosphorylation en Ser233 crée un site de fixation ayant une très forte affinité pour 14-3-3. Cette interaction avec 14-3-3 maintient Raf-1 dans une conformation inactive et l'empêche de se lier à Ras lorsque le niveau d'AMPc est élevé (Dumaz and Marais, 2003). L'inhibition de Raf-1 est, de plus, régulée dans l'espace. Il a en effet été montré que Raf-1 interagit avec une phosphodiesterase (la PDE8A) dont l'activité permet de réduire le niveau de phosphorylation au niveau de la Ser259. Or, cette phosphorylation empêche Raf-1 de migrer à la membrane pour se lier à son activateur Ras (Brown et al., 2013). L'hypothèse suggérée par les auteurs est que la PDE8A liée à Raf-1 générerait un microdomaine à

faible concentration d'AMPc, ce qui conduirait à une plus faible activité de PKA spécifiquement dans cette zone (Brown et al., 2013; Maurice, 2013).

L'inhibition de Raf-1 par PKA peut également être médiée par d'autres protéines. Par exemple, l'activation de Raf-1 requiert sa phosphorylation par PAK (*p21 protein -activated kinase*) au niveau du résidu Ser 338. En cellules NIH3T3, il a été montré que cette phosphorylation, et donc l'activation de Raf-1, sont inhibées par l'activité de PKA (Edin and Juliano, 2005).

3.1.3. Effets de PKA sur la voie MAPK/ERK *via* les phosphatases

PKA peut également avoir un effet activateur ou inhibiteur sur l'activation de MAPK/ERK en agissant sur des phosphatases spécifiques. Dans un premier cas, la protéine tyrosine phosphatase PTP-SL peut interagir avec MAPK/ERK grâce à son domaine KIM (*kinase interaction motif*). Il a été montré que PKA peut phosphoryler cette phosphatase au sein de son domaine, ce qui altère les capacités de PTP-SL à se fixer et à déphosphoryler MAPK/ERK sur le résidu tyrosine. Dans ce contexte, MAPK/ERK n'est plus retenue dans le cytoplasme, ce qui suggère que l'activité PKA régule l'activation de MAPK/ERK et sa translocation nucléaire (Blanco-Aparicio et al., 1999). Dans un second cas, des travaux ont révélé que l'activité de PKA régule la transcription du gène codant pour la phosphatase MKP-1. De plus, lors d'une stimulation de la signalisation MAPK/ERK par les facteurs de croissance, à la fois MAPK/ERK et PKA contribuent à protéger MKP-1 de sa dégradation. Ces éléments suggèrent qu'un niveau basal d'activité PKA est requis pour ajuster le niveau d'activité MAPK lors de ces stimulations (Pursiheimo et al., 2002).

3.1.4. Effets de PKA sur la voie MAPK/ERK *via* les protéines d'échafaudage

Il a été montré que la protéine d'échafaudage KSR-1 interagit avec l'une des protéines d'ancrage de PKA : AKAP-Lbc. La présence de cette protéine d'ancrage augmente l'activité de MAPK/ERK lors d'une stimulation par l'EGF. En présence d'AMPc, PKA liée à cette protéine d'ancrage phosphoryle KSR-1 sur la sérine en position 838, ce qui pourrait réguler son association avec MEK ou encore apporter un élément conformationnel nécessaire au maintien du complexe. De plus, bien que Raf soit recrutée par KSR-1 lors de la stimulation par les facteurs de croissance, il semble que dans ce contexte un autre mécanisme permette de maintenir Raf en proximité de son substrat préférentiel MEK1/2. En effet, Raf-1 ainsi que B-Raf, qui sont actifs dans ce cas, ont été retrouvés associés à AKAP-Lbc. L'interaction AKAP-Lbc avec KSR-1 permet donc de mettre en place un complexe protéique qui a pour but de favoriser et d'amplifier la signalisation MAPK/ERK (Smith et al., 2010; Smith et al., 2011).

3.2. Effets de MAPK/ERK sur la signalisation PKA

S'il est admis que PKA peut moduler l'activation de la voie MAPK/ERK, quelques exemples décrivent également comment, à l'inverse, MAPK/ERK peut exercer une action sur l'activité de PKA. RSK, cible en aval de MAPK/ERK, se fixe sur les sous-unités régulatrices de PKA lorsqu'elle est inactive, ce qui favorise la dissociation de ses sous-unités et donc l'activation de PKA (Houslay, 2006). En revanche, lorsque RSK est activée par MAPK/ERK, sa fixation sur les sous-unités catalytiques inactive PKA en favorisant l'interaction entre le dimère de sous-unités catalytiques (Chaturvedi et al., 2006; Houslay, 2006). Un autre point de connexion entre MAPK/ERK et PKA est la phosphodiesterase PDE4D, qui présente un domaine KIM ainsi qu'un domaine de fixation pour MAPK/ERK et peut donc être phosphorylée par cette kinase. La phosphorylation de PDE4D provoque son inhibition, ce qui peut entraîner une activation localisée de PKA puisque l'AMPc n'est pas dégradé. PKA, alors active, phosphoryle également la PDE4D, ce qui lève son inhibition. L'activité de MAPK/ERK cause donc une augmentation transitoire de l'activité de PKA par ce mécanisme. Néanmoins, certaines isoformes de la PDE4D (PDED4D1 et PDED4D2) ne possèdent pas le domaine phosphorylable par PKA ; dans les zones où ces protéines sont présentes, l'activation de PKA ne peut pas subir les effets de cette boucle de rétrocontrôle (Hoffmann et al., 1999; Houslay, 2006).

3.3. Effets du dialogue entre PKA et MAPK/ERK sur la vie cellulaire

Les interactions entre PKA et MAPK/ERK influencent l'intégration des signaux en réponse à un stimulus. La signalisation AMPc peut inhiber la prolifération induite par les facteurs de croissance activant la voie MAPK/ERK dans de nombreuses lignées telles que les NIH3T3, les cellules endothéliales, les hépatocytes ou encore les cellules musculaires lisses. Au contraire, les signaux générés par l'AMPc activent MAPK/ERK et stimulent ainsi la prolifération dans d'autres types cellulaires comme les cellules de Sertoli, les cardiomyocytes ou encore les cellules PC12. Les mécanismes précédemment décrits impliquant l'expression de Raf-1 ou B-Raf et la GTPase Rap1 seraient impliqués dans ces effets sur la prolifération (Stork and Schmitt, 2002).

Si l'on reprend l'exemple des réponses MAPK/ERK aux différents facteurs de croissance EGF et NGF en cellules PC12, on peut noter que l'activité de PKA participe également à l'établissement d'une réponse transitoire ou soutenue. En effet, les stimulations par le NGF et par l'EGF activent PKA au niveau membranaire, mais avec des cinétiques différentes. L'activité de PKA est soutenue en présence de NGF tandis qu'elle est transitoire en présence d'EGF. C'est la PDE3 qui serait responsable de ces différentes dynamiques. L'inhibition de la PDE3 multiplie par deux le temps lors duquel MAPK/ERK reste actif lors d'une stimulation par l'EGF (Herbst et al., 2011). Dans ce type

cellulaire on retrouve les deux isoformes de Raf : B-Raf et Raf-1. L'activation de Rap1, qui est notamment activée par PKA, joue donc un rôle activateur de la voie MAPK/ERK. La modélisation du réseau MAPK/ERK a permis de montrer que la stimulation par le NGF induit une activation soutenue de Rap1 qui conduit à l'activation soutenue de MAPK/ERK et donc à la formation de neurites (Sasagawa et al., 2005).

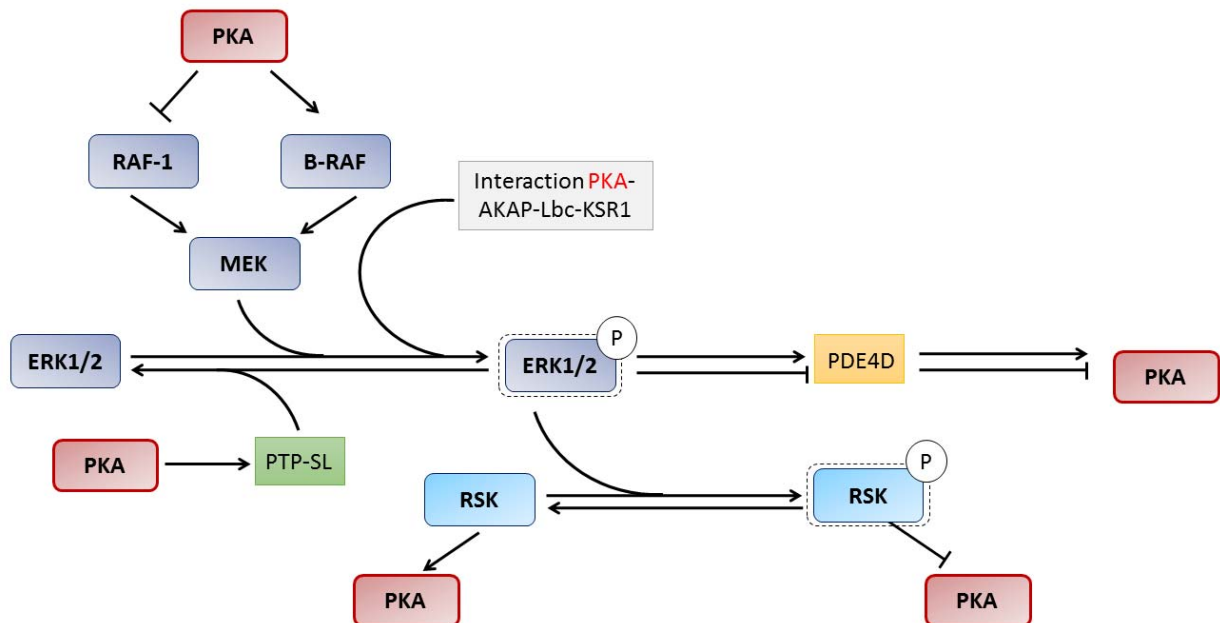


Figure 17 : Récapitulatif des différents dialogues moléculaires possibles entre les voies MAPK/ERK et PKA

Le schéma représente les différents moyens d'inhibition et d'activation de PKA sur MAPK/ERK et réciproquement. Les interactions détaillées sont expliquées dans le texte. Le schéma ci-dessus ne représente probablement pas un dialogue universel, mais récapitule les différents éléments issus de la bibliographie dont certains sont spécifiques d'un contexte ou type cellulaire.

III. Les biosenseurs FRET pour la mesure d'activité kinase *in vivo*

Les propriétés dynamiques des kinases MAPK/ERK et PKA requièrent l'utilisation de méthodes permettant de mesurer leur activité dans le temps et l'espace. Les limites des technologies employées au début de ce travail de thèse nous ont conduit à mettre en place une approche utilisant des biosenseurs FRET rapporteurs d'activité kinasique afin d'étudier ces propriétés.

1. Principe de fonctionnement des biosenseurs FRET

1.1. Généralités

Le terme de biosenseur regroupe toute une catégorie de systèmes ou d'outils sensibles aux analytes biologiques et donc capables de les détecter spécifiquement. Ces systèmes sont composés de deux parties : i) un biorécepteur (également appelé élément de reconnaissance moléculaire) qui est la partie capable de reconnaître l'analyte, et ii) un transducteur, qui correspond à la partie capable de transformer l'information reçue par le biorécepteur en un signal mesurable (figure 18).

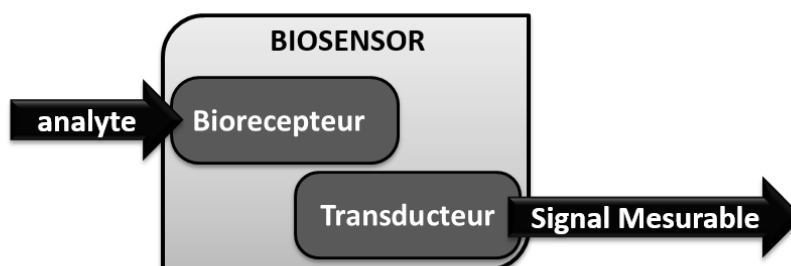


Figure 18 : Représentation schématique d'un biosenseur au sens générique

Un biosenseur se compose d'un biorécepteur capable de détecter un analyte, et d'un transducteur qui transforme l'information en un signal mesurable. D'après : Vandame et al., 2013a.

1.2. Les biosenseurs rapporteurs d'activité kinasique

Les biosenseurs se classent en différentes catégories en fonction des propriétés physiques ou chimiques utilisées pour transduire le signal. Dans la suite de ce travail, le terme biosenseur fera référence à une seule sous-catégorie de biosenseurs optiques : les biosenseurs utilisant le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) comme signal mesurable, et plus spécifiquement ceux capables de mesurer l'activité d'une kinase, qui seront appelés plus simplement **biosenseurs FRET** (*FRET-based biosensors*) dans la suite de ce document.

Ces biosenseurs FRET, sont génétiquement codés et donc construits par des techniques de biologie moléculaire. Ils se composent d'au moins trois parties agencées selon le schéma présenté figure 19 :

- Un couple de fluorophores adapté pour les expériences de FRET ; les plus fréquemment utilisés dans la construction de biosenseurs sont la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) et la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) ainsi que leurs variants (exemples : CyPET, Turquoise, Venus, cpVenus, YPet...). La CFP correspond au fluorophore donneur et la YFP au fluorophore accepteur.
- Un substrat spécifique de la kinase d'intérêt ; dans une majorité des cas, il s'agit d'une courte séquence d'acides aminés issue d'un substrat spécifique et contenant une séquence consensus de phosphorylation.
- Un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés ou PAABD (*phospho-aminoacid binding domain*)

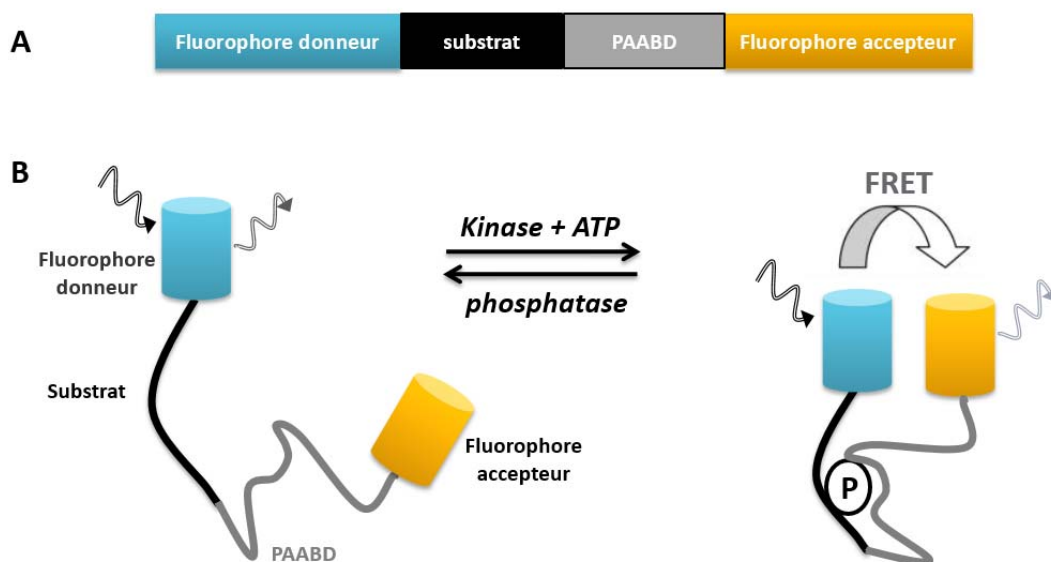


Figure 19 : Principe moléculaire et principe de fonctionnement d'un biosenseur FRET

A) Représentation schématisée des différentes parties composant un biosenseur. B) Représentation schématisée du changement conformationnel du biosenseur qui s'opère lorsque la kinase est active. D'après : Vandame et al., 2013a.

Lorsque la kinase d'intérêt est active, elle phosphoryle le substrat qui est alors reconnu par le PAABD. Ceci entraîne un changement conformationnel du biosenseur, qui permet un rapprochement des deux fluorophores et donc un transfert d'énergie de type FRET. Ce phénomène est réversible : sous l'action de la phosphatase appropriée et en absence d'activité kinase, le substrat est déphosphorylé,

le biosenseur est relaxé et il n'y a plus de transfert d'énergie (figure 19). Les biosenseurs FRET permettent de mesurer une balance entre l'activité kinase et l'activité phosphatase. Chaque signal détecté résulte donc de la modulation de l'activité de ces deux types de protéines.

L'aspect structurel d'un biosenseur est donc crucial pour sa fonctionnalité. Des « *linkers* », séquences d'acides aminés ne codant pour aucune des 3 parties précédemment mentionnées, peuvent être ajoutés entre les différents éléments d'un biosenseur afin d'y apporter plus de souplesse ou de rigidité, dépendamment des cas, afin de favoriser le transfert d'énergie entre les fluorophores. Des séquences d'adressages vers différents compartiments cellulaires peuvent compléter la construction du biosenseur.

1.3. Introduction à la technique de FRET

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif, sous la forme d'un couplage dipôle-dipôle, qui peut avoir lieu entre deux fluorophores sous plusieurs conditions. La première condition repose sur la proximité puisque ce phénomène ne peut avoir lieu que si les deux protéines fluorescentes sont suffisamment proches l'une de l'autre (de l'ordre de 10 nm). De plus, ce phénomène requiert le chevauchement du spectre d'émission du fluorophore donneur et du spectre d'excitation du fluorophore accepteur (figure 20). Enfin, l'orientation de ces fluorophores l'un par rapport à l'autre, est également importante pour le couplage dipôle-dipôle.

Les événements de FRET modifient certaines propriétés de la fluorescence émise par les fluorophores du biosenseur.

- Sous l'effet de ce transfert, on assiste à la diminution de l'intensité d'émission du fluorophore donneur tandis que celle de l'accepteur augmente. C'est sur cette modification que sont basées les mesures de FRET dites ratiométriques qui consistent à évaluer les variations du rapport intensité d'émission de la YFP par rapport à celle de la CFP.
- Le temps de vie d'un fluorophore est une de ses propriétés intrinsèques et correspond au temps moyen (de l'ordre de quelques nanosecondes) dans lequel il reste dans un état excité avant d'émettre un photon. Un événement de FRET est caractérisé par la diminution du temps de vie du fluorophore donneur qui peut être mesuré par les techniques de FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*).

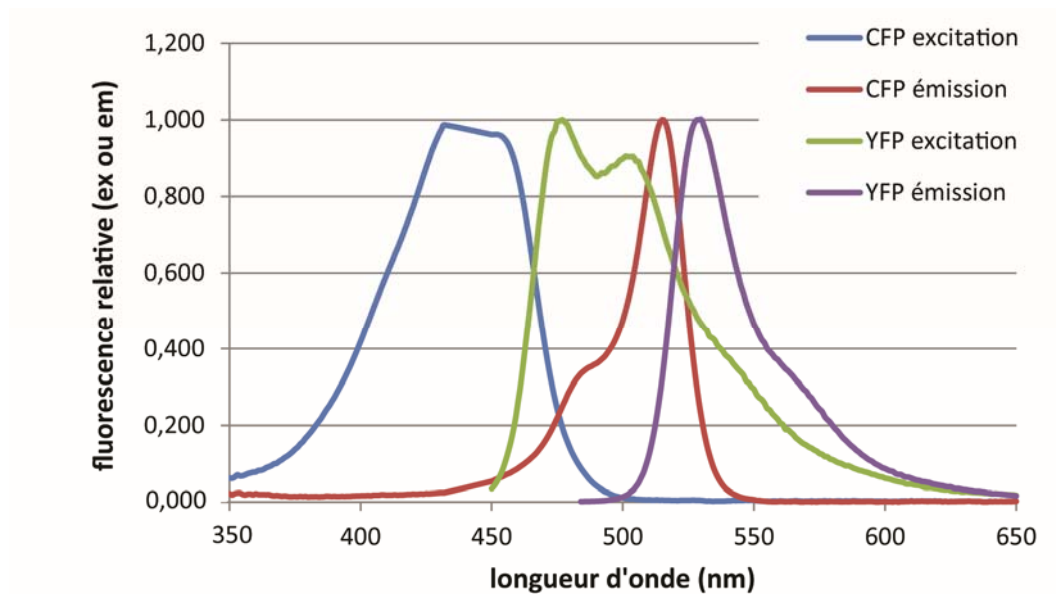


Figure 20 : Exemple du chevauchement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur

Spectres d'excitation et d'émission pour le couple de fluorophores CFP/YFP. Valeurs obtenues d'après le site web du laboratoire de Roger Tsien : <http://www.tsienlab.ucsd.edu/>

Les biosenseurs rapporteurs d'activité kinase, FRET ainsi que ses techniques de mesure, sont détaillés dans la publication: **From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells.** Vandame P & Sipiet F, Spriet C, Leray A, Vincent P, Trinel D, Bodart JF, Riquet FB, Héliot L Progress in molecular biology and translational science 113:145-216.

2. Evolution des biosenseurs PKA et MAPK/ERK

L'objectif, lorsque l'on fait évoluer un biosenseur, est de lui conférer de meilleures propriétés de spécificité et de sensibilité. Ce dernier paramètre dépend tout d'abord de la capacité du biosenseur à être phosphorylé par la kinase, même lorsque celle-ci est très peu active. Cela dépend également de l'intensité des signaux FRET obtenus et donc de leur capacité à être extraits du bruit de fond. En effet, lors de certains processus cellulaires, des variations d'activité faibles mais significatives peuvent s'avérer indétectables avec un outil peu sensible. Les biosenseurs rapporteurs d'activité MAPK et PKA ont donc connu plusieurs générations d'améliorations.

2.1. Evolution des biosenseurs rapporteurs de l'activité PKA

ART

Le premier biosenseur destiné à l'étude de l'activité de PKA a été développé en 2000 et présente quelques différences avec le principe général présenté paragraphe III.1.2 . Ce biosenseur appelé ART se compose de deux fluorophores la BGFP et la RGFP qui encadrent le domaine KID (*Kinase inducible domain*) de CREB, l'une des principales cibles de PKA (Nagai et al., 2000). Ce biosenseur ne contient aucun PAABD. Lorsqu'il est phosphorylé, le domaine KID connaît un changement conformationnel qui permet le transfert d'énergie entre les deux fluorophores.

AKAR1 à 4

Un PAABD a ensuite été ajouté dans les générations 1 à 4 de AKAR (*A Kinase Activity Reporter*), développées par Jin Zhang et collaborateurs. Dans AKAR1, ce PAABD provient de la séquence de la protéine 14-3-3 (famille de protéines qui se fixe spécifiquement aux résidus sérine phosphorylés) (Zhang et al., 2001). Néanmoins, ce biosenseur est peu sensible à l'action des protéines phosphatases ce qui ralentit la réversibilité de la réponse FRET et limite donc son utilisation pour les études physiologiques (Zhang, et al. 2001). AKAR1 a été optimisé (générant ainsi AKAR2) en partant de l'hypothèse selon laquelle l'affinité de 14-3-3 pour le substrat phosphorylé serait trop forte pour permettre une déphosphorylation efficace. C'est le domaine FHA1 (*forkhead associated domain 1*) qui a été choisi pour substituer à 14-3-3 et le substrat a également été optimisé en conséquence afin de favoriser sa reconnaissance par le FHA1 (Zhang et al., 2005). A partir de cette seconde version, d'autres éléments ont été modifiés afin d'améliorer le rapport signal sur bruit pour les signaux FRET générés par le repliement du biosenseur. Le remplacement du fluorophore accepteur par la cpVenusE172 (une version permutée circulairement de la Venus, elle-même un variant de la YFP) a donc donné lieu à une troisième version de ce biosenseur appelée AKAR3 (Allen and Zhang, 2006). AKAR3 a encore été amélioré en 2011 *via* le remplacement du fluorophore donneur par la Cerulean. (Depry et al., 2011). L'évolution des différentes parties composant AKAR1 à AKAR4 est décrite dans le tableau 3.

	Fluorophore donneur	PAABD	Substrat	Fluorophore accepteur
AKAR1 (Zhang et al., 2001)	ECFP	14-3-3	Kemptide modifié AGGTGGSLRRASLPGTGGSEL	Citrine
AKAR2 (Zhang et al., 2005)	ECFP	FHA1	SAGKPGSGEGTKGLRRATLVDGGTGGG	Citrine
AKAR3 (Allen and Zhang, 2006)	ECFP	FHA1	SAGKPGSGEGTKGLRRATLVDGGTGGSEL	cpV E172
AKAR4 (Depry et al., 2011)	Cerulean	FHA1	SAGKPGSGEGTKGLRRATLVDGGTGGSEL	cpV E172

Tableau 3 : Composition des biosenseur AKAR1 a AKAR4

Comparaison des modifications apportées aux différentes générations de AKAR. Dans la colonne substrat, les acides aminés représentés en gras représentent le site consensus reconnu par PKA avec en rouge la sérine ou la thréonine phosphorylable. Le kemptide est un substrat synthétique de PKA.

AKAREV

Ce biosenseur a été modifié d'après la version AKAR3. Dans cette étude, les auteurs ont mis au point un « *backbone* » pour la création de biosenseurs rapporteurs d'activité kinase, c'est-à-dire une séquence plasmidique contenant les séquences codant pour deux fluorophores et un *linker* (positionné entre le substrat et le PAABD). Ces différents composants sont séparés par des sites de restriction permettant l'insertion de différents substrats et PAABDs afin de pouvoir construire facilement un biosenseur pour une kinase donnée. Dans ce *backbone*, le couple de fluorophore a été optimisé et dans AKAREV, le donneur a été conservé (ECFP) tandis que l'accepteur a été remplacé par la YPet. La longueur du *linker* positionné entre le substrat et le PAABD a également été optimisée. Ce *linker*, composé de répétitions SAGG, permet d'augmenter significativement les ratios obtenus suite à l'ajout d'un analogue de l'AMPc, lorsque sa longueur augmente. La longueur optimale a été définie comme composée de 29 répétitions du motif SAGG et forme donc le *linker* appelé « *EV linker* » (Komatsu et al., 2011). Dans AKAREV, le PAABD et le substrat d'AKAR3 ont été conservés. Ce biosenseur présente un signal FRET trois fois plus important que AKAR3 ou AKAR4 lors d'une stimulation de l'activité de PKA par un analogue de l'AMPc (dbcAMP).

FLIM-AKAR

Si jusque-là les différentes optimisations des biosenseurs rapporteurs d'activité PKA ont été réalisés pour les mesures de FRET ratiométriques, aucun de ces outils n'a été testé en FLIM dans les publications associées à leur développement. Afin de pouvoir réaliser des mesures d'activité PKA dans le tissu cérébral, les fluorophores de AKAR3 ont été modifiés pour créer un rapporteur d'activité PKA optimisé pour les mesures en microscopie FLIM deux-photons. La ECFP a été remplacée par une version monomérique tronquée de la EGFP (meGFPΔ) et cpVenus a été remplacée par une version non fluorescente et circulairement permutee de la YFP (cpsREACH). Ces modifications permettent une sensibilité au pH réduite, un meilleur rapport signal sur bruit lors des mesures de temps de vie du donneur et minimisent également les fuites spectrales (Chen et al., 2014).

2.2. Evolution des biosenseurs rapporteurs de l'activité MAPK/ERK

Miu2

Le premier biosenseur FRET pour l'étude de MAPK/ERK, a été construit en 2006 de façon différente du schéma présenté dans le paragraphe III.1.2. Ce biosenseur, appelé Miu2 (pour **MAPK Indicator Unit ERK2**), exploite en effet le changement conformationnel qui a lieu lorsque MEK se lie à ERK. Il se compose donc d'une YFP et du CFP qui flanquent la séquence codante de ERK2 (issue du xénope), respectivement en N-terminal et en C-terminal. De courts *linkers* (2 et 3 acides aminés) séparent les séquences des protéines fluorescentes de la séquence de ERK2. Lorsque la voie de signalisation est activée, MEK se fixe à MAPK/ERK endogène mais également à ERK2 présent dans le biosenseur. Cette fixation entraîne le repliement de ERK2 au sein de Miu2, ce qui rapproche les deux fluorophores et permet un transfert d'énergie mesurable (Fujioka et al., 2006).

Si Miu2 a été le précurseur des biosenseurs MAPK/ERK, il présente néanmoins l'inconvénient d'agir en surexprimant ERK2. Or, cette surexpression, peut dans certains cas perturber les processus cellulaires, comme c'est par exemple le cas dans les cellules HCC (Human Hepatocellular Carcinoma) où la surexpression de ERK contribue à une augmentation de la prolifération (Tsuboi et al., 2004). Enfin, le biosenseur Miu2 reflète principalement l'interaction MEK-ERK et l'activité de MEK plutôt que celle de son effecteur en aval.

Erkus

Le premier biosenseur FRET rapporteur d'activité MAPK/ERK a été développé en 2007. Nommé Erkus (Sato et al., 2007), ce biosenseur reprend la composition détaillée dans le paragraphe III.1.2. Le

même couple de fluorophore que pour Miu2, c'est-à-dire CFP/YFP, a été utilisé dans Erkus. Ces fluorophores encadrent :

- le domaine FHA2 (*Forkhead-Associated 2*), qui dérive de Rad53p (une kinase impliquée dans la réponse aux agents génotoxiques chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hoch et al., 2013)). Ce domaine correspond au PAABD et reconnaît les résidus thréonine lorsqu'ils sont phosphorylés ;
- suivi d'une séquence codant pour un *linker* (en acides aminés : GTGGSSGSGS) ;
- suivi d'une courte séquence d'acides aminés correspondant à un substrat spécifique de MAPK/ERK : le résidu Thr669 au sein du récepteur à l'EGF (en acides aminés : KRELVEPLTPSIEAPNQALLR).

De plus, un motif d'ancrage de MAPK/ERK a été ajouté à l'extrémité du biosenseur, après la séquence de la YFP, afin d'augmenter l'affinité de MAPK/ERK pour le biosenseur et donc maximiser son efficacité. Ce motif provient d'un des substrats de MAPK/ERK : RSK-1 (séquence en acides aminés : PLESSILAQRRVRKLPSTTL). Enfin, deux autres versions d'Erkus ont été développées à partir de cette structure :

- Erkus-nuc, qui contient, après le motif d'ancrage, un signal de localisation nucléaire (en acides aminés : DPKKKRKVDPPKKRKVDPPKKRKV)
- Erkus-cyto, qui contient à la place, une séquence d'export nucléaire (en acides aminés : LPPLERLTL)

Erkus est également réversible, lors d'une inhibition de MAPK/ERK ou sous l'action des protéines phosphatases (Sato et al., 2007).

EKAR

En 2008, une deuxième génération du biosenseur rapporteur d'activité MAPK a été développée (Harvey et al., 2008). Les mêmes éléments que pour Erkus ont été utilisés mais chaque composant a été modifié et adapté afin de générer EKAR (*Extracellular-regulated Kinase Activity Reporter*) et d'en améliorer la spécificité et la sensibilité.

L'ingénierie de protéines fluorescentes connaît de rapides évolutions et de nouveaux fluorophores plus stables, ou possédant un meilleur rendement quantique, voient régulièrement le jour. L'une des façons d'améliorer un biosenseur, est donc de modifier le couple de fluorophores afin d'améliorer le transfert d'énergie. Dans EKAR, le couple de fluorophores se compose d'un variant de la CFP, la

mCerulean, et d'un variant de la YFP, la mVenus. Une version alternative de EKAR existe aussi avec un autre couple composé de l'eGFP et de la mRFP.

La séquence encadrée par ces deux fluorophores est constituée de :

- un domaine WW, qui correspond au PAABD, et qui reconnaît les résidus thréonine phosphorylé, avec une forte affinité pour les séquences riches en proline ;
- suivi d'un *linker* composé de 72 résidus glycine, qui confère une flexibilité accrue entre le PAABD et le substrat ;
- une partie de la séquence codant pour la protéine Cdc25 contenant le résidu thr48 spécifiquement phosphorylé par ERK (en acides aminés : PDVPRTPVGK) ;
- un domaine d'ancrage pour ERK cette fois-ci situé juste à côté du substrat. Il s'agit de la séquence consensus reconnue par ERK (en acides aminés : FQFP).

EKAREV

EKAREV provient du même travail de développement d'un *backbone* optimisé que AKAREV. Le PAABD, le substrat ainsi que le domaine d'ancrage de MAPK/ERK présents dans EKAR ont été conservés mais le *linker* a été remplacé par 29 répétitions du motif SAGG. Le couple de fluorophores a également été remplacé par celui composé de la ECFP et de la YPet (Komatsu et al., 2011).

EKAR2G

Enfin, une nouvelle version optimisée à partir de EKAR, a été construite en 2013. Dans cette étude les auteurs ont développé une librairie afin de tester différents fluorophores donneurs (des variants de la mTFP1 (*monomeric Teal Fluorescent Protein*) permutés circulairement en différentes positions) en combinaison avec différents variants de la Venus. Les versions présentant les couples de fluorophores mTFP1/cp227-Venus/cp173 et mTFP1/cp105-Venus/cp195 sont plus sensibles que EKAR et forment donc deux nouveaux biosenseurs optimisés pour les mesures d'activité MAPK/ERK appelés EKAR2G1 et EKAR2G2 (Fritz et al., 2013).

Objectifs

Les kinases MAPK/ERK et PKA ont fait l'objet de nombreuses études, notamment concernant leur implication et leurs rôles lors de ce processus essentiel qu'est la division cellulaire. Malgré ces études, les profils d'activité de ces kinases au cours du cycle cellulaire restent obscurs. Si des résultats en contradictions quant à ces profils peuvent être la conséquence de certaines caractéristiques propres aux différents modèles cellulaires d'étude, les propriétés dynamiques et spatio-temporelles des réseaux de signalisation impliquant ces 2 kinases, peuvent aussi être mises en cause. En effet, certaines méthodologies requièrent de travailler sur un grand nombre de cellules à la fois. Or, dans une population de cellules, les réponses à une condition expérimentale peuvent être moyennées ou écrasées, à cause de la variabilité des cinétiques de réponse d'une cellule à une autre. De la même façon, la perte de l'intégrité cellulaire, parfois nécessaire à certaines méthodologies, rend indétectables les variations de localisations.

Néanmoins, la détermination des activités PKA et MAPK/ERK ainsi que la compréhension de leurs régulations, restent des questions de premier ordre, tant pour une connaissance fondamentale des mécanismes contrôlant la progression du cycle cellulaire, que pour l'amélioration de leur ciblage thérapeutique dans le cas de pathologies associées au cycle cellulaire telles que les cancers.

Grâce aux innovations dans les domaines de l'ingénierie des protéines fluorescentes et de la microscopie, de nouveaux outils ont vu le jour afin de suivre les variations de l'activité d'une protéine d'intérêt *in vivo* et en cellules uniques, permettant ainsi de s'affranchir des effets de moyennage au sein d'une population. Nous nous sommes donc intéressés à ces outils : les biosenseurs de type KAR (*Kinase Activity Reporter*).

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de déterminer les profils spatio-temporels d'activité des kinases PKA et MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose dans le modèle cellulaire HeLa.

- Dans ce cadre, la première étape de ce projet a été de confronter notre modèle cellulaire, les cellules HeLa, aux données de la littérature sur les effets et profils de phosphorylation et de localisation de MAPK/ERK et PKA.
- Face aux limites techniques observées, la seconde étape a été de mettre en place une stratégie de mesure d'activité kinasique pour PKA et MAPK/ERK utilisant les biosenseurs et de développer de nouveaux outils moléculaires dédiés à la mesure d'activité MAPK/ERK *in vivo*.

- Enfin, l'utilisation de ces outils nous a ensuite permis d'étudier le comportement spatio-temporel de ces kinases lors du processus de division cellulaire.

La dernière partie de ce travail a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr. Emanuele Biondi et concerne le développement et la mise en place d'un biosenseur FRET pour l'étude de la phosphorylation chez les procaryotes. Ce travail a été réalisé dans le contexte spécifique de l'étude du régulateur majeur de la progression du cycle cellulaire de la bactérie *Caulobacter crescentus*.

Résultats

PARTIE I : Etude de PKA et de MAPK/ERK lors du cycle cellulaire des cellules HeLa

1. Caractérisation du modèle cellulaire et de son cycle cellulaire

1.1. Choix de la lignée cellulaire HeLa

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales d'adénocarcinome provenant de la biopsie du col de l'utérus effectuée en 1951 sur la patiente Henrietta Lacks, dont les initiales furent utilisées pour nommer cette lignée cellulaire (Lucey et al., 2009).

Le choix du modèle d'étude pour ce travail s'est porté sur cette lignée pour plusieurs raisons :

- i) Cette lignée a fait l'objet de nombreux travaux concernant l'étude du cycle cellulaire, ce qui en fait un modèle très documenté, notamment par des travaux de transcriptomique et de protéomique. Ce modèle est donc très complet quant à l'analyse du cycle cellulaire (Dephoure et al., 2008; Whitfield et al., 2002).
- ii) Les cellules HeLa présentent également l'avantage d'être particulièrement résistantes d'un point de vue expérimental et aisément transfectables. Elles constituent un modèle de choix pour la mise en place d'expériences de microscopie de fluorescence sur des cellules vivantes.
- iii) Aucun élément bibliographique n'indique, à notre connaissance, une dérégulation de la voie des MAPK/ERK, telle qu'une activation constitutive de B-RAF, ni de surexpression des sous-unités régulatrices de PKA, qui sont des caractéristiques observées dans de nombreuses lignées cancéreuses (Caretta and Mucignat-Caretta, 2011; Dhillon et al., 2007). Cette propriété permet donc de réaliser une étude des activités de PKA et MAPK/ERK dans leur forme *a priori* « native » afin d'en comprendre les fonctions. Notre étude pourra servir de comparaison avec des lignées présentant des dérégulations de l'une ou de ces deux protéines kinases.

1.2. Caractéristiques du cycle de division des cellules HeLa

Dans nos conditions de culture, les cellules HeLa présentent un taux de prolifération de 2,25 en 24h (figure 21A). Le temps de doublement de population calculé est de 21h30. Nos expériences de cytométrie en flux sur des cellules traitées à l'iodure de propidium pour une détection du contenu en ADN ont révélé que dans une population non synchronisée, 55% des cellules sont en phase G0/G1, 29% sont en phase S et 15% en phase G2/M (figure 21B,C). Ces données suggèrent des durées

d'environ 12h pour les phases G0/G1, de 6h pour la phase S, tandis que les phases G2 et M sont plus rapides et s'étendent sur un peu plus de 3h.

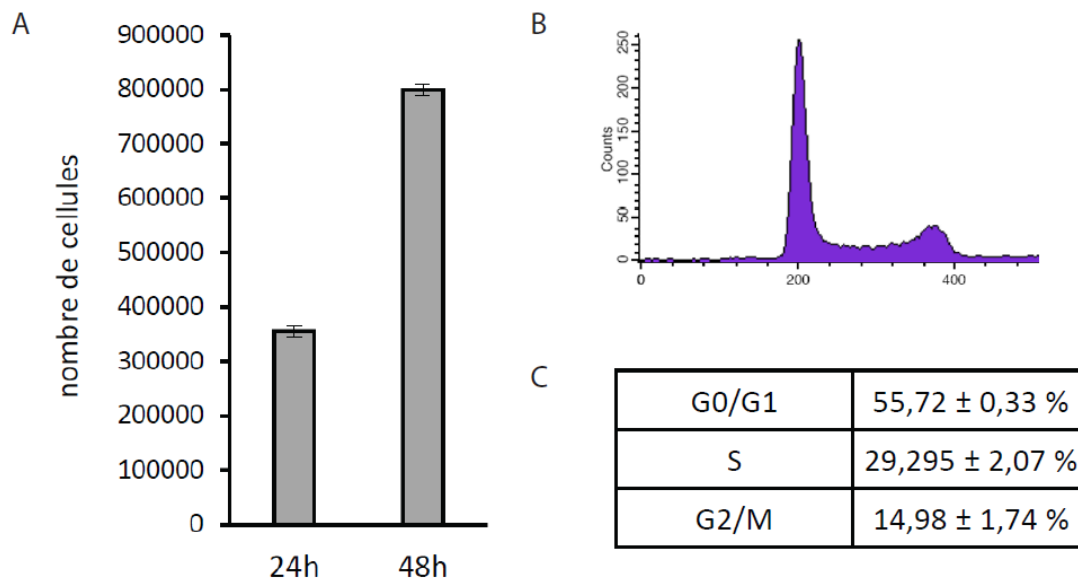


Figure 21 : Détermination du temps de chaque phase du cycle cellulaire des cellules HeLa.

(A) Nombres de cellules à 24 et 48h, utilisés pour déterminer le taux de prolifération de HeLa (B) Contenu en ADN mesuré par cytométrie en flux sur une population de cellules non synchronisées et traitées à l'iodure de propidium et (C) pourcentages de cellules dans chaque phase. Les statistiques ont été calculées sur trois expériences.

1.3. Synchronisation des cellules HeLa

Les techniques de synchronisation utilisant la thymidine et/ou le nocodazole permettent de stopper la progression du cycle cellulaire à une étape donnée (transition G1/S ou prométaphase). La thymidine, lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture, est incorporée dans les cellules où elle sera rapidement transformée en dTTP (desoxythymidine triphosphate) qui est un inhibiteur allostérique de la ribonucléotide réductase, enzyme responsable de la réduction de la cytidine diphosphate (CDP) en dCDP. Il en résulte un blocage de la synthèse d'ADN suite à la diminution de la concentration de dCTP synthétisée, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1, au moment de la transition G1/S. Plusieurs rinçages, constituant l'étape de relâche, sont ensuite nécessaires pour permettre la reprise du cycle cellulaire.

Lorsque les cellules HeLa sont soumises à cette synchronisation, nous observons que de $t = 2h$ à $t = 6h$ plus de 94% des cellules sont effectivement en phase S. Le reste de la population constitue la fraction de cellules non synchronisées de l'expérience. L'entrée en phase G2/M est détectée à partir de $t = 8h$

pour environ un quart des cellules. La proportion de cellules en G2/M augmente jusque 55% à $t=9\text{h}$ avant d'atteindre un maximum de 64,2% à $t=10\text{h}$. A ce même moment, plus de 10% des cellules sont déjà entrées en phase G1. Enfin les temps 12h et 14h s'accompagnent d'une augmentation de la fraction de cellules de retour en phase G1 (figure 22 et tableau 4).

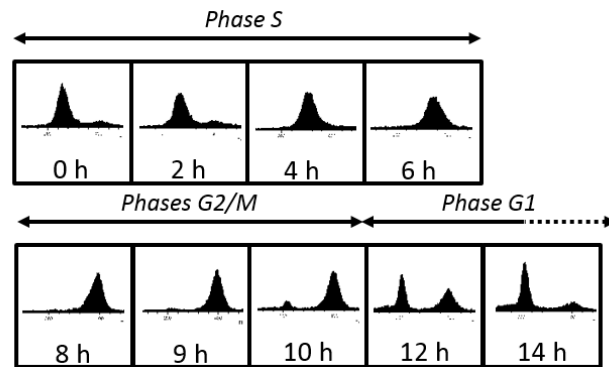


Figure 22 : Progression du cycle des cellules HeLa après une synchronisation par la thymidine.

Population de cellules synchronisées en fin de phase G1 par la technique de double blocs thymidine, et prélevées à différents temps après la reprise du cycle. Les cellules ont été traitées à l'iodure de propidium et le contenu en ADN a été mesuré par cytométrie en flux.

	0h	2h	4h	6h	8h	9h	10h	12h	14h
G0/G1	0%	0%	2.3%	2.6%	2.9%	4.8%	11.6%	45.9%	69.5%
S	97,30%	94.9%	94%	97.4%	70.8%	38.2%	24.2%	24.2%	11.3%
G2/M	2,73%	5.1%	3.7%	0%	26.3%	57%	64.2%	29.9%	19.2%

Tableau 4 : Répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à chaque temps après synchronisation par la thymidine.

Table des pourcentages de cellules dans les phases G0/G1, S et G2/M obtenus en cytométrie de flux pour l'expérience représentée figure 22.

La synchronisation utilisant le nocodazole à la suite d'un bloc thymidine permet quant à elle de stopper la progression du cycle cellulaire en début de mitose, au moment de la prométaphase. Le nocodazole est un poison du fuseau mitotique, qui interfère avec la polymérisation des microtubules, empêchant la formation du fuseau de division. D'après la littérature, les concentrations de

nocodazole utilisées pour la synchronisation varient du nanomolaire au micromolaire. Afin de déterminer la concentration optimale pour nos expériences, les cellules HeLa ont été soumises à différentes quantités de nocodazole puis fixées. Les microtubules ont été marqués par immunofluorescence avec un anticorps anti- α -tubuline et l'ADN grâce à l'utilisation du Hoechst, afin de déterminer cellule par cellule le stade de progression dans la mitose. La figure 23 montre les différences morphologiques, notamment au niveau de la texture de l'ADN, qui ont été utilisées pour classer les cellules dans chaque stade.

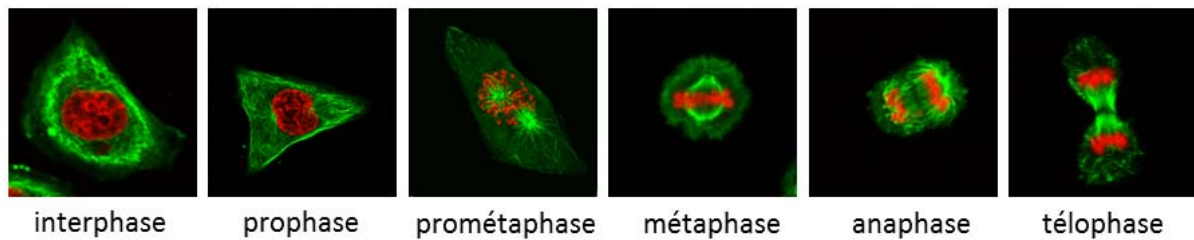


Figure 23 : Aspect du double marquage ADN/microtubules au cours des différentes étapes de la mitose

Les cellules ont été synchronisées par un bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole puis fixées. L'immuno-marquage de l' α -tubuline est représenté en vert et le marquage ADN par le Hoechst est représenté en rouge.

La gamme de concentrations de nocodazole révèle qu'un maximum de 85% des cellules présente un phénotype de prometaphase à 100 nM. En deçà de ces concentrations, la synchronisation est nettement moins efficace (figure 24). Afin de minimiser les effets toxiques du nocodazole sur les cellules utilisées, les expériences nécessitant une synchronisation en prometaphase ont été réalisées en utilisant 100 nM de nocodazole.

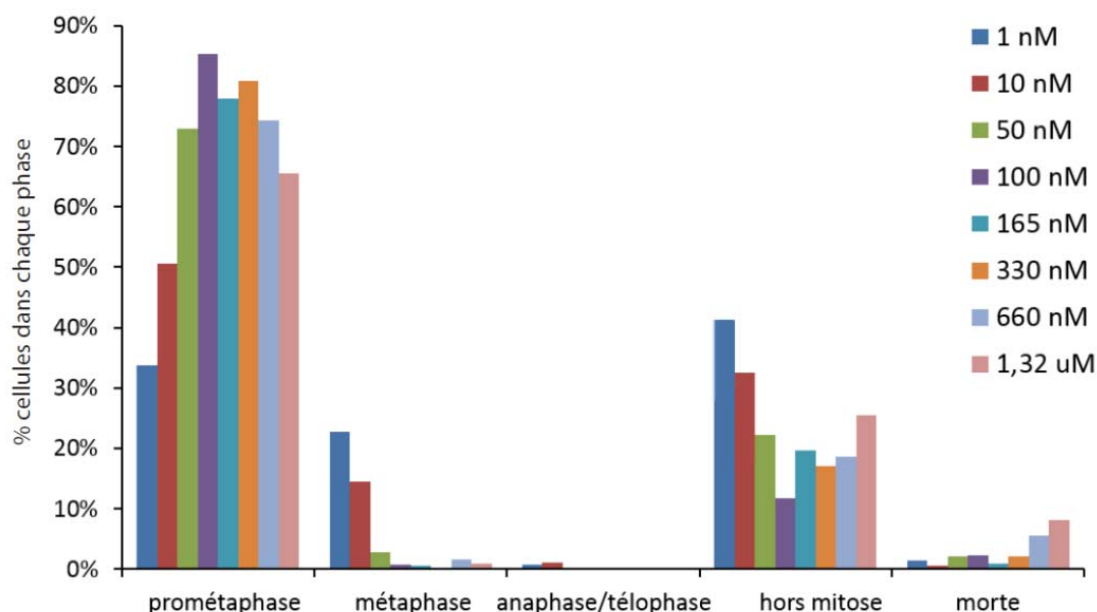


Figure 24 : Gamme de concentration du nocodazole et efficacité sur l'arrêt des cellules

Cellules synchronisées par un bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole qui a été réalisé à différentes concentrations (de 1 nM à 1,3 µM). Les cellules (n= 151 à 223 par condition) ont été classées dans les différents groupes sur des critères morphologiques.

2. Analyse de la phosphorylation de MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire des HeLa

2.1. Etude des niveaux de phosphorylation de MAPK/ERK

L'activation des MAPK/ERK 1 et 2 est liée à la phosphorylation sur leurs résidus Thr202 et Tyr204 (Thr183 et Tyr185 pour ERK2). La mesure de ces niveaux de phosphorylation par immunoempreinte est couramment utilisée pour estimer de façon indirecte l'activité de MAPK/ERK. Afin d'apprécier les variations d'activité de MAPK/ERK au cours du cycle, nous avons utilisé cette technique sur des cellules synchronisées au moment de la transition G1/S. Comme constaté sur la figure 25, de la phase S (t= 0h à t= 6h) jusqu'au retour en G1 (t= 12h), nous n'observons pas de variation tranchée du niveau de phosphorylation de MAPK/ERK. Les contrôles (stimulation de la voie par l'EGF, puis inhibition de l'activité par l'U0126) valident ces résultats, puisqu'ils permettent d'observer une très forte augmentation de l'intensité des bandes correspondant aux MAPK/ERK 1 et 2 phosphorylées.

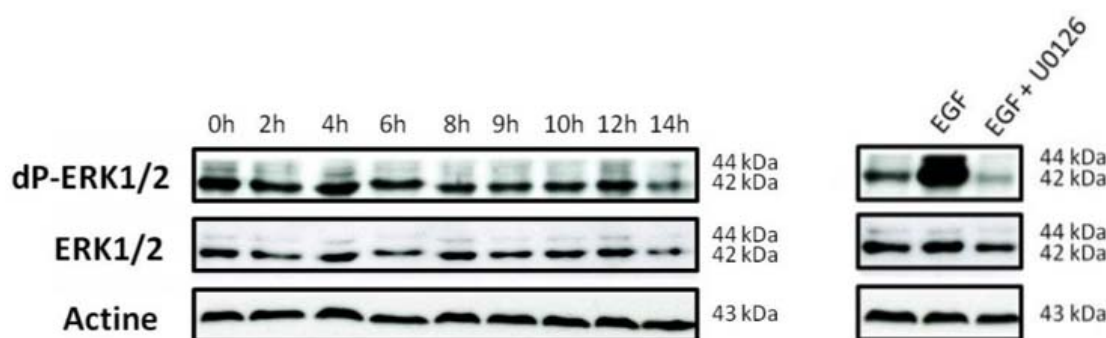


Figure 25 : Niveau de phosphorylation de MAPK/ERK dans une population synchronisée.

Immuno-empreintes réalisées sur des extraits protéiques (30 μ g par puits) de cellules synchronisées en G1/S et prélevées à différents moments de leur progression dans le cycle ($t=0h$ à $t=14h$). Ont été utilisés les anticorps dirigés contre les MAPK/ERK diphosphorylées (dpERK1/2), les MAPK/ERK totales et l'actine comme témoin d'équilibrage. En contrôle, les mêmes immunoempreintes sont réalisées sur des extraits de cellules non synchronisées avant et après activation de la voie MAPK par l'EGF, ainsi que sur des cellules mises en présence d'un inhibiteur de l'activité de MEK (U0126).

Lors des expériences de caractérisation du cycle cellulaire sous l'effet de la synchronisation par la thymidine (figure 22), nous avons observé que si la phase S présente un taux de synchronisation très élevé, dans les populations prélevées à 8h, 9h ou 10h, seule une partie des cellules est en G2/M (au maximum 64%). Le reste des cellules est réparti entre les phases S et G0/G1. Nous atteignons ici certaines limites de la synchronisation cellulaire et il est donc possible d'imaginer que certaines variations de la phosphorylation de MAPK/ERK sont simplement diluées dans la moyenne des cellules dans les différentes phases à ces temps donnés (exemple à $t=9h$ où 57% des cellules sont en G2/M et 38% encore en phase S). Une autre hypothèse réside dans le fait que les variations de phosphorylation MAPKs ne seraient pas des variations de la quantité de protéines phosphorylées mais des variations de leur localisation au sein de la cellule.

2.2. Etude de la localisation des formes phosphorylées de MAPK/ERK au cours du cycle

Afin de déterminer si la localisation des formes phosphorylées de MAPK/ERK varie au cours du cycle, nous avons réalisé des expériences d'immuno-fluorescence sur des cellules synchronisées et fixées aux mêmes temps que dans les expériences précédentes de cytométrie en flux et d'immuno-empreinte (figure 22 et figure 25). Les formes diphosphorylées (dpMAPK) de MAPK/ERK, ainsi que les MAPK/ERK totales ont été marquées. Le marquage de l'ADN effectué par le Hoechst nous permet de visualiser le noyau. En phase S, les formes biphosphorylées de MAPK/ERK sont détectées

majoritairement dans le cytoplasme, mais en phase G2, MAPK/ERK phosphorylée est détectée dans le compartiment cytoplasmique et dans le noyau. La répartition de cette protéine est homogène dans la cellule lors de la phase M, à l'exception de la plaque métaphasique où elle est pratiquement exclue. Enfin, les cellules présentent à nouveau au début de phase G1 une localisation des MAPK/ERK phosphorylées qui est homogène entre le noyau et le cytoplasme (figure 26).

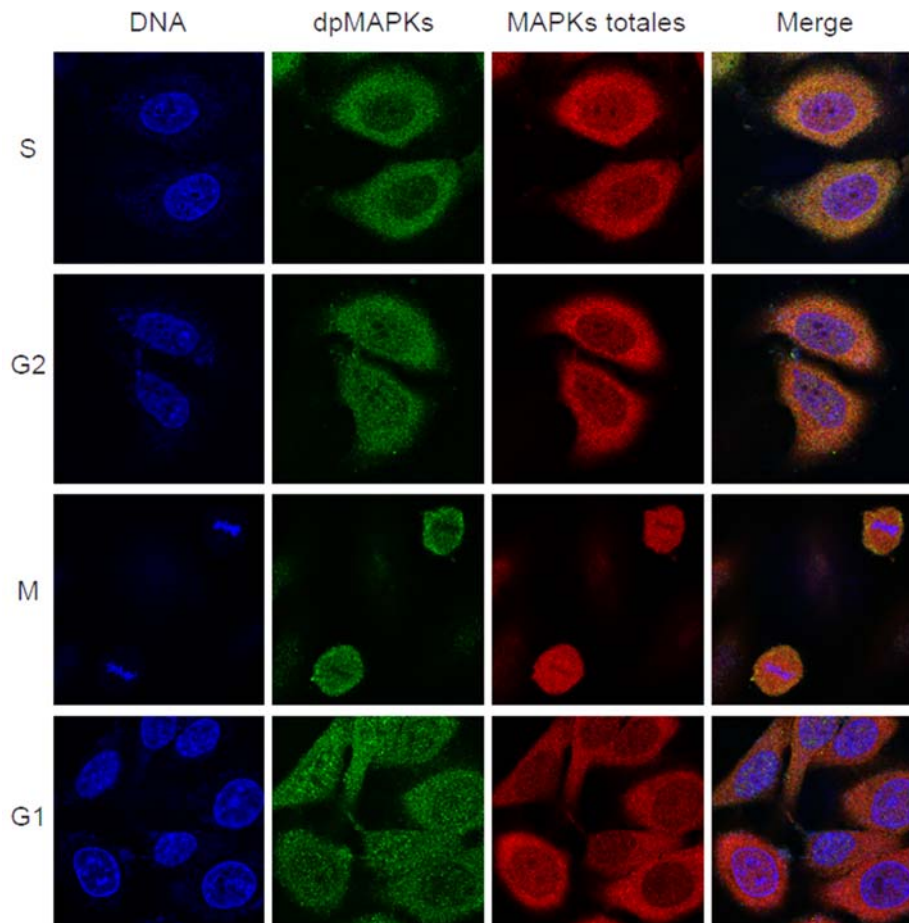


Figure 26 : Localisation des MAPK/ERK phosphorylées lors des différentes phases du cycle cellulaire

Immunofluorescence des MAPKs diphosphorylées (en vert) et totales (en rouge) combinée à un marquage de l'ADN (en bleu) effectué sur des cellules synchronisée par la thymidine. Quelques cellules représentatives de chaque phase S : (t=2h), G2 (t=8h), M (t=9h) et G1 (t=12).

D'un point de vue plus quantitatif, les niveaux d'intensité des formes phosphorylées de MAPK/ERK (en vert sur la figure 26) ont été mesurés pour chaque temps et comparés aux conditions contrôles. Afin de s'affranchir des variations intercellulaires de niveau d'expression de MAPK/ERK, ces mesures ont été normalisées sur le niveau d'intensité des MAPK/ERK totales (en rouge sur la figure 26). Les résultats révèlent que le taux de phosphorylation de MAPK/ERK au cours des différentes phases du

cycle reste faible au regard de ce qu'il peut atteindre lors d'une stimulation par facteur de croissance. Le rapport MAPK/ERK phosphorylée/non phosphorylée atteint en effet un maximum de 0,75 à $t = 4h$ contre 2,25 lors d'une stimulation par de l'EGF (données non représentées pour la condition EGF). Néanmoins, le taux de phosphorylation de MAPK/ERK varie au cours du cycle, notamment lors de la phase S avec une augmentation de la phosphorylation à $t = 4h$. Une légère augmentation du taux de phosphorylation est également détectée au cours de la mitose (0,51 à $t = 9$ et $10h$). Ce taux est plus élevé qu'en phase G2 (0,38 à $t = 8h$) et qu'en début de phase G1 (0,35 à $t = 12h$) (figure 27).

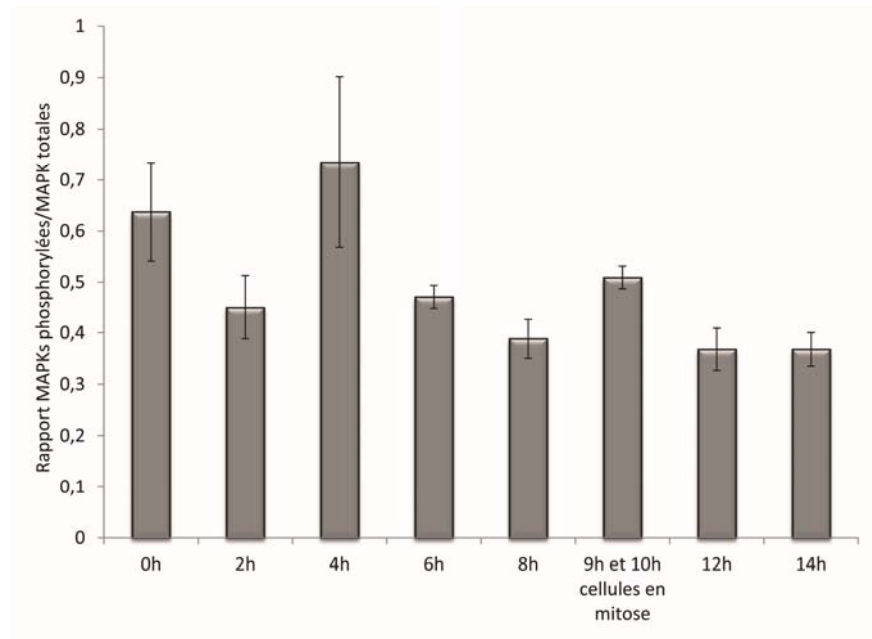


Figure 27 : Taux de phosphorylation de MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire

Calcul du rapport d'intensité du marquage MAPK/ERK phosphorylée sur MAPK/ERK totale à chaque temps après une synchronisation par la thymidine. Les mesures ont été réalisées sur 9 à 12 cellules par condition.

Nous avons ensuite effectué le même calcul de rapport MAPK/ERK phosphorylée sur MAPK/ERK totale mais cette fois-ci en séparant le noyau et le cytoplasme, pour les cellules en phases S, G2 et G1. De façon très intéressante, les résultats montrent que lors des phases S et G2, le taux de phosphorylation est plus élevé dans le compartiment cytoplasmique que dans le noyau, tandis que cette tendance s'inverse après la mitose aux temps 12 et 14h (figure 28). Ces éléments nous indiquent que les variations de phosphorylation de MAPK/ERK, sont sous-localisées au sein de la cellule.

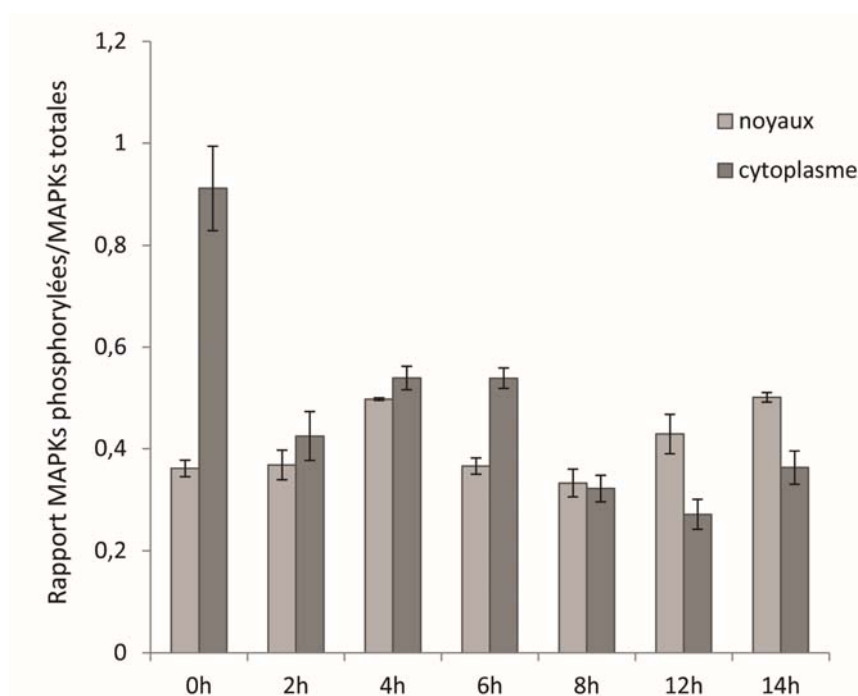


Figure 28 : Comparaison des taux de phosphorylation des MAPK/ERK par compartiment au cours du cycle cellulaire

Calcul du rapport d'intensité du marquage MAPKs phosphorylées/MAPKs totales dans le noyau et dans le cytoplasme à chaque temps après une synchronisation par la thymidine. Les mesures ont été réalisées sur 9 à 12 cellules par condition.

3. Analyse des effets et de la localisation de PKA au cours du cycle cellulaire des cellules

HeLa

3.1. L'augmentation du taux d'AMPC entraîne un retard de prolifération

Les travaux de Zeilig en 1976 sur l'effet de l'AMPC sur le cycle cellulaire des cellules HeLa, ont montré que l'élévation du contenu cellulaire en AMPC en phase S ou en phase G2, grâce à l'utilisation d'un analogue (le 8br-cAMP), retarde l'entrée en mitose de 10h (Zeilig et al., 1976). Afin d'observer son effet dans nos conditions expérimentales, nous avons soumis les cellules HeLa non synchronisées à une concentration de 100 μ M de 8br-AMPC et avons contrôlé leur prolifération à 24 et 48h. Les résultats indiquent un retard de prolifération particulièrement important à 48h (figure 29). Ces résultats confirment l'importance des variations du taux intracellulaire d'AMPC pour la progression du cycle, puisque maintenir cette concentration élevée de façon artificielle, ralentit la prolifération des cellules. Néanmoins, des expériences de cytométrie en flux sur des cellules traitées dans ces conditions, n'ont pas permis de déterminer significativement à quel moment du cycle les cellules sont retardées.

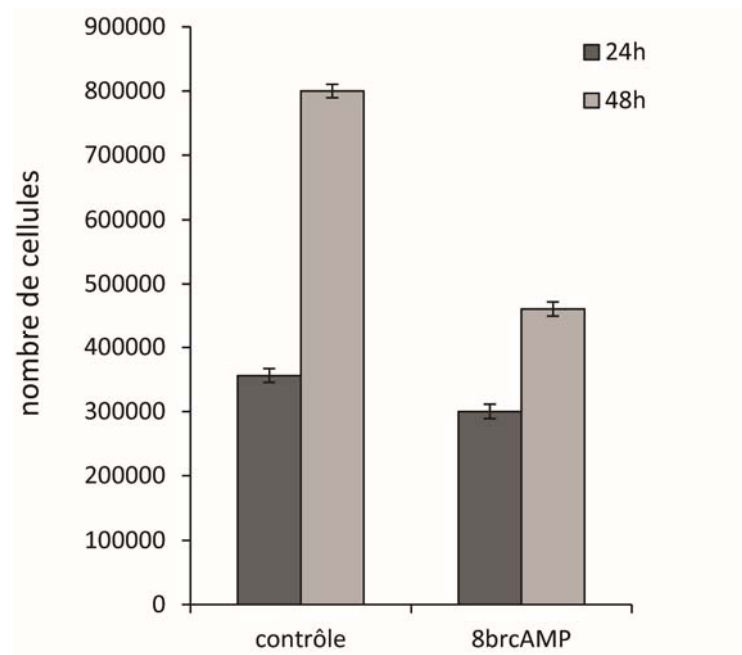


Figure 29 : Retard de prolifération des cellules HeLa soumises à un traitement par un analogue de l'AMPC.

Prolifération des cellules HeLa soumises ou non à une concentration de 0,1 mM de 8-br-cAMP à 24h et 48h. Les statistiques ont été calculées sur trois expériences.

3.2. Localisation de PKA au cours du cycle

Nous avons ensuite observé si la localisation des sous-unités catalytiques de PKA varie au cours du cycle cellulaire. Après synchronisation cellulaire par la thymidine, les cellules ont été fixées afin de réaliser une immunofluorescence indirecte dirigée contre la sous-unité de PKA (PKAc). Lors des phases S, G2 et de retour en G1, ce marquage présente une texture granulaire, cohérente avec la présence des AKAPs qui façonnent des microdomaines pour l'ancrage subcellulaire de PKA. Aucune différence notable n'est observée entre les différentes phases G1, S et G2 (figure 30).

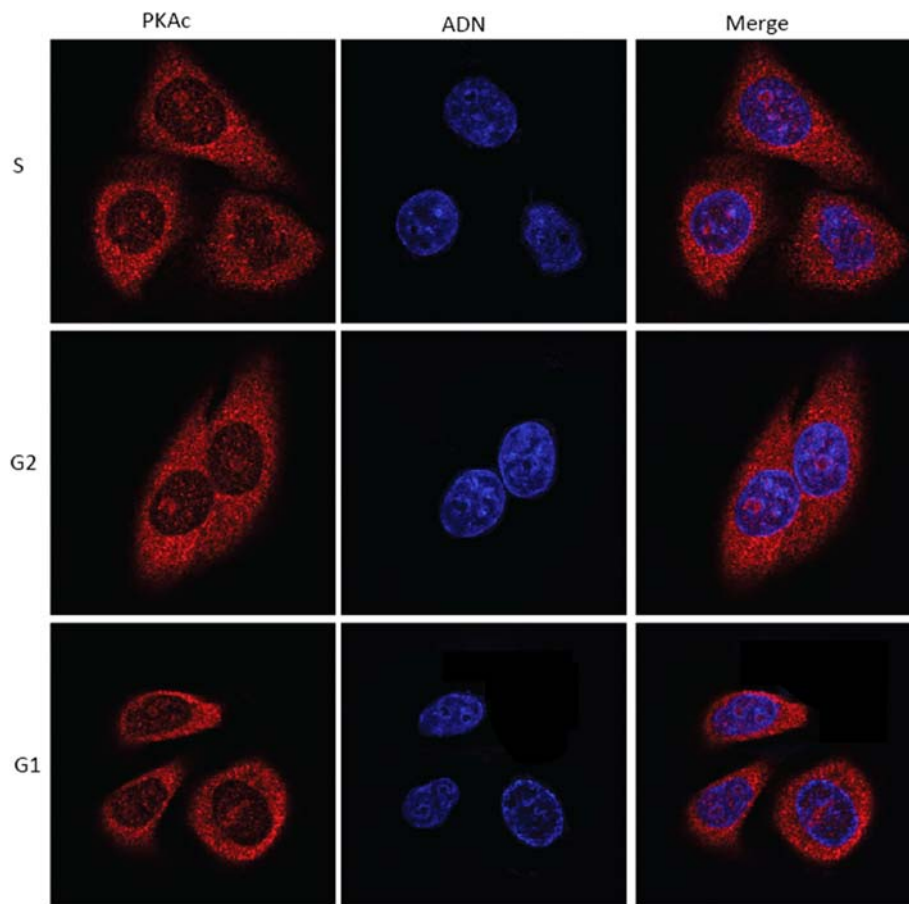


Figure 30: Localisation des sous-unités catalytiques de PKA lors des phases S, G2 et G1

Les cellules ont été synchronisées par la thymidine puis fixées. Un marquage des sous-unités catalytiques de PKA (en rouge) par immuno-fluorescence et un marquage de l'ADN (en bleu) ont été réalisés. Les images montrent quelques cellules représentatives de chaque phase S : (t=2h), G2 (t=8h), G1 (t=12).

En revanche, dans les temps entourant la phase de mitose, nous avons identifié dans certaines cellules deux petites régions, localisées dans cytoplasme mais en proximité du noyau, où l'intensité du marquage de cette sous-unité était beaucoup plus élevée. Afin de déterminer à quel moment précis correspondait ce phénotype, nous avons réitéré ces expériences d'immuno-fluorescence en y apportant deux modifications : i) les cellules ont été synchronisées par la technique du bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole dans le but de visualiser un maximum de cellules dans les étapes précoces et pendant la mitose, ii) un marquage α -tubuline a été ajouté pour permettre de déterminer les différents stades de la mitose. Ce type de marquage permet de définir les différentes étapes de la mitose grâce à l'observation de la formation du fuseau de division et de la condensation des chromosomes. Les images ont révélé que la localisation de PKAc reste granulaire dans tout le

corps cellulaire lors de la mitose. La concentration de PKAc est toutefois plus faible dans les zones où sont situés les chromosomes condensés. C'est lors des phases précoces de la mitose que nous avons retrouvé deux zones à forte concentration de PKAc. En prophase, ces zones se situent de part et d'autre du noyau, aux endroits vers lesquels convergent les microtubules. En prométaphase, ces deux régions se situent au milieu des asters. Ces éléments indiquent que PKAc est plus concentrée au niveau des centrosomes (figure 31).

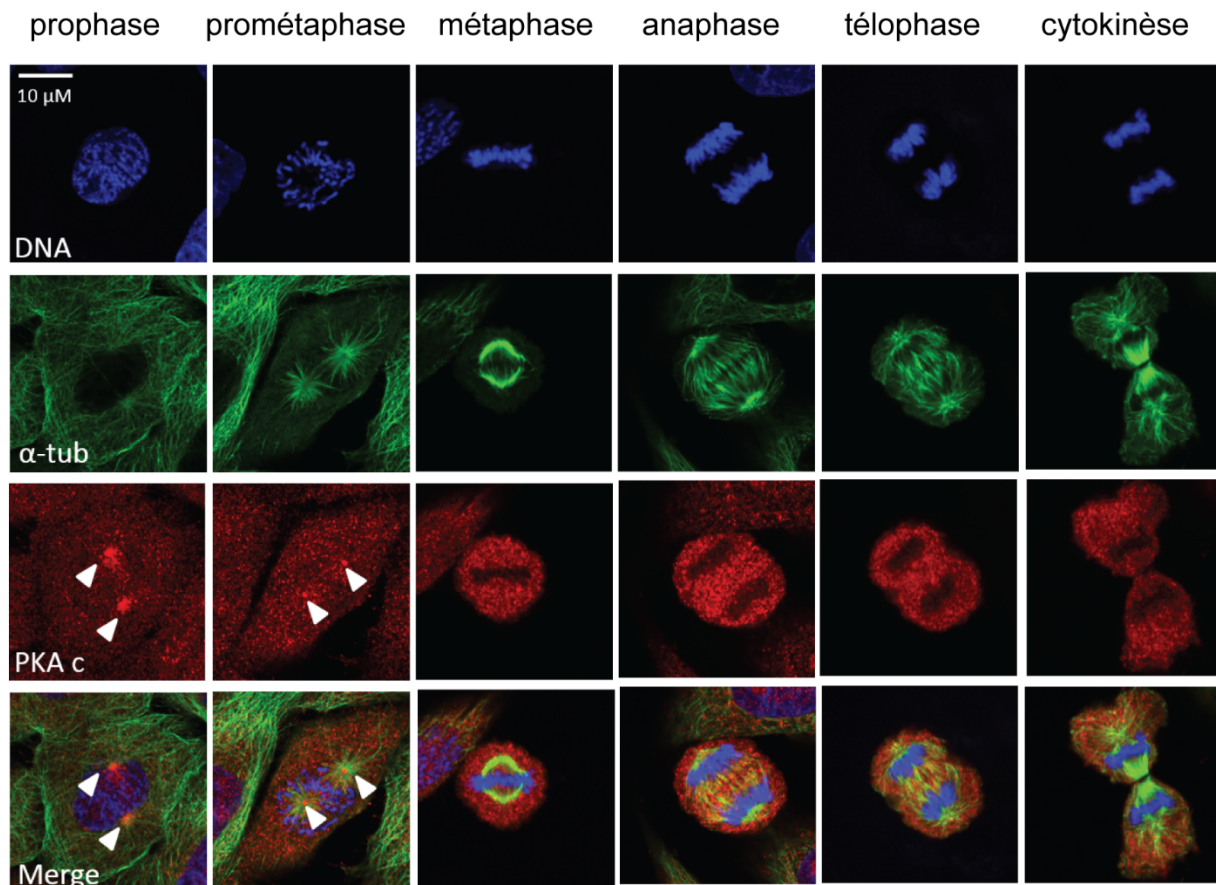


Figure 31 : Localisation des sous-unités catalytiques de PKA lors des différentes étapes de la mitose.

Les cellules ont été synchronisées par un bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole, puis fixées. Un marquage de l' α -tubuline (en vert), des sous-unités catalytiques de PKA (en rouge) par immunofluorescence et un marquage de l'ADN (en bleu) ont été réalisés.

Si on remplace le marquage PKAc par un marquage de la γ -tubuline, marqueur des centrosomes, on observe le même patron de localisation que pour les zones très intenses en PKAc (voir l'exemple de la prométaphase, figure 32). Ces éléments confirment l'augmentation de la concentration des sous-unités catalytiques de PKA au niveau des centrosomes, ce qui est cohérent avec l'augmentation

d'activité PKA détectée au niveau des centrosomes lors de la mitose (Terrin et al., 2012) (cf. introduction).

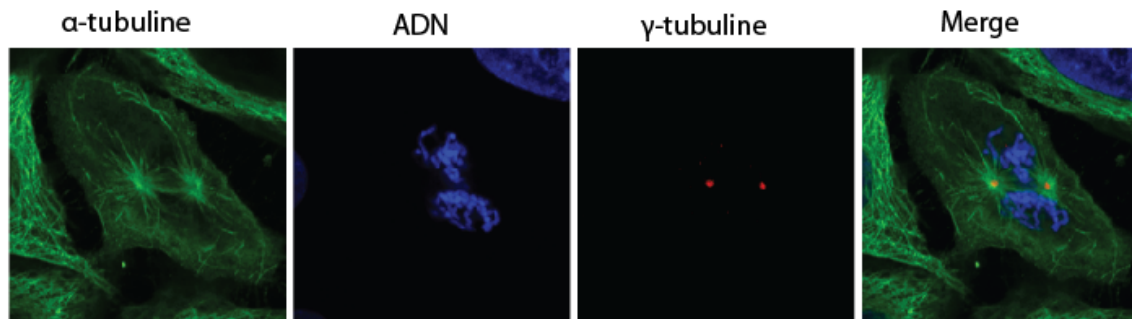


Figure 32 : Localisation des centrosomes par le marquage γ -tubuline

Une cellule représentative en prophase qui présente un marquage de l' α -tubuline (en vert), la γ -tubuline (en rouge) combinée à un marquage de l'ADN (en bleu).

4. Limites de l'étude des activités MAPK/ERK et PKA dans des populations de cellules

Nos données indiquent que des variations de phosphorylation et/ou de localisation de PKA et/ou MAPK/ERK se produisent lors de la mitose. Au début de cette étape de division, les sous-unités catalytiques de PKA sont fortement sous-localisées au niveau des centrosomes. Concernant MAPK/ERK, nous avons pu noter que si le taux de phosphorylation était plus élevé dans le cytoplasme avant la mitose, c'est dans le compartiment nucléaire qu'il est le plus élevé après l'étape de division.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'activité de ces kinases varie au cours de la mitose. Bien que très performants pour réaliser des mesures sur de la protéine purifiée, les tests de mesure colorimétrique et fluorescent que nous avons testés (STAR ERK1/2 ELISA (Merk Milipore) et ProFluor® PKA Assay (Promega)) pour mesurer l'activité de ces kinases se sont révélés peu fiables et peu reproductibles lorsque utilisés sur des extraits cellulaires. Par ailleurs, la synchronisation cellulaire présente certaines limites. Une fraction des cellules reste toujours non synchronisée et il existe des variations intercellulaires des différents temps requis pour effectuer chaque phase. Par exemple, sur la figure 22, lors d'une synchronisation par la thymidine, à $t = 10h$ seuls 64% des cellules correspondent aux cellules en mitose et en phase G2. Il est donc délicat d'apprécier les variations courtes d'activité au sein d'une population.

PARTIE II : Mise en place d'une approche en cellules uniques utilisant les biosenseurs FRET

Les limites observées et détaillées dans la partie précédente requièrent, dans le cadre de l'étude des kinases, des techniques de mesure d'activité *in vivo* en cellules uniques. La seconde partie de mon travail de thèse a donc été de mettre en place au sein du laboratoire, les stratégies nécessaires à ces mesures basées sur l'utilisation des biosenseurs FRET.

1. Mise en place technologique

Cette partie du travail a fait l'objet de la publication : **From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells.** Vandame P & Sipiet F ,Spriet C, Leray A, Vincent P, Trinel D, Bodart JF, Riquet FB, Héliot L *Progress in molecular biology and translational science* 113:145-216.

1.1. Définition de l'intervalle dynamique

L'une des propriétés cruciales d'un biosenseur est son intervalle dynamique. Cet intervalle correspond à la différence de valeur de ratio ou de temps de vie entre deux cas de figure : lorsque la kinase est complètement inactive et lorsqu'elle est pleinement active. Ces deux états peuvent être obtenus grâce à l'utilisation de drogues ou molécules spécifiques des kinases d'intérêt. L'intervalle dynamique doit être le plus large possible de manière à ce que le bruit de fond de la mesure soit négligeable par rapport aux variations d'activité. Un bon intervalle dynamique est donc lié à un bon rapport signal sur bruit (figure 33).

Afin de détecter les meilleurs signaux possibles, et d'obtenir le rapport signal sur bruit le plus élevé possible, il existe deux possibilités : diminuer le bruit et/ou augmenter l'intervalle dynamique. La première étape est l'optimisation des paramètres d'acquisitions vers le meilleur compromis entre :

- une illumination optimale afin de collecter un maximum de photons de fluorescence et donc d'obtenir la meilleur estimation des signaux FRET ;
- un gain faible pour minimiser le bruit de fond ;
- une puissance d'excitation et un temps d'exposition faibles afin de minimiser l'apparition d'effets phototoxiques et de photoblanchiment.

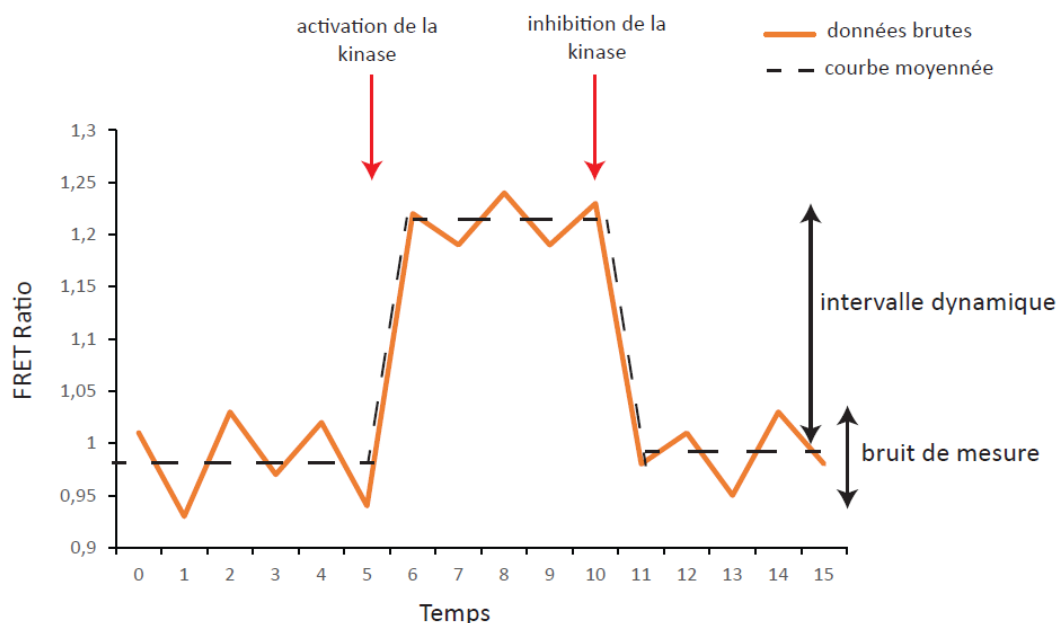


Figure 33 : Illustration schématique de l'intervalle dynamique

Courbe schématique d'étude de FRET par mesure des ratios d'intensité, avant et après stimulation de l'activité kinase, puis après son inhibition. Les variations de chaque état d'activité kinase correspondent au bruit de l'instrument et de l'échantillon. L'intervalle dynamique correspond à la différence de FRET (en ratio dans ce cas, mais également en temps de vie) entre le maximum et le minimum d'activité kinase détecté.

1.2. Avantages et inconvénients des différentes techniques de mesures testées

La première étape de la mise en place technologique pour l'utilisation des biosenseurs au sein du laboratoire a été le test de différentes techniques de mesure de FRET afin de déterminer la méthode adéquate pour chaque expérience. Les trois méthodes les plus couramment utilisées pour les mesures de FRET et disponibles sur site sont :

- les mesures ratiométriques ;
- les mesures de temps de vie dans le domaine temporel (également appelé TCSPC pour *time correlated single photon counting*) ;
- les mesures de temps de vie de fluorescence dans l'espace des fréquences (également appelé FD-FLIM pour *Frequency domain-FLIM*).

Pour comparer ces techniques, nous avons utilisé les biosenseurs AKAR3 et AKAR4 qui détectent l'activité de PKA (Allen and Zhang, 2006; Depry et al., 2011). Ces biosenseurs, particulièrement

performants et documentés, ont été nos outils de base pour cette mise en place technologique (figure 34). Depuis le début de ces travaux, une nouvelle version du biosenseur PKA existe : AKAREV (Komatsu et al., 2011), ainsi que la version FLIM-AKAR optimisée pour les mesures de FRET par FLIM (Chen et al., 2014).

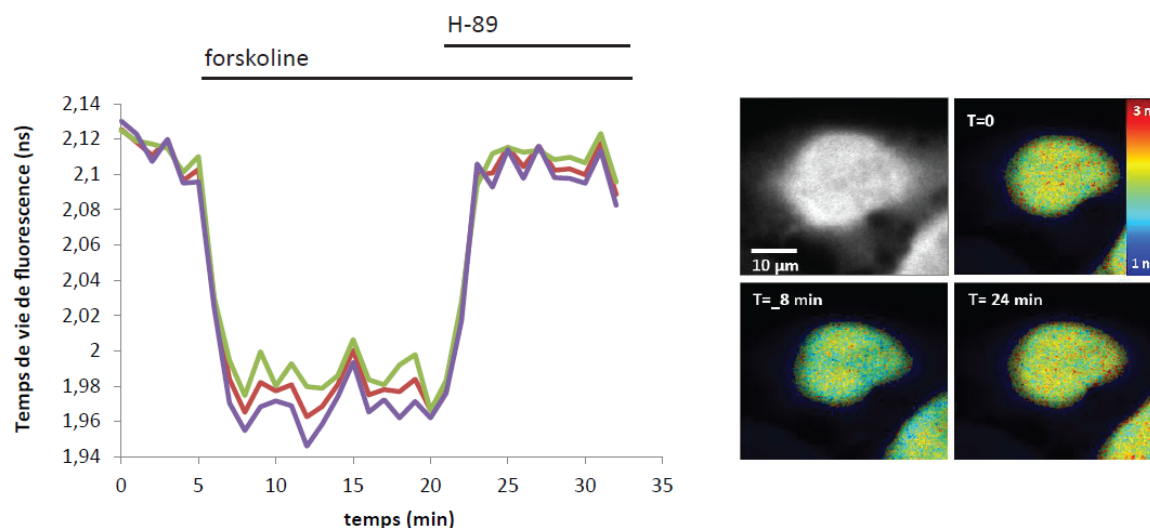


Figure 34 : Exemple de mesure d'activité PKA par FD-FLIM.

Temps de vie de fluorescence mesuré sur des cellules exprimant le biosenseur AKAR4. Le temps de vie de fluorescence est mesuré toutes les minutes et une chute de temps de vie correspond à une augmentation de FRET et donc de l'activité PKA. A $t = 5$ min, les cellules ont été mises en présence de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase qui induit une élévation du taux intracellulaire d'AMPc. A $t = 20$ min, les cellules ont été mises en présence de H-89, un inhibiteur de l'activité PKA. Les images montrent une cellule représentative (le temps de vie est représenté en échelle pseudo-couleur) aux différents temps indiqués. D'après (Vandame et al., 2013a).

Le tableau 5 présente nos conclusions sur ces différentes techniques dans le cadre de notre étude. Les différents avantages de la technique ratiométrique en font une méthode de choix notamment pour des mesures d'activité sur des périodes longues, telles que le cycle cellulaire. En effet, les faibles temps d'expositions et la puissance requise pour l'illumination, n'induisent que peu d'effets phototoxiques. Nos mesures ont montré que le photoblanchiment était négligeable dans ces conditions. Néanmoins, le FLIM reste une alternative de choix, notamment dans l'objectif d'utiliser plusieurs biosenseurs dans la même cellule afin de mesurer plusieurs paramètres à la fois, ou encore pour de l'imagerie en tissus épais, tels que des coupes de tissu cérébral (Carlson and Campbell, 2009; Chen et al., 2014).

Technique :	Avantages :	Inconvénients :
RATIO	→ Temps d'exposition par image court ($\approx 0,5$ sec) → Bonne résolution temporelle → Puissance d'excitation requise faible ($< 1\text{mW}$) → Peu de photoblanchiment → Nécessite uniquement des filtres appropriés → Résolution spatiale dépendante du microscope	→ Analyse complexe car de nombreuses sources d'artéfacts sont à prendre en considération
FD-FLIM	→ Temps d'exposition par image raisonnable (max 10 sec) → Peu de photoblanchiment → Facilité d'analyse	→ Temps d'exposition par image plus long (≈ 10 sec) → Puissance d'excitation requise plus élevée ($\approx 4\text{mW}$) → Nécessite l'accès à un équipement sophistiqué
TCSPC	→ Très bonne résolution spatiale → Grande précision dans les mesures de signal FRET	→ Temps d'exposition total plus long (de l'ordre de la minute) → Faible résolution temporelle → Nécessite l'accès à un équipement sophistiqué

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de FRET dans le cadre d'expérience de time-lapse utilisant les biosenseurs.

Les caractéristiques liées au temps d'exposition et à la puissance sont celles des systèmes disponibles sur site, dans les conditions permettant de mesurer l'activité kinase de PKA avec le biosenseur AKAR3.

Pour plus de détails sur la partie suivante qui concerne l'aspect méthodologique des mesures d'activité kinase liée à l'utilisation des biosenseurs voir la publication page 128.

2. Optimisation des outils préexistants : optimisation du biosenseur rapporteur d'activité MAPK/ERK

Au cours de l'étape de mise en place et de caractérisation, nous avons constaté que le biosenseur d'activité MAPK/ERK développé par Harvey (appelé EKAR pour *Extracellular-regulated Kinase Activity Reporter*) présente un intervalle dynamique faible à la fois dans la littérature et sur nos systèmes. Or, nos données précédemment obtenues par western blot ou par immuno-fluorescence suggèrent que les variations d'activité MAPK au cours du cycle sont faibles. Dans une recherche d'outils plus performants, nous avons donc entrepris de modifier ce biosenseur afin d'en améliorer la sensibilité.

Cette partie du travail a fait l'objet de la publication: **Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements.** [Vandame P, Spriet C, Riquet F, Trinel D, Cailliau-Maggio K, Bodart JF. Sensors 14\(1\):1140-54](#)

2.1. Comment optimiser un biosenseur ?

Plusieurs éléments peuvent être modifiés pour obtenir un meilleur intervalle dynamique. L'idée générale de l'optimisation d'un biosenseur est, soit d'en améliorer le récepteur, par exemple en ajoutant un domaine de fixation (*docking domain*) de la kinase d'intérêt dans la séquence du biosenseur afin de favoriser l'interaction senseur/kinase, soit de modifier la partie transductrice, pour améliorer le signal FRET. Ce deuxième choix implique plusieurs stratégies :

- Modifier les fluorophores : il existe de nombreux variants de chaque fluorophore qui présentent des propriétés optimisées comme un meilleur rendement quantique ou un temps de vie plus élevé. De nouveaux couples de fluorophores optimisés pour le FRET sont régulièrement développés.
- Modifier son changement de conformation : l'idée ici est d'apporter plus de flexibilité ou de rigidité au biosenseur, dans le but de favoriser la bonne orientation et le rapprochement des fluorophores.

2.2. Optimisation du biosenseur MAPK/ERK

2.2.1. Stratégie d'optimisation

Afin de rétrécir le champ d'investigations possibles, nous nous sommes basés sur de précédentes optimisations (Depry et al., 2011) et sur un biosenseur présentant un intervalle dynamique remarquable (Klarenbeek et al., 2011), pour tenter d'améliorer le biosenseur MAPK/ERK.

Dans le cadre de l'optimisation d'AKAR3 vers AKAR4 publiée en 2011, le simple changement du fluorophore donneur (remplacement de la CFP par une Cerulean) en combinaison avec la CpVenus, a permis d'augmenter l'intervalle dynamique d'environ 35% à 57% pour les mesures ratiométriques, ainsi que de 120 picosecondes (ps) à 140 ps sur les expériences de FD-FLIM (Depry et al., 2011; Vandame et al., 2013a).

Parmi les outils qui utilisent le FRET pour caractériser la voie AMPc/PKA, nous avons été amenés à utiliser une autre catégorie de biosenseur, qui ne reporte pas l'activité de la kinase mais la concentration d'AMPc. Ceux-ci sont construits d'une façon un peu différente : ils utilisent la propriété de la protéine Epac1 (ou Epac2) à se déplier lorsque l'AMPc s'y fixe. Ils sont constitués de deux fluorophores qui flanquent la séquence de la protéine EPAC (Ponsioen et al., 2004). Parmi ces outils, le biosenseur ^TEPAC^{vv} présente un intervalle dynamique impressionnant de 700ps en FLIM et de presque 100% en FRET ratiométrique (Klarenbeek et al., 2011). Les fluorophores de ce biosenseur ont été choisis de façon à optimiser les mesures par FRET ratiométrique mais également par FLIM. En effet, le fluorophore donneur est une turquoise tronquée qui présente un temps de vie plus élevé que les variants CFP et Cerulean (3,7 ns à la place de 2,3), tandis qu'en place d'accepteur, se trouve un dimère CpVenus-Venus qui augmente les capacités d'extinction ou « *quenching* » et favorise les expériences de FLIM et de FRET ratiométriques (Goedhart et al., 2010; Kremers et al., 2006).

La première étape de l'optimisation du biosenseur MAPK/ERK existant a donc été de remplacer les fluorophores de EKAR par ceux présents dans AKAR4 et ^TEPAC^{vv} (figure 35A). Lorsque nous avons commencé à tester ces nouveaux biosenseurs, de nouveaux travaux concernant l'optimisation des biosenseurs ont été publiés dans lesquels un *linker* a été conçu pour améliorer les capacités de plusieurs senseurs kinase préexistants (Komatsu et al., 2011)(cf. introduction). Sa présence ajoute le suffixe EV aux acronymes précédents pour donner un nom à cette nouvelle génération d'outils. Les résultats préliminaires encourageants du couple de fluorophores turquoise-dimère CPVenus-Venus nous ont conduits à les combiner à ce nouveau *linker* (figure 35B). La figure 35 expose la composition des 3 constructions testées et leurs modifications par rapport aux générations précédentes. Ces constructions ont été nommées d'après le biosenseur dont ils sont issus en y ajoutant les initiales des fluorophores utilisés.

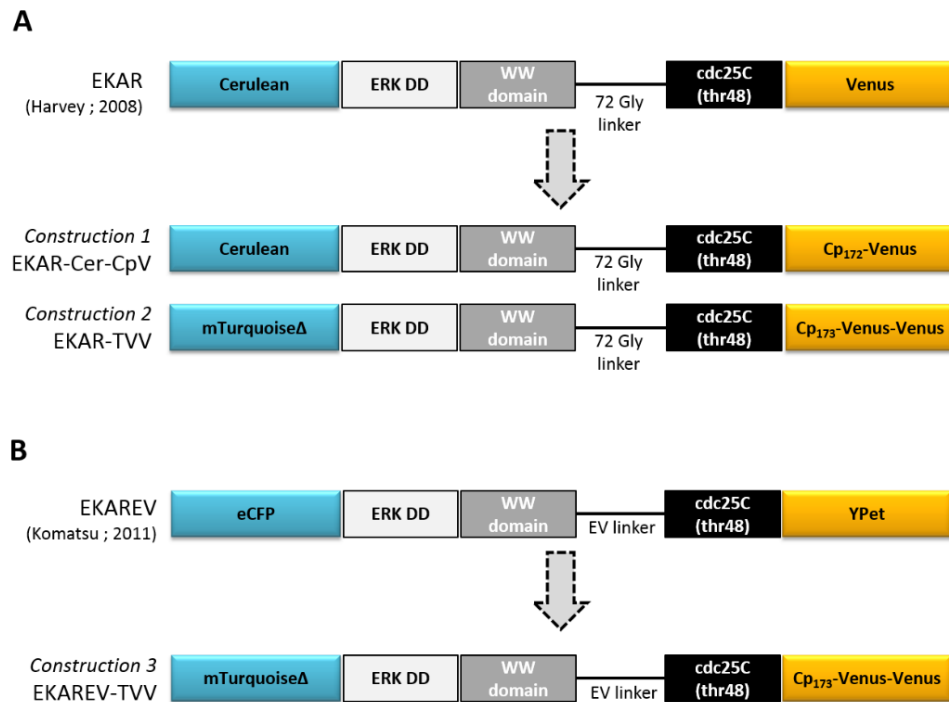


Figure 35 : Stratégie d'optimisation du biosenseur MAPK

ERK DD correspond au domaine de docking de MAPK/ERK (séquence d'acides aminés: FQFP). WW correspond au PAABD. Le substrat correspond à une partie de la séquence de la protéine Cdc25 (séquence d'acides aminés : PDVRTPVGK) qui est spécifiquement reconnue et phosphorylée par MAPK/ERK sur la thréonine 48. EKAR-Cer/CpV and EKAR-TVV dérivent de EKAR (Harvey et al., 2008) et EKAREV-TVV dérive de EKAREV (Komatsu et al., 2011). D'après (Vandame et al., 2013b)

2.2.2. Mesures des intervalles dynamiques des biosenseurs MAPK/ERK

Dans le but de créer une nouvelle génération de biosenseur MAPK la plus polyvalente possible pour la communauté scientifique, nous avons choisi de tester nos constructions à la fois en FRET ratiométrique et en FLIM afin de déterminer le biosenseur le plus performant. Pour ce faire, les cellules exprimant les différentes constructions moléculaires ont été privées de sérum afin d'inactiver la voie MAPK/ERK. Après quelques images qui correspondent à l'absence d'activité MAPK/ERK, les cellules ont été soumises à une stimulation par l'EGF, qui a pour conséquence d'activer la cascade MAPK/ERK (figure 36 et 37). Chaque biosenseur que nous avons construit a été comparé à celui à partir duquel il a été modifié.

Les mesures ratiométriques ont révélé que EKAR-Cer/cpV et EKAR-TVV présentent des intervalles dynamiques supérieurs à celui de EKAR après stimulation par l'EGF (figure 36). En revanche, la différence entre EKAREV et EKAREV-TVV est peu significative.

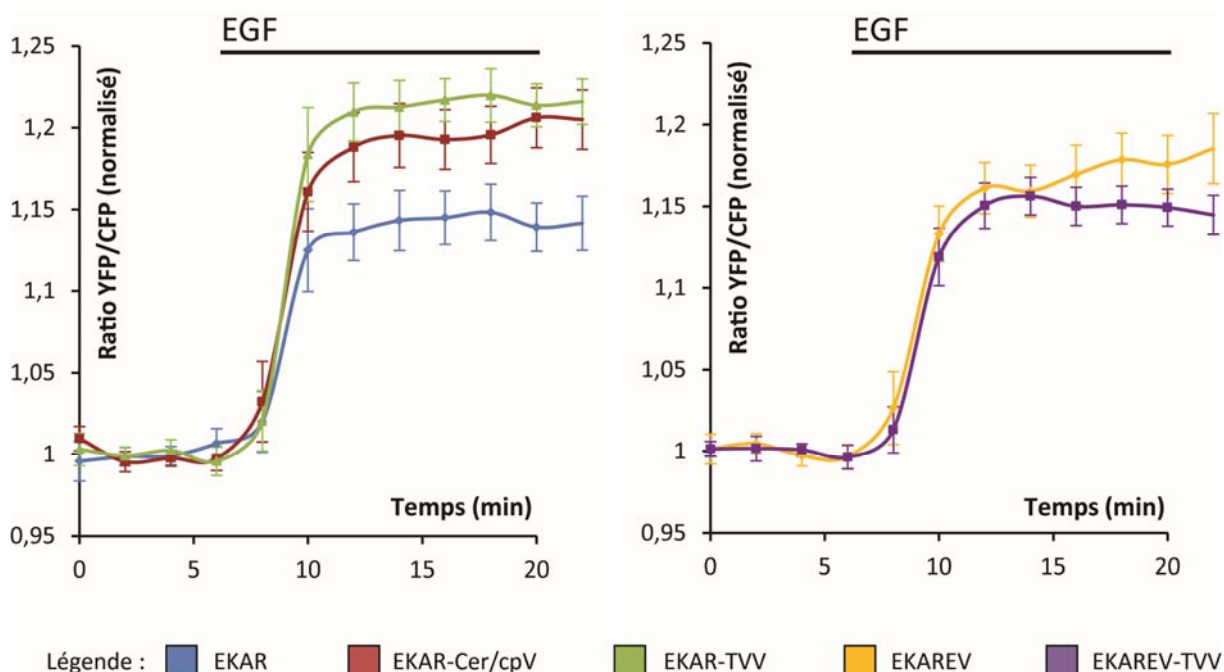


Figure 36 : Intervalles dynamiques des biosenseurs optimisés par rapport aux biosenseurs d'origine mesurés par FRET ratiométrique

Les courbes représentent les variations des ratios YFP/CFP mesurés sur des cellules ($n = 22$ à 43 par condition) exprimant les différents biosenseurs et privées de sérum avant et après stimulation de l'activité MAPK/ERK par l'EGF. D'après (Vandame et al., 2013b)

Lorsque la même expérience est réalisée en FLIM, on observe que EKAR-TVV et EKAREV-TVV présentent des intervalles dynamiques supérieurs, contrairement à EKAR-Cer/cpV qui est pourtant meilleur que EKAR lors des expériences de FRET par mesure des ratios (figure 37).

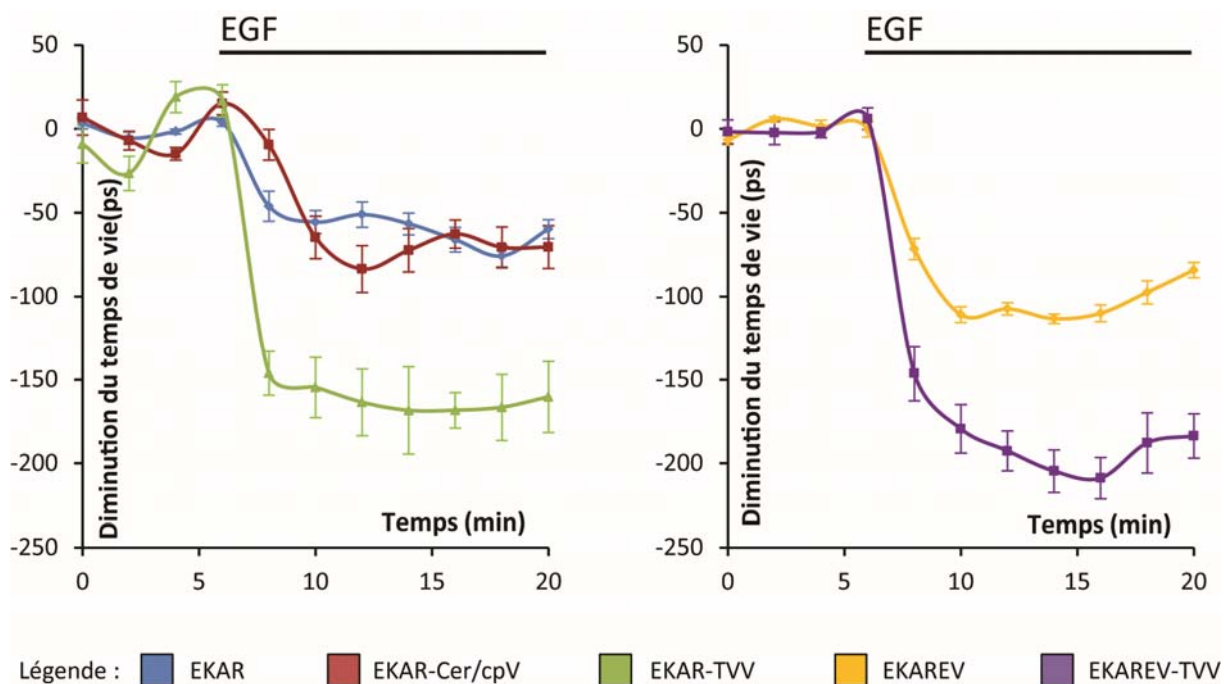


Figure 37 : Intervalles dynamiques des biosenseurs optimisés par rapport aux biosenseurs d'origine mesurés par FD-FLIM

Les courbes représentent les variations de temps de vie mesurées par FD-FLIM sur des cellules (n=4 à 8 cellules par condition) exprimant les différents biosenseurs et privées de sérum, avant et après stimulation de l'activité MAPK/ERK par l'EGF. D'après (Vandame et al., 2013b).

Le calcul des intervalles dynamiques obtenus par soustraction de la moyenne des points avant stimulation à la moyenne des points de la phase plateau après stimulation par l'EGF, pour chacune des deux techniques montre que EKAR-TVV est le biosenseur le plus polyvalent. En effet, son intervalle dynamique est de 21,5% au lieu de 14,2% pour EKAR en FRET ratiométrique et de 160 ps au lieu de 60 ps en FLIM. Le cas EKAREV-TVV est également intéressant : si celui-ci présente le meilleur intervalle dynamique en FLIM (192 ps), il ne présente aucun bénéfice pour les expériences de FRET-ratio (figure 38).

Comment un biosenseur peut-il être optimisé pour une technique de mesure et non pour une autre ? Le fait est qu'un événement de FRET correspond à une modification de l'environnement local d'un fluorophore. Cette modification affecte plusieurs des propriétés de la fluorescence. Or, FRET ratiométrique et FD-FLIM reposent chacun sur la mesure d'une ces propriétés : les intensités d'émission ou le temps de vie. Le repliement d'un biosenseur, nécessaire au transfert d'énergie, peut également contribuer en lui-même à modifier l'environnement local d'un fluorophore. Une hypothèse pour répondre à la question de départ est que les modifications engendrées par le repliement du biosenseur (et non par le FRET) pourraient affecter différemment les propriétés de la

lumière, donnant naissance ainsi à des biosenseurs très performants pour une technique de mesure mais pas obligatoirement pour une autre.

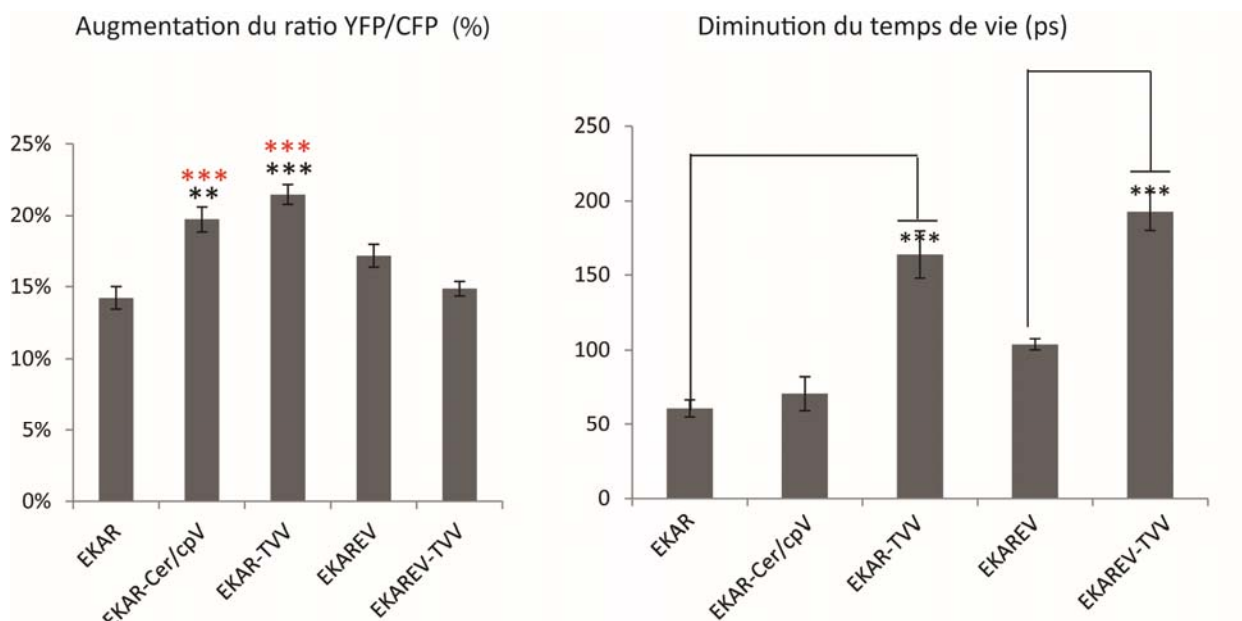


Figure 38 : Histogrammes des intervalles dynamiques obtenus en FRET ratio et en FD-FLIM

Les histogrammes représentent les variations de ratio (en % à gauche) et de temps de vie (en ps à droite) obtenues après stimulation par l'EGF pour les différents biosenseurs. 2 étoiles représentent une p -value $\leq 0,01$ et trois étoiles représentent une p -value $\leq 0,001$. Sur l'histogramme de gauche les symboles sont en rouge quand les données ont été comparées à EKAREV et en noir quand comparées à EKAR. D'après (Vandame et al., 2013b).

Le dernier point à contrôler lors de l'optimisation d'un biosenseur est de vérifier que les modifications apportées n'ont pas altéré sa réversibilité, c'est-à-dire sa capacité à être déphosphorylé sous l'action de protéines phosphatases et donc à retourner à un état conformationnel relaxé. Pour ce faire, les cellules ont été soumises, après une stimulation par l'EGF, à un traitement par l'U0126, un inhibiteur de l'activité MAPK/ERK. Sous l'effet de l'U0126, les cellules exprimant EKAR-TVV ou EKAREV-TVV, ont montré des niveaux de FRET qui décroissent jusqu'à retourner au niveau basal (c'est-à-dire, le même niveau de FRET qu'en état de privation de sérum) ce qui confirme leur réversibilité (figure 39). Nous avons également construit par mutagenèse dirigée les mutants non phosphorylables de EKAR-TVV et EKAREV-TVV comme contrôle négatif. Pour ces deux mutants, la thréonine au sein du substrat a été remplacée par une alanine. Lors des différentes activations ou inhibitions de MAPK/ERK, aucune variation des signaux de FRET n'a été détectée (figure 39).

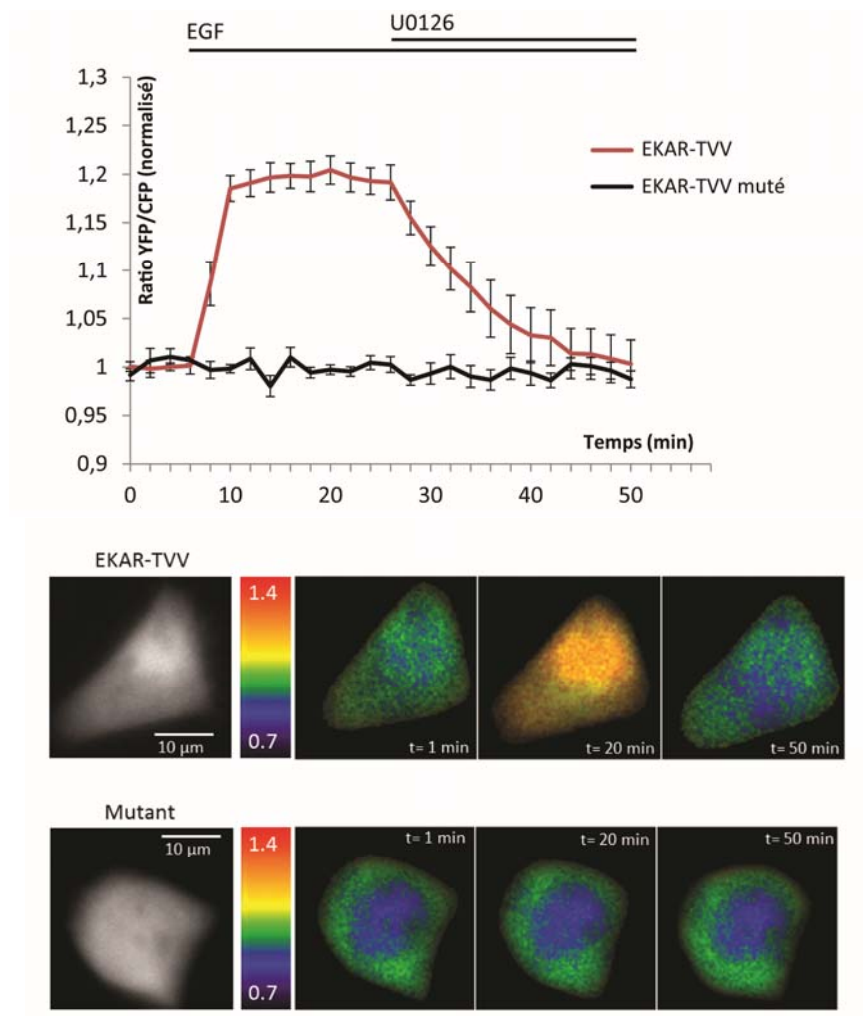


Figure 39 : Réversibilité de EKAR-TVV

Les courbes représentent les variations du ratio YFP/CFP, mesurées sur des cellules exprimant EKAR-TVV ($n=16$) ou sa version mutée ($n=25$), avant et après stimulation de l'activité MAPK par l'EGF et après inhibition de l'activité MAPK par l'U0126. En dessous, une cellule représentative de chaque condition à différents temps.

En conclusion, cette étape d'optimisation du biosenseur MAPK, nous a permis de développer un biosenseur polyvalent et performant : EKAR-TVV, dont l'intervalle dynamique est meilleur que celui des générations précédentes, à la fois en FRET ratiométrique et en FLIM. Ce biosenseur, ainsi que EKAREV-TVV qui présente le meilleur intervalle en FLIM, sont mis à disposition de la communauté scientifique et permettront des mesures d'activité MAPK/ERK *in vivo* plus sensibles.

PARTIE III : Mesures des activités kinase PKA et MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire

Les inconvénients des premières générations de biosenseurs MAPK/ERK ont été estimés au début de ce travail (cf. partie II des résultats). Ils nous ont conduits à débiter cette partie du travail par une étude de l'activité de PKA au cours du cycle, en attendant de disposer de nouveaux outils pour étudier MAPK/ERK.

1. Etude spatio-temporelle de l'activité de PKA

Cette partie du travail a fait l'objet de la publication : **The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation.** [Pauline Vandame](#), Corentin Spriet, Dave Trinel, Armance Gelaude, Katia Caillau, Coralie Bompard, Emanuele Biondi and Jean-François Bodart. *Cell Cycle*, 2014. Sous presse.

1.1. L'activité de PKA augmente lors de l'entrée en mitose

Les données d'immuno-fluorescence (figure 31) indiquent que les sous-unités catalytiques de PKA, responsables de son activité de phosphorylation, sont fortement localisées aux centrosomes lors des premières étapes de la mitose. Nous avons cherché à savoir si, à ce moment du cycle cellulaire, l'activité de PKA varie. Dans cet objectif, nous avons utilisé le biosenseur rapporteur d'activité PKA : AKAREV (Komatsu et al., 2011). Les cellules ont été synchronisées au moment de la transition G1/S par la technique du bloc thymidine et les mesures de FRET ont été réalisées toutes les 5 min par calcul des ratios d'intensité car c'est la méthode la moins phototoxique et la plus favorable à de l'imagerie sur des temps d'acquisitions longs. La figure 40 montre les profils d'activité PKA obtenus au cours de la mitose. L'activité de PKA augmente lorsque la cellule se détache de son substrat et s'arrondit, phénotype caractéristique de l'entrée en mitose. Cette activité reste élevée lors de la progression de la mitose et décroît au moment où les cellules prennent une forme allongée (lors de l'anaphase) juste avant d'effectuer leur cytokinèse (figure 40).

Après la cytokinèse, lorsque les cellules retournent en phase G1, deux comportements ont été observés :

- Certaines cellules ont montré un pic d'activité PKA, pendant un laps de temps court, avant de retourner à un niveau d'activité plus faible (figure 40).
- Ce pic n'a toutefois pas été détecté dans toutes les cellules. Une hypothèse pour l'expliquer est que cet événement est parfois trop court pour être décelé systématiquement avec une acquisition toutes les 5 minutes.

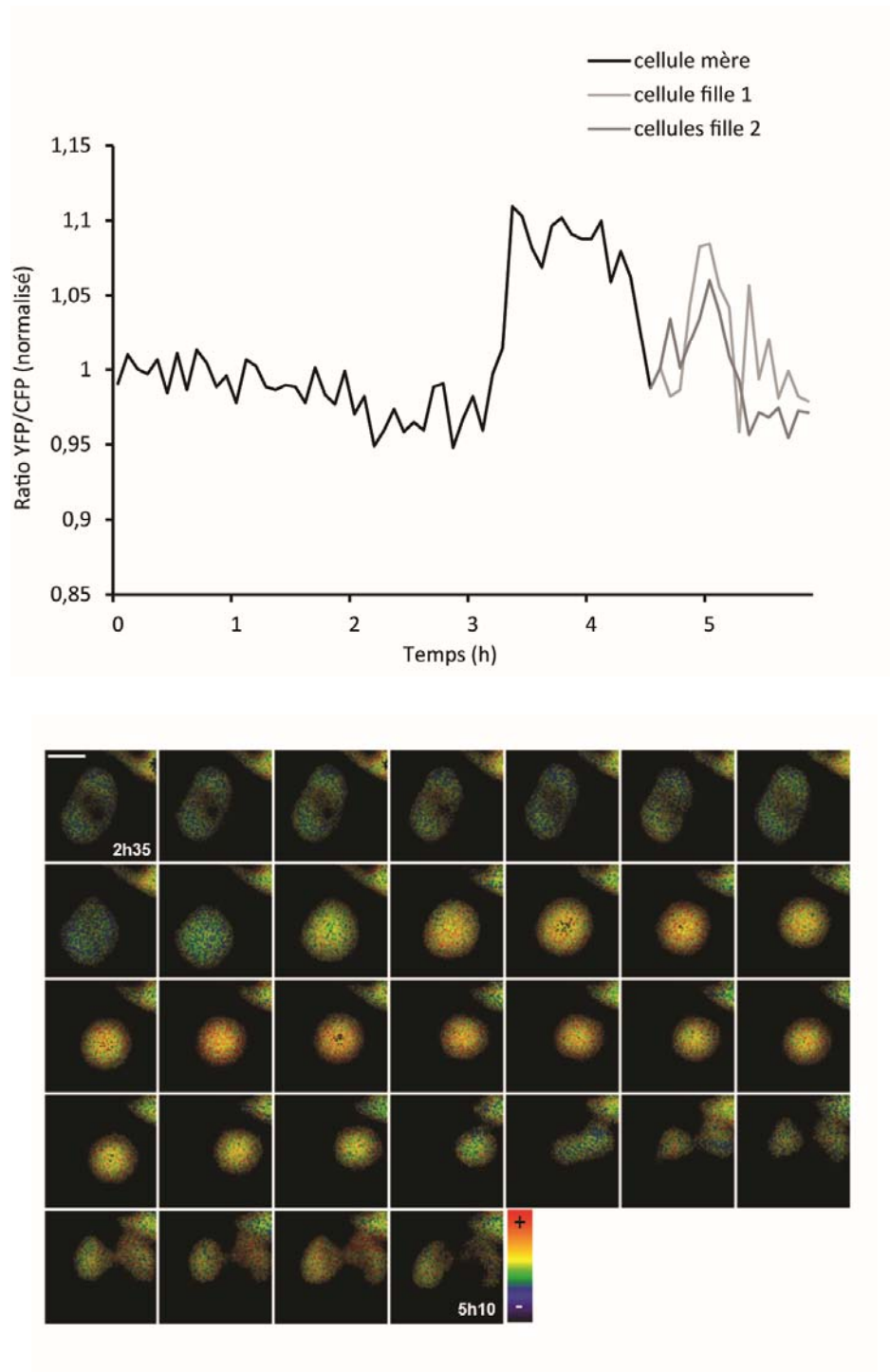


Figure 40 : L'activité de PKA augmente lors de la mitose

La courbe représente le ratio YFP/CFP mesuré dans une cellule en mitose exprimant le biosenseur rapporteur d'activité PKA AKAREV. A $t = 4h45$, la courbe se divise en deux courbes pour suivre l'activité PKA dans chacune des cellules filles. Les images représentent le ratio YFP/CFP en échelle pseudo-couleur, avant pendant et après la mitose.

Afin de contrôler que les variations de FRET observées lors de la mitose ne sont pas un artefact, conséquence de modifications physico-chimiques, ou encore morphologiques, nous avons construit une version non phosphorylable de AKAREV par mutagenèse dirigée. Lors d'une stimulation de l'activité de PKA par la forskoline, cette version mutée ne montre aucune variation du ratio YFP/CFP, ce qui valide la construction de ce mutant (figure 41). Nous avons ensuite réalisé des mesures au cours du cycle sur des cellules transfectées avec AKAREV T>A. Dans ces conditions, on observe une légère chute du signal FRET depuis l'arrondissement des cellules jusque la cytokinèse. Néanmoins, la comparaison statistique des ratios entre les cellules exprimant AKAREV et AKAREV muté aux différents moments de la mitose confirme que les variations observées sont significatives et correspondent à une augmentation de l'activité PKA (figure 42). Cette analyse montre une augmentation du ratio YFP/CFP de 24% au moment de la mitose, correspondant donc à une augmentation de l'activité PKA. Cette activité décroît à la cytokinèse : le ratio YFP/CFP diminue jusque 11%. Enfin la valeur intermédiaire en G1 s'explique par les deux types de comportements observés (pic d'activité PKA ou non) (figure 42).

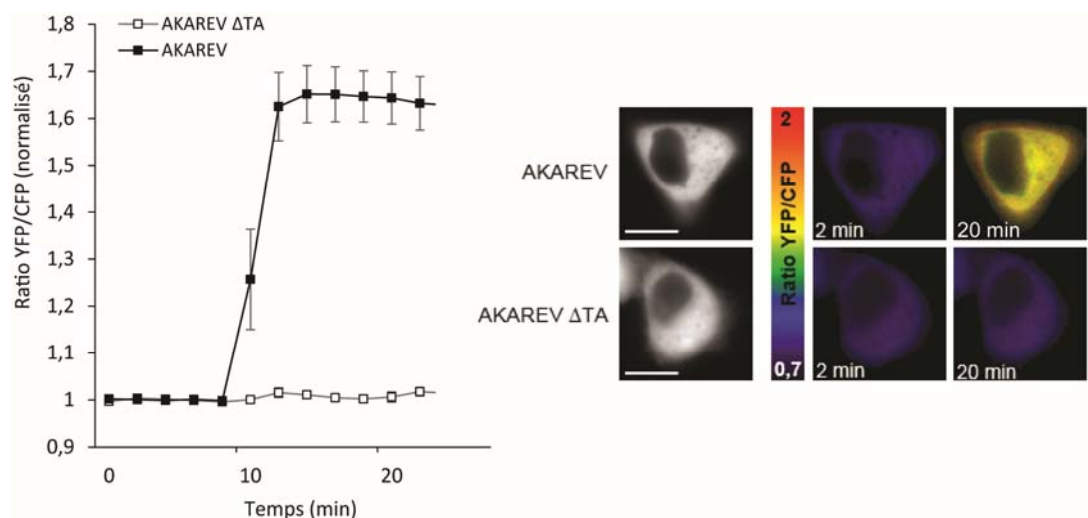


Figure 41 : Validation fonctionnelle du biosenseur muté AKAREV T>A

Ratios YFP/CFP mesurés sur des cellules exprimant AKAREV ($n=20$) ou AKAREV T>A ($n=11$), avant et après addition de 12.5 μ M de forskoline (à $t=8$ min). Images représentatives d'une cellule pour chaque condition avant et après ajout de forskoline, en échelle pseudo-couleur.

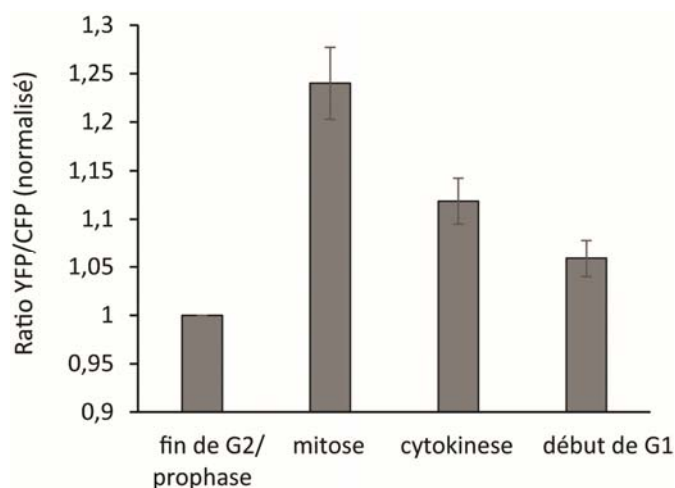


Figure 42 : Comparaison statistique des variations de ratio FRET observées dans les cellules exprimant AKAREV et sa version mutée lors de la mitose.

L'histogramme représente les différences moyennes entre les ratios mesurés sur les cellules exprimant AKAREV (n=8) et AKAREV muté (n=8). Les différentes étapes ont été différenciées sur des critères morphologiques : i) fin de G2/prophase correspond aux 5 points avant l'arrondissement de la cellule, ii) mitose correspond au moment où la cellule est effectivement ronde, iii) cytokinèse correspond au moment où la cellule s'allonge et commence sa constriction en deux cellules filles et iv) début de G1, correspond aux 5 points suivants.

1.2. L'activité de PKA est sous-localisée pendant les différentes étapes de la mitose

Dans un second temps, nous avons observé que l'activité de PKA est sous-localisée au sein de la cellule lors des étapes de la mitose. Nous avons réalisé des expériences de FRET par calcul des ratios d'intensités en augmentant la résolution et en y ajoutant du sectionnement optique sur un microscope confocal. Les cellules exprimant le biosenseur AKAREV ont été synchronisées et fixées au moment de la mitose. Sur les cellules en métaphase, nous avons observé que l'activité PKA était particulièrement élevée à proximité des chromosomes et, au contraire, plus faible là où se tient le fuseau de division (figure 43).

Afin de vérifier que ces variations ne résultent pas d'un artéfact causé par des variations de la concentration du biosenseur dans ces régions, la même expérience a été réalisée sur des cellules exprimant le biosenseur mutant AKAREV T>A, ainsi que sur des cellules exprimant AKAREV et traitées par un inhibiteur de l'activité PKA, le H-89. Dans ces deux conditions, aucune variation de ratio n'a été observée, ce qui confirme que les changements de ratio détectés au niveau des chromosomes ou du fuseau correspondent bien à différents niveaux d'activité PKA (figure 44).

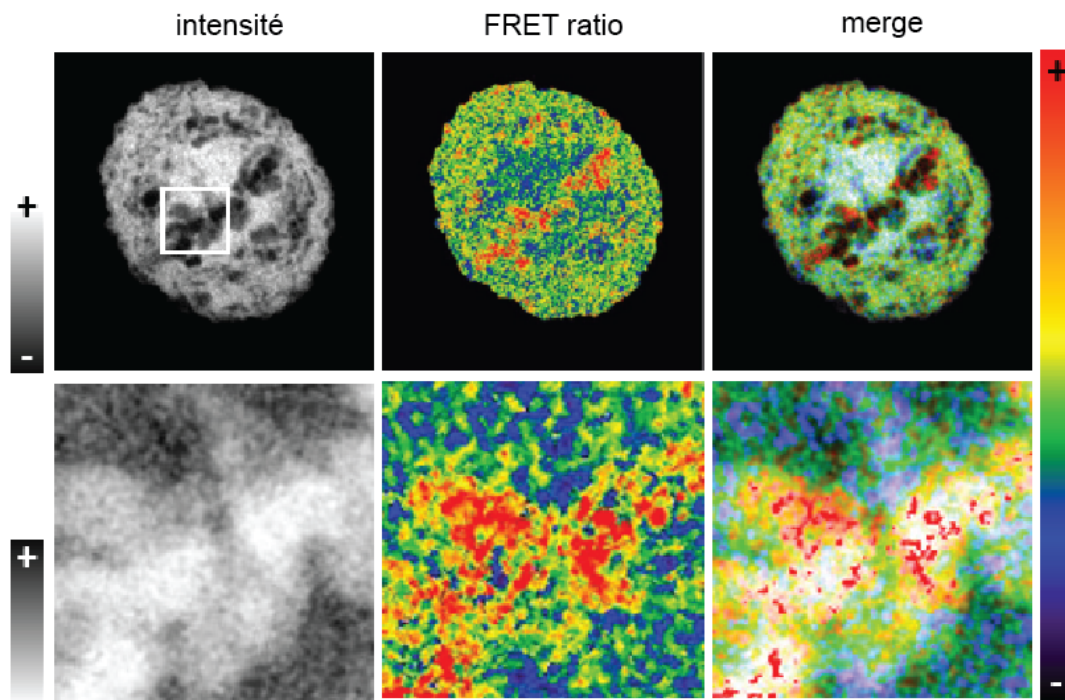


Figure 43 : Sous localisation de l'activité PKA en métaphase

Une cellule exprimant le biosenseur AKAREV en métaphase (représentative de $n=12$). Le haut de la figure représente successivement l'image d'intensité de la CFP (en niveau de gris) afin de visualiser les différentes structures intracellulaires, l'image de ratio YFP/CFP en pseudo-couleur et la superposition de ces deux images afin de visualiser quelles activités sont corrélées à quelles structures. La partie basse représente un agrandissement de la région d'intérêt définie sur l'image en haut à gauche. Dans le but de mieux visualiser les événements qui ont lieu au niveau des chromosomes, l'intensité est représentée cette fois-ci par une échelle de niveau de gris inversée, suivie de l'image de ratio, puis de la superposition des deux images précédentes.

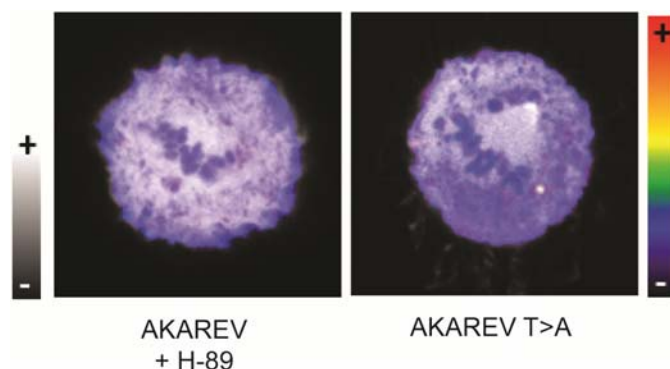


Figure 44 : Contrôle de sous localisation de l'activité PKA

Image des ratios YFP/CFP (en échelle pseudo-couleur) pondérés par l'intensité pour des cellules en métaphase exprimant i) AKAREV et traité par le H-89 (représentative de $n=4$) ii) AKAREV T>A (représentative de $n=6$).

Nous avons observé que ce patron de sous-localisation de l'activité PKA (activité plus forte à proximité des chromosomes) se prolongeait en anaphase. En effet, lors de cette étape de la mitose, une activité PKA importante est détectée au niveau de l'ADN, tandis qu'elle est plus faible entre les deux lots de chromosomes en train de migrer vers les pôles de la cellule (figure45).

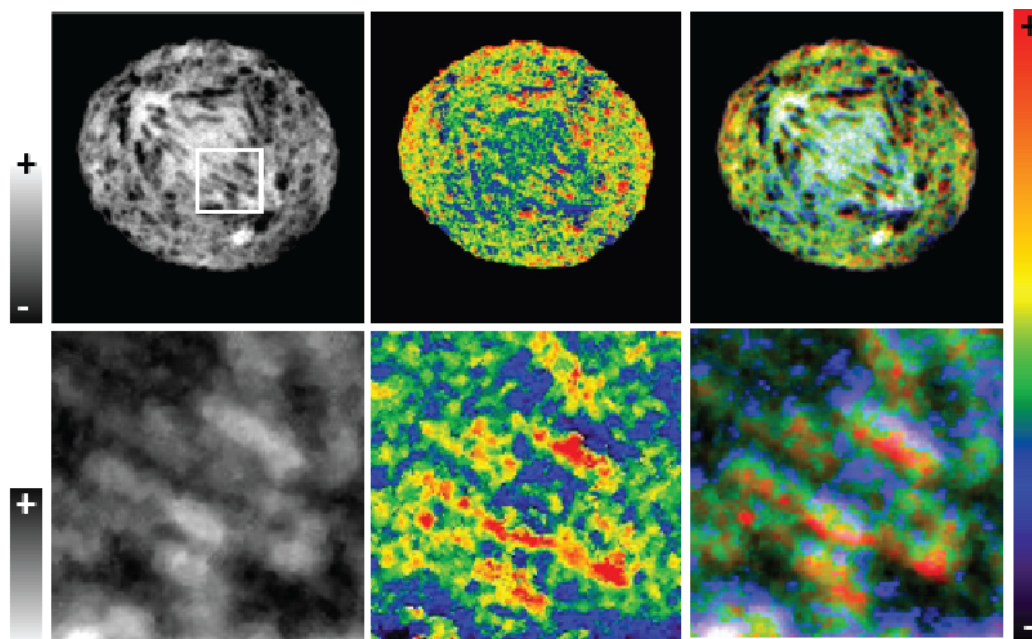


Figure 45 : Sous localisation de l'activité PKA en anaphase

Une cellule en anaphase exprimant le biosenseur AKAREV (représentative de $n=3$). La partie haute de la figure représente successivement une image d'intensité de la CFP (en niveau de gris) afin de visualiser les différentes structures intracellulaires, l'image de ratio YFP/CFP en échelle pseudo-couleur, et la superposition de ces deux images afin de visualiser quels niveaux d'activité sont corrélés à quelles structures. La partie basse représente un agrandissement de la région d'intérêt définie sur l'image en haut à gauche. Dans le but de mieux visualiser les événements qui ont lieu au niveau des chromosomes, l'intensité est représentée cette fois-ci par une échelle de niveau de gris inversée, suivie de l'image de ratio, puis de la superposition des deux images précédentes.

Nous sommes actuellement en train de mettre en place une stratégie de mesure de l'activité PKA aux centrosomes, pour observer cette activité notamment en prophase et prométaphase. Nous avons combiné l'expression du biosenseur AKAREV avec une étape d'immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps dirigé contre la γ -tubuline. Pour l'instant nos mesures à cet endroit présentent un rapport signal/bruit faible et sont difficilement analysables notamment à cause de la petite taille de la zone à analyser.

1.3. L'augmentation d'activité PKA lors de la mitose est nécessaire à un alignement correct des chromosomes en métaphase.

L'étape suivante a été de déterminer le rôle de l'augmentation d'activité PKA lors de la mitose. Cette augmentation est-elle nécessaire à la progression de la mitose ?

Les cellules ont donc d'abord été synchronisées en fin de phase G2 par un bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole. Après la relâche permettant aux cellules la reprise du cycle, elles ont été mises en présence de 10 μ M de H-89, l'inhibiteur de PKA, puis fixées à $t = 1$ h et $t = 2$ h après la reprise. D'après les marquages de l'ADN (marquage Hoechst) et du fuseau (immunofluorescence indirecte dirigée contre l' α -tubuline), chaque cellule de chaque condition a été classée selon la phase de la mitose dans laquelle elle se trouve. Les cellules en cytokinèse forment deux compartiments à part entière avec deux noyaux dans lesquels l'ADN est toujours condensé, tandis que l'identification des cellules ayant accompli la mitose et de retour en G1 est basée sur la présence d'un pont de cytoplasme (également marqué par l' α -tubuline) entre deux cellules. Dans ces conditions d'inhibition de PKA, la progression de la mitose n'est pas retardée. En effet, 2h après la relâche, $57.7 \pm 5.3\%$ des cellules sont retournées en G1 contre $64.6 \pm 10.8\%$ en condition contrôle (figure 46).

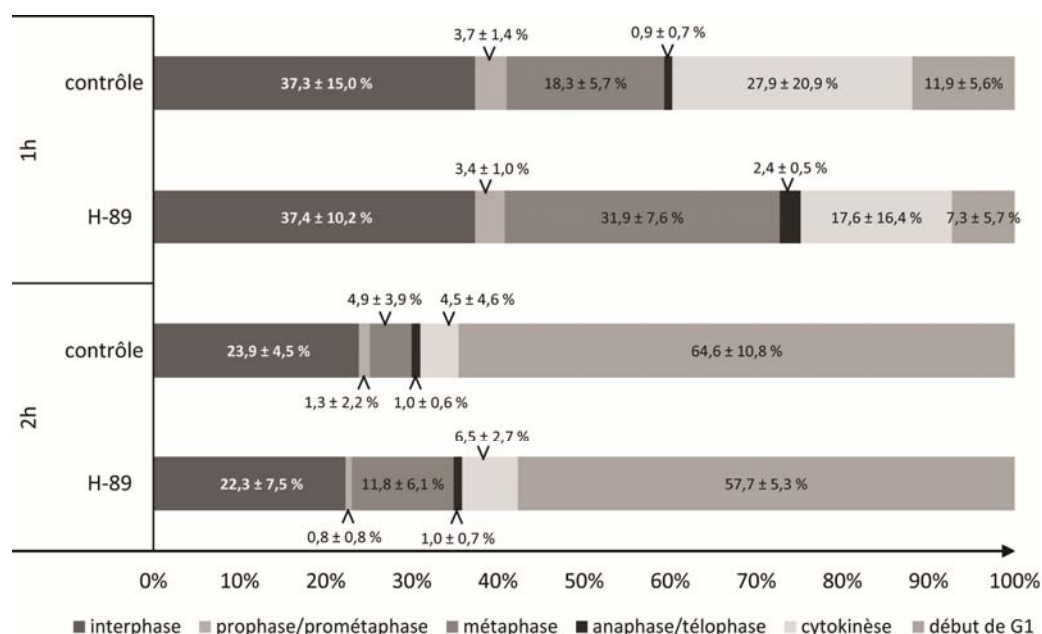


Figure 46 : Progression de la mitose lors d'une inhibition de PKA

Pourcentage de cellules ($n = 632$ à 1195 par condition) dans chaque phase de la mitose, interphase ou retour en G1, classées sur la base de critères morphologiques.

L'observation des phénotypes des cellules en métaphase soumises à l'inhibition de PKA par le H-89 a révélé des anomalies. En effet, un grand nombre de cellules en métaphase présentait un défaut d'alignement des chromosomes sur le fuseau. Dans certains cas, la migration précoce, d'un ou d'une partie des chromosomes, a été observée à un pôle de la cellule. Dans d'autres cas, les chromosomes ont présenté un alignement anarchique sur un fuseau pourtant déjà parfaitement formé (figure 47). Si on compare ces phénotypes avec ceux de la condition contrôle on observe que ces défauts d'alignement en métaphase concernent jusqu'à 63% des cellules traitées par le H-89 (figure 48). Ces données suggèrent que l'augmentation d'activité PKA au début de la mitose est nécessaire à la préservation de la stabilité chromosomique. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'ajout de 8-br-cAMP (analogue de l'AMPc) à la place du traitement H-89, n'a révélé ni retard ou accélération de la progression de la mitose, ni aberrations de l'alignement des chromosomes sur le fuseau.

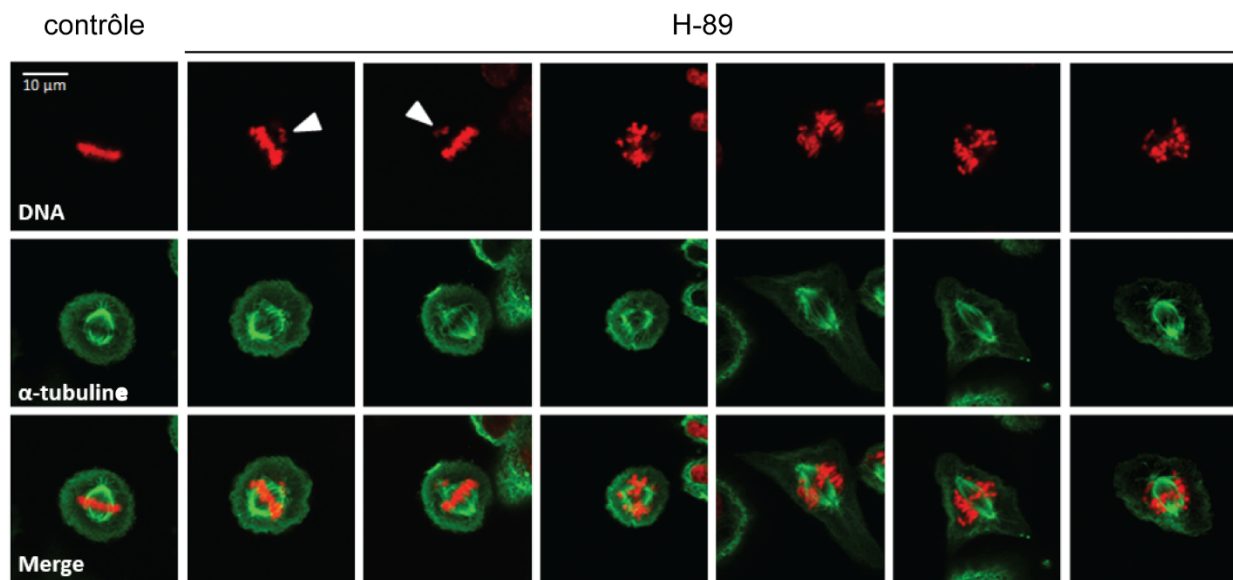


Figure 47: Phénotypes de cellules en métaphase lors de l'inhibition de PKA

Immuno-fluorescence de l' α -tubuline (en vert) combinée à un marquage de l'ADN (en rouge) effectués sur des cellules synchronisées par un bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole, puis traitées par le H-89 lors de la reprise du cycle cellulaire.

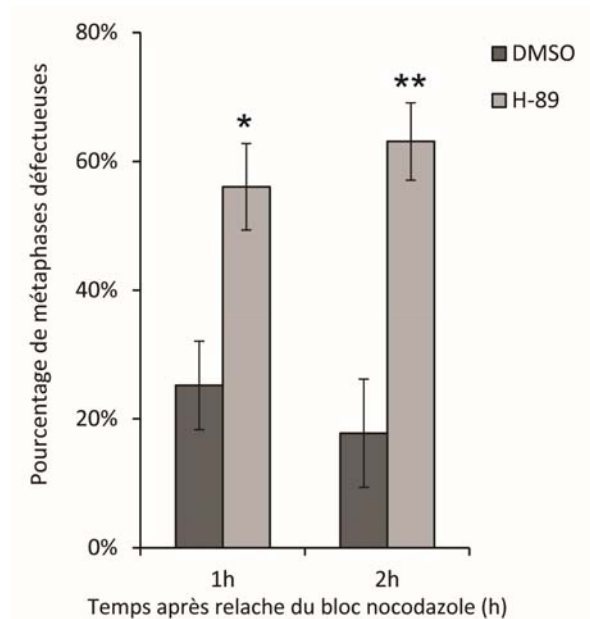


Figure 48 : Proportion de cellules présentant un phénotype mitotique aberrant lors d'une inhibition PKA

Pourcentage de cellules présentant les phénotypes de mitose défectueux illustrés figure 47, après 1h ou 2h de traitement par le H-89 effectué lors de la relâche du bloc nocodazole. Les étoiles représentent la p-value obtenue par test de student (sur trois expériences) avec : * < 0.05 and ** < 0.01.

2. Résultats préliminaires : les effets de PKA lors de la mitose résultent-ils d'une influence sur la signalisation MAPK/ERK ?

2.1. Comment varie l'activité de MAPK/ERK lors de la progression du cycle et lors de la mitose ?

Les données de Western Blot et d'immuno-fluorescence (figures 25 et 26,) semblent indiquer que les niveaux de phosphorylation de MAPK/ERK et donc de son activité, sont faibles au long du cycle cellulaire si nous les comparons aux variations obtenues lors d'une stimulation par l'EGF. De plus, si des relocalisations des formes phosphorylées de MAPK/ERK entre les différentes phases ont été observées, aucune variation tranchée du niveau de phosphorylation global de MAPK/ERK n'a été détectée en Western Blot. Afin de vérifier si ce dernier résultat est la conséquence des limites de la synchronisation cellulaire, nous avons réalisé des mesures d'activité MAPK/ERK *in vivo*, cellule par cellule.

Nos résultats préliminaires, obtenus avec le biosenseur EKAR-TVV n'ont, pour l'instant, pas révélé de variation tranchée lors de la progression du cycle et de la transition G2/M. En revanche, nous avons

pu observer une forte chute du signal au moment de la cytokinèse, en fin de mitose. Cette diminution d'activité est très rapide à l'échelle du cycle, puisque le signal passe du niveau basal à son niveau minimal en 10 minutes environ et revient ensuite au niveau basal 30 min plus tard. Plus précisément, la chute de l'activité MAPK/ERK débute lorsque la cellule s'arrondit lors de l'anaphase. Le ratio YFP/CFP est minimal au moment de la cytokinèse puis remonte un peu plus lentement lorsque les cellules finissent de s'individualiser et se ré-étalent sur leur substrat (figure 49).

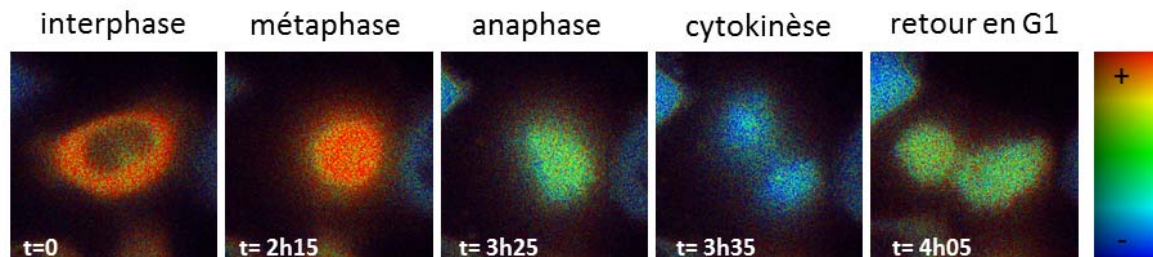


Figure 49 : Variation d'activité MAPK/ERK lors de la mitose

Les niveaux de FRET sont représentés par une échelle pseudo-couleur avant, pendant et après la cytokinèse.

2.2. PKA peut-elle modifier l'activité de MAPK/ERK ?

Il a été rapporté dans la littérature que MAPK/ERK est impliquée dans la stabilité chromosomique et l'aneuploïdie. Il a également été montré que l'activité de PKA peut moduler l'activité de MAPK/ERK (cf introduction). Comme nous l'avons démontré figure 47 et 48, l'inhibition de PKA entraîne l'apparition de phénotypes mitotiques aberrants pouvant générer des aneuploïdies. Une de nos hypothèses est que l'effet de cette inhibition sur l'alignement des chromosomes sur le fuseau dépendrait de MAPK/ERK.

Afin de déterminer quel était l'effet de PKA sur l'activité MAPK/ERK, nous avons utilisé l'inhibiteur de PKA (H-89) sur une population de cellules non synchronisées. Pour réaliser une étude cellule par cellule et observer si la phosphorylation de MAPK/ERK augmente dans ces conditions, nous avons réalisé marqué MAPK/ERK phosphorylée, MAPK/ERK totale (par immuno-fluorescence indirecte) et l'ADN (par traitement au Hoechst) afin d'identifier le compartiment nucléaire. Dans le but de s'affranchir des variations intercellulaires de niveau d'expression de MAPK/ERK, toutes les mesures d'intensité de fluorescence du marquage MAPK/ERK phosphorylé ont été normalisées sur l'intensité de la fluorescence du marquage MAPK/ERK total. Enfin, afin d'observer si les variations de phosphorylation suite à une inhibition de PKA sont sous-localisées au sein de la cellule, cette analyse

a été réalisée pour chaque cellule dans le compartiment cytoplasmique d'un côté et pour le compartiment nucléaire de l'autre.

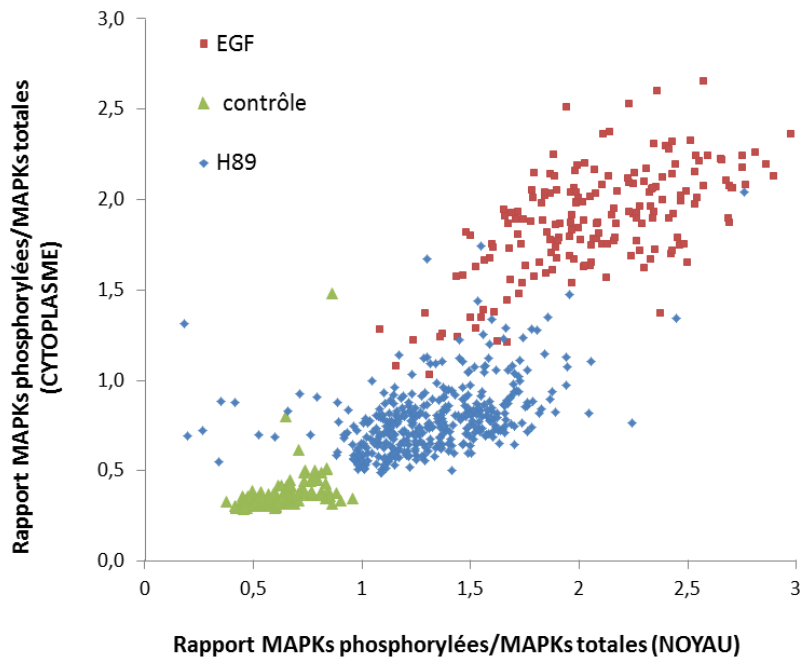


Figure 50 : Analyse cellule par cellule des taux de phosphorylation nucléaire et cytoplasmique de MEPK/ERK

Rapport de l'intensité de fluorescence des marquages MAPK/ERK phosphorylée sur MAPK/Erk totale dans le noyau et dans le cytoplasme en condition contrôle (n=171), en condition de stimulation par l'EGF (n=188) et en condition d'inhibition de PKA par le H-89 (n= 394).

Les résultats présentés figure 50 révèlent une augmentation de la phosphorylation de MAPK/ERK sous l'action du H-89 et ce, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Néanmoins, la spécificité de cette variation induite par une inhibition de PKA lors de la mitose reste à confirmer par d'autres analyses.

PARTIE IV : Extension du système de mesure d'activité/phosphorylation à un organisme modèle procaryote : étude du cycle cellulaire chez *Caulobacter crescentus*

Si les biosenseurs rapporteurs d'activité kinase sont de plus en plus couramment utilisés en cellules eucaryotes, ceux-ci sont beaucoup moins développés pour l'étude des kinases bactériennes. Néanmoins, les travaux de Gao et collaborateurs ont mis en évidence que les propriétés d'homodimérisation des régulateurs de réponses chez *Escherichia coli* pouvaient être utilisées afin de détecter l'activité de la kinase en amont (Gao et al., 2008). Avec l'appui de l'équipe d'Emanuele Biondi, nous avons donc développé un nouveau type de biosenseur pour l'étude *in vivo* de l'activité et la phosphorylation du principal régulateur du cycle cellulaire chez la bactérie modèle *Caulobacter crescentus*.

1. Présentation du contexte de l'étude

1.1. *Caulobacter crescentus* et son cycle cellulaire

C. crescentus est l'organisme modèle de l'étude du cycle cellulaire pour la famille des *Alphaproteobacteria*, un groupe taxonomique hétérogène qui comprend des symbiotes de plantes (par exemple : *Rhizobium*) ainsi que des pathogènes animaux (*Brucella*, *Rickettsia*) et de plantes (*Agrobacterium*). *C. crescentus* est une bactérie aquatique à gram-négative qui présente une division asymétrique. Chaque cycle de division produit deux cellules filles possédant le même génome mais un programme de développement différent. La première cellule fille est sessile et possède une extension de la membrane externe formant un pédoncule (*stalk*) qui lui permet de s'attacher à son substrat. Cette cellule fille peut recommencer immédiatement un nouveau cycle de réplication du chromosome et est appelée « *stalked cell* » (cellule pédonculée). La seconde cellule fille est motile, possède un flagelle et des pili qui lui permettent de nager jusqu'à un environnement où les conditions nutritives sont favorables. Celle-ci se différencie alors en cellule pédonculée : elle perd le flagelle et les pili et commence au même pôle la biosynthèse du pédoncule. Cette deuxième cellule est appelée « *swarmer cell* » (cellule flagellée) (figure 51)(Curtis and Brun, 2010).

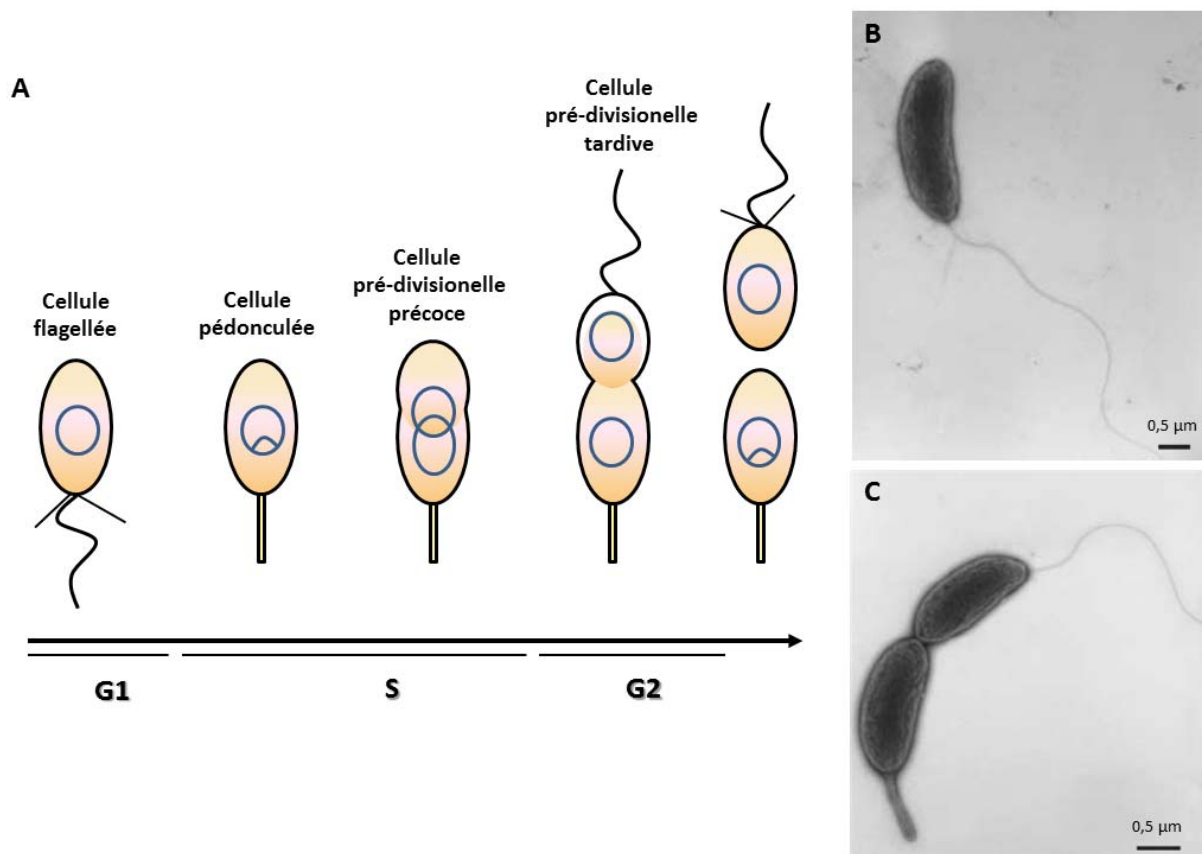


Figure 51 : Le cycle cellulaire de *C.crescentus*

C. Crescentus connaît une division asymétrique qui produit deux cellules filles différentes : une cellule pédonculée qui recommence immédiatement un nouveau cycle de réplication et une cellule flagellée qui se déplace jusqu'à trouver des conditions favorable afin de se différencier en cellule pédonculée. A) représentation schématique du cycle de développement de *C.crescentus*. B) une cellule flagellée et C) une cellule pré-divisonnelle en microscopie électronique. D'après : (Skerker and Laub, 2004)

1.2. CtrA et la régulation du cycle cellulaire chez *C. crescentus*

Le contrôle de cette division cellulaire asymétrique implique un réseau de régulation complexe composé en grande partie de systèmes à deux composants. Classiquement, et comme leur noms l'indique, ces systèmes sont composés de deux partenaires : une histidine kinase et un régulateur de réponse. L'histidine kinase en réponse à un signal, s'autophosphoryle sur un résidu histidine. Ce groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate du domaine receveur du régulateur de réponse, ce qui modifie l'activité de son domaine effecteur. Certaines histidine kinases (histidine kinases hybrides) possèdent leur propre domaine receveur auquel cas, le groupement phosphate est d'abord transféré à ce niveau sur un résidu aspartate. Ce groupement est ensuite pris en charge par une Hpt (*histidine phosphotransfer protein*) puis transféré au régulateur de réponse.

C'est par ce deuxième type d'histidine kinase qu'a lieu l'activation du régulateur majeur de la progression du cycle cellulaire chez *C. crescentus* : le facteur de transcription CtrA (*Cell-cycle transcription regulator A*). CtrA est activé par le phospho-relai composé de l'histidine kinase CckA et de la phosphotransferase ChpT (Biondi et al., 2006). CtrA est activé lorsqu'il est phosphorylé sur le résidu aspartate présent en position 51. Dans cet état, il a été montré que CtrA agit comme un activateur ou un répresseur de la transcription. Il a notamment été mis en évidence que CtrA contrôle, directement ou indirectement, la transcription de 26% des gènes régulés en fonction du cycle cellulaire (Laub et al., 2000). Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes dont les produits sont impliqués dans de nombreux processus essentiels à la progression du cycle cellulaire tels que l'assemblage du flagelle et des pili, la biosynthèse du pédoncule, l'initiation de la réplication de l'ADN, la méthylation de l'ADN et la division cellulaire (Laub et al., 2002). De plus, au stade cellule flagellée, CtrA actif se lie à 5 sites au niveau de l'origine de réplication ce qui bloque l'initiation de la phase S (Domian et al., 1997).

1.3. Régulation spatiale et temporelle de CtrA

La concentration de CtrA oscille lors de la progression du cycle cellulaire. CtrA est présent et actif au stade cellule flagellée, où il inhibe l'initiation de la réplication du chromosome (Quon et al., 1998). Lors de la transition G1/S, CtrA est déphosphorylé et dégradé ce qui permet à la cellule de dupliquer son ADN (Domian et al., 1997). Puis, en cellule pré-divisionnelle, il est synthétisé à nouveau et phosphorylé permettant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle (Laub et al., 2000). La phase de division produit donc une cellule flagellée dans laquelle CtrA doit être présent et phosphorylé, et une cellule pédonculée dans laquelle CtrA doit être dégradé pour permettre l'initiation d'un nouveau cycle de réplication. En cellules pré-divisionnelles, CtrA doit donc être régulé de façon spatiale et temporelle afin de générer deux cellules filles différentes.

Comme la plupart des histidines kinase, CckA agit à la fois comme une kinase mais également comme une phosphatase sur son substrat CtrA. Lorsque CckA n'est pas auto-phosphorylée, les groupements phosphate sont « renvoyés » du régulateur de réponse vers la kinase, où ils seront hydrolysés (Chen et al., 2009). L'activité de CckA est régulée par la kinase DivL, qui lui permet une activation maximale (Tsokos et al., 2011). De plus, l'activité de CckA est régulée négativement par un autre système à deux composants qui est constitué du régulateur de réponse DivK et de l'histidine kinase DivJ, dont l'action est contrebalancée par la phosphatase PleC (Biondi et al., 2006). DivK, lorsqu'il est phosphorylé, peut se fixer à DivL et ainsi perturber son interaction avec CckA, ce qui inhibe l'activité de cette dernière (Tsokos et al., 2011).

Il est important de noter que, si CtrA diffuse librement dans la bactérie, CckA est, quant à elle, principalement localisée aux pôles de la cellule pré-divisionnelle (Angelastro et al., 2010). Toujours à ce stade, PleC et DivL sont localisées au pôle qui donnera naissance à la cellule flagellée, tandis que DivJ est localisé au pôle pédonculé. La phosphorylation de CtrA au stade pré-divisionnel est donc régulée par un arrangement spatial complexe. En effet, au pôle flagellé, PleC est responsable de la déphosphorylation de DivK, qui n'inhibe donc pas l'interaction CckA-DivL, ce qui promeut en conséquence l'activité kinase de CckA et la phosphorylation de CtrA. En revanche, au pôle opposé, la colocalisation de DivJ et CckA, qui agit alors comme une phosphatase, réprime la phosphorylation de CtrA (figure 52) (Tsokos and Laub, 2012; Tsokos et al., 2011) .

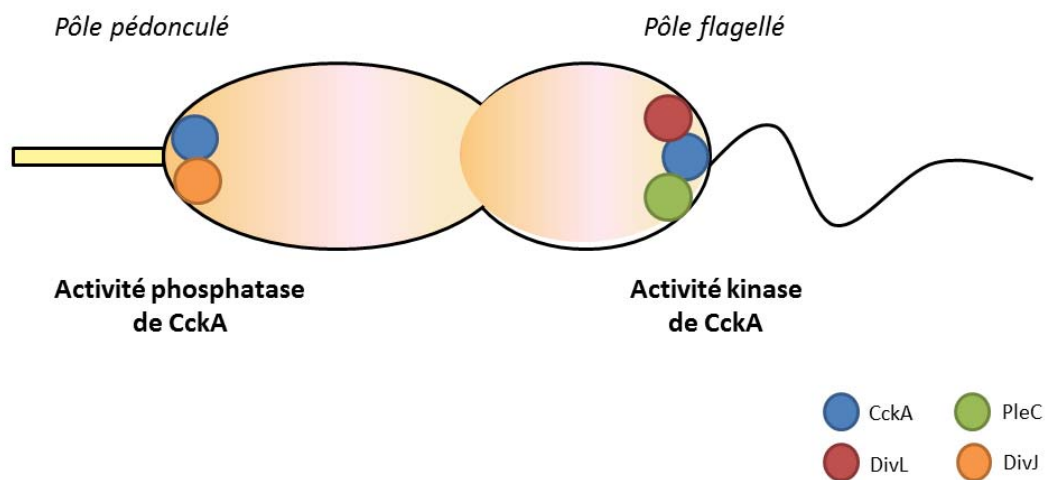


Figure 52 : Localisation des composants du réseau de régulation de CtrA

Au pôle pédonculé, la co-localisation de CckA avec DivJ lui confère une activité de phosphatase pour CtrA. Au pôle flagellé, la présence de DivL et de PleC permettent à CckA d'agir comme une kinase.

Le fait que CckA agisse comme une phosphatase au pôle pédonculé et comme une kinase au pôle opposé au stade pré-divisionnel, suggère l'existence d'un gradient de phosphorylation de CtrA entre les deux pôles pour assurer l'asymétrie de la division (figure 53)(Chen et al., 2011). Néanmoins, à ce jour, aucune mesure directe de la phosphorylation de CtrA *in vivo* n'a été réalisée.

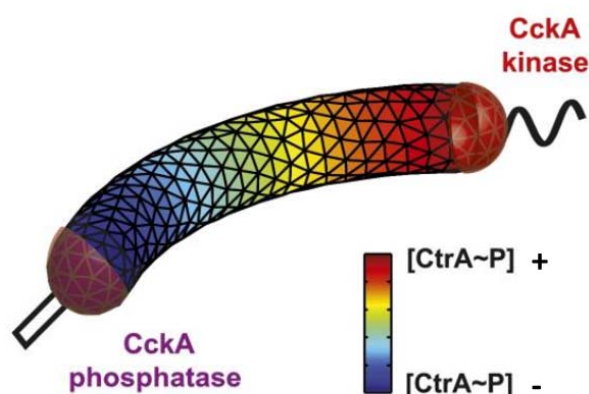


Figure 53 : Représentation schématique du gradient hypothétique de phosphorylation de CtrA

Comme CckA agit comme une source de phosphorylation pour CtrA au pôle flagellé, il a été suggéré que les formes phosphorylées formeraient un gradient entre les deux pôles de la bactérie au stade pré-divisonnel. D'après (Chen et al., 2011).

2. Développement et validation d'un biosenseur utilisant le FRET pour mesurer la phosphorylation de CtrA

2.1. Principe et construction du biosenseur

Des travaux antérieurs ont montré que sous l'effet de la phosphorylation, les régulateurs de réponses se dimérisent et que cette propriété peut être étudiée par FRET *in vitro* (Gao et al., 2008). Nous avons considéré l'hypothèse selon laquelle le régulateur de réponse CtrA de *C. crescentus* se comporte de la même façon. Nous avons donc construit, par biologie moléculaire, deux protéines de fusion constituées du domaine receveur de CtrA couplé à une CFP dans un premier cas et à une YFP dans un second cas. Le principe de cet outil est que lorsque la kinase CckA est active, il y a phosphorylation et dimérisation de CtrA, ce qui se traduit par un rapprochement des deux fluorophores, entre lesquels peut avoir lieu un transfert d'énergie par FRET. Dans les deux cas, le domaine receveur et la protéine fluorescente sont séparés par de courts *linkers* optimisés (GGGGGHM et GGGLVPRGSGGHM pour respectivement la CFP et la YFP (Gao et al., 2008)) afin d'apporter une certaine flexibilité à la construction et favoriser les événements de FRET (figure 54).

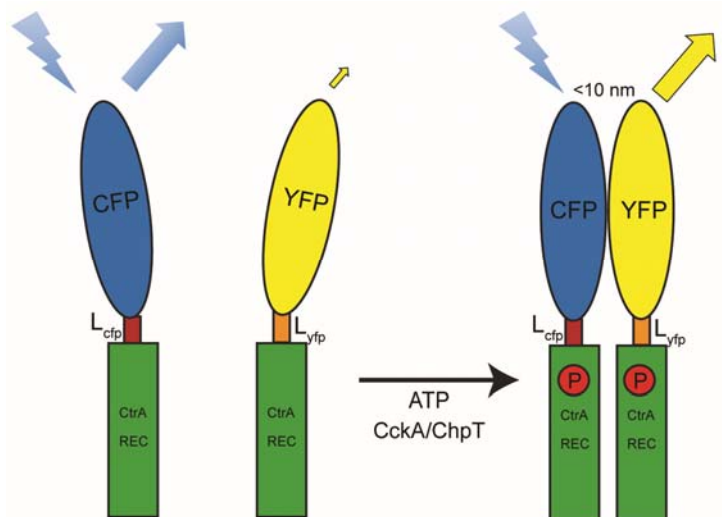


Figure 54 : Principe de fonctionnement du biosenseur de phosphorylation CtrA

Le domaine receveur de CtrA (CtrA REC en vert) a été fusionné dans un cas à la CFP (en bleu) et à la YFP (en jaune) dans un autre cas. Dans chacune de ces constructions, CtrA REC et la protéine fluorescente sont séparés par un linker (L_{CFP} et L_{YFP}). Lorsque le phospho-relai est activé, CtrA est phosphorylé et se dimérise, ce qui conduit à un transfert d'énergie entre les fluorophores.

Les séquences codant pour ces différentes protéines de fusion ont été insérées dans différents vecteurs d'expression : un vecteur à grand nombre, et un autre à faible nombre de copies, qui peuvent être exprimés conjointement chez *C. crescentus* sous l'effet d'une induction par l'IPTG ou le xylose.

2.2. Validation du biosenseur rapporteur de la phosphorylation de CtrA *in vivo*

Afin de pouvoir utiliser ce biosenseur pour l'étude de la phosphorylation de CtrA et de sa localisation subcellulaire *in vivo*, nous devons d'abord confirmer sa fonctionnalité. Nous avons donc construit deux lignées de *C. crescentus*:

- La première exprime CtrA-CFP et CtrA-YFP, sous le contrôle de promoteurs inducibles respectivement par l'IPTG et le xylose (figure 55).
- La seconde exprime CtrA-CFP et la YFP seule, sous le contrôle des mêmes promoteurs et nous sert de contrôle négatif.

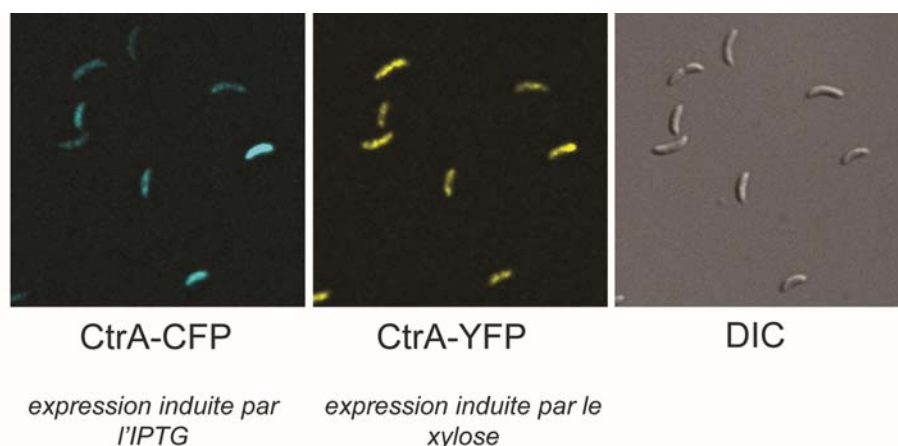


Figure 55 : Lignée de *C. crescentus* exprimant CtrA-CFP et CtrA-YFP

L'expression de CtrA-CFP (en bleu) et de CtrA-YFP (en jaune) a été induite par l'ajout d'IPTG (1mM) et de xylose (0.1%) au milieu de culture.

Comme constaté sur la figure 55, les niveaux d'expression de chacune des protéines de fusion varient d'une bactérie à une autre. Ici, contrairement aux biosenseurs qui ont été présentés précédemment pour l'étude des kinases MAPK/ERK et PKA, l'expression des fluorophores n'est pas stœchiométrique. Ceci a été pris en compte pour la réalisation des expériences de mesure de FRET ainsi que leur analyse (détaillé dans la section Matériel et Méthodes).

Les mesures de FRET ont été réalisées sur les deux lignées. Les ratios ont été calculés et appliqués pixel par pixel avec une échelle pseudo-couleur. Les résultats montrent une augmentation significative du signal FRET seulement lorsque les deux fluorophores sont fusionnés à CtrA (figure 56). L'analyse statistique, cellule par cellule, confirme que la différence de ratio observée est significative, ce qui atteste du fonctionnement de notre biosenseur *in vivo* (figure 57). Des expériences de FRET *in vitro*, (mesure de l'interaction CtrA-CFP et CtrA-YFP lorsque la cascade de phosphorylation est reconstituée en présence ou en absence d'ATP) réalisées par Antonella Fioravanti (doctorante dans l'équipe d'Emanuele Biondi) ont permis de démontrer que cette dimérisation est dépendante de la phosphorylation (données non représentées ici).

Si l'on observe attentivement les signaux FRET sur la figure 55, dans la condition CtrA-CFP + CtrA-YFP, on peut noter des différences de ratio et donc de l'intensité de la phosphorylation de CtrA, d'une cellule à une autre mais également au niveau subcellulaire.

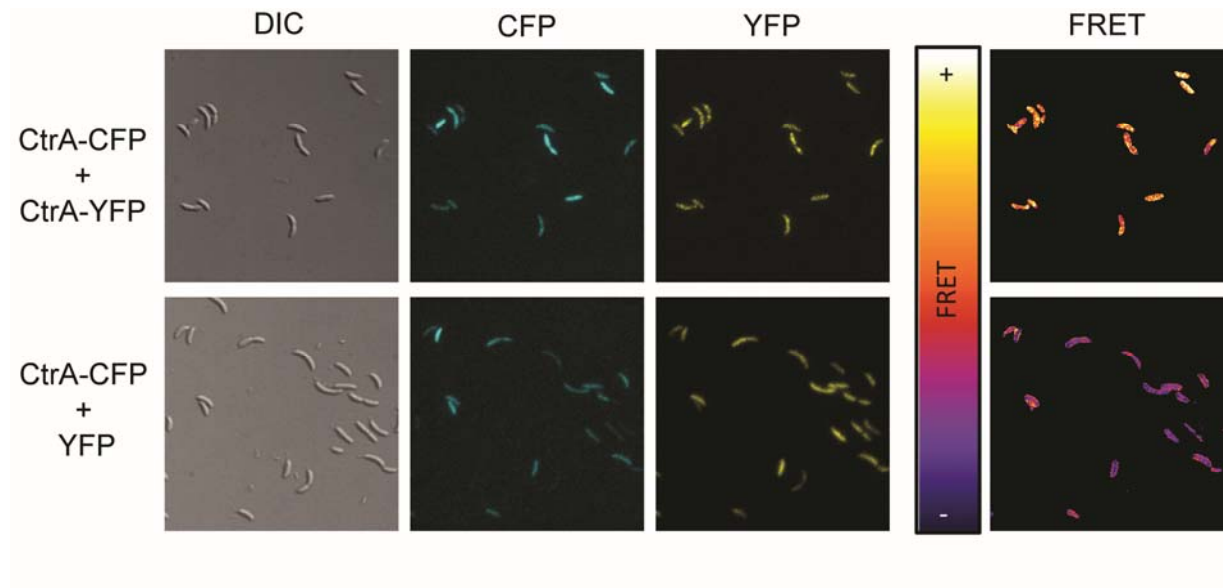


Figure 56 : Dimérisation de CtrA in vivo

Mesures de FRET réalisées sur les lignées de *C. crescentus* exprimant les protéines citées à gauche (un champ représentatif pour chaque condition). Sont représentés : DIC, CFP, YFP ainsi que l'image de ratio FRET pixel par pixel en échelle pseudo-couleur.

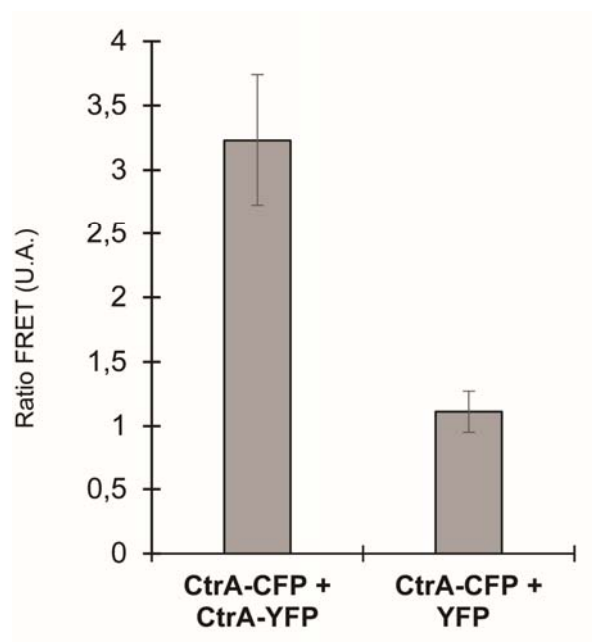


Figure 57 : Analyse statistique des ratios FRET mesurés in vivo entre CtrA-CFP et CtrA-YFP

Valeurs moyennes de ratio FRET dans chaque condition après une analyse cellule par cellule (n=30)

2.3. Etude de la phosphorylation de CtrA au cours du cycle cellulaire

Les cultures de *C. crescentus* sont facilement synchronisables puisque il est aisé d'isoler les cellules flagellées par centrifugation par gradient. Nous avons donc réalisé des mesures de FRET sur la lignée exprimant CtrA-CFP et CtrA-YFP au cours du cycle cellulaire (figure 58). Le t0 correspond à la population de cellules flagellées et donc à la phase G1. Les cellules effectuent ensuite leur différenciation en cellules pédonculées (le pédoncule est difficilement visible après l'étape de synchronisation) et progressent en phase S puis G2 pour enfin se diviser. Il est important de noter que si CtrA endogène est dégradé lors de la transition G1/S afin de permettre la réplication de l'ADN, ce n'est pas le cas de nos protéines de fusion qui ne contiennent que le domaine receveur de CtrA (et ne possèdent donc pas la séquence nécessaire à sa protéolyse).

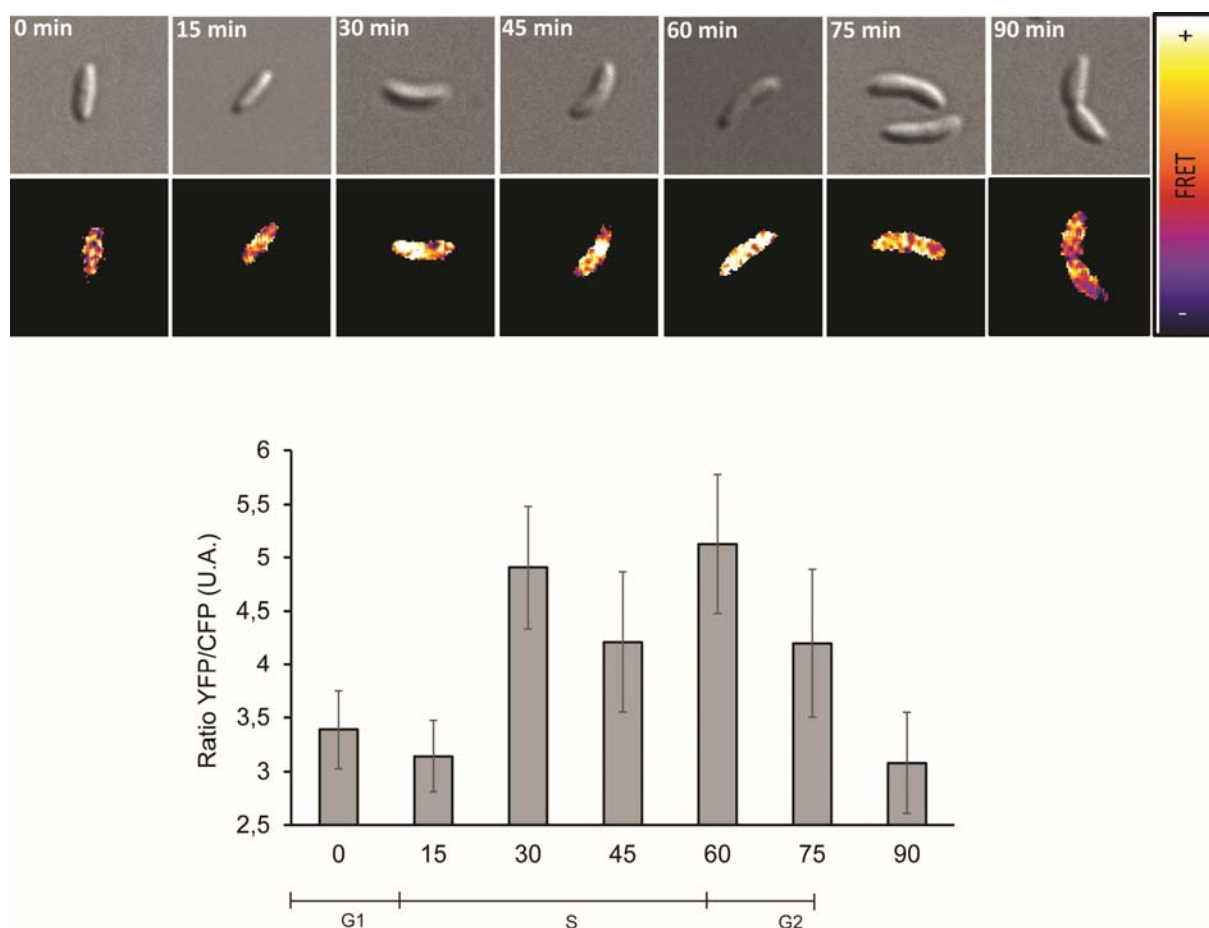


Figure 58 : Ratio YFP/CFP mesuré au cours de la progression du cycle cellulaire de *C. crescentus*

Ratios YFP/CFP mesurés sur une population synchronisée de *C. Crescentus* exprimant CtrA-CFP et CtrA-YFP. Une partie de la culture synchrone a été prélevée et fixée toutes les 15 minutes. Pour chaque temps, sont représentées les images de DIC et de ratio YFP/CFP en échelle pseudo-couleur. L'histogramme représente la moyenne des ratios mesurés cellule par cellule à chaque temps (n= 15 à 30 bactérie par conditions)

Les résultats de cette expérience révèlent que les ratios YFP/CFP et donc la phosphorylation de CtrA varient au cours du cycle cellulaire. Ces ratios dépendent de la quantité de CtrA-CFP et CtrA-YFP phosphorylée par rapport à la quantité de leur forme non phosphorylée et révèlent donc principalement l'activité de la cascade CckA-ChpT. La figure 58 nous montre que l'activité CckA est plus faible à $t = 0$ et $t = 15$ min, qu'elle augmente au cours de la phase S puis diminue à nouveau lors des $t = 75$ et $t = 90$ min.

Afin de comparer ces données à la phosphorylation de CtrA endogène, une immuno-empreinte a été réalisée par Antonella Fioravanti sur la même lignée bactérienne dans les mêmes conditions de synchronisation. Les formes phosphorylées et non phosphorylées de CtrA sont discriminées sur le gel par un retard de migration associé à la présence dans le gel d'électrophorèse d'un Phos-Tag ayant une affinité pour les groupements phosphate. A partir de ce gel, nous avons calculé le taux de phosphorylation de CtrA (intensité des bandes CtrA phosphorylé/CtrA non phosphorylé) (figure 59).

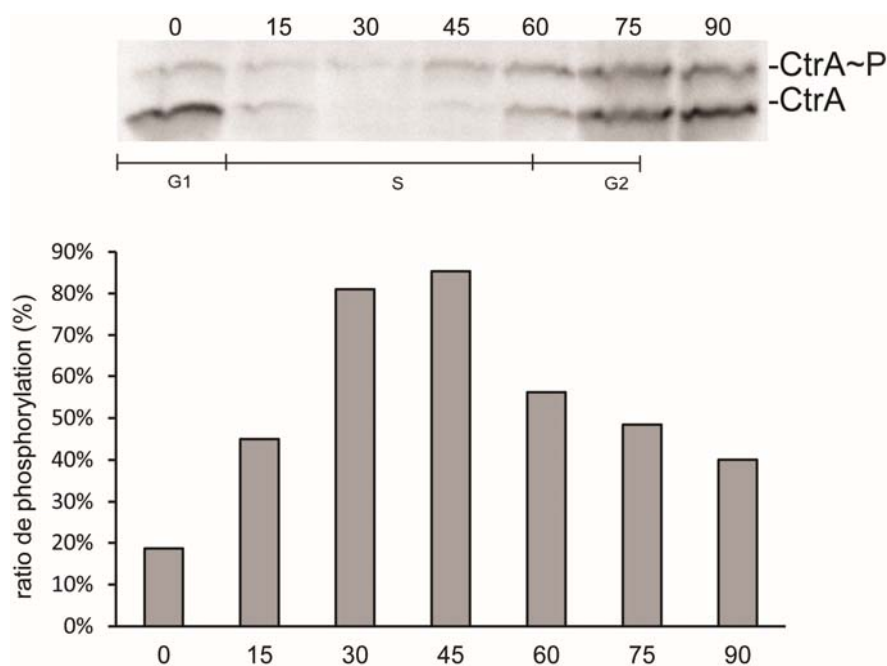


Figure 59 : Taux de phosphorylation de CtrA endogène au cours du cycle cellulaire

Immuno-empreinte du niveau de CtrA endogène, au cours du cycle, dont les formes phosphorylées présentent un retard de migration dû à la composition du gel d'électrophorèse (présence du Phos-TagTM). L'histogramme représente le ratio CtrA phosphorylé/CtrA non phosphorylé qui a été calculé par mesure de l'intensité des bandes.

Comme le montre la figure 59 (sur l'immuno-empreinte), au moment de la transition G1/S le niveau de CtrA phosphorylé chute pour ré-augmenter lors de la phase S et atteindre un maximum en G2.

Cette observation est cohérente avec les rôles de CtrA dans la progression du cycle. Si on regarde le ratio de phosphorylation, le profil obtenu au cours du cycle est similaire aux ratios FRET obtenus, ce qui confirme que notre biosenseur peut être utilisé pour mesurer l'activité CckA.

2.4. Localisation subcellulaire de la phosphorylation de CtrA

Afin de confronter nos données au modèle établi selon lequel, en cellules pré-divisionnelles, la phosphorylation de CtrA forme un gradient depuis le pôle pédonculé jusqu'au pôle qui donnera naissance à la cellule flagellée, nous avons entrepris d'analyser la sous-localisation des niveaux de FRET dans ce type de cellules. Pour ce faire, chaque bactérie au stade pré-divisionnel (identifiée sur critères morphologiques dans une population non synchronisée) a été divisée en cinq parties égales depuis le pôle pédonculé jusqu'au pôle flagellé, et la valeur moyenne du ratio dans chaque zone a été mesurée. Nos résultats montrent que CtrA est majoritairement phosphorylé à l'extrémité du pôle flagellé tandis que cette phosphorylation est beaucoup moins importante à l'extrémité du pôle pédonculé (figure 60). Ces éléments sont cohérents avec le fait que la phosphorylation de CtrA soit requise en cellules flagellées pour inhiber la réplication de l'ADN.

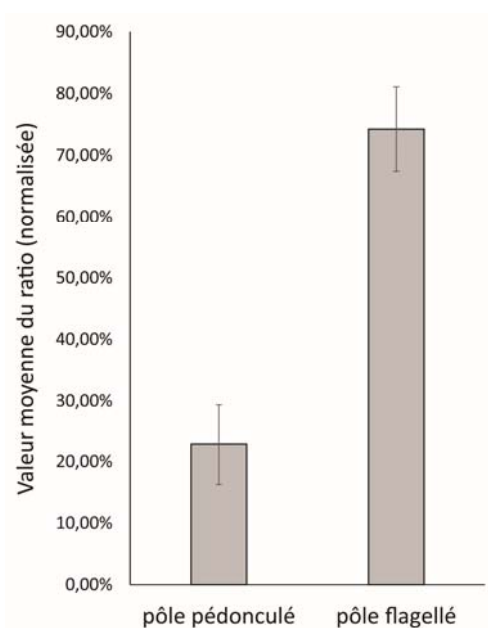


Figure 60 : Niveaux de phosphorylation de CtrA aux deux pôles des cellules pré-divisionnelles

Les valeurs sur le graphe représentent les moyennes des ratios mesurées à chaque extrémité pour 15 bactéries au stade pré-divisionnel. Afin de s'affranchir des variations intercellulaires et de pouvoir détecter les changements de ratio intracellulaires, chaque mesure a été normalisée sur les valeurs de ratio minimum et maximum de la bactérie étudiée.

Si, dans ces mêmes bactéries au stade pré-divisionnel, on trace ensuite une ligne large de 4 pixels allant du pôle pédonculé vers le pôle opposé et que l'on mesure les ratios YFP/CFP sur cette ligne, deux types de profils de phosphorylation différents sont obtenus. Dans un cas, le niveau de phosphorylation est faible au pôle pédonculé, augmente graduellement jusqu'au premier tiers de la bactérie et atteint une phase plateau élevée dans les deux tiers restant du corps cellulaire. Dans le second cas, on observe une phase plateau où le niveau de phosphorylation est faible dans les deux tiers du corps cellulaire (en partant du pôle pédonculé) puis la phosphorylation augmente graduellement pour atteindre son maximum au pôle opposé (figure 61).

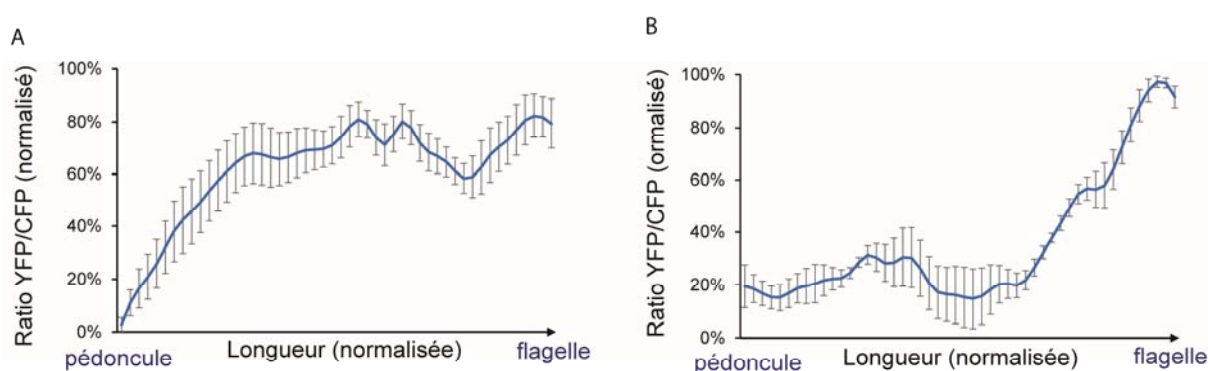


Figure 61 : Profils de phosphorylation de CtrA en cellules pré-divisionnelles.

Profils des ratios YFP/CFP (normalisés sur les valeurs minimum et maximum de chaque bactérie pour s'affranchir des variations de FRET intercellulaire) mesurés le long du corps cellulaire en partant du pôle pédonculé vers le pôle opposé. A) et B) représentent les deux types de profils obtenus.

Nos résultats préliminaires indiquent que le profil figure 61A correspond aux cellules au stade pré-divisionnel précoce (30-45 min) tandis que le profil figure 61B correspond aux cellules au stade pré-divisionnel tardif (60-75 min). De façon intéressante, nous n'avons pas identifié jusqu'à présent de profil intermédiaire, ce qui peut suggérer que le passage entre ces deux étapes s'effectue rapidement. De plus contrairement à l'hypothèse posée précédemment (Chen et al., 2011), nous n'observons pas de gradient uniforme partant d'un pôle à l'autre, mais plutôt un gradient qui est restreint à une petite partie du corps cellulaire, et qui pourrait se déplacer au cours du cycle. Afin d'étudier comment se produit l'établissement de ce profil spatial de phosphorylation de CtrA, nous projetons de réaliser des mesures similaires dans des lignées de *C. crescentus* présentant des mutations des membres du réseau de régulation de CtrA.

Discussion générale et Perspectives

L'intégration des signaux extracellulaires se traduit, au niveau cellulaire, par différentes prises de décisions : progression ou sortie du cycle cellulaire, différenciation, mort cellulaire programmée ou migration. La manière dont une cellule intègre ces signaux demeure une question de premier ordre dans le domaine de la biologie. Cette question est d'autant plus intrigante que, dans la plupart des cas, l'intégration a lieu en mobilisant des effecteurs moléculaires communs à la majorité des cellules. Il existe deux manières de concevoir des réponses à cette question: i) les effecteurs communs agissent sur des protéines en aval, qui elles, sont spécifiques d'un type cellulaire concerné et engagent une réponse distincte ; ii) ces effecteurs communs sont régulés dans le temps et l'espace et ce sont les différences spatio-temporelles qui déterminent l'action sur les protéines cibles et, en conséquence, la spécificité de la réponse cellulaire. La voie de signalisation MAPK/ERK, par exemple, possède plus de 160 substrats en aval (Yoon and Seger, 2006). Comment une même cascade de signalisation peut-elle discriminer les protéines à phosphoryler afin d'orienter la cellule vers une fonction donnée ? Une partie de la réponse se trouve dans les propriétés dynamiques et la régulation spatio-temporelle des kinases participant à la signalisation cellulaire. En effet la durée ou l'intensité de l'activation des MAPK/ERK, sont des éléments cruciaux qui contribuent à ces décisions cellulaires (Santos et al., 2007). La sous-localisation de l'activité kinase au sein de la cellule est également déterminante dans l'accomplissement des processus cellulaires, comme cela a été démontré pour la kinase PKA qui possède plus de cents substrats (Shabb, 2001; Terrin et al., 2012). Dans notre étude de la régulation du cycle cellulaire, nous nous sommes donc concentrés sur ces aspects dynamiques, en nous focalisant sur deux protéines kinases au cœur des voies de signalisation : MAPK/ERK et PKA.

L'étude de la dynamique des protéines doit beaucoup à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien, qui ont reçu en 2008 un prix Nobel pour la découverte de la GFP et de ses propriétés. En effet, de nouveaux outils ont été développés, basés sur les propriétés de la fluorescence et utilisant la GFP et/ou ses nombreux variants spectraux. Parmi ces outils, les biosenseurs FRET rapporteurs d'activité kinasique ont émergé depuis les années 2000, et ont notamment permis d'appréhender la mesure de l'activité des protéines kinases en cellules uniques et vivantes, c'est-à-dire qui ont conservé leur intégrité physique et leurs compartiments cellulaires. Ces outils permettent donc de mesurer la dynamique de l'activité kinase dans le temps et dans l'espace en s'affranchissant des limites de résolution temporelle qui peuvent être observées dans les expériences utilisant des populations de cellules. En effet, au sein d'une population, les cellules ne répondent pas à un stimulus au même instant exact. Les variations observées sur une population en représentent alors que la moyenne des variations qui touchent chacune des cellules. Cet effet de moyennage peut être encore plus impactant si l'on étudie les variations qui ont lieu lors de processus longs tels que le cycle cellulaire.

Nous avons en effet montré que lors d'une synchronisation cellulaire par la thymidine, les phases G2 et M (qui sont les phases les plus courtes) ne représentent, dans le meilleur des cas, que 64% des cellules (figure 22). Il est donc délicat d'apprécier les variations courtes d'activité au sein d'une population. Par ailleurs, de précédents travaux du laboratoire ont révélé, lors d'étude de la voie MAPK/ERK dans les ovocytes de xénope, les limites des méthodes d'immunoempreinte pour apprécier le niveau d'activité des MAPK/ERK. Dans certains cas, le niveau de phosphorylation de MAPK/ERK n'est pas corrélé à son niveau d'activité (Beaujois et al., 2013, et communications personnelles).

Optimisation du biosenseur rapporteur d'activité MAPK/ERK

Afin de détecter des variations d'activité kinase dans leur contexte natif, la communauté scientifique est en recherche constante d'outils de plus en plus sensibles et performants. Or, les biosenseurs MAPK/ERK préexistants au début de ce travail (EKAR, puis plus tard EKAREV), ont montré des intervalles dynamiques faibles. Or, lors de certains processus cellulaires, des variations d'activité faibles mais significatives peuvent être indétectables avec un outil dont l'intervalle dynamique est faible. Nos résultats, obtenus notamment par immuno-empreinte (figure 25), suggèrent que les variations d'activité MAPK/ERK au cours du cycle cellulaire dans les cellules HeLa sont fines et sous-localisées. Si nous possédions déjà des outils performants pour les mesures d'activité PKA, l'intervalle dynamique de EKAR semblait trop faible pour observer des variations au cours du cycle. Nous avons donc développé un biosenseur rapporteur d'activité MAPK/ERK optimisé pour les mesures de FRET par calcul des ratios d'intensité mais également pour le FLIM. Notre construction EKAR-TVV montre un intervalle dynamique plus grand avec ces deux techniques, par rapport à celui de EKAR et EKAREV. Notre biosenseur est donc plus sensible et est mis à disposition de la communauté scientifique. Afin de mesurer l'activité de MAPK/ERK dans des compartiments spécifiques, différentes séquences de localisation pourront y être ajoutées par la suite.

Lors de cette étape d'optimisation, un deuxième biosenseur a attiré notre attention : EKAREV-TVV. Ce dernier présente le meilleur intervalle dynamique dans les mesures de FRET par FLIM, mais aucune amélioration lors de mesures ratiométriques. Comment ce biosenseur peut-il être optimisé pour une technique de mesure et non pour une autre ? Une hypothèse est que le repliement du biosenseur contribue en lui-même à modifier l'environnement local d'un fluorophore (c'est-à-dire en plus de mettre à proximité le second fluorophore). Il serait donc possible que cette modification affecte différemment les propriétés de la fluorescence comme le temps de vie ou l'intensité

d'émission. Cela pourrait expliquer pourquoi EKAREV-TVV est très performant en FLIM mais par pour les mesures ratiométriques.

Etude dynamique de l'activité de PKA et de MAPK/ERK lors de la mitose

Les voies de signalisation PKA et MAPK/ERK sont fréquemment dérégulées dans les pathologies cancéreuses (Caretta and Mucignat-Caretta, 2011; Dhillon et al., 2007). Les protéines qui composent ces cascades sont des cibles thérapeutiques potentielles (Naviglio et al., 2009; Santarpia et al., 2012). Il est donc crucial de comprendre comment ces kinases agissent lors de la progression du cycle. PKA et MAPK/ERK sont impliquées à de nombreux niveaux dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Ces kinases sont régulées de façon très dynamique. La détermination de leurs profils spatio-temporels d'activités au cours de ce processus est un enjeu de taille afin de comprendre comment leurs différentes actions sont coordonnées au sein de la cellule pour aboutir à la formation de deux cellules filles.

L'étude de la dynamique spatio-temporelle de PKA avec les biosenseurs FRET, nous a permis de mettre en évidence les variations d'activité de cette kinase lors de la mitose avec une résolution temporelle de cinq minutes. Nous avons montré que l'activité de PKA augmente en début de mitose pour revenir à un niveau basal à la cytokinèse (figure 40). Cette augmentation d'activité ne semble pas indispensable à l'entrée en mitose, puisque lors d'une inhibition de PKA nous n'avons observé aucun retard, ni accélération, de l'entrée ou de la progression de la mitose (figure 46). Au contraire, l'inhibition de PKA, en extraits cyclants d'ovocyte de xénope, induit une activation prématurée du MPF (Grieco et al., 1994). Cela suggère des différences dans les modes d'actions de PKA lors de la transition G2/M, entre ces différents types cellulaires. Enfin nous avons montré que l'augmentation de l'activité PKA joue un rôle dans la stabilité chromosomique, comme l'atteste l'apparition de phénotypes mitotiques aberrants lors de l'inhibition de PKA (figures 47 et 48).

Les mécanismes moléculaires responsables du rôle de PKA dans le maintien de l'intégrité génétique dans ce contexte restent toutefois à déterminer. Nos résultats soulèvent donc de nombreuses questions quant au rôle de PKA sur la ségrégation des chromosomes :

- Quels sont les effets d'une inhibition de PKA sur le point de contrôle du fuseau ?
- L'effet de PKA sur la stabilité chromosomique dépend-il d'Aurora A ?

- L'effet de PKA sur la stabilité chromosomique dépend-il de MAPK/ERK?
- Quelle est l'activité de PKA aux centrosomes lors des phases précoces de la mitose ?
- Peut-on perturber la signalisation PKA dans des compartiments subcellulaires spécifiques pour en étudier les effets sur la stabilité chromosomique?

L'inhibition de PKA altère-t-elle le point de contrôle du fuseau?

Plusieurs travaux ont mis en évidence une implication de la signalisation PKA dans les fonctions des centrosomes, des kinétochores ou dans l'assemblage du fuseau (Diviani and Scott, 2001; Imaizumi-Scherrer et al., 2001; Magtanong et al., 2011; Terrin et al., 2012; Walter et al., 2000). Nous avons également mis en évidence que lors de la métaphase et de l'anaphase, l'activité de PKA est particulièrement élevée à proximité de la chromatine (figures 43 et 45). Cela pourrait suggérer que l'activité de PKA lors de la mitose joue un rôle dans l'attachement des chromosomes sur le fuseau. Cette hypothèse soulève une autre question : qu'en est-il alors de l'activation du point de contrôle du fuseau lors de l'inhibition de PKA ?

L'étude de Kotani et collaborateurs a montré que la chute de l'activité de PKA est nécessaire à l'activation de l'APC/C et à la transition métaphase-anaphase (Kotani et al., 1998). Nous pouvons supposer que, lors de l'inhibition de l'augmentation d'activité PKA en début de mitose, l'APC/C n'est plus régulé négativement par la phosphorylation de PKA sur ses sous-unités tsg24 et Cdc27. Cela pourrait permettre aux cellules de s'affranchir du point de contrôle du fuseau et aux chromosomes de migrer prématurément. De plus, lors de l'inhibition de PKA nous n'avons constaté aucun retard de progression de la mitose. Cet élément soutient l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de PKA permettrait de se libérer de l'action du point de contrôle du fuseau.

Comme mentionné précédemment, il a été rapporté que la chute d'activité PKA est essentielle à la transition métaphase-anaphase. Pourtant nos résultats démontrent que l'activité de PKA reste élevée jusque la cytokinèse. Il est possible que la diminution d'activité de PKA ne soit requise que dans certains compartiments. Une variation globale n'exclue pas, en effet, l'existence de variations locales essentielles. Cela renforce l'idée que l'activité de PKA doit être précisément régulée de façon spatiale afin de coordonner ses différents rôles lors de la mitose.

L'effet de PKA sur la stabilité chromosomique dépend-il de l'activité d'Aurora A ?

Il a été décrit que PKA phosphoryle Aurora A en position Thr288, ce qui conduit à une augmentation de son activité (Walter et al., 2000). Aurora A est localisée aux centrosomes depuis le début de la

prophase jusqu'à la télophase. L'inhibition de cette kinase induit de nombreux défauts de mitoses, tels qu'une amplification des centrosomes (c'est-à-dire la présence de plus de deux centrosomes), des alignements aberrants de chromosomes, ou des fuseaux multipolaires (Lukasiewicz and Lingle, 2009). Lors d'une inhibition de PKA, l'activité d'Aurora A serait réduite, ce qui pourrait également contribuer à l'apparition de phénotypes mitotiques aberrants.

L'effet de PKA sur la stabilité chromosomique dépend-il de l'activité de MAPK/ERK?

Enfin, nos résultats préliminaires ont révélé que l'inhibition de PKA entraîne une augmentation de la phosphorylation de MAPK/ERK (figure 50). D'après la littérature, la surexpression ou l'inhibition de MAPK/ERK génèrent des fuseaux de division anormaux, de l'instabilité chromosomique et des défauts de mitoses (Riquet et al., 2011). Il semble que l'activité MAPK/ERK lors de la mitose doive être finement régulée et située dans un intervalle permissif afin de maintenir la stabilité chromosomique. Il est envisageable que l'effet de l'inhibition de PKA sur la ségrégation chromosomique ait lieu *via* une augmentation de l'activité de MAPK/ERK. Une perspective possible serait donc de réduire l'activité MAPK (avec de faibles doses d'inhibiteur) tout en inhibant PKA et d'observer si ces conditions expérimentales permettent de retrouver des phénotypes mitotiques normaux. De plus, confirmer la chute d'activité MAPK/ERK lors de la cytokinèse, ainsi que mesurer la dynamique de ses variations lors de la mitose, nous permettrait de mieux comprendre le rôle de cette kinase dans le processus de division.

Bien que les résultats concernant l'activité MAPK/ERK lors de la cytokinèse restent à confirmer, il est intéressant de noter que le même type de profil (chute d'activité rapide) est observé à la cytokinèse lors de mesure d'activité PKA. Les signaux FRET, générés par le repliement du biosenseur sous l'effet de l'activité kinase, sont réversibles sous l'action des protéines phosphatases. Aussi, ces outils mesurent une balance entre l'activité kinase et l'activité phosphatase. Il est donc également possible d'émettre comme hypothèse que l'activité des protéines phosphatases augmenterait fortement lors de la cytokinèse.

Quelle est l'activité de PKA aux centrosomes lors des phases précoces de la mitose ?

Nous avons également montré que les sous-unités catalytiques de PKA sont présentes en plus forte concentration au niveau des centrosomes lors de la prophase et de la prométaphase (figure 31). Les travaux de Terrin, ont montré qu'en mitose l'activité de PKA au niveau des centrosomes. Néanmoins, les auteurs se sont uniquement intéressés à l'étape de métaphase (Terrin et al., 2012). Il serait donc intéressant de pouvoir mesurer l'activité de PKA à cet endroit dans les phases précoces de la mitose.

Pour cela nous sommes en train de mettre en place des expériences qui combinent expression du biosenseur AKAREV et immuno-marquage de la tubuline γ pour observer l'évolution de l'activité de PKA sur des cellules fixées aux différentes étapes de la mitose. Afin de mesurer cette activité en cellule vivantes, il serait possible de modifier AKAREV par biologie moléculaire pour lui ajouter un signal de localisation centrosomal (ce type de séquence est notamment présent chez la cycline E (Matsumoto and Maller, 2004)).

Peut-on perturber la signalisation PKA dans des compartiments subcellulaires spécifiques pour en étudier les effets sur la stabilité chromosomique?

Afin de déterminer comment la dynamique spatio-temporelle de PKA est impliquée dans la ségrégation correcte des chromosomes lors de la mitose, une autre stratégie pourrait être mise en place. L'idée est de manipuler localement le contenu en AMPc en agissant sur les AKAPs ou PDEs spécifique de certains compartiments cellulaires. Par exemple : l'expression d'un dominant négatif de PDE4D3 entraîne une augmentation de la concentration en AMPc au niveau des centrosomes (Terrin et al., 2012). A ce même endroit, il est possible de délocaliser PKA en surexprimant une partie de la séquence d'acides aminés situés en C-terminus de la protéine AKAP450 (la partie responsable du ciblage d'AKAP450 aux centrosomes). Cette manipulation sature les sites de fixation disponibles et conduit à la délocalisation de cette AKAP et de l'activité de PKA (Keryer et al., 2003).

Toujours dans l'idée de manipuler localement l'activité de PKA, il existe des outils moléculaires, qui peuvent être utilisés en combinaison avec les biosenseurs FRET, permettant de perturber la signalisation intracellulaire (Sample et al., 2014). C'est le cas de l'outil appelé SMICUS (*Spatiotemporal Manipulation of Intracellular cAMP Using sAC*) qui permet de générer de l'AMPc dans différents compartiments cellulaire. Pour le construire, Sample et collaborateurs ont utilisé une isoforme de l'adénylate cyclase qui est soluble (sAC) et chimiquement activée par le bicarbonate (Tresguerres et al., 2011) . Cette protéine est étiquetée avec une protéine fluorescente pour contrôler la transfection et le niveau d'expression. Différents signaux de localisation y ont été ajoutés afin de pouvoir activer la production d'AMPc spécifiquement dans le noyau, dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique (Sample et al., 2012).

Si les biosenseurs FRET sont de plus en plus couramment utilisés chez les eucaryotes, ceux-ci sont encore peu développés pour l'étude de l'activité kinase et la phosphorylation chez les procaryotes. Pourtant l'étude du cycle cellulaire bactérien requière également des informations spatio-temporelles.

Etude de la phosphorylation du principal régulateur du cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

Le processus de division cellulaire asymétrique est un mécanisme crucial chez les eucaryotes car il permet de générer de nombreux types cellulaires à partir du zygote, ou encore car il est responsable de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches (Morrison and Kimble, 2006). La division asymétrique est retrouvée chez certains modèles unicellulaires eucaryotes (i.e. : la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*) mais également procaryotes (Li, 2013).

Le modèle bactérien *C. crescentus* est un excellent modèle pour l'étude de la régulation des processus spatio-temporel. Cette bactérie, en plus de sa division asymétrique possède deux pôles différents qui peuvent être distingués par des critères morphologiques. Les mécanismes à l'origine de cette division impliquent le facteur de transcription CtrA. Ce régulateur de réponse doit, à la fin de la division cellulaire, être phosphorylé et actif dans la cellule fille flagellée afin d'inhiber la réplication de l'ADN, tandis que sa déphosphorylation et sa dégradation sont nécessaires à l'initiation de la phase S dans la cellule fille pédonculée. Il a donc été supposé que dans les stades précédant la division, les formes phosphorylées de CtrA formeraient un gradient uniforme entre les deux pôles de la cellule (Chen et al., 2011). Néanmoins aucune mesure directe n'avait jusqu'ici permis de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Nous avons donc construit un outil moléculaire basé sur le FRET afin d'étudier *in vivo* la phosphorylation de CtrA. Cet outil se compose de deux protéines de fusion : le domaine receveur de CtrA fusionné à la CFP dans un cas et à la YFP dans l'autre cas, qui sont exprimés sous le contrôle de deux promoteurs différents (figures 52 et 53). Après avoir validé que la dimérisation de ces protéines de fusion dépend de leur phosphorylation par CckA, nous avons entrepris d'étudier la localisation de cette phosphorylation en cellules pré-divisionnelles.

De façon très intéressante, nous observons un gradient de phosphorylation dans ces bactéries. Néanmoins ce gradient est confiné dans une zone restreinte du corps cellulaire et laisse place dans le reste de la bactérie à des niveaux de phosphorylation homogènes (figure 59). De plus ce gradient est localisé différemment au cours de la progression du cycle :

- Dans les stades pré-divisionnels précoces, le niveau de phosphorylation est faible au pôle pédonculé, augmente graduellement jusqu'au premier tiers de la bactérie et atteint une phase plateau élevée dans les deux tiers restant du corps cellulaire. A cette étape du cycle, le gradient de phosphorylation est donc situé en proximité du pôle pédonculé.
- Dans les stades pré-divisionnels tardifs, on observe une phase plateau où le niveau de phosphorylation est faible dans les deux tiers du corps cellulaire (en partant du pôle pédonculé) puis la phosphorylation augmente graduellement pour atteindre son maximum au pôle opposé. A cette étape du cycle, le gradient de phosphorylation est donc situé en proximité du pôle flagellé

Nous n'avons en revanche pas identifié de stade intermédiaire où le gradient serait placé au milieu du corps cellulaire et entouré de deux phases plateaux. Ceci peut suggérer que le gradient se déplace de façon rapide d'une position à l'autre au cours du cycle.

Ces résultats ouvrent de nombreuses questions concernant l'établissement et le maintien de ces profils de localisation des formes phosphorylées de CtrA. Nous supposons que les protéines DivL, DivK, DivJ ou encore PleC, qui participent à définir l'activité de CckA en tant que kinase ou phosphatase, pourraient contribuer à l'établissement de ces profils de localisation. Les profils de sous-localisation de CtrA phosphorylée seront donc étudiés dans des lignées présentant des mutations de ce réseau de régulation.

En conclusion générale, l'utilisation de biosenseurs FRET nous a permis de révéler pour la première fois le profil spatio-temporel d'activité de PKA au cours de la mitose avec une résolution de cinq minutes. Nous avons également montré que l'activité de cette kinase est sous-localisée et est particulièrement élevée à proximité des chromosomes lors de la métaphase et l'anaphase. L'augmentation d'activité de PKA qui a lieu en début de mitose est d'ailleurs requise pour le maintien de l'intégrité du génome. Il serait particulièrement intéressant d'élargir cette étude à d'autres modèles cellulaires, tumoraux ou non, afin de déterminer si ces actions de PKA sont spécifiques aux cellules HeLa ou si elles sont conservées lors de la mitose des cellules eucaryotes. Des lignées cellulaires telles que les fibroblastes NIH3T3 ou encore les cellules CHO pourraient être utilisées dans ce contexte, afin d'y comparer les données d'activité PKA précédemment obtenues *in vitro* (Costa et al., 1976; Kotani et al., 1998).

De plus le développement d'un biosenseur optimisé pour les mesures d'activité MAPK/ERK, nous a permis de mettre en évidence que l'activité de cette kinase chute brusquement lors de la cytokinèse, de façon similaire à l'activité de PKA. Enfin la création d'un biosenseur rapporteur de la

phosphorylation du régulateur majeur du cycle cellulaire chez *C. crescentus*, nous a permis de déterminer la répartition des formes phosphorylées de CtrA avant la division. Ce biosenseur nous servira par la suite à comprendre comment le réseau de régulation de CtrA participe à l'asymétrie de la division de *C. crescentus*.

Le développement et l'utilisation d'outils pour la mesure de l'activité kinase, ou de la phosphorylation en cellule unique, permettent donc d'obtenir une vision en quatre dimensions des processus biologiques. De nombreuses questions restent encore à résoudre pour comprendre la manière dont PKA coordonne ses différentes actions lors de la mitose des cellules HeLa, ou encore pour comprendre comment s'établissent et se maintiennent les gradients de phosphorylation de CtrA lors du cycle cellulaire de *C. crescentus*.

Matériel et Méthodes

Cette section est organisée en deux grandes parties qui récapitulent l'ensemble des techniques employées pour l'étude du cycle cellulaire chez les eucaryotes dans un premier cas, et chez les procaryotes dans un second cas.

I. Etude du cycle cellulaire eucaryote

1. Biologie Moléculaire

1.1. Construction des biosenseurs EKAR optimisés

Les versions optimisées de EKAR, ainsi que les mutants inactifs, ont été construits comme décrits précédemment (Vandame et al., 2013b). Ces constructions ont notamment été modifiées en utilisant les fluorophores et/ou *linker* présents dans EKAR, AKAR4, ^TEPAC^W, et EKAREV (Depry et al., 2011; Harvey et al., 2008; Klarenbeek et al., 2011; Komatsu et al., 2011). Nous remercions d'ailleurs Dr. Jin Zhang, Dr. Karel Svoboda, Dr. Jun-ichi Miyazaki et Dr. Kees Jalink (The Nederlands Kanker Instituut) pour nous avoir fourni ces différents plasmides. Les cartes des plasmides contenant les biosenseurs optimisés EKAR-TVV et EKAREV-TVV sont en annexe page 155 et 156.

1.2. Construction du biosenseur mutant AKAREV T>A

Le plasmide contenant le biosenseur AKAREV nous a été fourni par Dr. Jun-ichi Miyazaki (Komatsu et al., 2011). La version mutée AKAREV T>A a été construite par mutagenèse dirigée suivant la procédure décrite par Sawano et Miyawaki, en utilisant l'oligonucléotide antisens 5' GCCGTCAACCAGCGCCG CGCGCCTCAATC 3' (Sawano and Miyawaki, 2000). La carte du plasmide contenant le biosenseur AKAREV est en annexe page 154.

2. Culture cellulaire, synchronisation et transfection transitoire

Les cellules HeLa ont été cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium : 1g/l D-glucose, L-Glutamine, Pyruvate) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (Pénicilline 100U/mL, Streptomycine 100 µg/mL). Pour certaines expériences les cellules ont subi une privation en sérum (DMEM supplémenté par 0.5% de SVF) pendant 8h.

Des activateurs et inhibiteurs de MAPK et de PKA ont été utilisés dans certaines expériences pour traiter les cellules : EGF à 100 ng/mL (Sigma Aldrich) et U0126 à 10 µM (Sigma Aldrich) pour MAPK,

8-br-cAMP à 0,1mM (Tocris Bioscience), forskoline à 12,5 μ M (Tocris Bioscience) H-89 dihydrochloride à 10 μ M (Sigma Aldrich) pour PKA.

La synchronisation cellulaire au moment de la transition G1/S a été réalisée par la technique du double bloc thymidine. Les cellules ont été mises en présence de 2,5 mM de thymidine (Sigma Aldrich) pendant 24h. Elles ont ensuite été replacées pendant 12h dans du milieu de culture frais, puis remises en présence de 2,5 mM de thymidine pendant 24h. La synchronisation cellulaire au moment de la transition G2/M a été réalisée par la technique du bloc thymidine suivi d'un bloc nocodazole. Les cellules ont été mises en présence de 2,5 mM de thymidine (Sigma Aldrich) pendant 24h. Elles ont ensuite été replacées pendant 6h dans du milieu de culture frais, puis remises en présence de 100 nM de nocodazole (Sigma Aldrich) pendant 4h. Les cellules reprennent leur cycle cellulaire lorsqu'elles sont remises en présence de milieu de culture frais.

Les transfections transitoires des différents plasmides ont été réalisées avec du FuGENE HD (Roche) sur des cellules précédemment ensemencées sur lamelles de verre. Un mélange de 100 μ L d'opti-MEM, 1 à 2 μ g de plasmide et de 4 μ L d'agent transfectant a été incubé à 37°C pendant 30 min puis ajouté directement dans le milieu de culture.

3. Test de prolifération

100 000 cellules ont été ensemencées dans chacun des puits d'une plaque 6 puits, dans les milieux contenant ou non des inhibiteurs ou activateurs de la kinase étudiées aux concentrations mentionnées précédemment. Après 24 ou 48h de traitement, les cellules ont été détachées de leur substrat par 300 μ L de trypsine. 700 μ L de milieu de culture y a été ajouté et l'ensemble a été transféré en tube 1,5mL. Après homogénéisation et coloration au bleu trypan, les cellules ont été comptées sur lame de Malassez. Pour chaque expérience, chaque condition a été réalisée en triplicat et chaque triplicat a été compté deux fois.

4. Cytométrie en flux

Les cellules ont été fixées dans une solution d'éthanol 70% glacé. Après 24h d'incubation à -20°C, les cellules ont été rincées, puis traitées par une solution d'iodure de propidium (100 μ g/mL ; Sigma Aldrich) et de RNase A (200 μ g/mL ; Sigma Aldrich) 1h à 37°C. L'analyse du contenu en ADN a été réalisée sur un cytofluorimètre en flux (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Chaque analyse a été effectuée sur 10.000 cellules. L'iodure de propidium a été excité par un laser monochrome à 488 nm et la fluorescence a été détectée sur le canal FL3 (650 nm). Le logiciel Cell Quest Pro a été utilisé pour l'acquisition des données, et le logiciel ModFit pour l'analyse des phases du cycle cellulaire.

5. Western-Blotting

Pour les différentes conditions des extraits protéiques ont été réalisés et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (12%) en conditions dénaturantes. Après transfert les membranes de nitrocellulose sont saturées par 5% de BSA ou 5% de lait pendant 45min, puis incubées 1h à température ambiante avec les différents anticorps primaires.

Les anticorps primaires sont dirigés contre : les formes biphosphorylées de Erk1/2 (Sigma Aldrich, 1/2000^{ème}), Erk1/2 totaux (Abcam, 1/1000^{ème}) et l'actine (Santa Cruz, 1/1000^{ème}). Les anticorps secondaires : anti- immunoglobulines de souris ou de lapin couplées à la peroxydase (GE Healthcare, 1/10000^{ème}) sont ensuite incubés 45min. La révélation est effectuée par réaction de chimioluminescence (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer).

6. Immuno-fluorescence

Les cellules ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde (4%) pendant 30 min puis perméabilisées avec une solution de Triton-100X (0,5%). La saturation est effectuée pendant 1h dans une solution composée de 2% BSA, 2% SVF, 5% sérum normal d'âne, ou de 2% de BSA uniquement en fonction des anticorps. Les anticorps primaires ont été incubés pendant 2h afin de marquer :

- les formes biphosphorylées de Erk1/2 (Sigma Aldrich) utilisé au 1/100^{ème}
- Erk1/2 totaux (Abcam) utilisé 1/200^{ème}
- les sous-unités catalytique de PKA (Abcam) utilisé au 1/500^{ème}
- l' α -tubuline (Sigma Aldrich) utilisé au 1/700^{ème}
- l' γ -tubuline (Sigma Aldrich) utilisé au 1/2000^{ème}

Les anticorps secondaires utilisés (produits chez l'âne et sont des anti-immunoglobulines de souris couplé à un Alexafluor488, ou des anti-immunoglobulines de lapin couplés à un Alexafluor594 (Invitrogen)) ont ensuite été incubés 1h. Avant le montage entre lame et lamelle par une solution de Mowiol-488, les cellules ont été incubées dans une solution contenant 2 μ g/mL de Hoechst (Molecular Probes, Life Technologies).

7. Microscopie confocale

Les images des expériences d'immuno-fluorescence ont été réalisées sur un microscope confocal SP5 (Leica Microsystem) avec un objectif à immersion (huile) 63x, N.A. 1.4, ou sur un microscope confocal A1-R (Nikon) équipé d'un objectif à immersion (huile) 60x 1.4 NA. Dans le deux cas les acquisitions ont été réalisées de façon séquentielle. Sur le SP5, l'excitation a été effectuée à 405, 488 et 594 nm

et les signaux ont été respectivement détectés entre 420-480nm, 505-590nm et 605-710nm. Sur l'A1-R, l'excitation a été effectuée à 405, 488 et 561 nm et les signaux ont été respectivement détectés à 450 ± 50 , 525 ± 50 et 595 ± 50 nm.

8. Mesure de FRET ratiométrique

8.1. En vidéomicroscopie

Les expériences de mesure de FRET en time-lapse ont été réalisées sur des cellules exprimant les différents biosenseurs, dans du DMEM sans rouge de phénol pour les expériences de plus de 4h ou dans le cas contraire, dans le milieu L-15 (Leibowitz Medium.) Les images ont été acquises sur un vidéomicroscope inversé AF6000X (Leica Microsystems) thermostaté à 37°C, avec un objectif 63× 1.3 NA à huile. L'excitation a été réalisée avec un filtre passe-bandes 427 ± 10 nm et avec un miroir dichroïque double bande (440/520 nm). Les signaux ont été détectés avec une roue à filtres rapide pour le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur respectivement à 472 ± 30 nm et 542 ± 27 nm. L'ajout de composés chimiques au milieu de culture pour activer ou inhiber une kinase a été réalisé manuellement.

L'analyse a été effectuée sur le logiciel ImageJ avec une macro (sous-logiciel écrit en langage Java et pouvant être intégré dans ImageJ) que nous avons développée à partir de la procédure décrite par Kardash (Kardash et al., 2011). Pour plus de détails, le code de cette macro est en annexe. La pondération des images de ratio par l'intensité a été effectuée grâce à une procédure Matlab développée par Dave Trinel.

8.2. En microscopie confocale

Les expériences de mesures de FRET pour déterminer la sous-localisation de l'activité kinase ont été réalisées sur un microscopie confocale A1-R (Nikon) équipé d'un objectif à immersion (huile) 60x 1.4 NA. L'excitation est réalisée à 405 nm et les signaux sont simultanément détectés à 450 ± 50 et 525 ± 50 nm.

L'analyse a été effectuée sur le logiciel ImageJ avec une macro que nous avons développée à partir de la procédure décrite par Kardash (Kardash et al., 2011). Pour plus de détails, le code de cette deuxième macro est en annexe. La pondération des images de ratio par l'intensité a été effectuée grâce à une procédure Matlab développée par Dave Trinel.

9. Mesure de FRET par FLIM

9.1. En FD-FLIM

Les mesures de FRET par FLIM dans le domaine fréquentiel (FD-FLIM) ont été réalisées sur un système LIFA (Lambert Instruments) installé sur un microscope Inversé Eclipse TE2000 (Nikon) équipé d'une chambre thermostattée à 37°C et d'un objectif à huile 60x 1,4NA. Les acquisitions ont été effectuées avec un bloc filtre CFP (426-446 nm excitation ; miroir dichroïque 455 nm; émission 460/500 nm). La fréquence de modulation utilisée a été réglée sur 40 MHz et la MCP (microchannel plate) à 800V. Une solution d'acide carboxylique 7-(diethylamino)coumarin-3 (Sigma Aldrich) diluée dans du méthanol a été utilisée comme référence de temps de vie (4 ns). Chaque mesure de temps de vie de fluorescence au cours du temps a été calculée grâce à l'acquisition de 36 images en décalage de phase. L'ajout de composés chimiques au milieu de culture pour activer ou inhiber une kinase a été réalisé manuellement. Enfin, les valeurs de temps de vie de phase ont été extraites grâce au logiciel LiFlim.

9.2. En TCSPC

Les mesures de TCSPC sont réalisées sur le système et selon le protocole décrit précédemment (Waharte et al., 2006).

II. Etude du cycle cellulaire procaryote

1. Biologie Moléculaire

Les séquences du domaine receveur de CtrA, de la CFP et de la YFP ont été amplifiées par PCR avec les oligonucléotides listés dans le tableau 6, clonés dans le pGEM-T (Proméga) puis séquencés.

	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide antisens
CtrA rec	5' AAGCTT ATGCGCGTACTGTTGATCGAGGATG 3' HindIII	5' GGTACC CTTCGAACGACGGACCACCGCGT 3' KpnI
CFP	5' CATATG GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT 3' NdeI	5' AAGCTT GTGGCCGCCGCCGCC CTTGACAGC TCGTCCATGCCGA 3' HindIII linker CFP
YFP	5' CATATG GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT 3' NdeI	5' AAGCTT GCCGCCCGAGCCGCCGCCG ACGAGGC CGCCGCC CTTGACAGCTCGTCCATGCCGA 3' HindIII linker YFP

Tableau 6 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le clonage du biosenseur de phosphorylation CtrA

Les sites de restriction sont représentés en rouge, les séquences codant pour les linkers présents entre la protéine fluorescente et CtrA dans le biosenseur sont représentées en bleu

CtrA en combinaison avec la CFP dans un cas et la YFP dans l'autre cas, ont ensuite été insérés par restriction/ligation dans le pSRK qui est un vecteur d'expression à grand nombre de copies (Khan et al., 2008). Les gènes chimériques ont ensuite été réamplifiés à partir de ces constructions par PCR en utilisant l'oligonucléotide sens 5' **CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC** 3' et l'oligonucléotide antisens de CtrA présenté dans le tableau 6 (la séquence **CACC** correspond au 4 bases nécessaires au clonage directionnel par le système Gateway). Les produits PCR ont été clonés dans le pENTR-D (Life Technologies) et séquencés à nouveau. Les séquences codant pour CtrA-CFP et CtrA-YFP ont ensuite été introduites par LR-recombinaison dans le vecteur pML396 (vecteur d'expression inductible par le xylose).

2. Culture et synchronisation des lignées *C. crescentus*

Les bactéries ont été cultivées dans du milieu PYE (*peptone-yeast extract*) à 30°C et sous agitation. Au besoin, les antibiotiques suivants ont été ajoutés au milieu de culture : tétracycline (1 µg/ml) et kanamycine (25 µg/ml). L'expression de CtrA-CFP a été induite par ajout de 1mM d'IPTG (isopropyl-b-D- thiogalactoside). L'expression de CtrA-YFP a été induite par ajout de 0,1% de xylose.

Pour la synchronisation, une culture de 20 mL à DO=0,6 a été centrifugée à 4°C, 11 000 rpm, resuspendue dans 2 mL milieu minimal (*M2 salts*) auquel est ajouté 2 mL de Percoll (Sigma Aldrich). Le mélange a ensuite été centrifugé à nouveau à 10 000g, 4°C pendant 20 min, puis la bande correspondant aux cellules flagellées a été isolée, rincée avec du milieu minimal puis transférée en milieu de culture PYE à 30°C.

3. Mesure de FRET en bactéries

Pour chaque condition, après 4h d'induction de l'expression des protéines de fusion 1 mL de culture bactérienne à DO=0,6 a été centrifugé puis resuspendu dans 150 µL de PBS. Pour l'expérience en cellule synchronisée, les bactéries ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde 4%, pendant 15 min à température ambiante, suivies de 30 min à 4°C. Après rinçage, ces bactéries ont été resuspendues dans du PBS. Une goutte de cette suspension bactérienne a ensuite été déposée entre lame et lamelles. Les images ont été acquises sur un vidéomicroscope AL6000-X (Leica Microsystem) avec un objectif à huile, 100X 1,4 NA. L'excitation est réalisée avec les filtres passe-bandes suivants : 427±10 et 504±12 nm et avec un miroir dichroïque double bandes (440/520 nm). Les signaux ont été détectés avec une roue à filtres rapide pour le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur respectivement à 472 ± 30 nm et 542 ± 27 nm.

L'analyse des ratio YFP/CFP a été effectuée sur le logiciel ImageJ avec une macro que nous avons développée, avec l'aide de Corentin Spriet, à partir de la procédure décrite par Kardash (Kardash et al., 2011), en prenant en compte l'expression non stœchiométrique des fluorophores et en adaptant l'équation finale selon celle précédemment décrite pour ce type d'expériences (Wouters et al., 2001). Pour plus de détails, le code de cette macro est en annexe. Lors de chaque expérience, les coefficients de compensation spectrale du donneur et de l'accepteur ont été recalculés sur des échantillons exprimant CtrA-CFP seul et CtrA-YFP seul.

4. Electrophorèse Phos-Tag, Immuno-empreinte CtrA et quantification

L'électrophorèse SDS-PAGE Phos-Tag a été réalisée selon la procédure décrite précédemment (Pini et al., 2013). Après transfert, la membrane a été saturée dans du PBS à 3% de lait et 0.1% de NP40, puis incubée sur la nuit à 4°C avec un anticorps dirigé contre CtrA (dilution : 1/3000^{ème}) dans le mélange PBS/lait/NP40. Après quatre nouveaux rinçages, la membrane a été incubée 1h avec l'anticorps secondaire dilué au 1/50000^{ème} dans le mélange PBS/lait/NP40, puis révélée avec le kit Substrat HRP Immobilon Western Blotting Chemoluminescence (Merck Milipore). La quantification de l'intensité des bandes CtrA phosphorylé et CtrA non phosphorylé a été réalisée avec le logiciel ImageJ.

Bibliographie

- Allen, M.D., and Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 716-721.
- Angelastro, P.S., Sliusarenko, O., and Jacobs-Wagner, C. (2010). Polar localization of the CckA histidine kinase and cell cycle periodicity of the essential master regulator CtrA in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 192, 539-552.
- Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L., and Beach, D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 55, 371-378.
- Astuti, P., Pike, T., Widberg, C., Payne, E., Harding, A., Hancock, J., and Gabrielli, B. (2009). MAPK pathway activation delays G2/M progression by destabilizing Cdc25B. *J Biol Chem* 284, 33781-33788.
- Baillie, G.S. (2009). Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *Febs J* 276, 1790-1799.
- Balan, V., Leicht, D.T., Zhu, J., Balan, K., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Qin, J., Ruan, H., Comb, M.J., and Tzivion, G. (2006). Identification of novel in vivo Raf-1 phosphorylation sites mediating positive feedback Raf-1 regulation by extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biol Cell* 17, 1141-1153.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23, 2016-2027.
- Biondi, E.G., Reisinger, S.J., Skerker, J.M., Arif, M., Perchuk, B.S., Ryan, K.R., and Laub, M.T. (2006). Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* 444, 899-904.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J., and Pulido, R. (1999). A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* 147, 1129-1136.
- Bodart, J.F. (2010). Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem* 109, 850-857.
- Bodart, J.F., Baert, F.Y., Sellier, C., Duesbery, N.S., Flament, S., and Vilain, J.P. (2005). Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 283, 373-383.
- Bodart, J.F., Gutierrez, D.V., Nebreda, A.R., Buckner, B.D., Resau, J.R., and Duesbery, N.S. (2002). Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev Biol* 245, 348-361.
- Brown, K.M., Day, J.P., Huston, E., Zimmermann, B., Hampel, K., Christian, F., Romano, D., Terhzaz, S., Lee, L.C., Willis, M.J., *et al.* (2013). Phosphodiesterase-8A binds to and regulates Raf-1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1533-1542.
- Caretta, A., and Mucignat-Caretta, C. (2011). Protein kinase a in cancer. *Cancers (Basel)* 3, 913-926.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.

- Carlson, H.J., and Campbell, R.E. (2009). Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol* 20, 19-27.
- Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1299-1310.
- Chaturvedi, D., Poppleton, H.M., Stringfield, T., Barbier, A., and Patel, T.B. (2006). Subcellular localization and biological actions of activated RSK1 are determined by its interactions with subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 26, 4586-4600.
- Chen, Y., Saulnier, J.L., Yellen, G., and Sabatini, B.L. (2014). A PKA activity sensor for quantitative analysis of endogenous GPCR signaling via 2-photon FRET-FLIM imaging. *Front Pharmacol* 5, 56.
- Chen, Y.E., Tropini, C., Jonas, K., Tsokos, C.G., Huang, K.C., and Laub, M.T. (2011). Spatial gradient of protein phosphorylation underlies replicative asymmetry in a bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1052-1057.
- Chen, Y.E., Tsokos, C.G., Biondi, E.G., Perchuk, B.S., and Laub, M.T. (2009). Dynamics of two Phosphorelays controlling cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 191, 7417-7429.
- Chu, C.S., Hsu, P.H., Lo, P.W., Scheer, E., Tora, L., Tsai, H.J., Tsai, M.D., and Juan, L.J. (2011). Protein kinase A-mediated serine 35 phosphorylation dissociates histone H1.4 from mitotic chromosome. *J Biol Chem* 286, 35843-35851.
- Collas, P., Le Guellec, K., and Tasken, K. (1999). The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *J Cell Biol* 147, 1167-1180.
- Costa, M., Gerner, E.W., and Russell, D.H. (1976). Cell cycle-specific activity of type I and type II cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 251, 3313-3319.
- Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1376-1387.
- Cseh, B., Doma, E., and Baccarini, M. (2014). "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett* 588, 2398-2406.
- Curtis, P.D., and Brun, Y.V. (2010). Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 13-41.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10762-10767.
- Depry, C., Allen, M.D., and Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst* 7, 52-58.
- Dessauer, C.W. (2009). Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 76, 935-941.
- Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H., and Reddy, E.P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26, 3185-3202.

- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
- Diviani, D., and Scott, J.D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 114, 1431-1437.
- Domian, I.J., Quon, K.C., and Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90, 415-424.
- Dougherty, M.K., Muller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
- Duckworth, B.C., Weaver, J.S., and Ruderman, J.V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16794-16799.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 278, 29819-29823.
- Dumesic, P.A., Scholl, F.A., Barragan, D.I., and Khavari, P.A. (2009). Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 185, 409-422.
- Dupre, A., Haccard, O., and Jessus, C. (2011). Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. *J Signal Transduct* 2011, 350412.
- Dupre, A., Jessus, C., Ozon, R., and Haccard, O. (2002). Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Embo J* 21, 4026-4036.
- Edin, M.L., and Juliano, R.L. (2005). Raf-1 serine 338 phosphorylation plays a key role in adhesion-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 25, 4466-4475.
- Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A., and Hunt, T. (2010). Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Adv Enzyme Regul* 50, 375-399.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Factor, V.M., Seo, D., Ishikawa, T., Kaposi-Novak, P., Marquardt, J.U., Andersen, J.B., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2010). Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 5.
- Ferrell, J.E., Jr., and Bhatt, R.R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 19008-19016.
- Fritz, R.D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., Ritsma, L., Ponsioen, B., Fluri, E., Schulte-Merker, S., van Rheenen, J., *et al.* (2013). A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci Signal* 6, rs12.
- Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J Biol Chem* 281, 8917-8926.

- Futran, A.S., Link, A.J., Seger, R., and Shvartsman, S.Y. (2013). ERK as a model for systems biology of enzyme kinetics in cells. *Curr Biol* 23, R972-979.
- Gao, R., Tao, Y., and Stock, A.M. (2008). System-level mapping of Escherichia coli response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol Microbiol* 69, 1358-1372.
- Gerits, N., Mikalsen, T., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M., and Moens, U. (2007). Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem* 282, 37232-37243.
- Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M.A., Vischer, N.O., Jalink, K., and Gadella, T.W., Jr. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat Methods* 7, 137-139.
- Grieco, D., Avvedimento, E.V., and Gottesman, M.E. (1994). A role for cAMP-dependent protein kinase in early embryonic divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9896-9900.
- Grieco, D., Porcellini, A., Avvedimento, E.V., and Gottesman, M.E. (1996). Requirement for cAMP-PKA pathway activation by M phase-promoting factor in the transition from mitosis to interphase. *Science* 271, 1718-1723.
- Gross, S.D., Lewellyn, A.L., and Maller, J.L. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 276, 46099-46103.
- Han, S.J., Chen, R., Paronetto, M.P., and Conti, M. (2005). Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol* 15, 1670-1676.
- Harding, A., Giles, N., Burgess, A., Hancock, J.F., and Gabrielli, B.G. (2003). Mechanism of mitosis-specific activation of MEK1. *J Biol Chem* 278, 16747-16754.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Harvey, C.D., Ehrhardt, A.G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R.J., and Svoboda, K. (2008). A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19264-19269.
- Hecquet, C., Lefevre, G., Valtink, M., Engelmann, K., and Mascarelli, F. (2002). cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. *Oncogene* 21, 6101-6112.
- Herbst, K.J., Allen, M.D., and Zhang, J. (2011). Spatiotemporally regulated protein kinase A activity is a critical regulator of growth factor-stimulated extracellular signal-regulated kinase signaling in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 31, 4063-4075.
- Hoch, N.C., Chen, E.S., Buckland, R., Wang, S.C., Fazio, A., Hammet, A., Pelliccioli, A., Chabes, A., Tsai, M.D., and Heierhorst, J. (2013). Molecular basis of the essential s phase function of the rad53 checkpoint kinase. *Mol Cell Biol* 33, 3202-3213.
- Hoffmann, R., Baillie, G.S., MacKenzie, S.J., Yarwood, S.J., and Houslay, M.D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *Embo J* 18, 893-903.

- Horne, M.M., and Guadagno, T.M. (2003). A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol* 161, 1021-1028.
- Houslay, M.D. (2006). A RSK(γ) relationship with promiscuous PKA. *Sci STKE* 2006, pe32.
- Huang, C.Y., and Ferrell, J.E., Jr. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10078-10083.
- Huang, W., Kessler, D.S., and Erikson, R.L. (1995). Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Mol Biol Cell* 6, 237-245.
- Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D.M., Barradeau, S., Hellio, R., and Weiss, M.C. (2001). Type I protein kinase a is localized to interphase microtubules and strongly associated with the mitotic spindle. *Exp Cell Res* 264, 250-265.
- Indolfi, C., Avvedimento, E.V., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Rapacciuolo, A., Giuliano, P., Grieco, D., Cavuto, L., Stingone, A.M., Ciullo, I., *et al.* (1997). Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* 3, 775-779.
- Iyer, G.H., Moore, M.J., and Taylor, S.S. (2005). Consequences of lysine 72 mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent kinase. *J Biol Chem* 280, 8800-8807.
- Kardash, E., Bandemer, J., and Raz, E. (2011). Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat Protoc* 6, 1835-1846.
- Keryer, G., Witczak, O., Delouree, A., Kemmner, W.A., Rouillard, D., Tasken, K., and Bornens, M. (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 14, 2436-2446.
- Keryer, G., Yassenko, M., Labbe, J.C., Castro, A., Lohmann, S.M., Evain-Brion, D., and Tasken, K. (1998). Mitosis-specific phosphorylation and subcellular redistribution of the RII α regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 34594-34602.
- Khan, S.R., Gaines, J., Roop, R.M., 2nd, and Farrand, S.K. (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol* 74, 5053-5062.
- Kim, C., Cheng, C.Y., Saldanha, S.A., and Taylor, S.S. (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 130, 1032-1043.
- Kim, C., Vigil, D., Anand, G., and Taylor, S.S. (2006). Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *Eur J Cell Biol* 85, 651-654.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., and Roger, P.P. (2001). Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.
- Klarenbeek, J.B., Goedhart, J., Hink, M.A., Gadella, T.W., and Jalink, K. (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* 6, e19170.

- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 22, 4647-4656.
- Kondoh, K., and Nishida, E. (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1227-1237.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1, 371-380.
- Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.B., and Gadella, T.W., Jr. (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* 45, 6570-6580.
- Kumar, B., Sinclair, J., Khandrika, L., Koul, S., Wilson, S., and Koul, H.K. (2009). Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol* 34, 1557-1564.
- Labbe, J.C., Capony, J.P., Caput, D., Cavadore, J.C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J.M., Picard, A., and Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* 8, 3053-3058.
- Landsverk, H.B., Carlson, C.R., Steen, R.L., Vossebein, L., Herberg, F.W., Tasken, K., and Collas, P. (2001). Regulation of anchoring of the RIIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIalpha: implications for chromosome dynamics at mitosis. *Journal of Cell Science* 114, 3255-3264.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 22, R966-980.
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H.M., Brattsand, G., and Gullberg, M. (1997). Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* 17, 5530-5539.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4632-4637.
- Laub, M.T., McAdams, H.H., Feldblyum, T., Fraser, C.M., and Shapiro, L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* 290, 2144-2148.
- Lefkimiatis, K., and Zaccolo, M. (2014). cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacol Ther.*
- Lents, N.H., Keenan, S.M., Bellone, C., and Baldassare, J.J. (2002). Stimulation of the Raf/MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr-160 phosphorylation of a nuclear-targeted CDK2. *J Biol Chem* 277, 47469-47475.
- Li, R. (2013). The art of choreographing asymmetric cell division. *Dev Cell* 25, 439-450.
- Lohka, M.J., Hayes, M.K., and Maller, J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3009-3013.

- Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., and Hutchins, G.M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133, 1463-1467.
- Lukasiewicz, K.B., and Lingle, W.L. (2009). Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environ Mol Mutagen* 50, 602-619.
- Ma, L., Ho, K., Piggott, N., Luo, Z., and Measday, V. (2012). Interactions between the kinetochore complex and the protein kinase A pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* 2, 831-841.
- MacCorkle, R.A., and Tan, T.H. (2005). Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* 43, 451-461.
- Magtanong, L., Ho, C.H., Barker, S.L., Jiao, W., Baryshnikova, A., Bahr, S., Smith, A.M., Heisler, L.E., Choy, J.S., Kuzmin, E., *et al.* (2011). Dosage suppression genetic interaction networks enhance functional wiring diagrams of the cell. *Nat Biotechnol* 29, 505-511.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177, 129-145.
- Matsumoto, Y., and Maller, J.L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306, 885-888.
- Matten, W., Daar, I., and Vande Woude, G.F. (1994). Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* 14, 4419-4426.
- Matyakhina, L., Lenherr, S.M., and Stratakis, C.A. (2002). Protein kinase A and chromosomal stability. *Ann N Y Acad Sci* 968, 148-157.
- Maurice, D.H. (2013). PDE8A runs interference to limit PKA inhibition of Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6248-6249.
- Morgan, D.O. (2010). *Le cycle cellulaire (de boeck)*, pp. 295.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inouye, S., Hirose, K., Iino, M., and Hagiwara, M. (2000). A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nat Biotechnol* 18, 313-316.
- Nam, H.J., Lee, I.J., Jang, S., Bae, C.D., Kwak, S.J., and Lee, J.H. (2014). p90 ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) isoenzyme specifically regulates cytokinesis progression. *Cell Signal* 26, 208-219.
- Nasmyth, K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol* 13, 1170-1177.

Naviglio, S., Caraglia, M., Abbruzzese, A., Chiosi, E., Di Gesto, D., Marra, M., Romano, M., Sorrentino, A., Sorvillo, L., Spina, A., *et al.* (2009). Protein kinase A as a biological target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 13, 83-92.

Nikonova, A.S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., Jr., and Golemis, E.A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci* 70, 661-687.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.

Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20, 214-220.

Ory, S., Zhou, M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., and Morrison, D.K. (2003). Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* 13, 1356-1364.

Palmer, A., Gavin, A.C., and Nebreda, A.R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* 17, 5037-5047.

Pastan, I.H., Johnson, G.S., and Anderson, W.B. (1975). Role of cyclic nucleotides in growth control. *Annu Rev Biochem* 44, 491-522.

Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9-22.

Pidoux, G., and Tasken, K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* 44, 271-284.

Pini, F., Frage, B., Ferri, L., De Nisco, N.J., Mohapatra, S.S., Taddei, L., Fioravanti, A., Dewitte, F., Galardini, M., Brilli, M., *et al.* (2013). The DivJ, CbrA and PleC system controls DivK phosphorylation and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 90, 54-71.

Pirino, G., Wescott, M.P., and Donovan, P.J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 8, 665-670.

Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zacco, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* 5, 1176-1180.

Porter, L.A., and Donoghue, D.J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* 5, 335-347.

Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.

Pursiheimo, J.P., Kieksi, A., Jalkanen, M., and Salmivirta, M. (2002). Protein kinase A balances the growth factor-induced Ras/ERK signaling. *FEBS Lett* 521, 157-164.

Quon, K.C., Yang, B., Domian, I.J., Shapiro, L., and Marczyński, G.T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 120-125.

- Rahmouni, S., Cerignoli, F., Alonso, A., Tsutji, T., Henkens, R., Zhu, C., Louis-dit-Sully, C., Moutschen, M., Jiang, W., and Mustelin, T. (2006). Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol* 8, 524-531.
- Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.
- Ramos, J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2707-2719.
- Reboutier, D., Troadec, M.B., Cremet, J.Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P., and Prigent, C. (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol* 201, 65-79.
- Rhind, N., and Russell, P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Riquet, F.B., Vandame, P., and Bodart, J.F. (2011). Ploidy in Mitosis and Meiosis: A Role of MAPK/Erk Network. Salvatore de Rossi and Filippo Bianchi *Aneuploidy : etiology, disorders, and risk factors*.
- Roberts, E.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., Pages, G., Pouyssegur, J., and Ahn, N.G. (2002). Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* 22, 7226-7241.
- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Rubin, C.I., and Atweh, G.F. (2004). The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 93, 242-250.
- Sample, V., DiPilato, L.M., Yang, J.H., Ni, Q., Saucerman, J.J., and Zhang, J. (2012). Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol* 8, 375-382.
- Sample, V., Mehta, S., and Zhang, J. (2014). Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of Cell Science* 127, 1151-1160.
- Santarpia, L., Lippman, S.M., and El-Naggar, A.K. (2012). Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16, 103-119.
- Santos, S.D., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 9, 324-330.
- Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K., and Kuroda, S. (2005). Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* 7, 365-373.
- Sato, M., Kawai, Y., and Umezawa, Y. (2007). Genetically encoded fluorescent indicators to visualize protein phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in single living cells. *Anal Chem* 79, 2570-2575.
- Sawano, A., and Miyawaki, A. (2000). Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 28, E78.

- Scott, J.D., Dessauer, C.W., and Tasken, K. (2013). Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 187-210.
- Shabb, J.B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101, 2381-2411.
- Shaul, Y.D., Gibor, G., Plotnikov, A., and Seger, R. (2009). Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes Dev* 23, 1779-1790.
- Shaul, Y.D., and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1213-1226.
- Shinohara, M., Mikhailov, A.V., Aguirre-Ghiso, J.A., and Rieder, C.L. (2006). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity is not required in mammalian cells during late G2 for timely entry into or exit from mitosis. *Mol Biol Cell* 17, 5227-5240.
- Skerker, J.M., and Laub, M.T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* 2, 325-337.
- Smith, F.D., Langeberg, L.K., Cellurale, C., Pawson, T., Morrison, D.K., Davis, R.J., and Scott, J.D. (2010). AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nat Cell Biol* 12, 1242-1249.
- Smith, F.D., Langeberg, L.K., and Scott, J.D. (2011). Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell Cycle* 10, 731-732.
- Soberg, K., Jahnsen, T., Rognes, T., Skälhegg, B.S., and Laerdahl, J.K. (2013). Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits. *PLoS One* 8, e60935.
- Solc, P., Schultz, R.M., and Motlik, J. (2010). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod* 16, 654-664.
- Stork, P.J., and Schmitt, J.M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12, 258-266.
- Takahashi, M., Dillon, T.J., Liu, C., Kariya, Y., Wang, Z., and Stork, P.J. (2013). Protein kinase A-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. *J Biol Chem* 288, 27712-27723.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Ueki, K., Izumi, T., Chatani, Y., Kohno, M., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Akanuma, Y. (1992). Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 267, 20293-20297.
- Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E., and Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697, 259-269.
- Terrin, A., Di Benedetto, G., Pertegato, V., Cheung, Y.F., Baillie, G., Lynch, M.J., Elvassore, N., Prinz, A., Herberg, F.W., Houslay, M.D., *et al.* (2006). PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *J Cell Biol* 175, 441-451.

- Terrin, A., Monterisi, S., Stangherlin, A., Zoccarato, A., Koschinski, A., Surdo, N.C., Mongillo, M., Sawa, A., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., *et al.* (2012). PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J Cell Biol* 198, 607-621.
- Thornton, B.R., and Toczyski, D.P. (2006). Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* 20, 3069-3078.
- Tresguerres, M., Levin, L.R., and Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int* 79, 1277-1288.
- Tsokos, C.G., and Laub, M.T. (2012). Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol* 15, 744-750.
- Tsokos, C.G., Perchuk, B.S., and Laub, M.T. (2011). A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell-fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell* 20, 329-341.
- Tsuboi, Y., Ichida, T., Sugitani, S., Genda, T., Inayoshi, J., Takamura, M., Matsuda, Y., Nomoto, M., and Aoyagi, Y. (2004). Overexpression of extracellular signal-regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 24, 432-436.
- Van Hooser, A., Goodrich, D.W., Allis, C.D., Brinkley, B.R., and Mancini, M.A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 23), 3497-3506.
- Vandame, P., Sipietter, F., Spriet, C., Leray, A., Vincent, P., Trinel, D., Bodart, J.F., Riquet, F.B., and Heliot, L. (2013a). From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 113, 145-216.
- Vandame, P., Spriet, C., Riquet, F., Trinel, D., Cailliau-Maggio, K., and Bodart, J.F. (2013b). Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements. *Sensors (Basel)* 14, 1140-1154.
- Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S., and Stork, P.J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89, 73-82.
- Waharte, F., Spriet, C., and Heliot, L. (2006). Setup and characterization of a multiphoton FLIM instrument for protein-protein interaction measurements in living cells. *Cytometry A* 69, 299-306.
- Walsh, S., Margolis, S.S., and Kornbluth, S. (2003). Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol Cancer Res* 1, 280-289.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906-4916.
- Wang, R., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Ashorn, C.L., Gallick, G.E., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., and Kuang, J. (2007). Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* 128, 1119-1132.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., *et al.* (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 13, 1977-2000.

- Wouters, F.S., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I. (2001). Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* 11, 203-211.
- Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., and Krebs, E.G. (1999). Mitogen-activated protein kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11335-11340.
- Wu, C.F., Liu, S., Lee, Y.C., Wang, R., Sun, S., Yin, F., Bornmann, W.G., Yu-Lee, L.Y., Gallick, G.E., Zhang, W., *et al.* (2014). RSK promotes G2/M transition through activating phosphorylation of Cdc25A and Cdc25B. *Oncogene* 33, 2385-2394.
- Yamaguchi, T., Pelling, J.C., Ramaswamy, N.T., Eppler, J.W., Wallace, D.P., Nagao, S., Rome, L.A., Sullivan, L.P., and Grantham, J.J. (2000). cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int* 57, 1460-1471.
- Yamamoto, T., Yuyama, K., and Yamamoto, H. (2006). Low concentrations of nitric oxide (NO) induced cell death in PC12 cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) but not via extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) or c-Jun N-terminal protein kinase (JNK). *Neurosci Lett* 392, 170-173.
- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbisky, G.J., and Weber, M.J. (1998). Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol* 142, 1547-1558.
- Zeilig, C.E., Johnson, R.A., Sutherland, E.W., and Friedman, D.L. (1976). Adenosine 3':5'-monophosphate content and actions in the division cycle of synchronized HeLa cells. *J Cell Biol* 71, 515-534.
- Zhang, H., Koo, C.Y., Stebbing, J., and Giamas, G. (2013). The dual function of KSR1: a pseudokinase and beyond. *Biochem Soc Trans* 41, 1078-1082.
- Zhang, J., Hupfeld, C.J., Taylor, S.S., Olefsky, J.M., and Tsien, R.Y. (2005). Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437, 569-573.
- Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14997-15002.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.

Publications

- **The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation.**

Pauline Vandame, Corentin Spriet, Dave Trinel, Armance Gelaude, Katia Cailliau-Maggio, Coralie Bompard, Emanuele Biondi, & Jean-François Bodart. Cell Cycle, 2014. Sous presse.

The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation.

Authors :

Pauline Vandame, Corentin Spriet, Dave Trinel, Armance Gelaude, Katia Caillau, Coralie Bompard, Emanuele Biondi and Jean-François Bodart

Abstract :

The cyclic adenosine monophosphate dependent kinase protein (PKA) controls a variety of cellular processes including cell cycle regulation. Here, we took advantages of genetically encoded FRET-based biosensors, using an AKAR-derived biosensor to characterize PKA activity during mitosis in living HeLa cells using a single-cell approach. We measured PKA activity changes during mitosis. HeLa cells exhibit a substantial increase during mitosis, which ends with telophase. An AKAREV T>A inactive form of the biosensor and H89 inhibitor were used to ascertain for the specificity of the PKA activity measured. On a spatial point of view, high levels of activity near to chromosomal plate during metaphase and anaphase were detected. By using the PKA inhibitor H89, we assessed the role of PKA in the maintenance of a proper division phenotype. While this treatment in our hands did not impaired cell cycle progression in a drastic manner, inhibition of PKA leads to a dramatic increase in chromosome misalignment on the spindle during metaphase that could result in aneuploidies. Our study emphasizes the insights that can be gained with genetically encoded FRET-based biosensors, which enable to overcome the shortcomings of classical methodologies and unveil *in vivo* PKA spatiotemporal profiles in HeLa cells.

Key Words :

PKA, Cell cycle, Mitosis, FRET based biosensor, chromosome segregation

Introduction:

The cyclic adenosine monophosphate dependent kinase protein (PKA) controls a variety of cellular processes including cell cycle regulation. PKA, in its inactive state, is composed of 4 sub-units: a dimer of regulatory sub-units and a dimer of catalytic sub-units. The binding of a specific ligand to G-protein coupled receptor, leads to the production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by the adenylyl cyclase. The binding of four molecules of cAMP to the regulatory sub-units, induces a conformational change that releases the dimer of catalytic sub-units, corresponding to the active form of PKA, then able to phosphorylate its substrates within the cell ¹.

PKA is dynamically regulated in space and time. Indeed, the phosphodiesterases, enzymes responsible for the degradation of cAMP, are targeted to different sub-cellular compartments. Those enzymes thus create limits of cAMP pools, due to their degradation activities ². The cAMP/PKA signaling is also controlled at a subcellular level by the presence of the A-Kinase Anchor proteins (AKAPs) that differentially target PKA to specific subcellular compartments. Those AKAPs serve as a control mechanisms for signal transduction because PKA is anchored in the vicinity of its targets and can phosphorylate only selected proteins ³.

The cAMP/PKA pathway is specifically implicated in the control of mitosis as it phosphorylates several substrate involved in its progression ⁴. Several lines of evidences have suggested a role for PKA in mitosis. In fact PKA is implicated in the process of chromosomes condensation. Indeed the type II α regulatory sub-units are associated to AKAP95 that is localized to the chromatin during the mitosis of HeLa cells. It has been show that this interaction as well as PKA activity are required to maintain the chromosomes condensation ⁵. In HeLa cells PKA activity seems also required during mitosis because it phosphorylates the histone H1.4 at the Ser35 position resulting in a dissociation of this protein from the chromatin during mitosis. Indeed, PKA inhibition leads to an increased compaction of the chromatin, highlighting its involvement in the regulation of the condensation of the chromosomes during mitosis⁶. Moreover, in yeast, PKA must be inhibited during mitosis in order to promote the activation of the anaphase promoting complex (APC) responsible for the cyclins destruction and involved the sister chromatid segregation⁷. In fact, the purified catalytic subunit of PKA is able to phosphorylate two sub-units of the APC: cdc27 and Tsg24, resulting in a suppression of the APC activation in NIH3T3 cells ⁸. That suggests that PKA activity is required at the onset of mitosis to prevent an early activation of this complex. Finally, the Aurora A kinase, key protein for mitosis progression as it is involved in centrosomes maturation, spindle formation, and as it participate to the cdk1/cyclinB activation, is also a target of PKA. Phosphorylation of Aurora A by PKA induces an increase of its activity suggesting that PKA regulation could be essential during mitosis.

Nevertheless, despite its implication in the control of mitosis, the precise profile of PKA activity during this crucial step of division remains quite elusive. On one hand, early studies have shown that the cAMP level is low during G2 phase and mitosis in HeLa cells and that an artificial increase of the cAMP level at metaphase accelerate the exit of mitosis ⁹. Similarly, in *Xenopus* cycling extracts a low cAMP level is detected at the onset of M-phase ¹⁰. A drop in AMPc level and PKA activity is also known to be requested for M-phase entry and meiotic resumption in *Xenopus* oocytes ¹¹. Noticeably, cell separation in *Saccharomyces cerevisiae* was also observed to be accompanied by AMPc levels changes ¹². In the same way a decrease of PKA activity, correlated to a high PDE4D9 activity, during mitosis was observed in Rat-1 cells ¹³. On the other hand, if one focus on at PKA activity instead of the level of its activator, an increase of the kinase activity has been revealed during the mitosis of Chinese hamster ovary cell. ¹⁴ More recently, in NIH3T3, an increase of PKA activity from the beginning of mitosis until metaphase has been highlighted ⁸.

The influence of the cAMP/PKA on cell proliferation also exhibits a cell-type specificity. Depending on the cell line, the cAMP pathway can for example modulate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade at different levels ¹⁵. As a result, cAMP can inhibit the growth of NIH3T3 cells ¹⁶ while it stimulates the proliferation of the prostate cancer cell line LNCaP ¹⁷. Nevertheless, the numerous types of cAMP/ PKA deregulations found in cancer cells encourage scientists to explore the role of PKA as a therapeutic target for several cancers types (reviewed in ¹⁸). It is thus crucial to understand the PKA activity behavior during the cell cycle and especially during mitosis.

Although the behavior of the cAMP level and PKA activity during mitosis differs depending on the cell lines, as the types of anchored phosphodiesterases and anchor proteins for PKA differ between cell types, one shall also consider that PKA kinase activity could be highly dynamic and tightly regulated in space and time. Kinases studies are often hindered because their activity profiles to experimental conditions may be averaged in a population of cells, making some activity variations undetectable using traditional methods ¹⁹. This is notably the case during the cell cycle, when, even with a good cell synchrony, short events could be undetectable. Moreover as the cell integrity is often lost, spatial information can also be diluted.

To overcome those shortcomings, genetically encoded FRET-based biosensors have been developed in order to visualize protein activity *in vivo* and in single cells. Those Kinase Activity Reporters are composed of two fluorescent proteins suitable for FRET experiment that are flanking a specific substrate of the kinase of interest and a phospho-amino-acid binding domain (PAABD). This PAABD is able to recognize and bind the phosphorylated substrate, allowing a conformational modification that eventually brings the fluorophores close to each other and leads to a measurable FRET signal²⁰⁻²³. Those signals are reversible as the biosensor they can be dephosphorylated by protein phosphatase. In fact, every increase FRET signal increase reflects modification of the kinase/phosphatase activity balance.

Here we took advantages of those tools, using the AKAREV biosensor²³, that directly derives from the well characterized AKAR4²⁴, to assess PKA activity during mitosis in living HeLa cells using a single-cell approach. We have measured the PKA activity during mitosis, revealing high activity near to the chromosomal plate during metaphase independently of any specific localization of the catalytic sub-units. We also demonstrate that this activity is required to maintain a proper division phenotype.

Results

1- PKA activity increases during mitosis

The use of the PKA biosensor AKAREV²³, allowed us to precisely define the timing of PKA activity changes during mitosis in HeLa cells. Cells were synchronized and images were acquired every 5 minutes to calculate FRET ratios and thus activity variations over time. We showed the activity curve and the FRET ratio images for one representative cell (fig 1A, B). Those measurements reveal that PKA activity increased starting from the moment where the cell became round and less adherent, which is a characteristic of the entry in metaphase (t= 3h15 on fig 1AB). This activity stayed high during the mitosis process and finally decreased at the cytokinesis (4h40). In some of the cells we detected a short peak of PKA activity just after cytokinesis (exemplified in fig 1AB), before the return to a basal activity level while the cells reenter in G1 phase.

To further confirm those results we constructed an AKAREV T>A inactive form of the biosensor. It consists in a point mutant version of the biosensor AKAREV: the phosphorylable threonine in the substrate was replaced by an alanine. In this case there is no phosphorylation of the biosensor, and thus no conformational changes that generate FRET signal. We confirmed the loss functionality of AKAREV T>A using 12.5 μ M of forskolin, an activator of the adenylate cyclase, that induces an increase of the production of cAMP and thus of PKA activity. Using forskolin, the original biosensor AKAREV exhibited a strong FRET ratio increase that reached 65%. Contrarily, upon addition of this activator, we observed that cells expressing AKAREV T>A did not show any increase of the YFP/CFP ratio (fig 1D,E).

We thus analyzed the PKA activity variations during mitosis, in comparison with the signals of this negative control biosensor. To get a statistical view of this process, we averaged the YFP/CFP values on several cells at different representative moments based on morphological criteria: prior to mitosis, during mitosis, while cytokinesis occurred and finally when cells returned in G1 phase. This analysis confirmed the increase of PKA activity during metaphase characterized by 24% of FRET ratio increase. This activity decreased at cytokinesis, as showed by FRET ratio decrease to only 11% (fig 1C). As mentioned previously, we detected in early G1 two different behaviors: in some cases a short peak of PKA activity and in other cases, after cytokinesis PKA activity stays low. We hypothesize that

this very brief increase is sometimes not detected because of the temporal resolution, and could explain the intermediate value of 6% obtained for cells in early G1 (fig 1C).

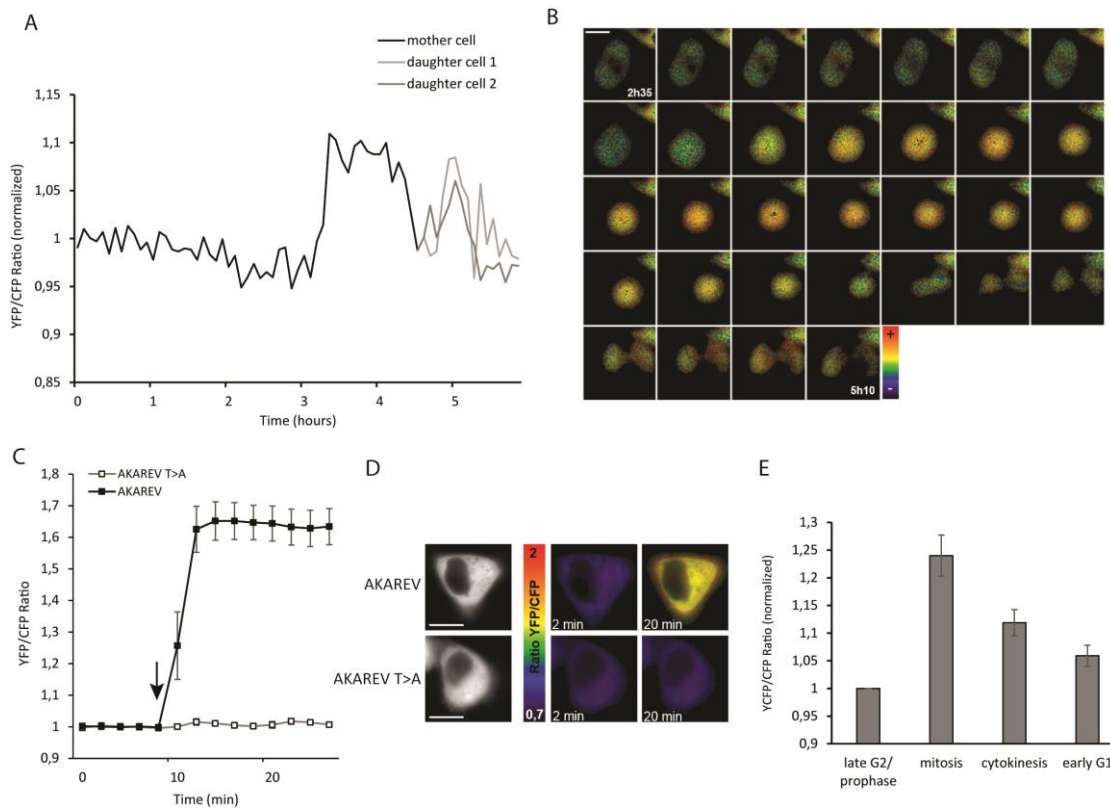


Fig 1: PKA activity increases during mitosis.

YFP/CFP ratio (normalized on the average of the 5 first time point values), corresponding to PKA activity during the mitosis of one representative HeLa cell (black). At $t=4h45$, when the division has occurred, the two curves correspond to each daughter cell (dark grey and light grey) (A). Pseudo color images representing YFP/CFP ratio around mitosis of the same cell from $t=2h35$ to $t=5h10$ (scale bar= $10\mu M$) (B). For the functionality control of the AKAREV biosensor and of the inactive mutant AKAREV T>A, YFP/CFP ratio has been measured before ($t=0$ to 8 min) and after ($t=10$ to 22 min) the addition of forskolin ($12.5 \mu M$) to the imaging medium, ($n=20$ for AKAREV; $n=11$ for AKAREV T>A). An arrow indicates the time point where forskolin was added (C). Representative images for each condition in pseudo color scale (D). Histogram represents the average YFP/CFP ratio of AKAREV ($n=8$) normalized on the values obtained with its inactive mutant AKAREV T>A ($n=8$). This time, all the single curves has been normalized on the late G2/prophase step. Different cell cycle steps were isolated according to morphological criterions: late G2/prophase corresponds to the 5 time points before the cell become round, mitosis corresponds to the moment where the cell is effectively round, cytokinesis corresponds to the moment where the cell stretches out and start the constriction in two daughter cells, and early G1 corresponds to the 5 next points (E).

2- PKA catalytic sub-unit is highly concentrated to the centrosome during prophase and prometaphase

PKA is able to phosphorylate many substrates in the cell. To understand the role of the activity variations during mitosis and their potential effects, we wanted to define if the catalytic sub-units of

PKA, responsible for phosphorylation, were specifically sub-localized during the cell division, in which case this localization could bring insights on the processes or molecules targeted by PKA during mitosis.

Mitotic stages are easily defined using the combination of DNA and spindle staining, by observing both the formation of the division apparatus and the condensation of the DNA. We thus combined DNA, α -tubulin and PKA catalytic sub-unit staining on synchronized HeLa cells (Fig. 2). We observed that the catalytic subunit of PKA showed a granular localization in the whole cell (except where the condensed chromosomes sat and where PKA concentration was lower) all along mitosis. Additionally, in the early phases of mitosis, two dots where PKA was highly concentrated can be distinguished. Those dots were localized where the microtubules converged at both sides of the nucleus in prophase, and right in the middle of the asters in prometaphase (fig 2). Using a centrosomal staining (γ -tubulin) we confirmed that this specific PKA localization corresponds to the centrosomes, and is independent of PKA activity inhibition (data not shown).

So prior to the increase of PKA activity highlighted from metaphase to cytokinesis, PKA is highly concentrated in the centrosomal regions.

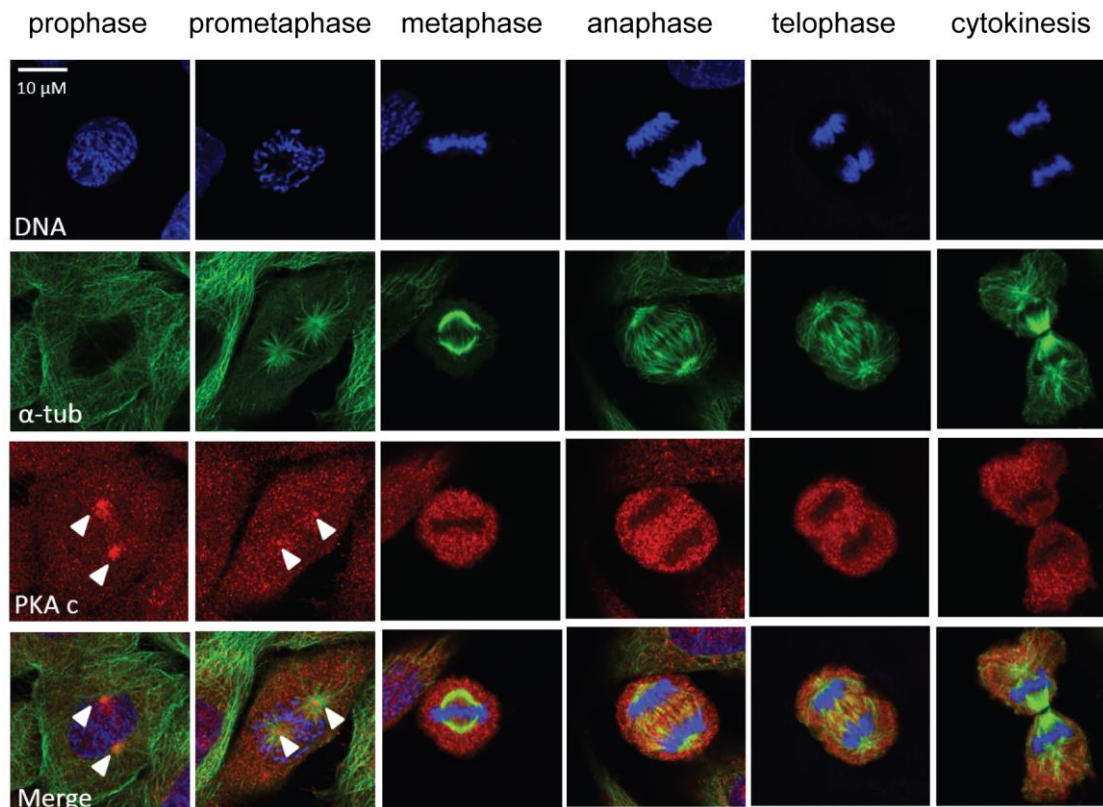


Figure 2: PKA localization during mitosis.

HeLa cells at different mitotic stages from prophase to cytokinesis exhibiting a DNA staining (Hoechst, in blue, upper panel), a spindle staining (α -tubulin, in green, second panel) and a PKA catalytic sub-unit staining (in red, third panel). The lower panel represents the merge of the different channels. White arrows highlight the centrosomal regions where PKA catalytic sub-unit is more concentrated.

3 - PKA activity is high near the chromosomes during metaphase and anaphase

In order to observe PKA activity sub-localization, we performed FRET experiments increasing the spatial resolution as well as adding optical sectioning using confocal microscopy. HeLa cells expressing the biosensor were synchronized using thymidine block and were fixed 9h after their release in fresh medium. In figure 3 are represented intensity images in order to define the different structures inside the mitotic cells (fig 3, left panel) and we applied a pseudo color scale on FRET images that reveals in red the highest activity regions within the cell (fig 3, center and right panel). We also chose to merge the intensity and ratio channels in order to keep to sub-cellular structure information associated with PKA activity (fig 3, right panel). On the zoomed region (fig 3B and 3C) we applied an inverted grey scale, so that on the merge the structure of the condensed DNA was highlighted.

Those experiments show that during metaphase PKA activity is particularly high in the close vicinity of the condensed chromosomes (fig 3A, 3B) in both metaphase and anaphase. In the same way a strong PKA activity is detected near the chromatin during anaphase, while this activity is lower between the two bundles of chromosomes (fig 3C, 3D). Moreover cells expressing the mutant biosensor, or treated with a PKA inhibitor result in the abolition of any sub localization of PKA activity confirming the previous results (fig 3E).

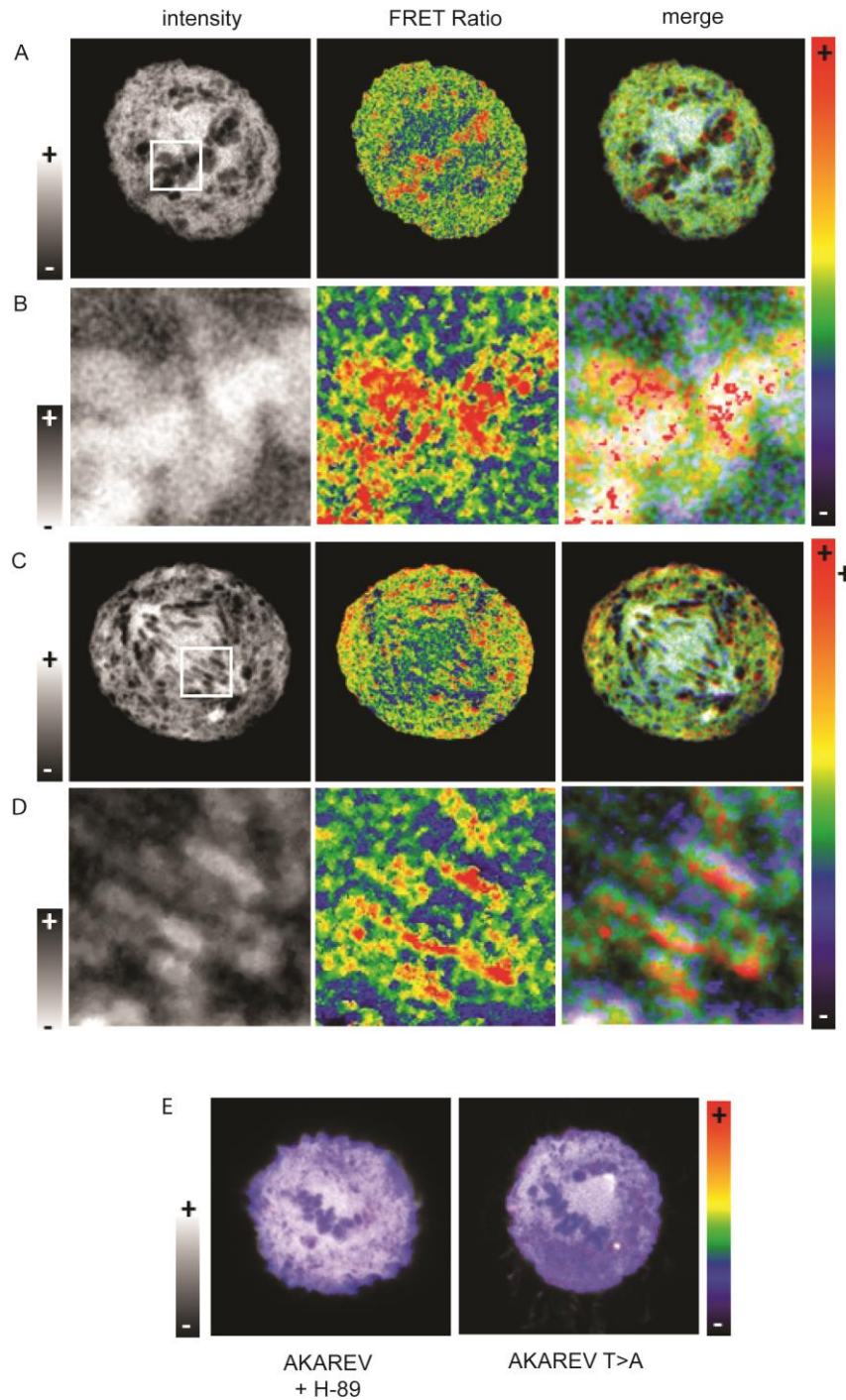


Figure 3: Sub-localization of PKA activity during metaphase and anaphase

Confocal FRET experiment of cells expressing the AKAREV biosensor during metaphase (A) and anaphase (C). White squares define the zoom in regions of the cell in metaphase (B) and in anaphase (D). The left panel is composed of intensity images, the center panel corresponds to the FRET ratio images represented in a rainbow pseudo color scale and the right panel is the merge of the two images. To highlight the chromosome regions where PKA is highly active, we applied an inverted grey lookuptable on the zoom in images (B and D, left panel). Merge of intensity and FRET images in a metaphasic cell expressing AKAREV and treated with H-89 (10 μ M), and another expressing the mutant AKAREV T>A (E).

4- Inhibition of PKA activity induces mitotic defects that do not delay the progression of mitosis

Consistent with our data, according to which PKA plays a role at the centrosome and at the level of the condensed chromosomes during mitosis, several clues in literature also converge in the idea that PKA activity during mitosis is involved in chromosomes positioning.

It was also previously reported that an artificial increase of PKA activity using a cAMP analog during metaphase accelerate the exit of mitosis⁹. Now that we define that, at least in our cell line, mitosis was characterized by an increase of PKA activity from metaphase to cytokinesis, we wanted to observe if preventing experimentally this increase using the PKA activity inhibitor H-89 dihydrochloride, could lead to opposite effects. We thus synchronize the cells in late G2 using a thymidine block followed by a nocodazole block. Cells were then release in presence or absence of 10 μ M of H-89 and fixed 1h and 2 h later.

Using a combination of DNA and spindle staining in confocal microscopy we image hundreds of cells in each conditions and classified them in the different step of mitosis. The repartition of cells through the different steps did not reveal any delay or acceleration in the progression of mitosis compared to the control experiment. As an example, 2h after nocodazole release, in control conditions $64.6 \pm 10.8\%$ of cells exhibited the phenotype of a G1 cell, characterized by the presence of a cytoplasmic bridge between two daughter cells. Upon treatment with the inhibitor, G1 cells represented $57.7 \pm 5.3\%$ of the population, revealing an absence of delay of mitosis when PKA is inhibited (fig 4B). Nevertheless it appeared that cells that have been treated with the PKA inhibitor exhibited improper phenotype in metaphase, such as a chromosome that have already migrated to one of the spindle pole, or anarchic alignment of chromosomes whereas the spindle was already perfectly formed (fig 4A). We quantified the proportion of cells with those kinds of mitotic defects and the results showed that up to 63% of metaphases exhibited strong defects (fig 4C). As the respect of the proper alignment of the DNA on the mitotic spindle preserves cells from aneuploidy, those results suggest that the increase of PKA activity during mitosis could be involved in chromosomal stability.

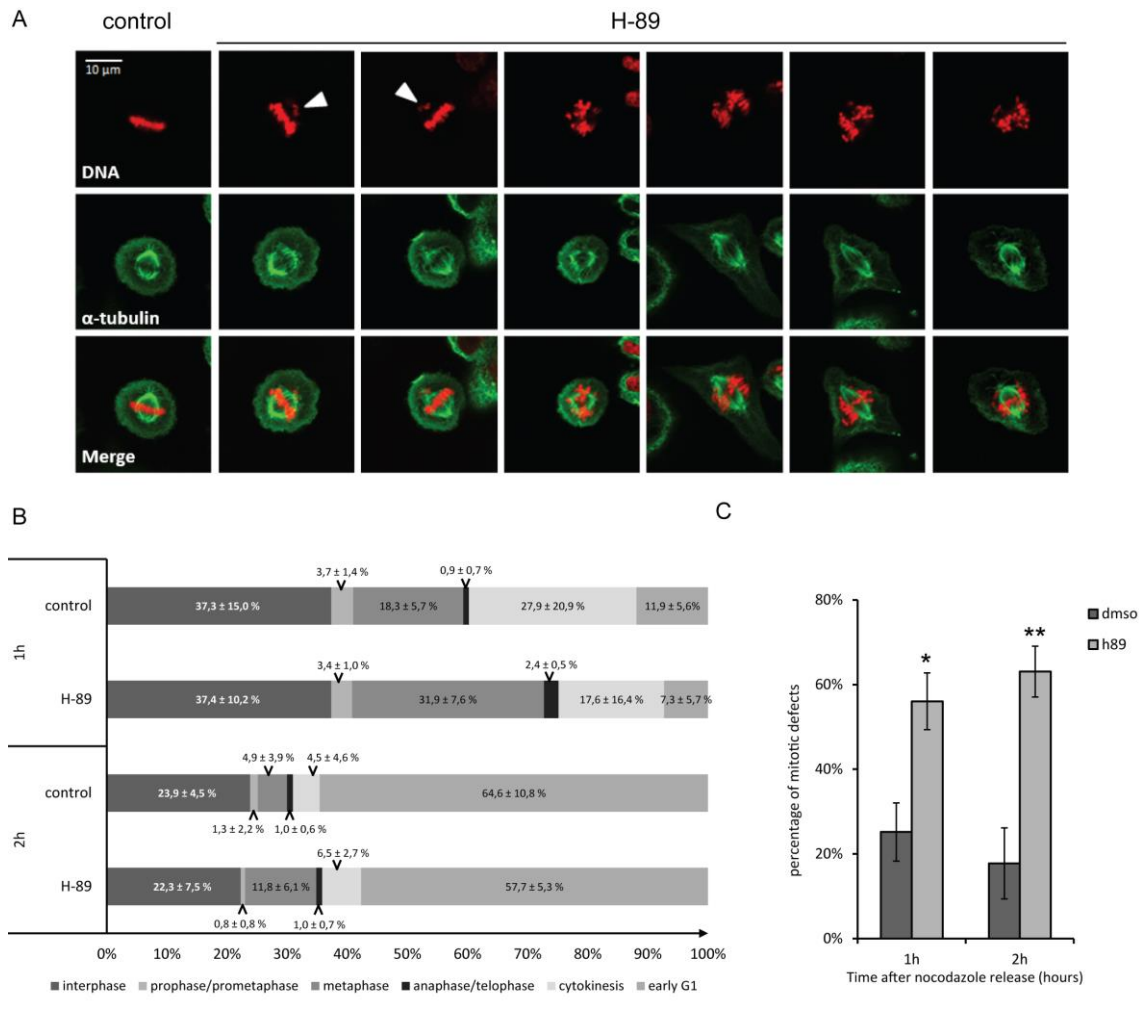


Figure 4: Effets of PKA inhibition using H-89 during mitosis

Immunostaining of metaphasic HeLa cells synchronized using thymidine-nocodazole blocks. DNA was stained using Hoechst (upper panel, in red), spindle was stained using an α -tubulin antibody (second panel, in green). The lower panel represent the merge of the two channels. First column shows a metaphase in control conditions, the next columns show different kind of mitotic phenotypes observed upon inhibition of PKA activity using H-89 (10 μ M). White arrows highlight chromosomes or pieces of DNA that have migrated precociously (A). Percentage of cells in each phase of mitosis defined according to phenotype, at 1 hour and 2 hour after release from a thymidine-nocodazole synchrony, in control and h-89 treated conditions (total number of cell measured on 4 independent experiments: $n=663$, $n=632$, $n=754$ and $n=1195$ for respectively control condition after 1h and 2h, H-89 condition after 1h and after 2h)(B). Percentage of mitotic defects observed in control and H-89 treated cells. Stars represent p -values obtained on a student t -test performed on the results of the four experiments with * < 0.05 and ** < 0.01 (C).

Discussion

In this study we highlighted the *in vivo* dynamics of PKA activity during mitosis using FRET-based biosensors. We have shown that at the onset of mitosis, that in prophase and prometaphase, the catalytic sub-unit of PKA is highly localized at the centrosomes, but this specific localization is lost in the next steps of mitosis. The entry in metaphase is associated with a rapid increase of PKA activity

that stays elevated until the cell effectively divides in two daughter cells during cytokinesis. Moreover we have been able to detect that during metaphase and anaphase, PKA activity is the highest in the vicinity of the duplicated chromosomes. If the FRET-based biosensor was able to reveal PKA activity during mitosis, one shall not neglect the impact of phosphatase during this process. Indeed, intensities measured reflect the changes of a kinase/phosphatase activity balance. Finally we demonstrate that the inhibition of PKA activity prior to mitosis leads to abnormal mitotic phenotypes thus suggesting that the upkeep of PKA activity during mitosis is involved in the maintenance of the chromosomal stability.

Previous works already pointed out a link between PKA activity and chromosomal stability²⁵. For example in mouse hepatoma cells BW1J, the type I regulatory sub-units (RI) as well as the catalytic subunits of PKA colocalize with the tubulin at the mitotic spindle. Moreover overexpression of the α sub-type (RI α) as well as expression of a RI α mutant that acts as a dominant negative of PKA activity lead to an increase of the proportion of cells possessing a spindle that exhibits more than two poles²⁶. Furthermore, PKA is able to phosphorylate oncoprotein 18 (also called stathmin), a microtubules destabilizing protein whose activity is negatively regulated by phosphorylation at the onset of mitosis in order to allow the formation of the mitotic spindle^{27, 28}.

Centrosomes are essential to ensure the fidelity of chromosomes segregation as they guide microtubules within the organization of a bipolar spindle. Consistently with our data exhibiting a high concentration of PKA at the centrosomes (fig 2), it has been shown that several AKAPs are able to target PKA to those organelles such as AKAP350, AKAP450, CG-NAP and also pericentrin²⁹. As a necessary component of the centrosomal matrix, pericentrin is involved in the organization of the mitotic spindle by interacting with dynein and γ -tubulin. Very interestingly, this protein, that co-immuno precipitate with both PKA catalytic and type II regulatory sub-units (RII), is highly phosphorylated upon an elevation of PKA activity^{30, 31}. Moreover, removal of PKA anchoring in the cells leads to spindles defects²⁹. It has also been shown that the cAMP level at the centrosome increases during mitosis and come with an increase of PKA activity in this zone³². PDE4D3 is a phosphodiesterase that degrades cAMP specifically localized at the centrosome. Using an inactive mutant of PDE4D3, it was shown that disrupting the centrosomal microdomain of the low cAMP level reported in interphase drives a local increases of the level of cAMP and accumulation of the cells in prophase³². As previously mentionned, several different AKAPs target PKA to this compartment, which reinforces the idea of multiple roles and/or targets of PKA at the centrosome and thus its requirement.

In this study we observed that PKA activity is increased near the condensed DNA, and that inhibition of the global activity of PKA inside the cell also leads to mitotic defects (fig 3 and fig 4). Nevertheless we did not observe spindle defects such as multi-polar spindles. Our data mostly included misalignment of chromosomes on the metaphase plates when PKA activity is switched off. We then speculated that PKA could affect the attachment of the DNA on the spindle and thus the kinetochores functions or the segregation of the sister chromatids. Indeed, in yeast, dosage suppression experiments have revealed a genetic link between PKA signaling and kinetochores. In this model overexpression of PKA negative regulators is able to rescue the viability of kinetochore genes mutants³³. Moreover the deletion of BCY1, a negative regulator of PKA, leads to a strong increase of the chromosome loss rate, involving the attenuation of PKA signaling as a contribution to kinetochore functions³⁴. While our experiments also demonstrate that the inhibition of PKA leads to mitotic defects (fig 4), we hypothesized that PKA activity should be comprised in a permissive interval (not too high but not too low) in order to favor a proper cell division.

Moreover PKA is also involved in the regulation of the Anaphase Promoting Complex that plays an important role in sister chromatids segregation. PKA must be inhibited during mitosis in order to promote the activation of this complex³⁵. We can hypothesize that PKA inhibition allows the cells to by-pass the metaphase/anaphase checkpoint. Further experiment about the how PKA activity could also affect this checkpoint activation in such context could bring essential information to understand the involvement of this kinase in chromosomal stability.

In conclusion, as a member of the family of signaling molecules, PKA is able to phosphorylate multiples targets including several crucial proteins required for mitosis and maintenance of genetic integrity by preserving or acting on centrosomes and kinetochores functions as well as sister chromatids segregation or DNA condensation. All the elements, previously mentioned are converging to the idea of a precise spatial but also temporal regulation of PKA activity within the cell during mitosis. We provide here a precise overview of PKA spatio-temporal dynamics, in HeLa cells, during mitosis, that appears essential to understand the way the different specific effects of PKA are associated in the regulation of cell division.

Materials and Methods

Chemical reagents and Antibodies

Thymidine (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1895>), Nocodazole (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m1404>) and the PKA inhibitor H-89 dihydrochloride (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1427>) were from Sigma and used respectively at 2.5 mM, 100 nM and 10 μ M. Forskolin was purchased from Tocris Bioscience and used at 12.5 μ M (<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=2337>). Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse was purchased from Sigma (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t6199>), Anti-cAMP Protein Kinase Catalytic subunit antibody was from Abcam (<http://www.abcam.com/camp-protein-kinase-catalytic-subunit-antibody-ab26322.html>). Alexa conjugated secondary antibodies produced in donkey were purchased from Invitrogen and we used specifically an anti-mouse IgG-alexa488 (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A21202?CID=search-a21202>) and an anti-rabbit IgG-alexa594 (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A21207?CID=search-a21207>). Hoechst 33242 was purchased from Molecular Probes, Life Technologies.

Plasmids

The plasmid containing the AKAREV biosensor sequence has been provided by Dr Jun-ichi Miyazaki²³. The mutated biosensor AKAREV T>A was constructed by site directed mutagenesis according to the procedure described by Sawano and Miyawaki³⁶ using the reverse primer 5' GCCGTCAACCAGCGCCGCGCCTCAATC 3'.

Cell culture, transfection and synchrony

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum and antibiotics (100 units/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin) at 37 °C with 5% CO₂. Cells were seeded on 10 mm or 32 mm coverslips in six-well plates and grown to reach 30-50% of confluency. For FRET experiment, cells were then transfected with 1.5 μ g of DNA per well using FuGENE HD (Roche) transfection reagent.

Cells were synchronized using 2.5mM of thymidine during 20h, and were then released into fresh media to progress from S phase to mitosis (9h). Depending on the experiment, an additional step of

synchrony, prior to the mitosis, have been performed using a 100 nM nocodazole incubation during 4h.

Immuno-fluorescence staining

Cells on coverslips were fixed with paraformaldehyde 4% for 30 min, then washed and permeabilised using a 0.5% Triton-100X for 5 min. Then cells were incubated 1h in a blocking solution containing 2% Foetal calf serum, 5% donkey serum, and 2% Bovine serum albumin (PKAc and α -tubulin antibodies) or 2% Bovine serum albumin (γ -Tubulin antibody). Cells were then incubated for 2h with primary antibodies diluted respectively at 1/500, 1/700 and 1/2000 for PKAc (rabbit), α -tubulin (mouse) and γ -Tubulin (rabbit). After washing, cells were incubated with the appropriate secondary antibodies: IgG anti-mouse conjugated to alexa 488 and IgG anti-rabbit conjugated to alexa 594. Cells were then washed and incubated with Hoechst (2uM, 10min). Finally coverslips were mounted on slides using Mowiol 488 mounting medium and sealed with clear nail polish.

Time lapse FRET imaging

Time lapse experiment were performed on cells in supplemented DMEM without red phenol for long term experiments or in Leibowitz medium (L-15) for short term experiments, on a thermostatted (37 °C) inverted Leica AF6000 videomicroscope (Leica Microsystem) with 63 $\times$ 1.3 NA glycerin-immersion objective. Fluorescence excitation was performed with a 427 ± 10 nm bandpass filter through a double band dichroic mirror (440/520 nm). To avoid displacements between donor and acceptor's fluorescence measurements, we used fast detection filter wheel (respectively with 472 ± 30 nm and 542 ± 27 nm bandpass filters)

Confocal microscopy

Images were acquired on a Nikon A1R confocal microscope using a 60x 1.4 NA oil-immersion objective. For immuno-staining experiments, fluorescence excitation was performed sequentially at 404, 488 and 561 nm and signal were respectively detected at 450 ± 50 , 525 ± 50 and 595 ± 50 . For FRET experiment, excitation was performed at 404 nm and signals were detected simultaneously at 450 ± 50 and 525 ± 50 nm.

FRET Analysis

FRET ratios from widefield microscopy experiment were calculated with an ImageJ and a Matlab routine developed according to the procedure described previously by Kardash and coworkers³⁷. For more details about the system implementation and application, see²². The same strategy has been used for confocal FRET images except concerning the background subtraction that was realized manually.

Acknowledgements

Pauline Vandame is granted by the University of Lille 1 and the Region Nord-Pas-de-Calais. We thank the personal of the BICeL-Lille1-HB Facility for access to the microscopy systems and technical advices. We also thank, Jun-ichi Miyazaki as source for the material. We are also grateful to Alain Martoriati for discussion and comments, and we thank Arlette Lescuyer and Franck Riquet for their technical assistance.

1. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:9-22.
2. Lefkimmiatis K, Zaccolo M. cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacol Ther* 2014.
3. McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 2006; 12:317-23.
4. Ferrari S. Protein kinases controlling the onset of mitosis. *Cell Mol Life Sc* 2006; 63:781-95.
5. Collas P, Le Guellec K, Tasken K. The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *J Cell Biol* 1999; 147:1167-80.
6. Chu CS, Hsu PH, Lo PW, Scheer E, Tora L, Tsai HJ, Tsai MD, Juan LJ. Protein kinase A-mediated serine 35 phosphorylation dissociates histone H1.4 from mitotic chromosome. *J Biol Chem* 2011; 286:35843-51.
7. Yamashita YM, Nakaseko Y, Samejima I, Kumada K, Yamada H, Michaelson D, Yanagida M. 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. *Nature* 1996; 384:276-9.
8. Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1998; 1:371-80.
9. Zeilig CE, Johnson RA, Sutherland EW, Friedman DL. Adenosine 3':5'-monophosphate content and actions in the division cycle of synchronized HeLa cells. *J Cell Biol* 1976; 71:515-34.
10. Grieco D, Avvedimento EV, Gottesman ME. A role for cAMP-dependent protein kinase in early embryonic divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9896-900.
11. Wang J, Cao WL, Liu XJ. Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. *Cell Cycle* 2006; 5:213-7.
12. Smith ME, Dickinson JR, Wheals AE. Intracellular and extracellular levels of cyclic AMP during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1990; 6:53-60.
13. Sheppard CL, Lee LC, Hill EV, Henderson DJ, Anthony DF, Houslay DM, Yalla KC, Cairns LS, Dunlop AJ, Baillie GS, et al. Mitotic activation of the DISC1-inducible cyclic AMP phosphodiesterase-4D9 (PDE4D9), through multi-site phosphorylation, influences cell cycle progression. *Cell Signal* 2014; 26:1958-74.
14. Costa M, Gerner EW, Russell DH. Cell cycle-specific activity of type I and type II cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1976; 251:3313-9.
15. Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 2002; 12:258-66.
16. Chen J, Iyengar R. Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated G alpha s. *Science* 1994; 263:1278-81.
17. Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ, Cox ME. Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21:8471-82.
18. Caretta A, Mucignat-Caretta C. Protein kinase a in cancer. *Cancers (Basel)* 2011; 3:913-26.
19. Sample V, Mehta, S., and Zhang, J. Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of Cell Science* 2014; 127:1151-60.
20. Zhang J, Allen MD. FRET-based biosensors for protein kinases: illuminating the kinome. *Mol Biosyst* 2007; 3:759-65.
21. Sipietier F, Vandame P, Spriet C, Leray A, Vincent P, Trinel D, Bodart JF, Riquet FB, Heliot L. From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 113:145-216.
22. Vandame P, Spriet C, Riquet F, Trinel D, Cailliau-Maggio K, Bodart JF. Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements. *Sensors (Basel)* 2013; 14:1140-54.

23. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, Matsuda M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 2011; 22:4647-56.
24. Depry C, Allen MD, Zhang J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst* 2011; 7:52-8.
25. Matyakhina L, Lenherr SM, Stratakis CA. Protein kinase A and chromosomal stability. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 968:148-57.
26. Imaizumi-Scherrer T, Faust DM, Barradeau S, Hellio R, Weiss MC. Type I protein kinase a is localized to interphase microtubules and strongly associated with the mitotic spindle. *Exp Cell Res* 2001; 264:250-65.
27. Larsson N, Marklund U, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17:5530-9.
28. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004; 93:242-50.
29. Diviani D, Scott JD. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 2001; 114:1431-7.
30. Diviani D, Langeberg LK, Doxsey SJ, Scott JD. Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr Biol* 2000; 10:417-20.
31. Lutz W, Lingle WL, McCormick D, Greenwood TM, Salisbury JL. Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J Biol Chem* 2001; 276:20774-80.
32. Terrin A, Monterisi S, Stangherlin A, Zoccarato A, Koschinski A, Surdo NC, Mongillo M, Sawa A, Jordanides NE, Mountford JC, et al. PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J Cell Biol* 2012; 198:607-21.
33. Ma L, Ho K, Piggott N, Luo Z, Measday V. Interactions between the kinetochore complex and the protein kinase A pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* 2012; 2:831-41.
34. Magtanong L, Ho CH, Barker SL, Jiao W, Baryshnikova A, Bahr S, Smith AM, Heisler LE, Choy JS, Kuzmin E, et al. Dosage suppression genetic interaction networks enhance functional wiring diagrams of the cell. *Nat Biotechnol* 2011; 29:505-11.
35. Yanagida M, Yamashita YM, Tatebe H, Ishii K, Kumada K, Nakaseko Y. Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354:1559-69; discussion 69-70.
36. Sawano A, Miyawaki A. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E78.
37. Kardash E, Bandemer J, Raz E. Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat Protoc* 2011; 6:1835-46.

- **Optimization of ERK activity biosensors for both ratiometric and lifetime FRET measurements.**

Pauline Vandame, Corentin Spriet, Franck Riquet, Dave Trinel, Katia Cailliau-Maggio, & Jean-François Bodart. Sensors 14(1):1140-54. 2013.

Article

Optimization of ERK Activity Biosensors for both Ratiometric and Lifetime FRET Measurements

Pauline Vandame ^{1,2}, Corentin Spriet ², Franck Riquet ^{1,2}, Dave Trinel ², Katia Cailliau-Maggio ¹ and Jean-François Bodart ^{1,2,*}

¹ Laboratoire de Régulation des Signaux de division, EA4479, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 147, Site de Recherche Intégré en Cancérologie (SIRIC) ONCOLILLE, University Lille1, Villeneuve d'Ascq F-59655, France; E-Mails: pauline.vandame@ed.univ-lille1.fr (P.V.); franck.riquet@iri.univ-lille1.fr (F.R.); Katia.Maggio@univ-lille1.fr (K.C.-M.)

² Interdisciplinary Research Institute, USR3078 CNRS, Université Lille Nord de France, 50 avenue de Halley, Villeneuve d'Ascq Cedex F-59558, France; E-Mails: corentin.spriet@iri.univ-lille1.fr (C.S.); dave.trinel@iri.univ-lille1.fr (D.T.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Jean-Francois.Bodart@univ-lille1.fr; Tel.: +33-3-2043-6867.

Received: 8 November 2013; in revised form: 6 December 2013 / Accepted: 19 December 2013 /

Published: 10 January 2014

Abstract: Among biosensors, genetically-encoded FRET-based biosensors are widely used to localize and measure enzymatic activities. Kinases activities are of particular interest as their spatiotemporal regulation has become crucial for the deep understanding of cell fate decisions. This is especially the case for ERK, whose activity is a key node in signal transduction pathways and can direct the cell into various processes. There is a constant need for better tools to analyze kinases *in vivo*, and to detect even the slightest variations of their activities. Here we report the optimization of the previous ERK activity reporters, EKAR and EKAREV. Those tools are constituted by two fluorophores adapted for FRET experiments, which are flanking a specific substrate of ERK, and a domain able to recognize and bind this substrate when phosphorylated. The latter phosphorylation allows a conformational change of the biosensor and thus a FRET signal. We improved those biosensors with modifications of: (i) fluorophores and (ii) linkers between substrate and binding domain, resulting in new versions that exhibit broader dynamic ranges upon EGF stimulation when FRET experiments are carried out by fluorescence lifetime and ratiometric measurements. Herein, we characterize those new biosensors and discuss their observed differences that depend on their fluorescence properties.

Keywords: genetically-encoded biosensor; ERK; FRET

Abbreviation List

72 gly: 72-glycine linker

AKAR3: A Kinase Activity Reporter 3

AKAR4: A Kinase Activity Reporter 4

cAMP: cyclic Adenosine Mono Phosphate

CFP: Cyan Fluorescent Protein

CpVenus172: Circularly permuted Venus in position 172

eCFP: Enhanced Cyan Fluorescent Protein

EGF: Epidermal Growth Factor

eGFP: enhanced Green Fluorescent Protein

EKAR: Extracellular signal-regulated Kinase Activity Reporter

EKAR-Cer-CpV: EKAR-Cerulean-Circularly permuted Venus

EKAREV: Extracellular signal-regulated Kinase Activity Reporter Enhanced Visualization

EKAREV-TVV: EKAREV-Turquoise-CpVenus-Venus

EKAR-TVV: EKAR-Turquoise-CpVenus-Venus

FHA2: Forkhead-Associated 2

FLiM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FP: Fluorescent Protein

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

GFP: Green Fluorescent Protein

KSR: Kinase Suppressor of Ras

MAPK/ERK: Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular signal-regulated kinase

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MEK: MAPK/ERK protein Kinase

Miu2: MAPK Indicator Unit ERK2

NGF: Nerve Growth Factor

PAABD: PhosphoAminoAcid Binding Domain

PKA: Protein Kinase A

TEPACVV: Turquoise Exchange Protein directly Activated by cAMP CpVenus-Venus

WW domain: Tryptophan (W) repeated domain

YFP: Yellow Fluorescent Protein

1. Introduction

How a cell can integrate numerous external signals to elicit a specific and adapted response with only a limited number of signaling effectors remains a puzzling question. These effectors are finely tuned and regulated by post-translational modifications, including phosphorylation, which in turn is able to control subcellular localization and activity. Intensity and duration of the phosphorylation

depend on the equilibrium between the activities of kinases and phosphatases, as well as on the crosstalk and connectivity established between pathways. All together, these parameters ensure appropriate and specific cell decisions.

Among the signaling cascades of phosphorylated molecules, which are dedicated to conveying information and integrating extracellular signals, the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) signaling network stands out [1,2]. Each MAPK signaling chain is a three tier cascade in which the upstream kinase (MEKK) phosphorylates and activates a second one (MEK), which in turn, phosphorylates and activates a third kinase (MAPK). The MAPK/ERK cascade successively enrolls MOS or Raf, MEK1/2, Extracellular Regulated Kinase (ERK) 1/2 that activates by phosphorylation a plethora of substrates within the cytoplasm and the nucleus, as effectors involved in the physiological response and phenotypical outcome. These substrates include transcription factors, kinases and phosphatases, signaling proteins, cytoskeletal proteins, proteinases and apoptotic proteins [3]. These substrates can be expressed in a cell specific type manner, but their activation also relies on threshold effects, therefore, the duration and amplitude of ERK activity level are crucial for signal integration. Depending upon the presence of feedbacks, the cascade may display different kinds of temporal responses affecting the resulting phenotypes. Indeed, distinct profiles of ERK activation in response to different growth factors were revealed in PC12 cells: EGF stimulation leads to a transient ERK activation, whereas NGF induces a sustained activation [4]. Network rewiring can also drive an abrupt ERK response in models like *Xenopus* oocytes, where feedback loops and feedforward loops elaborate physical properties like ultrasensitivity, bistability and irreversibility [5–7]. Spatial regulation also participates in proper signal propagation. Several scaffolding proteins that bind the components of the MAPKs cascade have been identified. They participate in anchoring the kinases and can promote their activation in different cell compartments. For example Sef1 localizes MEK on the Golgi membrane and KSR assembles the three members at the plasma membrane following the pathway stimulation [8].

During the past two decades, new tools have emerged concomitantly to the discovery of GFP. Among these tools, genetically encoded enzyme activity reporters based on Förster Resonance Energy Transfer (FRET) imaging have become more and more attractive due to their ability to sense and report the level of several analytes such as second messengers, ions or protein activity in living cells or tissues [9]. FRET is a non-radiative energy transfer between a pair of fluorophores. The energy transfer depends on the spectral overlap between the emission and excitation spectra, and the relative orientation of the so-called donor and acceptor. This energy transfer can only occur if donor and acceptor are in close vicinity. Genetically encoded enzyme activity reporters based on FRET are biosensors, since the latter term include systems composed of at least two parts: one part that specifically recognized an analyte, and a second part which “transduces” and conveys the signal from the recognition site toward an adapted instrument collecting a measurable signal.

Kinase activity biosensors are constituted by two fluorophores adapted for FRET experiments. Those fluorophores are flanking a specific peptide substrate of ERK and a domain recognizing and binding this peptide substrate when phosphorylated. The latter recognition allows a conformational change of the biosensor and thus a FRET signal.

Upon FRET several properties of light are modified and can be measured. The emission intensity of the donor fluorophore decreases, while emission intensity of the acceptor increases. In this way FRET can thus be evaluated by dividing the YFP signal by the CFP signal. An increase of this YFP/CFP ratio

thus corresponds to an increase of kinase activity and *vice versa* [10]. The lifetime of the donor fluorophore is also affected by a FRET event and decreases upon kinase activity.

The purpose of optimizing such tools directly relies on kinase activity behavior. In fact, in some biological processes, kinase activity changes are too low to be detected with the existing biosensors. This depends directly on an intrinsic property of the biosensor called the dynamic range, which corresponds to the maximal difference of “FRET value” between two conditions: when there is no kinase activity and thus no phosphorylation of the biosensor and when kinases are fully activated and thus biosensors are folded and give a strong signal. Dynamic range corresponds thus to the ability of the biosensor to give a measurable FRET signal even when kinase activity is low.

Regarding MAPK/ERK signaling pathway, the first FRET-biosensor designed was named Miu2 (for MAPK Indicator Unit ERK2) [11]. This biosensor used the conformational change of ERK occurring upon the binding of its activator MEK. Miu2 was made up with a FRET pair (CFP and YFP) flanking the *Xenopus* ERK2 sequence, from which they were spaced by short linkers of two and three aminoacids. When the MAPK/ERK pathway cascade is recruited by an external signal, activated MEK binds to endogenous ERK as well as the ERK enclosed within the sensor in order to achieve phosphorylation. This binding lead to a modification of ERK conformation within Miu2, bringing closer the two fluorophores and therefore noticeably increasing the FRET signal. However, Miu2 expression acts as an overexpression of ERK2, which is a disadvantage because ERK2 overexpression disturbs cellular processes like in the case of stimulation of proliferation in human hepatocellular carcinoma study [12]. Moreover if Miu2 reflects MEK activity and MEK-ERK interaction it does not reflect *per se* ERK activity. This last issue was resolved in 2007 with the engineering of Erkus [13], whose principle was quite different from Miu2, since the latter is based on the interaction between a phosphorylated substrate with a domain recognizing this phosphorylation. Erkus was built using the same fluorophore pair as Miu2, but these fluorophores were flanking a short amino acid sequence, corresponding to a specific target of ERK (threonine 669 within the Epidermal Growth Factor Receptor), followed by the FHA2 (Forkhead-Associated 2) domain, which binds to phosphorylated threonine residues. Moreover, an ERK docking motif was introduced at the end of the acceptor fluorophore sequence, to increase the affinity of ERK to the biosensor. Upon ERK activation, the substrate is phosphorylated and then recognized by the phospho-aminoacid binding domain (PAABD), leading to a conformational change that allows FRET phenomenon between the fluorophores. Such a process remains reversible upon the action of specific phosphatases or inhibition of kinase activity [13].

In 2008, another ERK biosensor named Extracellular-regulated Kinase Activity Reporter (EKAR) was published by Harvey and collaborators [14], taking advantages of the elements of Erkus but adapting each component. EKAR FRET pair was composed of a CFP variant (mCerulean) and of a YFP variant (mVenus), since constant progress in FPs engineering allows for an improved FRET efficiency by changing the fluorophore pair of a biosensor. Alternatively a biosensor was made up using another couple, eGFP and mRFP. The flanked sequence by the fluorophores includes in that case: (i) a partial sequence of the Cdc25C substrate containing the threonine 48 residue [2,15]; (ii) a WW domain, which replaced the FHA2 domain and also recognizes phosphorylated threonine residues but with an increased affinity for the proline-rich sequence; (iii) a linker constituted of 72 glycine residues was inserted between these two parts in order to improve the flexibility and favor the folding of the biosensor. The resulting EKAR revealed higher FRET variation than Erkus and Miu2. Finally in

2011, Komatsu and collaborators developed an optimized backbone for the generation of activity reporters [16]. The major characteristic of this backbone was the development of an improved linker whose length was optimized in order to favor the energy transfer between the two FRET pairs (e.g., ECFP/YPet or Turquoise-GL/YPet). Thus, development of ERK biosensors reflects the constant need for optimized tools to analyze kinase behaviors during cellular processes. It relies notably on optimizing their dynamic range. It corresponds to the maximal interval of variation that can be obtained by measuring the FRET level when there is no kinase activity and upon a strong stimulation of kinase activity. Thus, an increased dynamic range that allows detecting finer variations will increase our understanding of protein dynamics and cell fate decisions.

The dynamic range of the preexisting MAPK biosensors to be optimized is directly associated with FRET efficiency [9], which, in the case of a biosensor, relies: (i) from a structural point of view, on the folding of the biosensors when phosphorylated/dephosphorylated (*i.e.*, orientation factor, distance between fluorophores) and (ii) from a photophysical point of view, on the fluorophores' properties (*i.e.*, quantum yield, overlap integral). Two fluorescence properties, modified by FRET, are measured: fluorescence emission is monitored by ratiometric measurements while fluorescence lifetime is measured in Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-FRET (FLiM-FRET). Here we report new ERK biosensors, namely EKAR-Cep-CpV, EKAR-TVV and EKAREV-TVV, modified from the two last generation of biosensors EKAR and EKAREV [14,16]. Those new probes have been tested and compared with two different FRET techniques, fluorescence intensity and lifetime based measurements, in order to provide the most versatile ERK activity biosensor.

2. Experimental Section

2.1. DNA Constructs

Three different constructs were produced based on EKAR and EKAREV sequences [14,16], taking benefit of recent tandem fluorophores [17,18], and named accordingly to their structural elements. EKAR-Cer/CpV was generated by subcloning the coding sequence of the molecular recognition element (eg: docking domain followed by phospho-aminoacid binding domain, 72-Gly linker and substrate) of *prK5 cEKAR* [14], inserted between the two fluorophore sequences of the pcDNA3 AKAR4 [18]. First the AKAR4 coding sequence was sub-cloned into a pCS2 vector using BamHI/EcoRI. The BamHI unique restriction site of pcDNA3 was deleted by Klenow fill-in. Second, a BamHI restriction site was reintroduced at the 3' extremity of the Cerulean coding sequence by site-directed mutagenesis using the 5'-CTGTTCTTGAGAAACTTATGGATCCGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3' primer. The obtained plasmid contains thus two unique restriction sites BamHI and SacI flanking the whole sequence between the two fluorophores of AKAR4. The molecular recognition element of *prK5 cEKAR* was amplified by PCR using the sense-oligonucleotide 5'-AGCGGATCCATATGGCGGACGAGGAGAAGC-3' and the antisense-nucleotide 5'-CATGAGCTCGATATCCCGGGCCCGCGG-3' containing, respectively, one BamHI and one SacI restriction site. The resulting fragment was then subcloned into the pCS2 AKAR4 vector using BamHI/SacI enzymes.

2.2. EKAR-TVV

This was generated using the same kind of strategy: sub-cloning the sequence of the molecular recognition element of EKAR [14] between the FRET pair sequence of another biosensor named ^TEPAC^{VV} [17]. The whole sequence between the fluorophores of the pCDNA3 ^TEPAC^{VV} is surrounded by two unique restriction enzymes EcoRV and NheI. Because those restriction sites were already present in the coding sequence of EKAR, we proceed to a multisites-directed mutagenesis to delete those sites by introducing two silent mutations in EKAR with two primers: 5'-GGAGGAGGAG GAGCCAGCGGCGG AGGTGG-3' and 5'-GCGGGCCCCGGGACATCATGGTGAGCAAGG-3'. The molecular recognition element sequence of prK5 cEKAR was then amplified by PCR using the sense-oligonucleotide 5'-CGAT ATCTCCGGATCCATATGGCGGACGAG-3' and the antisense-nucleotide 5'-CGCTAGCGATGTCC CGGGCCCCGCGGG-3' containing respectively EcoRV and NheI. The resulting fragment was then sub-cloned into the pCDNA3 ^TEPAC^{VV} vector.

2.3. EKAREV-TVV

As the FRET pair used in the second construction gives us good results, we tried to optimize it with an improved linker named EV-linker contained in another MAPK biosensor EKAREV [16]. The major difference between the two first generations of MAPK biosensors [14,16] consists in a linker variation between the MAPK substrate and the WW domain which serves as phosphor amino-acid binding domain. To obtain a sensor containing both the FRET pair mTurquoise and CpVenus172-Venus and the EV-linker we amplified the whole sequence surrounded by the fluorophores of EKAR-EV by PCR using the following primers 5'-CGATATCTCGAGATGGCGGACGAGGAGAAG-3' and 5'-CGCT AGCGCGG CCGCCCGGAAATTG-3' containing EcoRV and NheI restriction sites, respectively. The PCR fragment obtained was once again sub-cloned between the fluorophores of the pCDNA3 ^TEPAC^{VV}. The same procedure was used to obtain the negative control sensor. We amplified the mutated (Threonine to Alanine within the substrate) EKAREV and sub-cloned this fragment into the pCDNA3 ^TEPAC^{VV}.

2.4. Cell Culture, Transfections and Chemicals

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum and antibiotics (100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin) at 37 °C with 5% CO₂. Cells were seeded on 32 mm coverslips in six-well plates and grown to reach 50% of confluency. Cells were then transfected with 1 µg of DNA per well using FuGENE HD transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany). Twenty four hours later, cells were starved in DMEM with 0.5% FCS overnight. Prior to images acquisition, DMEM was removed and cells were placed in L-15 buffered medium. Epidermal Growth Factor (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was resuspended in PBS and used at 100 ng/mL final concentration. MEK inhibitor U0126 dihydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) was resuspended in DMSO and used at the final concentration of 50 µM.

2.5. Ratiometric Measurements

Cells on coverslips were placed on a thermostatted (37 °C) inverted Leica AF6000 videomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with 63×, 1.3 numerical aperture (NA) glycerin-immersion objective. Fluorescence excitation was performed with a 427 ± 10 nm bandpass filter through a double band dichroic mirror (440/520 nm). To avoid displacements between donor and acceptor's fluorescence measurements, we used fast detection filter wheel (respectively with 472 ± 30 nm and 542 ± 27 nm bandpass filters). Images were acquired every two minutes. After 6 min, drugs were added to the cell medium by gentle pipetting.

YFP/CFP ratio for cell by cell data analysis was realized with the ImageJ software as described in [10]. Curves were obtained by subtracting the average of the baseline values (time points 0 to 6 min) from each time point. Histograms were calculated by subtracting the same average of baseline values from the average of plateau values after EGF stimulation (points at time 12 to 20 min). In both cases, average and standard deviation are calculated and represented. *p*-values were obtained using Student t-test.

2.6. FLiM Measurements

Frequency domain FLiM experiments were performed using the LIFA system (Lambert Instruments, Roden, The Netherlands) assembled on a wide field Nikon Eclipse TE2000 inverted microscope (Nikon, Amsterdam, The Netherlands) in a 37 °C thermostatted chamber and with a 60×, 1.4 numerical aperture (NA) oil immersion objective and appropriate CFP filter cube (excitation 426/446 nm; dichroic mirror 455 nm; emission 460/500 nm). The modulation frequency was set to 40 MHz and MCP to 800 V. We used a solution of 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (Sigma) diluted in methanol as lifetime reference (4 ns). 36 phases shifted intensity images were recorded every two minutes, pre-diluted EGF and U0126, according to the experimental designs, were manually added into the culture medium. Lifetime values were extracted with LiFLiM (Lambert Instruments). For each cell, lifetime variation was obtained by subtracting the average of the baseline values (time points 0 to 6 min) from each time point. Histograms represent the variation before (time points 0 to 6 min) and after (10–20 min) EGF induction. In both cases the average and standard deviation is calculated and represented. *p*-values were obtained using Student t-test.

3. Results and Discussion

The choice of the FRET pairs was guided by previous works on other FRET-based biosensors, one reporting PKA activity [18] and a second one probing the intracellular cAMP level [17]. Concerning the PKA activity biosensors, the optimization from A Kinase Activity Reporter 3 (AKAR3) to AKAR4 consisted in a swapping of the donor fluorophores eCFP for the Cerulean FP in combination with a circularly permuted Venus (in position 172) [18,19]. This change improved the dynamic range of the biosensor from 38% to 58% in ratio experiments [18]. Therefore, we used the same kind of procedure on EKAR and exchanged the Venus FP with its variant Cp172 Venus, to obtain a first construction named *EKAR-Cer-CpV*, including the Cerulean/cpVenus FRET pair (Figure 1A). ^TEPAC^{VV} is a cAMP level FRET biosensor that exhibits a remarkable dynamic range. This probe allows one to observe

variations up to 700 picoseconds in lifetime experiments and 100% ratio variation upon the stimulation of cAMP production [17]. Those performances drew our attention on the FRET pair used in this sensor: A combination of mTurquoise and a dimer cpVenus-Venus. The donor fluorophore is characterized by a phase lifetime of 3.7 ns (instead of 2.3 for the Cerulean) [20,21], which improves FLIM measures, while the use of an acceptors dimer also improves ratiometric experiments. We thus generated a second construction based on this pair and named it *EKAR-TVV* (Figure 1A).

As the ratiometric techniques is widely used for FRET-based biosensor measurements compared to FLiM experiments, we choose to first test *EKAR-Cer-CpV* and *EKAR-TVV* with this technique. Cells were starved in order to inhibit ERK activity and then stimulated with Epithelial Growth Factor (EGF). The difference between the basal ratio values corresponding to starved cells and the ratio values following EGF stimulation corresponded to the dynamic range of the biosensors. In order to compare the results among themselves, each value obtained over time for every single cell, was normalized on the average of baseline values (Figure 1C,D). When compared to *EKAR*, our two constructions exhibited an increased dynamic range as shown by the normalized YFP/CFP ratios after EGF stimulation (Figure 1C). To highlight those changes the average of baseline values was subtracted to the average of the values upon EGF stimulation and was depicted in Figure 1E. *EKAR-TVV* in particular, revealed a 21.5% FRET increase upon EGF stimulation, when *EKAR-Cer-CpV* and *EKAR* reached respectively 19.7% and 14.2% (Figure 1C,E).

Those probes were then tested in frequency domain FLiM. As previously described, cells were starved and then stimulated with EGF, and images were acquired every minute. Curves thus represented the lifetime variation to the average of baseline values (Figure 1F,G). The difference between baseline values and EGF values was also represented for each biosensor (Figure 1H). *EKAR-TVV*'s dynamic range was higher than *EKAR*'s (160 ps and 60 ps respectively) whereas there was no significant improvement with *EKAR-Cer-CpV*.

To summarize, our ERK sensor *EKAR-TVV*, based on the molecular recognition element of *EKAR* coupled to a FRET pair composed of mTurquoise and a dimer CpVenus-Venus FPs, exhibited an increase dynamic range in both techniques contrary to *EKAR-Cer-CpV*, which was improved for ratio experiments but did not show any difference with the original sensor when tested in FLiM.

The previously reported MAPK sensor *EKAREV* [16] was also an improved version of *EKAR* notably due to the modification of a linker within the probe. We thus choose to combine this modification with the most efficient FRET pair to further increase the biosensors dynamic range (Figure 1B). This third construction, named *EKAREV-TVV*, did not show improvement compared to *EKAR* or *EKAREV* using ratiometric techniques (Figure 1D,E). Conversely, it strongly improved the dynamic ranges in lifetime-based experiments compared to *EKAREV* (192 ps and 100 ps respectively). Moreover *EKAREV-TVV* overrode *EKAR-TVV* performance (160 ps), making it our best construction for lifetime experiments (Figure 1G,H).

Figure 1. Design and properties of ERK biosensors EKAR-Cer/CpV, EKAR-TVV and EKAREV-TVV.

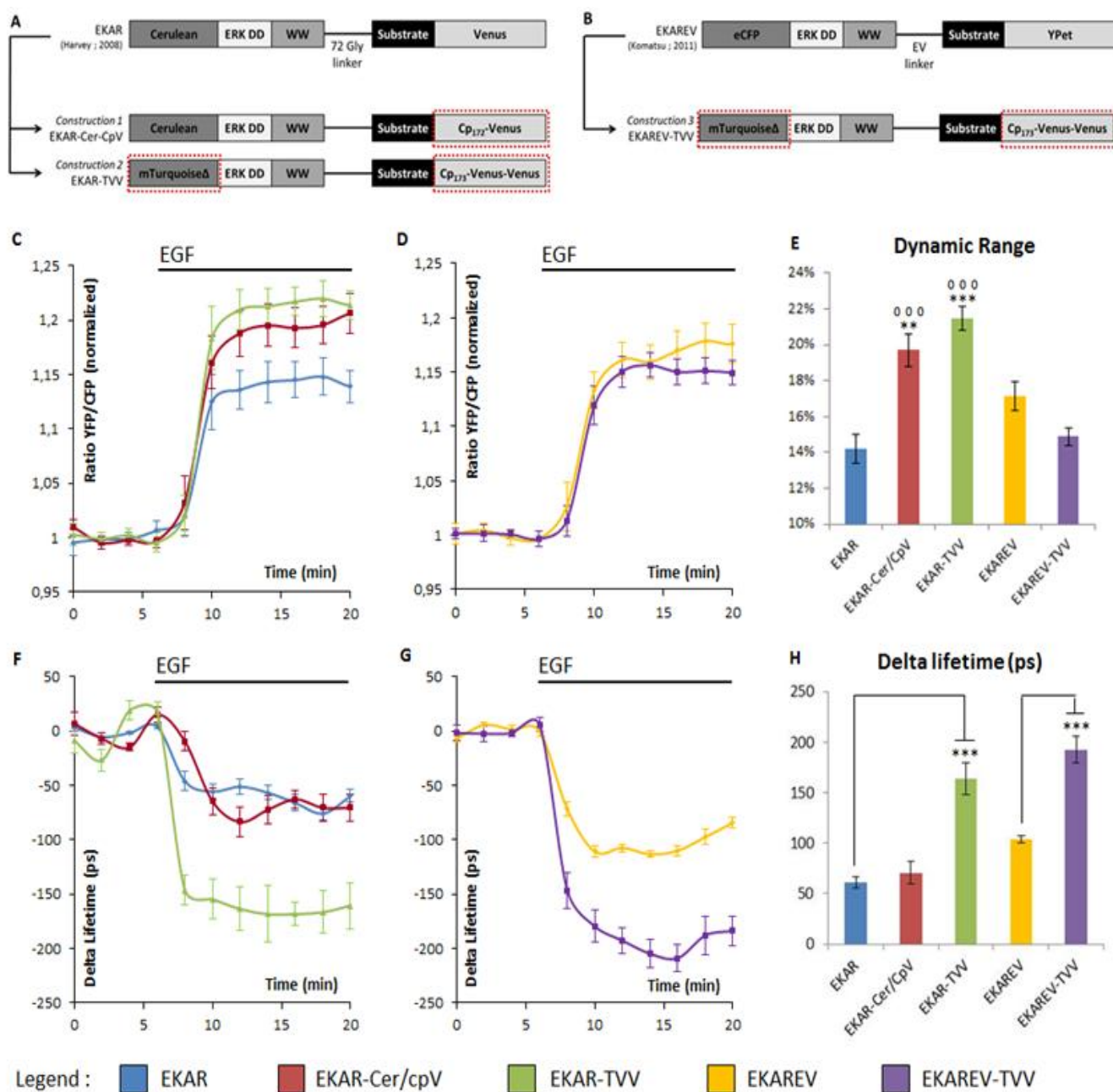


Figure 1A,B illustrates the design of new ERK biosensors. **ERK DD** corresponds to an ERK docking domain (amino acid sequence: FQFP). **WW** is a phospho-aminoacid binding domain. The substrate corresponds to a part of the Cdc25C sequence, coding for the amino acid sequence PDV RTPVGK specifically recognized and phosphorylated by ERK on the Threonine 48 residue. Dotted red boxes highlight the changes brought to the original constructions. EKAR-Cer/CpV and EKAR-TVV derive respectively from EKAR [14] (A) and EKAREV-TVV derives from EKAREV [16] (B).

Figure 1C,D shows the YFP/CFP ratio variations upon EGF stimulation in starved HeLa cells. EKAR-Cer/CpV (n = 43 cells) and EKAR-TVV (n = 23 cells) are compared to EKAR (n = 24 cells) (C). EKAREV-TVV (n = 22 cells) is compared to EKAREV (n = 28 cells) (D). The histogram

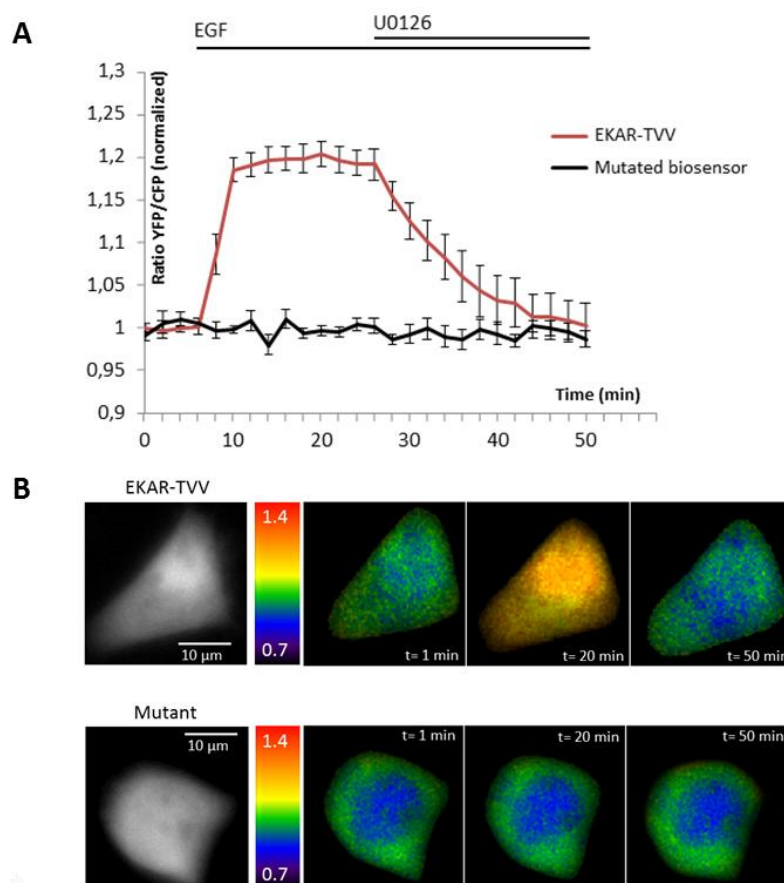
summarizes the percentage of FRET variations upon EGF stimulation (E). Two symbols represent a p value ≤ 0.01 and three symbols represent a p value ≤ 0.001 when compared to EKAR (circles) or EKAREV (stars).

Figure 1F,G shows the fluorescence lifetime variations upon EGF stimulation in starved HeLa cells. EKAR-Cer/CpV ($n = 6$ cells) and EKAR-TVV ($n = 8$ cells) are compared to EKAR ($n = 7$ cells) (F). EKAREV-TVV ($n = 5$ cells) is compared to EKAREV ($n = 4$ cells) (G). The histogram sums up the variation of the phase lifetime upon EGF stimulation (H). Three stars represent a p value ≤ 0.001 when compared to EKAR or EKAREV. The YFP/CFP ratio was normalized on the average of the baseline values (time points 0 to 6 min) for each cell (C, D). Lifetime variation was obtained by subtracting the average of the baseline values (time points 0 to 6 min) from each time point for each cell (F, G). For each time point either the average YFP/CFP ratio or the average delta lifetime of n cells and the standard deviation were calculated and represented. Histograms (E, H) were calculated by subtracting the same averages of baseline values from the average of plateau values after EGF stimulation (points at time 12 to 20 min). p -Values were obtained using Student t-test.

The ability of the biosensor to be dephosphorylated and return to its original conformation, when kinase activity decreases or stops, is a critical parameter. Since many kinases are regulated by negative feedback loops or more specifically if we take the sustained/transient activation of MAPK, a non-reversible probe would lead to wrong interpretation of physiological events, because we will be only able to detect the first activation step. To reverse the signal, the biosensor in its folded conformation has to allow the phosphatases to access to the phosphorylated site within the probe. We thus tested our best construction for each technique upon inhibition of the pathway by a chemical inhibitor of MEK, U0126 (Figures 2 and 3). Moreover, the relevance of kinase activity measurements needed to be controlled using a negative control biosensor. We obtained this probe by site-directed mutagenesis that replaced the phosphorylable amino acid within the substrate of the biosensor by a non-phosphorylable residue (e.g.,: threonine replaced by an alanine). We thus used a mutated biosensor to provide the evidence that FRET signal (increase or decrease) were not artifacts but corresponded to conformational changes of the probe (Figures 2 and 3).

EKAR-TVV revealed the highest dynamic range in FRET ratio study. Following an EGF stimulation cells expressing this probe, cells were exposed to the MEK inhibitor U0126. The CFP/YFP ratio returned to a basal level when MAPK were inhibited, which demonstrated that EKAR-TVV sensing was reversible. The variations were compared to the mutated biosensor (Figure 2A). A representative cell expressing either EKAR-TVV or the mutated biosensor before and after drugs addition allowed us to localize activity variations (Figure 2B). We did the same experiment in FLiM with the sensor that exhibited in our hands the higher dynamical range for this technique: EKAREV-TVV. As expected following an exposure to U0126, the fluorescence lifetime increased to reach a basal level corresponding to ERK activity when cells were starved (Figure 3A). As previously we used a mutated biosensor as control and plotted the lifetime variations for each construction on a representative cell (Figure 3B).

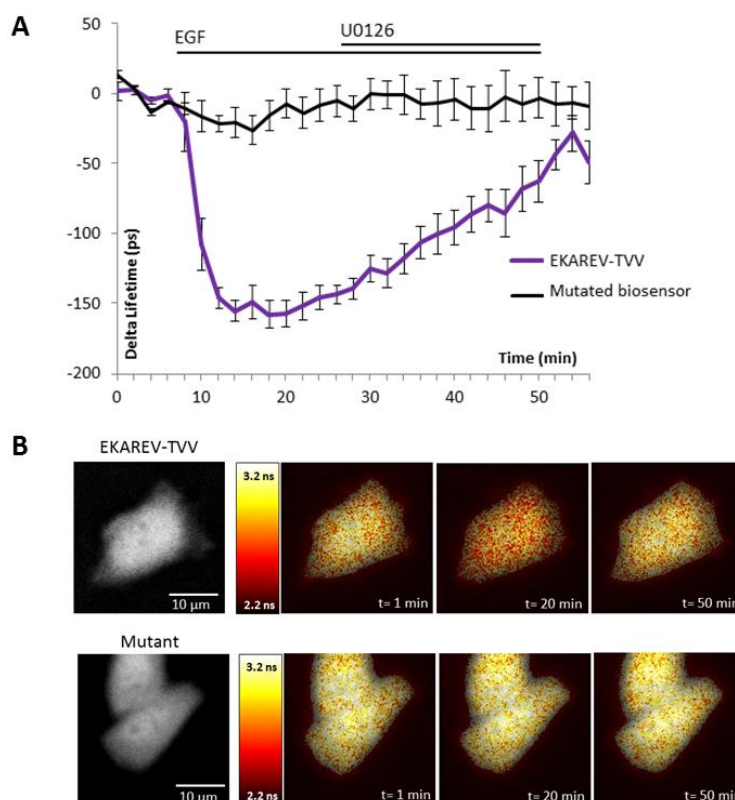
Figure 2. Reversibility control of EKAR-TVV in ratio experiments. Curves show the YFP/CFP ratio variations upon EGF stimulation and then inhibition of MAPK/ERK pathway with U0126 in starved HeLa cells expressing EKAR-TVV ($n = 16$ cells) or a mutated biosensor ($n = 25$ cells) (A). A representative cell illustrates the response of EKAR-TVV (upper panel) and the mutant (lower panel). Cells are represented before and after EGF stimulation and then after U0126 inhibition, in pseudo-color scale that corresponds to ratio values. Left panel represents CFP intensity in grey level (B).



4. Conclusions

Increasing biosensor sensitivity may rely on different strategies optimizing the combination of sensing domains (substrate and PAABD), linkers and fluorophores. Each optimization process for a biosensor is challenging because the global dimension and topology of each of them is different, and thus the structural requirements of each biosensor are unique. In some cases, a systematic approach, building all the combinations of the sensors key elements might be carried out [22]. In other cases, one can anticipate the optimal conditions and thus narrow the elements to optimize. Our approach consisted in modifying the best available ERK activity biosensors, EKAR and EKAREV. While their sensing component consists of a compact domain, and thus presents low structural requirements [22] and while the linkers were previously optimized, one can predict that further optimization will rely on the chosen donor/acceptor FRET pairs. Since monitoring FRET-based biosensors relies mainly on fluorescence lifetime and intensity, we needed donor fluorophores with high fluorescence lifetime, and acceptors allowing strong quenching when in close vicinity.

Figure 3. Reversibility control of EKAREV-TVV in FLiM experiments. Curves show the lifetime variations upon EGF stimulation and then inhibition of MAPK/ERK pathway with U0126 in starved HeLa cells expressing EKAREV-TVV ($n = 8$ cells) or a mutated biosensor ($n = 6$ cells) (**A**). A representative cell illustrates the response of EKAREV-TVV (upper panel) and the mutant (lower panel). Cells are represented during baseline, EGF stimulation and U0126 inhibition, in pseudo-color scale that corresponds to fluorescence lifetime values. Left panel represents CFP intensity in grey level (**B**).



Intensity and lifetime are two different properties of fluorescence. Intrinsic properties of fluorophores will therefore increase the dynamic range, *i.e.*, donor fluorescence lifetime for FLiM FRET experiments or both fluorophores brightness for ratiometric measurements. Thus, these properties can be used for a stepwise procedure of optimization of preexisting biosensors [14,16], in contrast to random approaches, which are time-consuming [22]. However, one should not discard the impact of other properties. One of the ideas that can be discussed relates to the fact the FRET biosensors may also be altered by quenching-related mechanism. If one considers the impact of conformational change on quenching, several cases may emerge: (i) quenching of donor—the dynamic range will increase in lifetime and ratiometric measurements; (ii) quenching of acceptor—the dynamic range of ratiometric measurements will be reduced whereas the lifetime measurements will not be impacted; (iii) quenching of both acceptor and donor—the signal to noise ratio will be reduced and therefore exert a strong negative impact on ratiometric measurements while the dynamic range of the lifetime measurements will be increased. That could explain why, surprisingly, when the expected-best FRET pair is combined to the expected-best linker, we only obtained a poor sensor for ratio experiments compared to FLiM.

Several requirements necessary to achieve the best dynamic range are independent of the measured properties of light, like the relative orientation of fluorophores. Due to the flexible nature of EKAR, it is hard to predict this orientation in a structural point of view. Then, while we can narrow the combination of what we identified as the best FRET pairs (CeruleanFP and mTurquoise as donors and Cp-Venus and Cp-Venus-Venus as acceptors [17,18]) and the best linkers (72 Gly and EV linker [14,16]), few empirical tests remained mandatory in the final optimization of such tools. We thus first tested the most promising FRET pairs and identified the mTurquoise/CpVenus-Venus (EKAR-TVV constructs) to give the higher dynamic range whatever the techniques. Then, we tested both available linkers in both lifetime and intensity based experiments. Our EKAR-TVV construction shows an increased dynamic range compared to the previous ERK biosensors EKAR and EKAREV in both ratiometric and lifetime experiments. On the other hand EKAREV-TVV is the best sensor for FLiM experiment, with almost 200 picoseconds of difference between inactive and active states. We were thus able to provide new optimized constructs depending on the measurement techniques. These biosensors will be a further milestone for a better understanding of ERK dynamics.

Acknowledgments

Pauline Vandame is funded by the University of Lille 1 and the Region Nord-Pas-de-Calais. This work has been supported by ANR G2 Progress. We also thank Christophe Slommiany, Laurent Heliot and the BioImaging Center Lille-Nord de France (BICeL) for the microscopy facilities. We also thank Jin Zhang, Karel Svoboda, Jun-ichi Miyazaki, and Kees Jalink (The Netherlands Kanker Instituut) as sources for the material. We are also grateful to Emanuele Biondi and Coralie Bompard for discussion and comments.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bodart, J.F. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: Unsolved issues. *J. Cell Biochem.* **2010**, *109*, 850–857.
2. Wang, R.; He, G.; Nelman-Gonzalez, M.; Ashorn, C.L.; Gallick, G.E.; Stukenberg, P.T.; Kirschner, M.W.; Kuang, J. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* **2007**, *128*, 1119–1132.
3. Yoon, S.; Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **2006**, *24*, 21–44.
4. Santos, S.D.; Verveer, P.J.; Bastiaens, P.I. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 324–330.
5. Ferrell, J.E., Jr.; Machleder, E.M. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* **1998**, *280*, 895–898.

6. Beaujois, R.; Riquet, F.; Cailliau, K.; Browayes, E.; Russo, C.; Blossey, R.; Vicogne, D.; Marin, M.; Lescuyer-Rousseau, A.; Vilain, J.P.; *et al.* Ultrasensitive MAPK/Erk activation in absence of protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *MAP Kinase* **2013**, *2*, 1–9.
7. Russo, C.; Giuraniuc, C.; Blossey, R.; Bodart, J.F. On the equilibria of the MAPK cascade: Cooperativity, modularity and bistability. *Phys. A Stat. Mech. Appl* **2009**, *388*, 5070–5080.
8. Pullikuth, A.K.; Catling, A.D. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: A perspective. *Cell Signal* **2007**, *19*, 1621–1632.
9. Sipieter, F.; Vandame, P.; Spriet, C.; Leray, A.; Vincent, P.; Trinel, D.; Bodart, J.F.; Riquet, F.B.; Heliot, L. From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 145–216.
10. Kardash, E.; Bandemer, J.; Raz, E. Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1835–1846.
11. Fujioka, A.; Terai, K.; Itoh, R.E.; Aoki, K.; Nakamura, T.; Kuroda, S.; Nishida, E.; Matsuda, M. Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8917–8926.
12. Tsuboi, Y.; Ichida, T.; Sugitani, S.; Genda, T.; Inayoshi, J.; Takamura, M.; Matsuda, Y.; Nomoto, M.; Aoyagi, Y. Overexpression of extracellular signal-regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **2004**, *24*, 432–436.
13. Sato, M.; Kawai, Y.; Umezawa, Y. Genetically encoded fluorescent indicators to visualize protein phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in single living cells. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2570–2575.
14. Harvey, C.D.; Ehrhardt, A.G.; Cellurale, C.; Zhong, H.; Yasuda, R.; Davis, R.J.; Svoboda, K. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19264–19269.
15. Eymin, B.; Claverie, P.; Salon, C.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Gazzeri, S. p14ARF triggers G2 arrest through ERK-mediated Cdc25C phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 759–765.
16. Komatsu, N.; Aoki, K.; Yamada, M.; Yukinaga, H.; Fujita, Y.; Kamioka, Y.; Matsuda, M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 4647–4656.
17. Klarenbeek, J.B.; Goedhart, J.; Hink, M.A.; Gadella, T.W.; Jalink, K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* **2011**, *6*, e19170.
18. Depry, C.; Allen, M.D.; Zhang, J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 52–58.
19. Allen, M.D.; Zhang, J. Subcellular dynamics of protein kinase a activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*, 716–721.
20. Goedhart, J.; van Weeren, L.; Hink, M.A.; Vischer, N.O.; Jalink, K.; Gadella, T.W., Jr. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 137–139.

21. Kremers, G.J.; Goedhart, J.; van Munster, E.B.; Gadella, T.W., Jr. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6570–6580.
22. Fritz, R.D.; Letzelter, M.; Reimann, A.; Martin, K.; Fusco, L.; Ritsma, L.; Ponsioen, B.; Fluri, E.; Schulte-Merker, S.; van Rheenen, J.; *et al.* A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal* **2013**, *6*, 12.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

- **Reporting Kinase Activities: Paradigms, Tools and Perspectives.**

Franck Riquet, Pauline Vandame Pauline Vandame, Francois Sipieter, Katia Cailliau-Maggio, Corentin Spriet, Laurent Heliot, & Jean-Francois Bodart. Journal of Biological Medicine.2011.

Reporting Kinase Activities: Paradigms, Tools and Perspectives

Franck Riquet^a, Pauline Vandame^a, François Sipieter^a, Katia Cailliau-Maggio^a, Corentin Spriet^b, Laurent Héliot^b,
Jean-François Bodart^{a,1,*}

^aEA4479 Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, Science and Technology University of Lille, USR 3078 CNRS, Cell Signalomics Group, Parc de la Haute Borne, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

^bInterdisciplinary Research Institute, Science and Technology University of Lille, USR 3078 CNRS, Biophotonique Cellulaire Fonctionnelle, Parc de la Haute Borne, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract

Delineating the complexity of the phosphorylation-based signaling network has become imperative for the understanding of cell functions both in physiological and pathological contexts, and for therapeutically perspectives. Protein kinases MAPK, PKA and Akt were here taken as examples of protein kinases whose respective spatiotemporal regulations are crucial for specific cellular functions achievement. To overcome the shortcomings of traditional methods, imaging approaches have been developed, using FRET or bioluminescence, providing high temporal and spatial resolutions for single cell and tissues analysis. Here are discussed properties of kinase activity reporters either based on FRET or bioluminescence.

Keywords: kinase, MAPK, PKA, Akt, KAR, KiBS, FRET, Bioluminescence

Journal of Biological Medicine 2011:1(2) 10-18

©2011 BioMed Best Ltd. All rights reserved.

1. BACKGROUND

Cellular functions require accurate translation of extracellular stimuli into functional responses *via* intracellular signaling cascades, many of which are critically regulated by protein kinases. Protein kinases covalently transfer the c-phosphate of ATP to recipient amino acid side chains on target proteins. These processes can be mediated by Serine/Threonine kinases (on Serine or Threonine residues) or by Tyrosine kinases (on Tyrosine residues). Phosphorylation of the target proteins results in changes in activities, interactions, localizations, or stability, thereby propagating a signal, which influences cellular decisions and functions. Signaling cascade propagation through mobilization of protein

kinases is tightly controlled by combinations of regulation motifs, including feedforward and feedback mechanisms, which ensure irreversible, sustained or transitory decisions[1–3]. These mechanisms are closely controlled to prevent aberrant protein kinases activation or inactivation, and cellular decisions are themselves subjected to regulatory checkpoint like those controlling cell cycle progression throughout replication and division[4, 5].

In the human genome, 518 protein kinases have been identified, nearly half of which being expressed from loci associated with specific disease or from regions amplified in human cancers[6]. Deregulations of protein kinases have been involved since then in various pathologies including cancer, neurological disorders, rheumatoid arthritis, immune, cardiac, -metabolic and infectious diseases[7–11]. As a result, protein kinases have become one of the major therapeutic targets for the last two decades[12, 13]. With one third of all intracellular proteins being phosphorylated[14], one might

*Corresponding author

Email address: jean-francois.bodart@univ-lille1.fr

(Jean-François Bodart)

¹Telephone:(33)320436867; Fax:(33)320434038

consider that virtually all cellular signaling processes involve the transfer of phosphate groups and implies that inhibition of aberrant kinases activity is considered to repair the deregulation of cellular signaling.

Delineating the complexity of the phosphorylation-based signaling network has become imperative for the understanding of cell functioning both in physiological and pathological contexts, and for therapeutically perspectives. Such a task may be undertaken either 1) by focusing on specific protein kinases, which act as main effectors or contributors in many pathological contexts, that serve as converging hub for oncogenic stimuli, like MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), PKA (Protein Kinase A), or Akt, or 2) by considering protein kinases in a global manner through kinome profiling. The kinome profiling aims at analyzing all protein kinases in cells or tissues, with respect to their abundance, activity, substrate specificity, phosphorylation pattern and even mutational status[14].

2. SPATIOTEMPORAL DYNAMICS OF KINASE DRIVES CELLULAR FUNCTIONS: CASE REVIEW OF MAPK/ERK, PKA AND AKT

Kinase activation profiles are closely associated to cellular decision. Actually, MAPK/Erk cascade provides a stunning example of how cells division might be driven by MAPK/Erk dynamics. Indeed, the phenotypical outcome of external stimuli might depend on the temporal profile of active, phosphorylated proteins recruited, as it is the case for MAPK/Erk[15, 16]. Typically, the MAPK/Extra-cellular regulated kinase (Erk) cascade is a highly conserved signaling pathway throughout eukaryotic cells, bridging cell surface receptors to diverse executor proteins, integrating signals and modulating many aspects of cell life such as cell cycle, survival, differentiation and cell migration. Serving as a node into a network for signal integration, the MAPK cascade consists of three layers, each one being composed of a kinase (MAPKKK or MAP3K, MAP2K or MEK and MAPK/Erk). Deregulation of the MAPK/Erk pathway due to alterations affecting the expression or function of a number of pathway components has long been associated with numerous pathologies including cancers, resulting in the constitutive activation of ERK and continual cell proliferation[17, 18].

Nevertheless, the MAPK/Erk network exhibits plasticity and different dynamical properties may arise from connections within this network. For instance, rewiring of Erk pathway architecture in the context of NGF or EGF stimulation in PC12 cells (model for neurone differentiation) is believed to build the dynamical response

observed for these growth factors; transient or sustained MAPK/Erk cascade activation following EGF or NGF stimulation, respectively[15, 19].

Similar dynamical properties of the MAPK/Erk pathway have been suspected to affect signaling cascade involved in cell death[20]. In fact, it is now clear that MAPK/Erk is directly linked to cell death signaling although molecular mechanisms involved in Erk-mediated cell death remain poorly understood. The MAPK/Erk cascade promotes also cell survival through inactivation of cell death machinery components and an increase of pro-survival genes transcription rate. These mechanisms contribute to decrease cell sensitivity to apoptosis and promote cell proliferation since the balance between the intensity and duration of pro- and anti-apoptotic signals transmitted by MAPK/Erk influence the decision of a cell to proliferate or die. In this respect, subcellular localization of MAPK/Erk pathway components and dynamical spatiotemporal changes are believed to determine cell fate between proliferation and death[21] (Figure 1). Sustained Erk activation observed in cadmium poisoning conditions and in the engineered cellular system Raf-1:ER[22] can be associated with a cell death signaling, whereas transient activation observed following growth factors stimulation protects cells from death. Sustained Erk activation, which is sufficient to induce cell death, is often associated with cell death mediated by ROS[23] because these radicals can suppress protein-phosphatases activities of MKP (MAPK-specific Phosphatases), exerting key roles in the regulation of MAPK/Erk dynamics[24]. Inhibition of MAPK/Erk activation using inhibitors against components of the MAPK cascade, has a survival effect on cells induced to die following chemicals or physical challenges. Forced MAPK/Erk cytosolic localization prevents survival or mitogenic response, but potentiates activities of specific pro-apoptotic proteins such as DAPK[25], Bik[26] and PEA-15[27] *via* the activation of PI3K/Akt pathway. Compartmentalized MAPK/Erk activity is therefore key to promote survival or death signaling. Thus, spatial signatures for the signal propagation of the MAPK/Erk signaling pathway have started to be explored both at experimental and theoretical levels in many different cellular models, from gametes to tissues[28–30]. Mechanisms leading to MAPK/Erk signal propagation are challenging issues, especially when considering MAPK/Erk signaling over long distance as in giant cells like oocytes or in neural tissue.

MAPK/Erk is not the only protein-kinase exhibiting complex spatial patterns, ranging from gradient to microdomains, tightly associated to cellular functions.

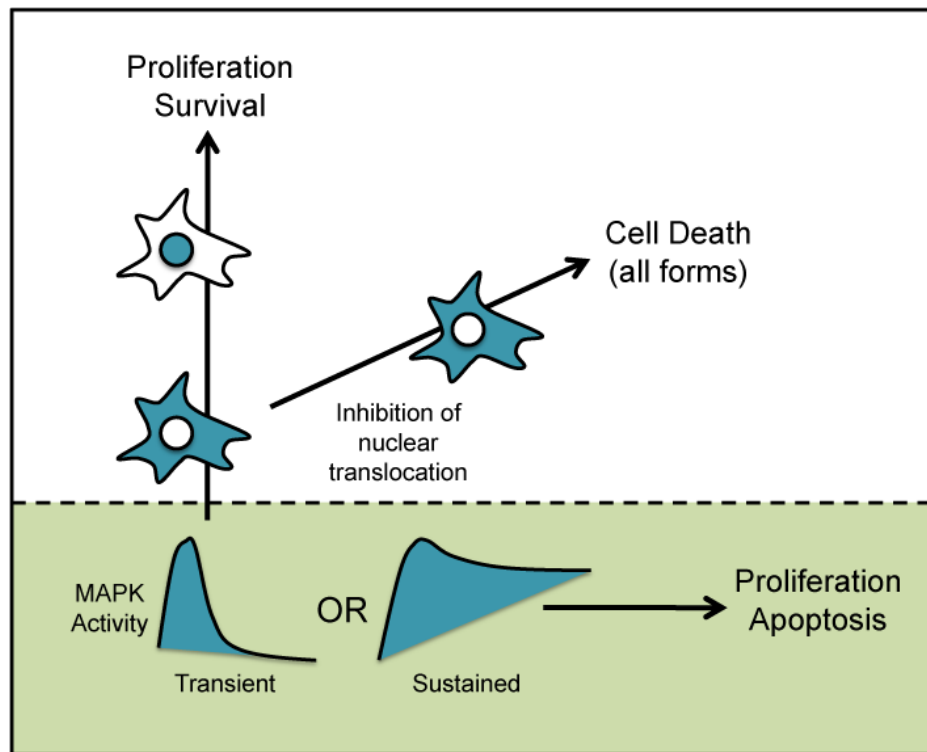


Figure 1. Spatiotemporal signatures of MAPK/Erk signaling drive cell fate between cell death and survival/proliferation. Transient and sustained MAPK activities (in blue) promote cell decision while spatial propagation of the signal is crucial to the final integration leading to cellular decision. Light green background: temporal regulation ; white background: spatial regulation.

Spatiotemporal regulation of PKA, whose activity is involved in many biological processes such as regulation of gene transcription, cell survival, cell cycle progression or cell migration, is known to be crucial for determination of cell response. PKA is a tetramer made up with a regulatory subunit dimer and two inactive catalytic subunits. When two cyclic Adenosine Mono Phosphate (cAMP) molecules bind with one regulatory dimer, the enzyme dissociates into a regulatory dimer and two active catalytic subunits. The balance between cAMP synthesis by Adenylate Cyclase and degradation by phosphodiesterase (PDE), contributes to generate temporal activity profiles, whereas different A-Kinase Anchoring-Proteins (AKAPs) restrains PKA to specific subcellular localizations[31] and target PKA to their substrates[32, 33]. As an example, it appeared that a balance of PKA activity- either in extent, space, time, or all three- is necessary for cell movement. In this context, PKA regulates several key events like membrane protrusion or filopodia formation, by controlling the activation states of Rho-GTPases Rac and cdc42[34]. In this context, PKA activity is compartmentalized in protrusive cellular structures formed during chemotaxis.

Reorganization of actin cytoskeleton and polarization during cell migration depends also on PKA activity cellular gradients. Those are, at least in part, dependent on the AKAP-Lbc anchoring function that might retain PKA close to its substrates during this migration process[35].

Since its identification as an oncogene in 1991[36, 37], Akt has been targeted by many strategies to unravel its role and mechanisms of activation. Growth factors, cytokines and hormones stimulate the phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), which generate a secondary messenger phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). The latter induces Akt translocation from the cytosol to the plasma membrane, where it is activated by phosphorylation on residue Thr308 and Ser473[38]. Convergent literature had suggested a role of lipid rafts for Akt activation (cholesterol and sphingolipid-enriched detergent resistant compartments) however evidences have been difficult to gather due to the absence of adequate tools. Genetically-encoded fluorescent reporters for kinase activity exhibited amenability to the purpose of dissecting the role of lipid rafts in Akt activation and led to determine

that PDGF- (Platelet Derived Growth Factor) or IGF-1- (Insulin Growth Factor-1) mediated Akt activation was differentially controlled between raft and non-raft regions at the plasma membrane[39, 40].

3. GETTING INTO MORE DYNAMISM: FRET-BASED KINASE ACTIVITY REPORTERS

How a cell integrates multiple signals into a fate remains rather challenging since cell-specific responses are mainly achieved through common effectors of signaling networks. Answer to this question is commonly addressed through the targeting of downstream effectors substrates (such as cytoplasmic targets, transcription factors and terminal enzymes), which ultimately process cell-specific phenotypes. Specific cell response to stimuli may arise from two possible mechanisms. On one hand, a signaling event may drive different cell phenotypes, but the latter depends only on the cell type that is stimulated because the molecular contributors of signal integration are cell-specific. On another hand, the nature of the activating signal (*i.e.* being transitory, delayed or sustained) is responsible for the typical or adapted cell response to stimulus. In order to decipher dynamical properties of signaling networks, integrative approaches have been developed. Indeed, mathematical and computational models have emerged as useful and original tools to address cellular signaling. When working synergistically, experimental and theoretical approaches increase the understanding of information-processing mechanisms, which mainly involve protein kinases and their regulators[18, 29, 41]. Nevertheless, traditional methodologies failed to feed synergistically this work, which request quantitative measurements for implementing mechanistic models as well as for verifying generated predictions. Knowledge of how cell regulatory systems are organized to allow signal integration with robust fidelity remains crucial to predicting drug action, understanding pathological deregulation and identifying effective molecular targets for drug discovery.

Suitable tools and methodologies are also requested to enable the dissection of signaling mechanisms at the single cell level up to complex and malignant environment. Thus, acquisition of dynamical parameters is resting upon the development and promises of molecular imaging, through innovations enabling real-time and non-invasive, or at least the less invasive, monitoring of protein kinases as biomarkers in living cells and organisms. So far, western blotting, immunostaining and immunohistochemistry for phosphorylated isoforms of kinase, when available, have provided valuable insights

into kinases function but these methods only allow static snapshots of cellular events. For *in vitro* kinase assays, cellular integrity is disrupted (mechanical lysis), and the phosphorylation of an exogenous substrate is classically monitored over time by radioactivity or phosphorylation-specific antibodies. Though these assays can detect kinase activity, the biological context is mainly lost during cell fixation or lysis.

At clinical levels, information are also requested regarding the dynamic changes within malignancy and its environment since biopsies only provide snapshots of biomarkers at the time where the sample is retrieved. These snapshots do not allow adapting rational molecular therapies in real time for clinical oncology purposes, where therapies are called to be adapted at the case-by-case level (bench to bedside approach). Nevertheless, several strategies have been developed for protein kinases profiling such as phosphoproteomic approaches[42, 43], reverse protein arrays[44, 45] and kinase peptide substrate arrays or peptide reporters[46–49]. Although these techniques cannot overcome the inconvenient of providing snapshots and are demanding in term of technology platforms, they are considered as potential clinical diagnostic tool to predict tumor evolution and response to targeted therapies[50]. Such techniques will not be further discussed in this article since we aim at focusing on gain from imaging strategies for protein kinases studies.

Innovations are called to change our view on how disease may be diagnosed, staged, monitored and treated, and on how cell decide their fate or drive themselves into such or such phenotypic decision. Development of imaging approaches will overcome the shortcomings of traditional methods, when providing high temporal and spatial resolution for single living cell analysis[51] and tissues. To this extent, kinase activity biosensors have been developed. Biological processes are intrinsically dynamics. Although traditional methods provide valuable insights for the understanding of many biological phenomenon, the possibility nowadays to measure, quantify and localize protein activity within a cell, a tissue, an embryo has revolutionized our train of thoughts and has encourage scientists to develop molecular tools for the assessment of protein activity within their physiological context. These ongoing efforts are resting on the emergence of biophotonics and the everlasting improvement of fluorophores, allowing precise and reliable measurements of cellular functions dynamics. The march of the “*in vivo* biochemistry” has begun, already yielding breathtaking results, using mostly PKA kinase activity reporter: AKAR (see for review[52]).

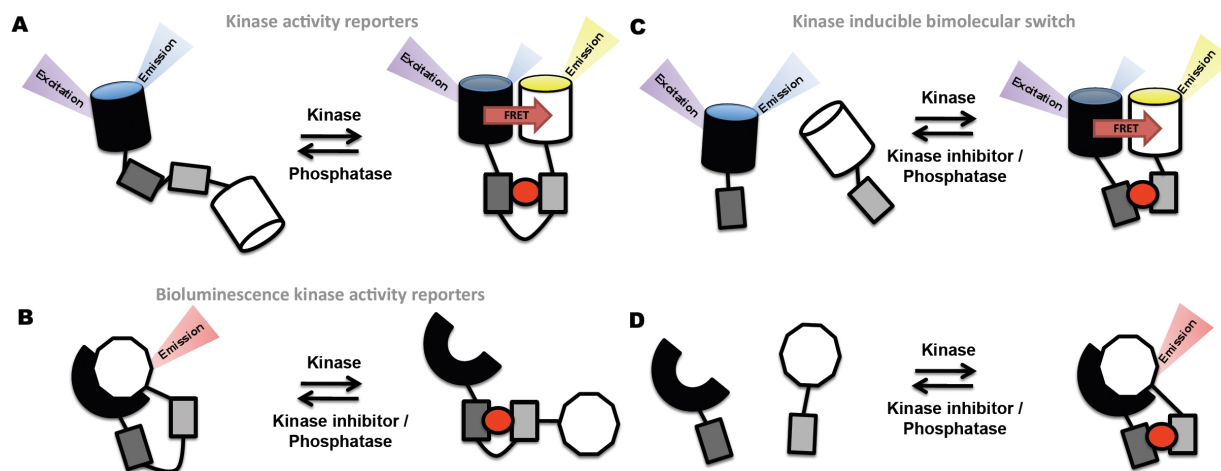


Figure 2. Designs and mechanisms of molecular tools for reporting kinase activity. **A)** Kinase Activity Reporters: a conformational change of the molecular switch is induced by phosphorylation (red circle), which results in a subsequent intramolecular binding between the phosphorylated substrate (light grey box) and the phosphoamino acid-binding domain (PAABD, dark grey box). When this switch occurs, it enables a change in FRET for the pair of FRET donor (black cylinder) and acceptor (white cylinder). **B)** Bioluminescence kinase activity reporters: N-Luc (amino acids 2-416; black symbol) and C-Luc (amino acids 398-550; white symbol) are terminal domains of luciferase that are incorporated between phospho-Serine/Threonine binding domain (FAH2 domain; dark grey box), a substrate peptide (light grey box) and flexible linkers; when phosphorylated, the conformation of the construct maintains the two luciferase domains apart, that has minimal bioluminescence while the dephosphorylation of the peptide substrate leads to the association of N-Luc and C-Luc and restoration of bioluminescence. **C, D)** Kinase inducible bimolecular switch (KIBS): they are made of kinase specific substrate (light grey box), phosphoamino acid-binding domain (PAABD, dark grey box), which will bind to the phosphorylated substrate, in an intermolecular manner contrasting with the intramolecular principle of KAR. Two reporting unit are fused with each domain (reporting unit A, black symbol, reporting unit B, white symbol). These couple might be composed of FRET pairs (C) or Bioluminescent reporting units (D).

As one major class of kinase biosensors, kinase activity reporters (KAR) serve as surrogate substrates for kinases and allow reporting of phosphorylation dynamics by FRET changes. FRET is a quantum mechanical process involving the radiationless transfer of energy from a donor fluorophore to an appropriately positioned acceptor fluorophore. Then, when two fluorescent reporters are close enough due to a conformational change of the KAR, the excitation of the donor induces an energy transfer from the donor to the acceptor resulting in the quenching of the donor and a rise of acceptor fluorescence[53]. Such reporters have been developed for various kinases. These reporters utilize, as a molecular switch, a substrate domain highly specific for the kinase of interest, attached to a phosphoamino acid binding domain (PAABD) tailored for maximum recognition of the phosphorylated substrate domain. Upon phosphorylation of the substrate, the PAABD binds the phosphopeptide, altering either the distance and/or the orientation between donor and acceptor fluorophores, resulting in a detectable change in FRET (Figure 2A).

While KAR represent a very attractive option for assessment of kinase activity dynamics in living cells, set-up and optimization of experimental conditions, acquisition technique and data analysis can be time-

consuming and at time rather discouraging. After optimizing these conditions, real time kinase activity measurement can be performed every 30sec in living cells. Moreover, depending on the imaging technique utilized for FRET measurements, sub-cellular and even localized kinase activity foyers can be readily identified as well.

An example of what can be performed nowadays using KAR is illustrated in Figure 3. Genetically encoded FRET biosensor Erk kinase activity reporter (EKAR) has been expressed in living cells. Kinase activity dynamic is readily visible in cell upon stimulation and subsequent inhibition of the MAPK/Erk pathway.

4. BIOLUMINESCENCE-BASED REPORTERS FOR PROTEIN KINASE ACTIVITY

As an alternate to genetically-encoded reporters using fluorescence, luciferases derivatives were considered for reporting kinase activity. Similarly to previously mentioned kinase activity reporters (KAR), these tools are called to enable non-invasive, real-time, repetitive imaging for studies of biological processes in intact cells or tissues in whole organisms. Firefly luciferase has appeared an attractive reporter because 30% of the

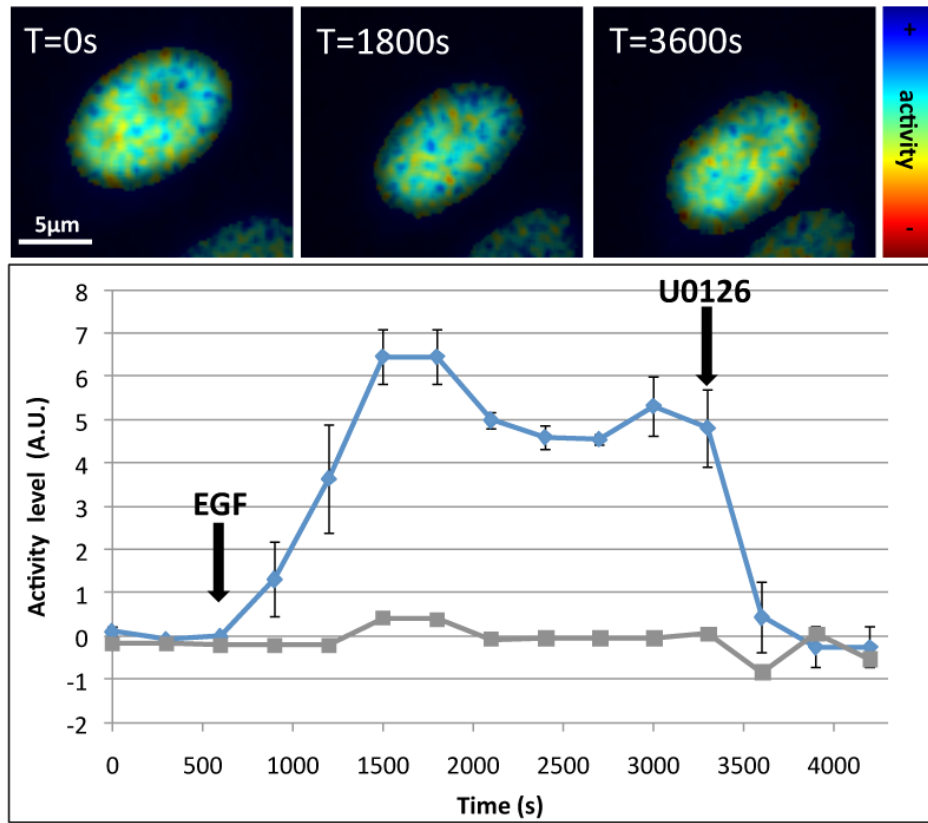


Figure 3. MAPK changes in activity, upon stimulation by Epidermal Growth Factor. HeLa cells were transfected using Nuclear EKAR Cerulean-Venus (genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity, Addgene plamid #18681 [54]). Cells were deprived in serum, stimulated by EGF (100ng/mL) and treated by MEK inhibitor U0126 (20μM). Phase and modulation lifetime acquisitions were performed in living cells (upper panel) to achieve localized measurements of MAPK activity along time. The mean fluorescence lifetime was measured on the whole cell and normalized to achieve a quantitative view of MAPK/Erk activity as depicted in the graph. For detailed description of the phase and modulation setup and acquisition protocol, see [55].

light generated has an emission spectra above 600 nm, at a region where the signal attenuation by the absorbing and scattering properties of living tissues in mammalian, is minimal[56, 57]. Indeed, the use of GFP or alternate fluorescent reporter systems in animal model is impaired by the high levels of background resulting from the excitation of subject tissue. However, the use of bioluminescence might overcome this disadvantage due to the low level of background autoluminescence in mammalian tissues[58].

Nevertheless, one problem remains when using bioluminescence resting on luciferase derivatives, the substrate, luciferin, needs to be provided to the experimental system. As for FRET-based kinase activity measurements, more and more red-shifted fluorophores are being characterized which should enable optimized in-depth imaging in living tissue.

As for KAR, bioluminescence-based reporters are

initially monomeric construct, which consists of two separate components, whose close proximity reconstitutes a reporter activity (Figure 2B): each component is inactive when taken individually but when they are brought together by conformational rearrangement, the luciferase enzymatic activity is restored due to the intramolecular complementation. Re-constitution of luciferase was based upon protein complementation assays that were previously used to monitor either protein-protein interaction, or kinase/protease activities[59]; the latter was validated upon complementation assays screening truncation libraries of N- and C-terminal fragments of luciferase. The complementation assays was noticeably used to demonstrate the phosphorylation-dependent interaction between hCdc25C and 14-3-3ε *in vitro* and the FRB-FKBP12 interaction in real time non-invasively[60, 61]. As previously stated, while these bioluminescence-based reporters, do not need exoge-

nous illumination, they could allow decreased background signals, thus increasing kinase activity reporting sensitivity.

A bioluminescent Akt Reporter (BAR) was built using an Akt consensus substrate peptide and phosphoamino acid binding domain (FHA2), flanked with N- and C-Terminal luciferase domains. When in presence of Akt, phosphorylation of the consensus site on the peptide leads to its interaction with the FHA2 domain. This interaction prevents the restoration of a functional luciferase activity through steric constraints. Once Akt activity is inhibited, this constraint is released and thus restores vicinity between the N- and C-terminal domains of luciferase, thereby enabling detection of bioluminescence. Thus, Akt inhibition can be easily monitored and quantitative and dynamical characteristics of Akt inhibitors like API2 may be assessed *in vivo* and compared to other inhibitors such as perfosine, an inhibitor of PI-3Kinase, which acts upstream Akt[62]. Differential activation of Akt has been reported through the use of BAR, following EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) stimulation in presence of EGFR inhibitor, erlotinib. BAR was able to detect erlotinib-mediated inhibition of EGFR and Akt, in the erlotinib-sensitive HCC287 cell lines while NCI-H1975 cell lines (erlotinib-resistant lung cancer cell lines), did not exhibit changes in Akt activity levels, therefore validating the utility/specificity of this reporter[52]. Furthermore, API2 and perfosine *in vivo* interactions with substrates were assessed and results were reflective of differences of bioavailability of the drugs at the tumor site, since perfosine induced 12-fold induction of bioluminescence in contrast to API2, which only induced a 4-fold induction[62].

One of the main advantages of these constructions based on bioluminescent is to result in less false positives than other cell-based reporters screen. Kinase reporters in case of bioluminescence are built to result in a gain of function assay, with the inhibition of kinase activity being monitored by an increase in bioluminescence. In standard enzyme-based assays, toxic compounds lead to loss of signal resulting in cell death and show up as false positives. With reporters such as BAR, signals from toxic agents are eliminated and not considered since having no effect on bioluminescence levels. The increase in bioluminescence will only arise from Akt inhibition. Then, bioluminescent kinase reporters may arise as attractive tools for screening validation in case of kinases inhibitors libraries high throughput analysis. In this effort, platforms have been developed[62] and bioluminescent kinase reporters have been developed for Glycogen synthase kinase 3-beta (Gsk-3 β),

Casein Kinase 1-alpha, FADD or Met-tyrosine kinase activities[63–65].

Kinase activity reporters using fluorescence suffer from limited dynamic range[66, 67], which is a critical parameter for detection of subtle changes in kinase activity[68, 69], since these subtle changes might have non-neglectable cellular outcomes. In order to overcome these inconvenient, kinase inducible molecular switch (KIBS) were built based on bioluminescence advantages. KIBS consists of a kinase specific substrate and a phosphoamino acid binding domain designed to bind the phosphorylated form of the peptide substrate, but in contrast to KAR these two domains are held by two separate reporting unit (Figure 2C). Thus, recognition of the phosphorylated form of the substrate peptide by the phosphoamino acid domain brings two reporter units in vicinity which enable either a FRET (Figure 2C) or a bioluminescent (Figure 2D) signal. Several bimolecular sensors were recently built. In a first step, FRET-based bimolecular sensor were designed to report for PKA and Protein Kinase C, named respectively BimAKAR and C-KIBS and appeared to conserve the advantages of unimolecular KAR regarding subcellular localization while improving their dynamical range in HEK293T cells[70]. Secondly, biomolecular sensors were turn on bioluminescence for readout: a bioluminescent-based reporter for PKA, LumAKAR, was tested and exhibited reversibility, accurate temporal resolution and subcellular localization, enabling for example to detect basal PKA/AMPC states[70].

5. CONCLUDING REMARKS

The molecular toolkits for kinases activity reporter are then called to be strengthened by new sensors, whose development will result in the improvement of sensitivity and kinetic properties, the enlargement of dynamic range, the conservation of reversibility and an increased resolution for subcellular localization in living cells. Building other bioluminescent reporters will take also advantages from numerous published resources and methodologies for identification of peptide as specific substrates. From a clinical point of view, the disadvantages for bioluminescence, as for any genetically encoded reporters, is that their use is restricted to the acceptance of a gene therapy protocols in patients. It remain also challenging to determine which protein kinases are “essential” and should be targeted; mostly, the Achilles’heel(s) of specific oncogenic events remain likely to be determined. Nevertheless, kinase activity reporters offer major advantages 1) for fundamental research in the understanding of how protein kinases

integrate and achieve cellular functions in physiological and pathological situations, such as in aberrant oncogenic signaling, 2) for drug-target validation, 3) for identification of next drugs generation and 4) for monitoring therapeutic outcomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

FS is supported by the CNRS and the University of Lille 1. PV is supported by the Region Nord-Pas de Calais and the University of Lille 1.

REFERENCES

- [1] B. Novak, J. J. Tyson, B. Gyorffy & A. Csikasz-Nagy (2007), [Irreversible cell-cycle transitions are due to systems-level feedback](#). *Nat Cell Biol*, 9(7) 724–728
- [2] J. J. Tyson & B. Novak (2008), [Temporal organization of the cell cycle](#). *Curr Biol*, 18(17) R759–R768
- [3] A. Csikász-Nagy, O. Kapuy, A. Tóth, C. Pál, L. J. Jensen, F. Uhlmann, J. J. Tyson & B. Novák (2009), [Cell cycle regulation by feed-forward loops coupling transcription and phosphorylation](#). *Mol Syst Biol*, 5 236
- [4] P. Nurse (2000), [A long twentieth century of the cell cycle and beyond](#). *Cell*, 100(1) 71–78
- [5] D. O. Morgan (2007), *The Cell Cycle: Principles of Control. Primers in Biology*, Oxford University Press/New Science Press
- [6] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter & S. Sudarsanam (2002), [The protein kinase complement of the human genome](#). *Science*, 298(5600) 1912–1934
- [7] P. Blume-Jensen & T. Hunter (2001), [Oncogenic kinase signalling](#). *Nature*, 411(6835) 355–365
- [8] R. Kumar, V. P. Singh & K. M. Baker (2007), [Kinase inhibitors for cardiovascular disease](#). *J Mol Cell Cardiol*, 42(1) 1–11
- [9] B. K. Mueller, H. Mack & N. Teusch (2005), [Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders](#). *Nat Rev Drug Discov*, 4(5) 387–398
- [10] J. Westra & P. C. Limburg (2006), [p38 mitogen-activated protein kinase \(MAPK\) in rheumatoid arthritis](#). *Mini Rev Med Chem*, 6(8) 867–874
- [11] A. Wirth (2010), [Rho kinase and hypertension](#). *Biochim Biophys Acta*, 1802(12) 1276–1284
- [12] P. Cohen (2002), [Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?](#) *Nat Rev Drug Discov*, 1(4) 309–315
- [13] G. Scapin (2006), [Protein kinase inhibition: different approaches to selective inhibitor design](#). *Curr Drug Targets*, 7(11) 1443–1454
- [14] S. A. Johnson & T. Hunter (2005), [Kinomics: methods for deciphering the kinome](#). *Nat Methods*, 2(1) 17–25
- [15] S. D. M. Santos, P. J. Verveer & P. I. H. Bastiaens (2007), [Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate](#). *Nat Cell Biol*, 9(3) 324–330
- [16] J. F. Bodart (2010), [Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues](#). *J Cell Biochem*, 109(5) 850–857
- [17] J. F. Bodart, A. Chopra, X. Liang & N. Duesbery (2002), [Anthrax, MEK and cancer](#). *Cell Cycle*, 1(1) 10–15
- [18] R. J. Orton, M. E. Adriaens, A. Gormand, O. E. Sturm, W. Kolch & D. R. Gilbert (2009), [Computational modelling of cancerous mutations in the EGFR/ERK signalling pathway](#). *BMC Syst Biol*, 3 100
- [19] A. von Kriegsheim, C. Preisinger & W. Kolch (2008), [Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics](#). *Methods Mol Biol*, 484 177–192
- [20] Y. Mebratu & Y. Tesfagzi (2009), [How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?](#) *Cell Cycle*, 8(8) 1168–1175
- [21] M. Ebisuya, K. Kondoh & E. Nishida (2005), [The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity](#). *J Cell Sci*, 118(Pt 14) 2997–3002
- [22] S. Cagnol, E. Van Obberghen-Schilling & J.-C. Chambard (2006), [Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death](#). *Apoptosis*, 11(3) 337–346
- [23] J. Dong, S. Ramachandiran, K. Tikoo, Z. Jia, S. S. Lau & T. J. Monks (2004), [EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death](#). *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(5) F1049–F1058
- [24] T. Boutros, E. Chevet & P. Metrakos (2008), [Mitogen-activated protein \(MAP\) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer](#). *Pharmacol Rev*, 60(3) 261–310
- [25] C.-H. Chen, W.-J. Wang, J.-C. Kuo, H.-C. Tsai, J.-R. Lin, Z.-F. Chang & R.-H. Chen (2005), [Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK](#). *EMBO J*, 24(2) 294–304
- [26] Y. A. Mebratu, B. F. Dickey, C. Evans & Y. Tesfagzi (2008), [The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN \$\gamma\$ -induced cell death](#). *J Cell Biol*, 183(3) 429–439
- [27] A. Trencia, A. Perfetti, A. Cassese, G. Vigliotta, C. Miele, F. Oriente, S. Santopietro, F. Giacco, G. Condorelli, P. Formisano & F. Beguinot (2003), [Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action](#). *Mol Cell Biol*, 23(13) 4511–4521
- [28] C. I. Maeder, M. A. Hink, A. Kinkhabwala, R. Mayr, P. I. H. Bastiaens & M. Knop (2007), [Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling](#). *Nat Cell Biol*, 9(11) 1319–1326
- [29] B. N. Kholodenko & M. R. Birtwistle (2009), [Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems](#). *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1(1) 28–44
- [30] R. Blossey, J. F. Bodart, A. Devys, T. Goudon & P. Lafitte (2011), [Signal propagation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes: role of bistability and ultrasensitivity for a mixed problem](#). *J Math Biol*. (Epub ahead of print)
- [31] S. S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N. M. Haste, E. Radzio-Andzelm & G. Anand (2004), [PKA: a portrait of protein kinase dynamics](#). *Biochim Biophys Acta*, 1697(1–2) 259–269
- [32] M. C. Faux & J. D. Scott (1996), [More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location](#). *Trends Biochem Sci*, 21(8) 312–315
- [33] M. L. Dell'Acqua, K. E. Smith, J. A. Gorski, E. A. Horne, E. S. Gibson & L. L. Gomez (2006), [Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics](#). *Eur J Cell Biol*, 85(7) 627–633
- [34] A. K. Howe (2004), [Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA](#). *Biochim Biophys Acta*, 1692(2–3) 159–174
- [35] A. A. Paulucci-Holthauzen, L. A. Vergara, L. J. Bellot, D. Cantton, J. D. Scott & K. L. O'Connor (2009), [Spatial distribution of protein kinase A activity during cell migration is mediated by A-kinase anchoring protein AKAP Lbc](#). *J Biol Chem*, 284(9) 5956–5967
- [36] A. Bellacosa, J. R. Testa, S. P. Staal & P. N. Tsichlis (1991),

- A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254(5029) 274–277
- [37] P. F. Jones, T. Jakubowicz, F. J. Pitossi, F. Maurer & B. A. Hemmings (1991), [Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10) 4171–4175
- [38] E. Fayard, L. A. Tintignac, A. Baudry & B. A. Hemmings (2005), [Protein kinase B/Akt at a glance](#). *J Cell Sci*, 118(Pt 24) 5675–5678
- [39] X. Gao & J. Zhang (2008), [Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains](#). *Mol Biol Cell*, 19(10) 4366–4373
- [40] X. Gao & J. Zhang (2009), [Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters](#). *Commun Integr Biol*, 2(1) 32–34
- [41] D. Gilbert, M. Heiner, R. Breitling & R. Orton (2010), [Computational modelling of kinase signalling cascades](#). *Methods Mol Biol*, 661 369–384
- [42] F. S. Oppermann, F. Gnad, J. V. Olsen, R. Hornberger, Z. Greff, G. Kéri, M. Mann & H. Daub (2009), [Large-scale proteomics analysis of the human kinome](#). *Mol Cell Proteomics*, 8(7) 1751–1764
- [43] J. Li, U. Rix, B. Fang, Y. Bai, A. Edwards, J. Colinge, K. L. Bennett, J. Gao, L. Song, S. Eschrich, G. Superti-Furga, J. Koomen & E. B. Haura (2010), [A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer](#). *Nat Chem Biol*, 6(4) 291–299
- [44] M. Pawlak, E. Schick, M. A. Bopp, M. J. Schneider, P. Oroszlan & M. Ehrat (2002), [Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis](#). *Proteomics*, 2(4) 383–393
- [45] T. Rubic, G. Lametschwandtner, S. Jost, S. Hinteregger, J. Kund, N. Carballido-Perrig, C. Schwärzler, T. Junt, H. Voshol, J. G. Meingassner, X. Mao, F. Werner, A. Rot & J. M. Carballido (2008), [Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity](#). *Nat Immunol*, 9(11) 1261–1269
- [46] J. B. Tuynman, L. Vermeulen, E. M. Boon, K. Kemper, A. H. Zwinderman, M. P. Peppelenbosch & D. J. Richel (2008), [Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits c-Met kinase activity and Wnt activity in colon cancer](#). *Cancer Res*, 68(4) 1213–1220
- [47] Y. M. Schrage, I. H. Briaire-de Bruijn, N. F. C. C. de Miranda, J. van Oosterwijk, A. H. M. Taminiau, T. van Wezel, P. C. W. Hogendoorn & J. V. M. G. Bovée (2009), [Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment](#). *Cancer Res*, 69(15) 6216–6222
- [48] A. H. Sikkema, S. H. Diks, W. F. A. den Dunnen, A. ter Elst, F. J. G. Scherpen, E. W. Hoving, R. Ruijtenbeek, P. J. Boender, R. de Wijn, W. A. Kamps, M. P. Peppelenbosch & E. S. J. M. de Bont (2009), [Kinome profiling in pediatric brain tumors as a new approach for target discovery](#). *Cancer Res*, 69(14) 5987–5995
- [49] M. Versele, W. Talloen, C. Rockx, T. Geerts, B. Janssen, T. Lavrijssen, P. King, H. W. H. Göhlmann, M. Page & T. Perera (2009), [Response prediction to a multitargeted kinase inhibitor in cancer cell lines and xenograft tumors using high-content tyrosine peptide arrays with a kinetic readout](#). *Mol Cancer Ther*, 8(7) 1846–1855
- [50] S. R. Piersma, M. Labots, H. M. W. Verheul & C. R. Jiménez (2010), [Strategies for kinome profiling in cancer and potential clinical applications: chemical proteomics and array-based methods](#). *Anal Bioanal Chem*, 397(8) 3163–3171
- [51] P. J. Verveer & P. I. H. Bastiaens (2008), [Quantitative microscopy and systems biology: seeing the whole picture](#). *Histochem Cell Biol*, 130(5) 833–843
- [52] L. Zhang, K. C. Lee, M. S. Bhojani, A. P. Khan, A. Shilman, E. C. Holland, B. D. Ross & A. Rehemtulla (2007), [Molecular imaging of Akt kinase activity](#). *Nat Med*, 13(9) 1114–1119
- [53] B. Camuzeaux, C. Spriet, L. Hélot, J. Coll & M. Duterque-Coquillaud (2005), [Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses](#). *Biochem Biophys Res Commun*, 332(4) 1107–1114
- [54] C. D. Harvey, A. G. Ehrhardt, C. Cellurale, H. Zhong, R. Yasuda, R. J. Davis & K. Svoboda (2008), [A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49) 19264–19269
- [55] A. Leray, F. B. Riquet, E. Richard, C. Spriet, D. Trinel & L. Hélot (2009), [Optimized protocol of a frequency domain fluorescence lifetime imaging microscope for FRET measurements](#). *Microsc Res Tech*, 72(5) 371–379
- [56] C. H. Contag & B. D. Ross (2002), [It's not just about anatomy: in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology](#). *J Magn Reson Imaging*, 16(4) 378–387
- [57] L. F. Greer III & A. A. Szalay (2002), [Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review](#). *Luminescence*, 17(1) 43–74
- [58] D. K. Welsh & S. A. Kay (2005), [Bioluminescence imaging in living organisms](#). *Curr Opin Biotechnol*, 16(1) 73–78
- [59] S. Fields & O. Song (1989), [A novel genetic system to detect protein-protein interactions](#). *Nature*, 340(6230) 245–246
- [60] K. E. Luker & D. Piwnica-Worms (2004), [Optimizing luciferase protein fragment complementation for bioluminescent imaging of protein-protein interactions in live cells and animals](#). *Methods Enzymol*, 385 349–360
- [61] D. Piwnica-Worms & K. E. Luker (2005), [Imaging protein-protein interactions in whole cells and living animals](#). *Ernst Schering Res Found Workshop*, (49) 35–41
- [62] S. Nyati, B. D. Ross, A. Rehemtulla & M. S. Bhojani (2010), [Novel molecular imaging platform for monitoring oncological kinases](#). *Cancer Cell Int*, 10 23
- [63] A. P. Khan, K. A. Schinske, S. Nyati, M. S. Bhojani, B. D. Ross & A. Rehemtulla (2010), [High-throughput molecular imaging for the identification of FADD kinase inhibitors](#). *J Biomol Screen*, 15(9) 1063–1070
- [64] S. Nyati, R. Ranga, B. D. Ross, A. Rehemtulla & M. S. Bhojani (2010), [Molecular imaging of glycogen synthase kinase-3 \$\beta\$ and casein kinase-1 \$\alpha\$ kinases](#). *Anal Biochem*, 405(2) 246–254
- [65] L. Zhang, S. Virani, Y. Zhang, M. S. Bhojani, T. L. Burgess, A. Coxon, C. J. Galban, B. D. Ross & A. Rehemtulla (2011), [Molecular imaging of c-Met tyrosine kinase activity](#). *Anal Biochem*, 412(1) 1–8
- [66] T. K. Kerppola (2006), [Complementary methods for studies of protein interactions in living cells](#). *Nat Methods*, 3(12) 969–971
- [67] L. Hodgson, F. Shen & K. Hahn (2010), [Biosensors for characterizing the dynamics of rho family GTPases in living cells](#). *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 14 Unit 14.11.1–Unit 14.11.26
- [68] S. B. VanEngelenburg & A. E. Palmer (2008), [Fluorescent biosensors of protein function](#). *Curr Opin Chem Biol*, 12(1) 60–65
- [69] Q. Ni, A. Ganesan, N. N. Aye-Han, X. Gao, M. D. Allen, A. Levchenko & J. Zhang (2011), [Signaling diversity of PKA achieved via a Ca²⁺-cAMP-PKA oscillatory circuit](#). *Nat Chem Biol*, 7(1) 34–40
- [70] K. J. Herbst, M. D. Allen & J. Zhang (2011), [Luminescent kinase activity biosensors based on a versatile bimolecular switch](#). *J Am Chem Soc*, 133(15) 5676–5679

- **From FRET Imaging to Practical Methodology for Kinase Activity Sensing in Living Cells.**

Pauline Vandame & François Sipieter, Corentin Spriet, Aymeric Leray, Pierre Vincent, Dave Trinel, Jean-François Bodart, Franck. B Riquet & Laurent Héliot. Fluorescence-Based Biosensors – from concepts to applications Progress in Molecular Biology and Translational Science, Academic Press, Elsevier.2013.



From FRET Imaging to Practical Methodology for Kinase Activity Sensing in Living Cells

François Sipieter^{*,†,‡} and Pauline Vandame^{†,‡}, Corentin Spriet^{*,‡},
Aymeric Leray^{*,‡}, Pierre Vincent^{‡,§}, Dave Trinel^{*,‡},
Jean-François Bodart^{†,‡}, Franck B. Riquet^{†,‡,1} and Laurent Héliot^{*,‡,1}

^{*}Biophotonic Team (BCF), IRI CNRS, University Lille1—University Lille2 USR 3078, Villeneuve d'Ascq, France

[‡]Groupement de Recherche Microscopie Fonctionnelle du vivant, GDR2588-CNRS, Villeneuve d'Ascq, France

[§]Neurobiologie des processus adaptatifs—UMR 7102, UPMC, Paris, France

[†]Laboratoire de Régulation des Signaux de division EA4479 University Lille1, Villeneuve d'Ascq, France

¹Corresponding authors: Emails: franck.riquet@iri.univ-lille1.fr; laurent.heliot@iri.univ-lille1.fr

Contents

1. Introduction	147
2. Fluorescence Generalities	151
2.1 Introduction	151
2.2 The absorption process	151
2.3 The emission process	153
3. FRET Measurement	156
3.1 Introduction	156
3.2 FRET basis	157
3.3 Overlap integral $J(\lambda)$	158
3.4 Orientation factor κ^2	159
3.5 Energy transfer efficiency	160
3.6 FRET measurements of molecular populations	161
3.7 Conclusion on FRET principles and applications	162
3.8 Few considerations on fluorescent proteins	163
4. FRET Measurements: Methods and Instrumentation	164
4.1 Intensity-based approaches	167
5. Data Analysis	173
5.1 Ratiometric imaging	173
5.2 Fluorescence lifetime imaging	176
6. Design and Optimization of Genetically Encoded KARs	186
6.1 Substrate peptide identification	187
6.2 Phosphoamino acid-binding domain	189
6.3 Optimal linker combinations in FRET-based biosensors	190
6.4 Choosing a FRET pair	191

6.5 Targeting FRET biosensors to subcellular compartments	194
6.6 <i>In vitro</i> and <i>in cellulo</i> characterization of new FRET biosensors	194
7. Considerations for KAR Measurements	196
7.1 Controlling acquisition systems	196
7.2 Controlling biological samples	200
7.3 Biosensor dynamic range and reproducibility	203
8. Toward Quantitative Approaches in Biological Processes	204
9. Outlook and Perspective	206
9.1 What about multisensing?	206
9.2 Kinase activity measurements in living animals	206
Acknowledgments	207
References	208

ABBREVIATIONS

A	acceptor
AKAR	A-kinase activity reporter
Akt	protein kinase B
AMDI	adaptive Monte Carlo data inflation
ATP	adenosine triphosphate
BFP	blue fluorescent protein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCD	charge-coupled device
cDNA	complementary DNA
CFP	cyan fluorescent protein
CKAR	C-kinase activity reporter
Cp	Circularly permuted
CyPET	optimized eCFP for FRET
D	donor
DC	direct current
DCR	dual channel ratio
DNA	deoxyribonucleic acid
DsRed	<i>Discosoma</i> sp. red fluorescent protein
DVR	dual view ratio
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EKAR	extracellular regulated kinase activity reporter
Epac	exchange protein activated by cAMP
ERK	extracellular regulated kinase
FD	frequency domain
FHA	forkhead associated
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FP	fluorescent protein
FRET	Förster resonance energy transfer
GFP	green fluorescent protein
GTPase	hydrolase enzyme that can bind and hydrolyze guanosine triphosphate (GTP)
IRF	instrumental response function

JNK c-Jun N-terminal kinase
KAR kinase activity reporter
LSM least squares method
MAPK mitogen-activated protein kinase
MLE maximum likelihood estimation
MPK mitogen-activated protein kinase phosphatase
MRE molecular recognition element
PAABD phosphoamino acid-binding domain
PKA protein kinase A
PKC protein kinase C
PKG protein kinase G
PMT photomultiplier tube
PTB phosphotyrosine binding
R ratio
Rac subfamily of the Rho family of GTPases
RFP red fluorescent protein
RNA ribonucleic acid
siRNA small interfering RNA
SR sequential ratio
TCSPC time-correlated single-photon counting
TD time domain
U2OS osteosarcoma cell line
YFP yellow fluorescent protein
YPet optimized YFP for FRET

Foreword

Biological processes are intrinsically dynamic. Although traditional methods provide valuable insights for the understanding of many biological phenomena, the possibility of measuring, quantifying, and localizing proteins within a cell, a tissue, and even an embryo has revolutionized our train of thoughts and has encouraged scientists to develop molecular tools for the assessment of protein or protein complex dynamics within their physiological context. These ongoing efforts rest on the emergence of biophotonic techniques and the continuous improvement of fluorescent probes, allowing precise and reliable measurements of dynamic cellular functions. The march of the "*in vivo* biochemistry" has begun, already yielding breathtaking results.



1. INTRODUCTION

How cells sense external and internal signals and how these signals are processed to drive specific responses in a multiscale context are major questions in biology.

Protein phosphorylation plays a significant role in a wide range of cellular processes such as cell proliferation, differentiation, and cellular death. In eukaryotes, phosphorylation occurs on serine, threonine, tyrosine, and

histidine residues. Protein phosphorylation can alter the activity of many proteins, causing a chain reaction leading to the phosphorylation of many proteins involved in a particular cellular process. Conventional analytical methods have identified and characterized various posttranslational modifications, but the major drawback is that these methods provide only a snapshot of the cell. In fact, in order to assess activity of protein kinases, immunoblotting and immunocytochemistry with phospho antibodies toward specific residues described to report on kinase activation, are global and indirect/static approaches. They are limited to the time resolution and the quality of the cell fractionation assay under analysis. In addition, antibodies toward specific phospho residues do not really reflect activity of the kinase of interest.

To go beyond the snapshot, tools have been developed to answer the new challenges in today's biology quest: protein localization, interaction, and activity, when applicable. Concerning the latter, fluorescent biosensors have now become the biologist's toolbox to visualize, especially, the spatiotemporal dynamics of kinase signaling in living systems. They provide high sensitivity and versatility while only minimally perturbing cell physiology.

The word "biosensor" is a rather generic term that is used to define a wide array of systems that enable the sensing of various analytes. Typically, a biosensor is composed of two parts having distinct functions. The first, referred to as the "bioreceptor," recognizes the analyte and is responsible for the selectivity and the sensitivity of the whole biosensor. The second, named "transducer," is in charge of conveying the signal from the recognition part toward the adapted instrument (Fig. 5.1).

This definition is, of course, applicable to molecular biosensors dedicated to sensing biological events in living cells. Indeed, the analyte is represented by ions such as Ca^{2+} , second messengers such as cAMP (cyclic adenosine monophosphate), an enzymatic activity such as kinase activity, or an active enzyme conformation. The bioreceptor or molecular recognition element (MRE) is thus materialized by calmodulin/M13 or TroponinC/M13, Epac (exchange protein activated by cAMP), and the substrate/phosphoamino acid-binding domain (PAABD) respectively. The transducer element is represented in these cases by fluorescent proteins, which, when their distance allows it, will generate a change in their fluorescent signal or spectral properties. Thus, the instrument dedicated to signal detection is an "optical fluorescent microscope" or a "spectrofluorimeter."

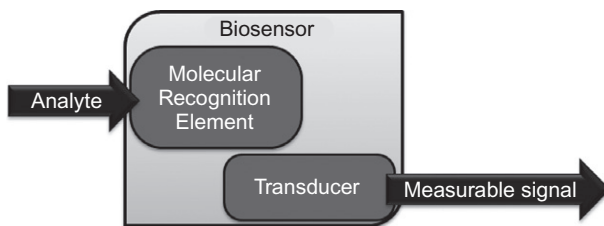


Figure 5.1 Schematic representation of the basic principle of the biosensor.

The first of a long line of such biosensors was developed in R. Tsien's lab and reported in 1996.¹ While of simple design, it was the first to demonstrate that fluorescent protein variants could be used for biosensing. This first genetically encoded biosensor was composed of a blue fluorescent protein (BFP) and a green fluorescent protein (GFP) encompassing a trypsin cleavable linker. Thereafter, many different types of biosensors have been developed with various molecular structures (Fig. 5.2).

All genetically encoded fluorescent protein (FP)-based biosensors are classified into groups depending on their structure.^{2,3} Kinase activity reporters (KARs) are included in the group based on intramolecular Förster resonance energy transfer (FRET). The archetypal structure of such biosensors consists of two FPs flanking an MRE (Fig. 5.3). The interaction of an active kinase with its specific MRE (substrate + PAABD) leads to a change in the molecular conformation of the MRE. This change alters the distance and/or relative orientation between the two FPs and, consequently, the FRET signal. This chapter focuses on genetically encoded biosensors, and specifically those dedicated to kinase activity measurements. Although kinase activity reporters (KARs) vary in specificity depending on the choice of the substrate, the design strategy of these reporters remains universal.⁴

Genetically encoded FRET biosensors can be used to analyze molecular events in single living cells and tissue, and even expressed in animals (e.g., aquatic animals, transgenic mice). They are expressed in the native context of a living cell to report on dynamic events. However, as described by Frommer *et al.*,² these FRET biosensors actively sense ("active reporters") cellular microenvironments and even the subcellular microenvironment and cannot be regarded as "passive reporters" such as for instance, regular FP-fused protein.

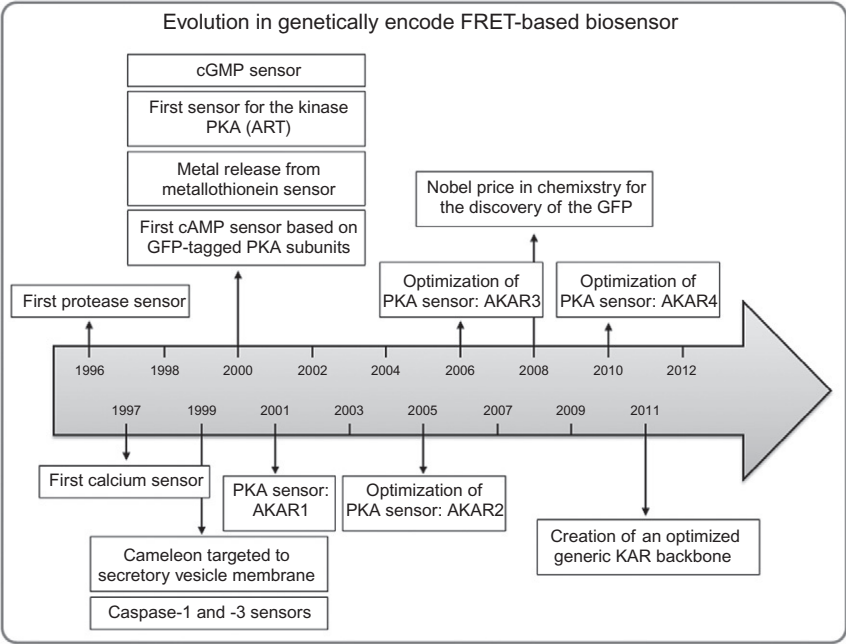


Figure 5.2 Evolution in genetically encoded FRET-based biosensors.

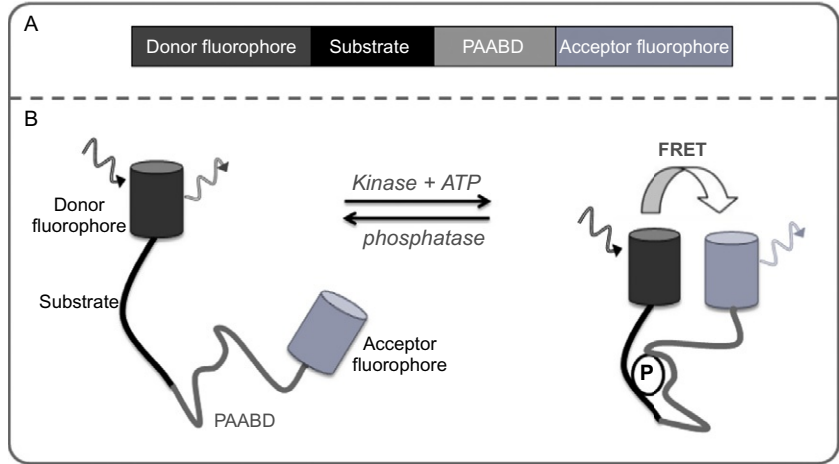


Figure 5.3 General scheme of the functional domains of FRET-based kinase activity reporter (KAR). The schematic representation shows the biosensor conformational changes upon phosphorylation by the specific kinase leading to an increase in FRET between donor and acceptor fluorophores.



2. FLUORESCENCE GENERALITIES

2.1. Introduction

The relaxation of a fluorophore from an excited state to its ground state after the absorption of electromagnetic radiation may result in the emission of photons, which is called “luminescence”. If this transition occurs for an electron in the excited singlet state (with a spin opposite to that of a paired electron in the ground state), this emission is called “fluorescence”. The fluorescent molecule is often promoted to the S_1 excited state. In most cases, a rapid relaxation subsequently occurs from the lowest vibrational level of the first excited state S_1 ; this is the internal conversion process that usually occurs within approximately 10^{-12} s and results in some energy loss from the system, which is responsible for the energy difference (Stokes’ shift) between the absorption and emission spectra (see the Jablonski diagram in Fig. 5.4). The energy of the emitted photon is dependent upon the ground state toward which the transition occurs.

2.2. The absorption process

The energy of the excited photon must be equal to, or greater than, the energy difference (E_0 and E_1) between the ground state (S_0) and the excited state (S_1). The frequency of this photon is $\nu = (E_1 - E_0)/h$, where h is the Plank constant. When a photon is absorbed, its energy is transferred to the valence electron and this electron is promoted to a higher electronic orbit, thus putting the molecule in the excited state. This absorption is very fast, since it occurs within 10^{-15} s.

Experimentally, the efficiency of light absorption at a wavelength λ is characterized by the *absorbance* $A(\lambda)$ related to the *transmittance* $T(\lambda)$ by

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log T(\lambda) \quad [5.1]$$

where I_0 is the intensity of a monochromatic incident light of wavelength λ passing through an isotropic sample containing absorbing molecules at a concentration c (mol^{-1}), I is the light intensity leaving the absorbing medium, and l (cm) is the absorption path length (sample thickness) of the sample (Fig. 5.5).

The absorbance follows the Beer–Lambert law

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc \quad [5.2]$$

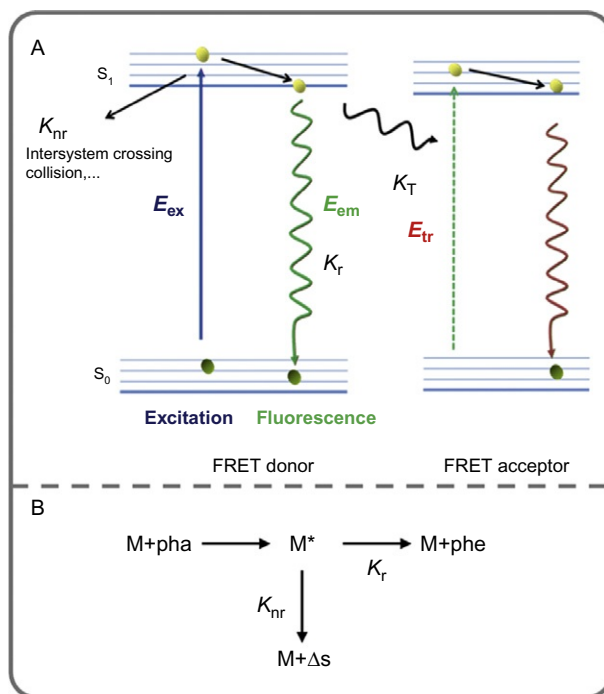


Figure 5.4 (A) Jablonski diagram. S_0 is the fundamental energy level of the electron, S_1 is the first excited level, and the small lines represent the vibrational energy levels. E_{ex} is the energy of excitation, E_{em} is the energy of fluorescence emission, K_r is the radiative de-excitation rate, and K_{nr} is the nonradiative de-excitation rate. (B) Scheme of the molecular equilibrium occurring between the absorption and emission processes where M is the fluorophore (molecule), M^* is the excited state of the molecule, pha is the photon absorbed, phe is the photon emitted, ΔS is the entropy, k_r is the radiative de-excitation rate, and k_{nr} is the nonradiative de-excitation rate.

where $\varepsilon(\lambda)$ is the molar absorption coefficient ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and l (cm) is the absorption path length (sample thickness) of the sample (Fig. 5.5).

The absorbance reflects the probability of a population of fluorophores to jump to an excited state under the effect of an incident photon at the wavelength λ .

The *absorption coefficient* $\alpha(\lambda)$ is the absorbance divided by the optical path length (l) in the medium:

$$\alpha(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{l} = \frac{1}{l} \log \left(\frac{I_0}{I} \right), \quad I = I_0 e^{-\alpha(\lambda)l} \quad [5.3]$$

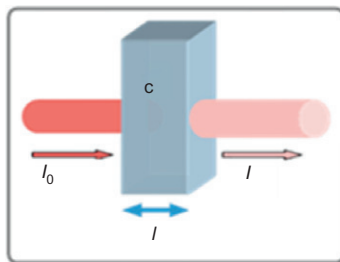


Figure 5.5 Physical parameters implicated in the absorbance measurements. I_0 is the intensity of the incident light. I correspond to residual intensity after absorption by the sample. l is the path length of the sample.

2.3. The emission process

When a molecule has been promoted to an excited state upon the absorption of electromagnetic radiation, it necessarily returns to the ground state through competition between radiative (K_r) and nonradiative (K_{nr}) pathways. The radiative pathways involve photon emission, and nonradiative pathways include energy transfer through collisions, resonance energy transfer through near-field dipole–dipole interactions (such as FRET detailed in the next section), and photochemical decomposition. A change in the vibrational and rotational states of the molecule can also cause a loss of energy via a nonradiative process.⁵

The Jablonski diagram shown in Fig. 5.4 illustrates the balance of energy through the excitation–relaxation cycle.

The difference in energy (or wavelength) between the absorbed and the emitted photons is known as the “Stokes shift” shown in Fig. 5.6. This phenomenon was first described by Sir G. G. Stokes in 1852. A large Stokes shift is often highly desirable for simplifying the wavelength separation between the fluorescence emission and the excitation.⁶

There is competition between the different de-excitation processes previously discussed (K_r and K_{nr}). The quantum yield (Φ) is the ratio of the number of photons emitted to the number of photons absorbed. It can also be described using the rates of radiative (K_r) and nonradiative (K_{nr}) processes of de-excitation.

$$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{nr}} \quad [5.4]$$

The quantum yield can vary from 0 to 1, where 0 corresponds to non-fluorescent materials and 1 corresponds to highly fluorescent materials in which each photon absorbed results in an emitted photon.

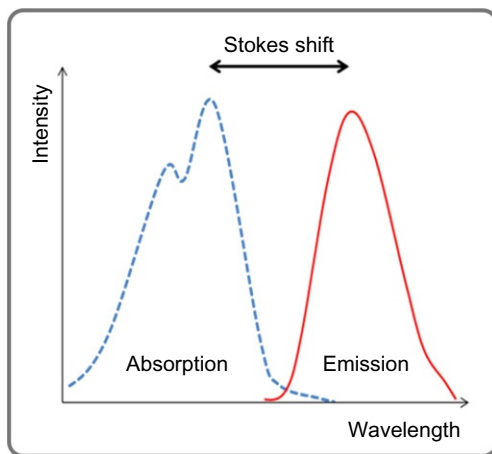


Figure 5.6 Illustration of the Stokes shift between the absorption and emission spectra.

The excited molecules (M^*) could be de-excited by radiative (K_r) or nonradiative (K_{nr}) processes whose intersystem transfer as FRET (K_T). In classical kinetics, the rate of disappearance of excited molecules is expressed by the differential equation

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = (K_r + K_{nr})[M^*] \quad [5.5]$$

Integration of this equation yields the time evolution of the concentration of the excited molecules $[M^*]$ (see Fig. 5.4).

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{(-t/\tau)} \quad [5.6]$$

$$\text{With } \tau = \frac{1}{K_r + K_{nr}} \quad [5.7]$$

$[M^*]_0$ is the concentration of the excited molecules at time 0, which results from light excitation. The *fluorescence lifetime* τ is in the range of 10^{-9} s (0.5–20 ns for commonly used fluorescence transitions). τ describes the average time for which a molecule stays in its excited state before emitting a photon.⁷ The resonance transfer or FRET (K_T) is included in nonradiative deactivation pathways (K_{nr}). It can be defined as the difference between the rates K_{nr} of the donor only and K_{nr} of the donor in the presence of the

acceptor. The fluorescence intensity begins to decrease when molecules are in their excited states. This decrease depends upon the rate of electron de-excitation and it can be deduced from Eq. (5.7):

$$I_t = I_0 e^{-t/\tau} \quad [5.8]$$

$$\text{With } \tau = \frac{1}{K_y + K_{nr} + K_T} \quad [5.9]$$

where K_{nr} is the nonradiative rate of the donor only. The fluorescence lifetime is in fact the inverse of the slope of the curve measuring the fluorescence as a function of time in a semilogarithmic representation (Fig. 5.7).

The fluorescence impulse response function $I(t)$ is often represented by a multiexponential decay model

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad [5.10]$$

where τ_i are the decay times and α_i are the amplitudes of the components. The values of α_i and τ_i may have a direct or an indirect molecular significance. For a mixture of fluorophores, if each component has a single decay time, τ_i are their decay times (Fig. 5.7). The parameters α_i and τ_i cannot always be attributed to molecular features of the sample. Alternatively, the measured intensity decay can be fitted with Eq. (5.10). The values of α_i and τ_i can be used to calculate the *fractional contribution* f_i of each decay time τ_i to the steady-state intensity:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad [5.11]$$

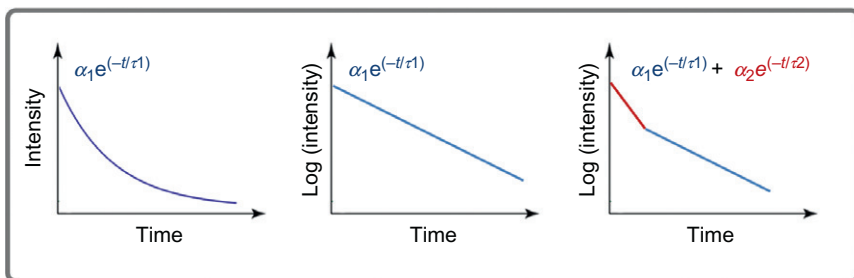


Figure 5.7 Fluorescence lifetime decay profiles: $\tau_2 < \tau_1$ (adapted from the Nikon website).

The resolution of multiple τ_i becomes increasingly difficult as they get more closely spaced. The statistically significant resolution of close τ_i requires a high signal-to-noise ratio and a large number of collected photons. The calculation of the energy transfer efficiency from the donor fluorescence lifetime in the presence and absence of the acceptor (Eq. 5.11) assumes that, under the experimental conditions, the donor decays according to a single-exponential model. If the donor displays a multi-exponential decay, τ_i values can be used to calculate the average lifetime $\langle\tau\rangle$. It is defined as the average time that the fluorophore remains in the excited state and is defined as

$$\langle\tau\rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \sum_i f_i \tau_i \quad [5.12]$$

In order to simplify data representation, mean lifetime τ_{mean} has been largely used in FRET experiments.^{8–11} It is given by

$$\tau_{\text{mean}} = \sum_i \alpha_i \tau_i = \int I(t) dt \quad [5.13]$$



3. FRET MEASUREMENT

3.1. Introduction

Among the different previously described nonradiative deactivation processes (K_{nr}), the energy transfer between dipoles was first described by Förster in 1926 and Perrin in 1932. Förster resonance energy transfer or FRET is a physical process in which the energy of a chromophore (called “donor” [D]) in its excited state is transferred nonradiatively to a neighboring chromophore (called “acceptor” [A]) while in its ground state.⁵ This physical process has been often applied experimentally for investigating molecular interactions at distances beyond the diffraction-limited resolution (for review see Refs. 5,7). For instance, FRET measurements (generally used in spectroscopy and microscopy) allow the investigation of the formation of protein complexes in living cells and tissues, as well as the conformational changes of single proteins such as biosensors (for review see Refs. 6,7,12).

3.2. FRET basis

FRET is one possible pathway for the relaxation of the excited state molecules. This phenomenon occurs only under appropriate conditions of proximity and orientation between two fluorophores (donor and acceptor), which are as follows:

1. This form of energy transfer occurs in the near field of the donor. In other words, the distance (r) between D and A must be less than 10 nm ($r < 10$ nm) so that $K_T \neq 0$.
2. The energy transfer is achieved between molecules with resonant oscillation dipole moments (overlapping wave functions). This requires an overlap between the D emission spectrum and the A excitation spectrum.
3. The orientation of the emission dipole moment of D with respect to the excitation dipole moment of D must be such as for FRET to occur.

The theoretical concept for FRET was developed following both the classical model by Perrin in 1925 followed by the quantum mechanical model in 1932 and by Förster in 1946–1949^{13–15} (for review see Refs. 5,6).

If one considers a single donor and acceptor separated by a distance r , the rate of energy transfer $K_T(r)$ can be calculated as a probability of the transfer of an energy quantum from D to A per time unit, given by the fundamental equation

$$K_T(r) = \frac{\Phi_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000 \ln(10)}{128 \pi^5 n^4 N_A} \right) J(\lambda) \int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda \quad [5.14]$$

where Φ_D is the donor quantum yield (as previously described in this chapter) in the absence of acceptor, τ_D the donor lifetime in the absence of acceptor, n is the refractive index of the medium, N_A is the Avogadro's number, $J(\lambda)$ is the overlap integral, F_D is the normalized fluorescence intensity of the donor, and κ^2 is a dimensionless orientation factor describing the relative spatial orientation of the donor and acceptor transition moments. Note that ϵ_A , Φ_D , and n are fixed by the choice of FRET pairs and the medium. Therefore, $K_T(r)$ variation is mainly dependent on r and κ .

Equation (5.14) is not easy to use for the design of biochemical experiments⁶. This is why the Förster distance R_0 was introduced by Förster in 1948. When the transfer rate $K_T(r)$ is equal to the decay rate of the donor in absence of an acceptor, one-half of the donor molecules decay by the energy transfer process. Once the value of R_0 is known, the rate of energy transfer K_T can be easily calculated as

$$K_T(r) = \frac{1}{\tau D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad [5.15]$$

for $r = R_0$

$$K_T(r) = 1/\tau D \quad [5.16]$$

One obtains (from Eq. 5.14)

$$R_0^6 = \Phi_D \kappa^2 \left(\frac{9000 \ln(10)}{128 \pi^5 n^4 N_A} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [5.17]$$

R_0 is given in Angström and may be simplified as

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} [\Phi_D \kappa^2 J(\lambda) n^{-4}] \quad [5.18]$$

This expression allows the Förster distance to be calculated from the spectral properties of the donor and the acceptor and from the donor quantum yield Φ_D .¹³

FRET efficiency is dependent on the inverse sixth power of the inter-molecular separation (r) (discussed in the next section).

Additionally, Förster distance is usually reported for an assumed value of κ^2 of 2/3 characterizing free FRET pairs. The question of dipole–dipole orientation is discussed later.

Directly, if the transfer rate is much faster than the decay rate, then energy transfer will be efficient; otherwise, FRET will be inefficient.

A crucial step in the practical implementation of FRET is the knowledge of several major parameters:

- the quantum yield Φ_D of the fluorophore donor only;
- the overlap integral $J(\lambda)$ between the donor and acceptor fluorophores;
- the orientation factor κ^2 between two fluorophore dipoles.

3.3. Overlap integral $J(\lambda)$

$J(\lambda)$ is the *overlap integral* between the donor emission and the acceptor absorption spectra (expressed as $M^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$) and is defined as

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad [5.19]$$

where $F_D(\lambda)$ is the corrected fluorescence donor (dimensionless) and ϵ_A is the extinction coefficient of the acceptor at λ (expressed in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4. Orientation factor κ^2

κ^2 can vary from 0 to 4 according to the following equation:

$$\begin{aligned}\kappa^2 &= (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \\ &= (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\Phi - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2\end{aligned}\quad [5.20]$$

where θ_A , θ_D , θ_T , and Φ are as shown in in Fig. 5.8.

Additionally, the fluctuation of *refractive index* n can induce errors in the calculated distance r but this effect is not usually considered.

The orientation factor (κ^2) characterizes the statistical average of the relative fluorophore orientations, and determines both how well the fluorophore dipoles are coupled and how efficiently energy is transferred (Fig. 5.8). However, if the dipoles are perpendicular, κ^2 becomes zero, which would result in serious errors in the calculated distance. This question has been discussed in detail.^{16–18} In general, the variation of κ^2 does not induce major errors in the calculated distance; however, for intramolecular FRET in biosensors this question is of importance. In fact, in a rigid molecule (such as a polypeptide with four to nine amino acid residues) with isotropic orientational distribution (statistically randomly distributed) of the donor and the acceptor transition moments but with no rotation during the lifetime of excited state (frozen), the value of $\kappa^2=0.476$ can be used. The optimal value of κ^2 at room temperature is $2/3$.¹⁹ For a fluorophore bound to macromolecules (i.e., fluorescent

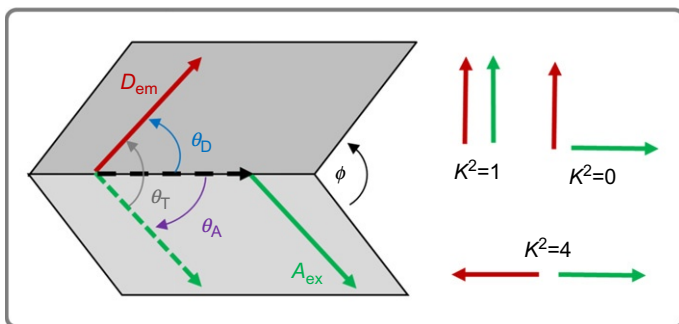


Figure 5.8 Parameters involved in the calculation of the orientation factor κ^2 .

proteins), segmental motions of the donor and acceptor tend to randomize the orientations and $\kappa^2=2/3$ is classically used.^{6,20} Computational simulations showed that κ^2 converges to $2/3$ in a FRET sensor where the D/A pair is presumed to be freely mobile.²¹ Finally, the evaluation of errors in the distance (r) due to approximation on κ^2 has been reported, but they are no more than 10%.²⁰

3.5. Energy transfer efficiency

The *efficiency of energy transfer* (E) can be defined as the ratio of the relaxation rate due to energy transfer to the sum of all relaxation rates.

$$E = \frac{K_T(r)}{\tau_D^{-1} + K_T(r)} \quad [5.21]$$

The rate of energy transfer is often defined as a function of inverse sixth power of the distance between the two molecules.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad [5.22]$$

The first factor that affects the FRET signal is the distance (r) between the fluorophores. The most sensitive range of r is $0.7\text{--}1.4 R_0$, corresponding to 90–10% FRET efficiency (Fig. 5.9). R_0 usually ranges from 4 to 7 nm; hence protein conformational change in this range is ideal for the largest FRET dynamic in biosensors.

The transfer efficiency is typically measured using the relative fluorescence intensity of the donor in the absence (F_D) or presence (F_{DA}) of acceptor.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\int I_{DA}(t)dt}{\int I_D(t)dt} \quad [5.23]$$

where F_{DA} is the intensity of donor fluorescence emission in presence of acceptor, F_D is the intensity of donor fluorescence in absence of acceptor, and I_D and I_{DA} are, respectively, the intensity decays of the donor alone and the donor in the presence of the acceptor.

The transfer efficiency can also be calculated from the lifetimes under these respective conditions (τ_D and τ_{DA}):

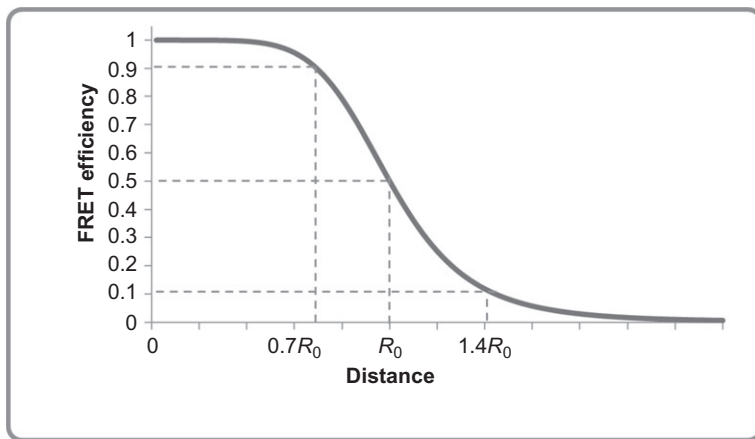


Figure 5.9 FRET efficiency as a function of the distance between the donor and the acceptor. The FRET efficiency is 50% when the distance is equal to the Förster distance (R_0). FRET efficiencies ranging from 10% to 90% correspond to distances between fluorophores of $1.4R_0$ and $0.7R_0$, respectively.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad [5.24]$$

The FRET kinetic measurement can be performed by the calculation of the ratio (R) between the two stationary states' kinetics. R is classically used for measurements by FRET-based biosensors (see next section).²²

Both Eqs. (5.23) and (5.24) are applicable only to donor/acceptor pairs that are separated by a fixed distance. However, single-exponential decays are rare in biology.

The mean lifetime τ_{mean} defined by Eq. (5.15) has been largely used in FRET experiments.^{8–11} This mean lifetime is then equivalent to the area of the fluorescence intensity decay, which is related to the FRET efficiency E . However, the mean lifetime does not correspond to the correct average lifetime, which is defined by Eq. (5.12).

3.6. FRET measurements of molecular populations

In FRET analysis, particularly for biosensors, two elements must be usually considered: the interacting fluorophore population and the FRET efficiency.

The distance distribution density function $P(r)$ describes the probability of finding the specific donor/acceptor pair separation.

The apparent transfer efficiency (E) can be written as

$$E = \int_0^{\infty} \frac{P(r)R_0^6}{R_0^6 + r^6} dr \quad [5.25]$$

Bulk measurements of FRET efficiency by intensity-based methods cannot distinguish between an increase in FRET efficiency (i.e., coupling efficiency) and an increase in FRET population (concentration of FRET species) since both parameters are not resolved. FRET measurements based on the analysis of the donor fluorescence lifetime may resolve this problem with multiexponential decay models.^(7,23) The assumption that interacting and noninteracting populations are present allows the determination of both the efficiency of interaction and the fractional population of the interacting molecules. In the first instance, the presence/absence of FRET is determined by fitting the experimental data to a single-exponential decay.⁶ Sufficient reduction in the measured lifetime indicates the existence of FRET. Additional analysis is subsequently applied to determine the source of lifetime reduction. In this case, a biexponential fluorescence decay model applied to the data allows the determination of the fluorescence lifetimes of noninteracting and interacting subpopulations or two distinct levels of interaction in case of many biosensors. In time-domain measurements (see next section), data may be fitted by iterative convolution with

$$I(t) = \text{IRF}(t) \otimes \left\{ \text{Offset} + \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \right\} \quad [5.26]$$

where $\text{IRF}(t)$ is the instrumental response and Offset is the baseline, τ_i is the lifetime of interacting or noninteracting populations, and α_i is the pre-exponential factor relating to the absolute species concentration (Fig. 5.10).²⁴

3.7. Conclusion on FRET principles and applications

It is difficult to obtain quantitative determination of labeled interacting molecules from steady-state images. The fluorescence intensity does not only depend on the FRET efficiency but also on the unknown local concentration of dyes. Up to eight measurements at different excitation wavelengths and in different emission wavelength bands can be used to obtain calibrated FRET results from steady-state data.⁷ In lifetime data, however, FRET shows up as a dramatic decrease of the donor lifetime.⁶ Initially, qualitative FRET results can be obtained by fitting decay curves with a single-exponential approximation.

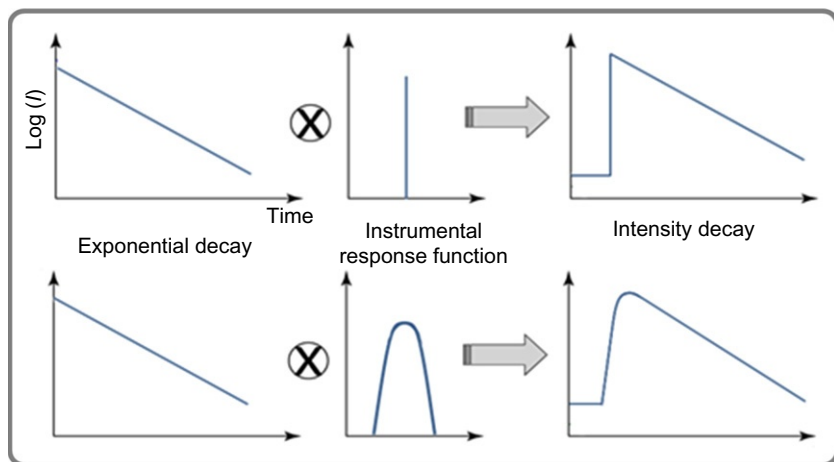


Figure 5.10 Illustration of the convolution product. When the instrumental response function (IRF) of the FLIM system is temporally short, the measured intensity decay is almost identical to the sample decay. If the IRF is large, the collected decay becomes very much different of the sample decay, and it becomes thus necessary to take into account this IRF to obtain correct lifetime estimations.

Quantitative measurements require multiexponential decay analysis.⁶ The proportion of donor molecules involved in energy transfer is given by the ratio of the two exponential decay amplitudes, α_2/α_1 , while the average coupling efficiency of the FRET pairs is given by the lifetime ratio τ_2/τ_1 .

A major complication of many *in vivo* FRET experiments is the large and differential contribution of cellular autofluorescence to the measured donor and acceptor fluorescence. Autofluorescence contributions can be sometimes corrected by acquiring an additional image,²⁵ or they can be minimized by the use of spectral lifetime image microscopy.²⁶

When autofluorescence is substantial, determination of FRET efficiency by fluorescence lifetime measurement might be advantageous because autofluorescence lifetime is usually very short and can be included in the fit of lifetime data. Finally, one has to consider the limitations imposed by the available instrumentation. For example, lifetime measurements require relatively sophisticated instrumentation, which is not yet widely available.

3.8. Few considerations on fluorescent proteins

Green fluorescence proteins from the jellyfish *Aequorea victoria* are well characterized and have provided myriad applications in cellular biology.^{27,28} GFP engineering has generated a large range of fluorescent proteins of

different colors,²⁹ enabling scientists to consider dynamic localization of several proteins of interest in living cells.¹

The properties of these FPs reveal that they are excellent candidates for FRET-based biological applications (see Table 5.1). The choice of a particular FP as a donor or an acceptor is very important and is mainly based on the analysis of its respective excitation and emission spectra. FPs must meet certain criteria to form a FRET pair: (i) an effective overlap between the emission spectrum of the fluorophore donor and the excitation spectrum of the acceptor; (ii) a large extinction coefficient at the region of excitation; (iii) a high quantum yield (ratio of photons emitted/photons absorbed); (iv) a separation between the excitation and emission spectra of the donor and of the acceptor; (v) good photostability; (vi) high brightness; (vii) minimal perturbation to the environment by FPs (toxicity); (viii) minimum sensitivity to the cellular environment (pH, chloride); and (ix) inability or at least limited capacity to dimerize and/or oligomerize. The last requirement is very important because the use of oligomerizing FPs may compromise the interpretation of the FRET signal. In 2006, Dunn *et al.*⁴³ elegantly demonstrated that the use of monomeric FPs significantly increased the FRET efficiency of a KAR. However, the FPs' expression level must be sufficiently high to provide enough signal, but not too high, it should become cytotoxic. In contrast, some tetrameric FPs can be toxic to bacteria when produced in large quantities, but this is not the case with monomeric FPs. All these requirements need to be considered and therefore a compromise in the choice of a particular FP in a specific context is suggested. Fortunately, FPs are continually being subjected to molecular engineering to improve their intrinsic properties and to increase the number of variants.^{44,45} Generally, for biosensing approaches, FRET can be evaluated by ratiometric methods by measuring the fluorescence emitted by the acceptor in response to the excitation of the donor fluorophore. However, when considering protein interactions studies by FRET measurement, FLIM is a preferred method. Thus, other approaches have emerged in recent years with fluorescent protein engineering that rely on donor FLIM for biosensing studies.



4. FRET MEASUREMENTS: METHODS AND INSTRUMENTATION

As previously described, FRET induces modification of several properties of the emitted fluorescence. Different techniques thus arise from these modified measurements,^{46,47} such as monitoring the fluorescence emission

Table 5.1 Properties of frequently used FPs and their implementation as FRET pair for ratiometric and fluorescence lifetime imaging
Main fluorescent proteins

Protein	Color ^a	Organism	Excitation peak (nm) ^b	Emission peak (nm) ^b	Brightness	Photostability	Oligomerization	References
eCFP	Cyan	<i>Aequorea victoria</i>	433/445	475/503	++	+++	Weak dimer	Cubitt <i>et al.</i> ³²
meCFP	Cyan	<i>Aequorea victoria</i>	433/452	475/505	++	+++	Monomer	Zacharias <i>et al.</i> ³³
Cerulean	Cyan	<i>Aequorea victoria</i>	433/445	475/503	+++	++	Weak Dimer	Rizzo <i>et al.</i> ³⁴
mCerulean	Cyan	<i>Aequorea victoria</i>	433/445	475/503	+++	++	Monomer	Rizzo <i>et al.</i> ³⁴
eGFP	Green	<i>Aequorea victoria</i>	488	507	+++	++++	Weak dimer	Tsien ²⁹
meGFP	Green	<i>Aequorea victoria</i>	488	507	+++	++++	Monomer	Heim <i>et al.</i> ³⁵
eYFP	Yellow	<i>Aequorea victoria</i>	514	527	++++	++	Weak dimer	Miyawaki <i>et al.</i> ³⁶
Venus	Yellow	<i>Aequorea victoria</i>	515	528	++++	+	Weak dimer	Nagai <i>et al.</i> ³⁷
mVenus	Yellow	<i>Aequorea victoria</i>	515	528	++++	+	Monomer	Nagai <i>et al.</i> ³⁷
DsRed	Red	<i>Discosoma</i> sp.	558	583	++++	++++	Tetramer	Matz <i>et al.</i> ³⁸
mRFP1	Red	<i>Discosoma</i> sp.	584	607	++	+	Monomer	Campbell <i>et al.</i> ³⁹
tdTomato	Red	<i>Discosoma</i> sp.	554	581	++++	+++	Tandem dimer	Shaner <i>et al.</i> ⁴⁰
mCherry	Red	<i>Discosoma</i> sp.	587	610	++	+++	Monomer	Shaner <i>et al.</i> ⁴⁰

Table 5.1 Properties of frequently used FPs and their implementation as FRET pair for ratiometric and fluorescence lifetime imaging—cont'd
Example of FRET pair fluorescent proteins

FRET pair	Recommended donors	Recommended acceptors	Donor excitation (nm)	Acceptor emission (nm)	Laser	R_0^c	References
Cyan–yellow	meCFP/ mCerulean	eYFP/mVenus	433–452/ 433–445	527/528	Violet	4.92 ± 0.10	Allen and Zhang ⁴¹
Green–red	meGFP	mRFP1/mCherry/ tdTomato	488	607/610/581	Argon	4.73 ± 0.09	Harvey <i>et al.</i> ⁴²

^aThe colors represent the emission fluorescence of the corresponding fluorescent protein.

^bMaximum wavelengths of the excitation and emission spectra.

^c R_0 : Förster distances r_0 for FRET pairs of fluorescent proteins. R_0 values are given in nanometers.

References 29–42.

Adapted from Refs. 30,31.

spectrum, lifetime, anisotropy, and so on. In the particular case of biosensor application, the most popular technique is called the “sensitized emission,” which consists in acquiring the fluorescence emitted by the donor only and the acceptor only, after donor excitation. However, several other techniques offer very interesting alternatives for quantifying the molecular activity, for example, (i) spectral imaging, which consists of excitation at one wavelength and measurement of the whole emission spectrum, and (ii) FLIM for measuring the lifetime changes of donor fluorescent proteins.

Each of these techniques has its own advantages and drawbacks. Using two extreme examples, sensitized emission is the simplest method and can be performed on nearly all conventional microscopes, but it requires great care with regard to biological references; FLIM, on the other hand, needs tricky instrumentation but can yield unambiguous measurements of FRET efficiency. In the following section, systems needed to perform reliable biosensor imaging experiments are therefore described.

4.1. Intensity-based approaches

The most intuitive and easy methods to perform FRET measurements are based on fluorescence intensity. The technique discussed now consists in imaging the sensitized emission, that is, the fraction of acceptor emission induced by the nonradiative energy transfer from the donor molecule. These measurements can be based on either ratiometric or spectral imaging.

4.1.1 Ratiometric approach

FRET measurements using biosensors are usually performed by acquiring the fluorescence emitted by the donor and the acceptor. The resulting data are usually represented by the ratio of these fluorescence measurements after appropriate corrections. The classical ratiometric approach, which is based on Equation (5.14), consists in measuring at least three channels: (i) excitation and observation of the donor (I_{donor}); (ii) excitation of the donor and observation of the acceptor (I_{FRET}); and (iii) excitation and observation of the acceptor (I_{acceptor}). I_{acceptor} is needed to compensate for donor and acceptor concentration differences, thus accounting for bleed-through and nonspecific excitation.⁴⁸ In the case of biosensor measurements performed on living cells, the donor and acceptor amounts are identical and the last channel acquisition is useless. In this particular case, only (i) and (ii) are required and, as will be seen in Section 5, correction by acceptor channel will even decrease the signal-to-noise ratio of the measured signal. This experimental condition is formally similar to the well-described conditions used to

Table 5.2 Example of the adapted filter set for the CFP/YFP FRET pair⁴⁸

Channel	Excitation filter	Excitation dichroic	Emission filter
I_{donor}	420/20	450	475/40
I_{FRET}	420/20	450	535/25

image calcium with ratiometric indicators, except that calcium probes such as fura-2 show a ratiometric change for two different excitation wavelengths while biosensors show a ratiometric change of the fluorescence emission for one excitation wavelength.

One major advantage of this technique is that it requires only two wide-field or confocal images, allowing for high-speed acquisitions of fluorescence images with systems equipped with appropriate filter sets available in most imaging core facilities (Table 5.2).

Special care must, however, be taken to limit the delay between the acquisition of I_{donor} and I_{FRET} to avoid artifacts due to cell movement between two image acquisitions (see Section 7 of this chapter). The traditional system needs a filter cube change and thus a delay of several hundreds of milliseconds between image acquisitions is possible, which is not negligible compared to the movement times of cells or organelles. Instead of changing the fluorescence cube, which may worsen image registration, a faster solution is the use of a filter wheel between the microscope and the camera, which allows changes to be made in the emission filter in less than 100 ms. Solutions have also been developed to perform simultaneous acquisitions of both channels, as described in Fig. 5.11.^{49–51}

These wide-field configurations allow fast acquisition of both channels but they lack optical sectioning capability. Confocal microscopes can also be used in the same way, with excitation of the donor and simultaneous collection of the fluorescence emitted by donor and acceptor molecules. This allows for a three-dimensional localization of the biosensor response, and video-rate confocal microscopes can be used when a high spatial resolution is needed, as shown by the early use of biochemical biosensors.⁵² The use of confocal microscopes also opens the way to more complex acquisition procedures such as spectral imaging.

4.1.2 Spectral imaging

Most of the latest confocal microscopes are designed for spectral imaging either in the sequential mode or, most interestingly, for biosensor imaging in the simultaneous mode.⁵³ Indeed, for FRET applications, spectral imaging is

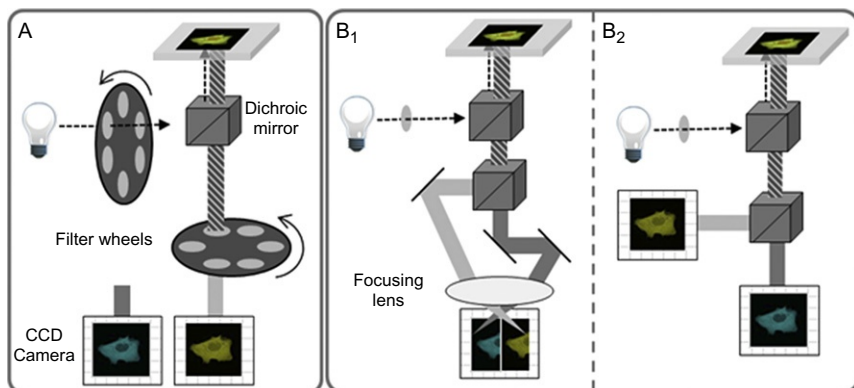


Figure 5.11 Examples of the setup optimized for ratiometric FRET measurements. In (A), images are acquired sequentially. A fast filter wheel allows fast switching between both acquisitions (10–30 ms). In (B), images are acquired simultaneously. A dichroic mirror is used to separate the emission from donor and acceptor molecules. A focusing lens can then be used for directing the light of both channels on each half of the same camera (B₁), or two different cameras can be used for light collection (B₂).

a slower but more precise configuration for measuring sensitized emission. It consists in measuring for each pixel of an image the overall emission spectrum and is not limited to only two bandwidths using filters (see Fig. 5.12 for more details about the setup).

Gathering fluorescence emission spectra then allows donor and acceptor emission spectra to be separated according to the distinct shape of both spectra after spectral unmixing. The fluorescence signal is then analyzed in the same way as traditional ratiometric images are. It, however, allows for distinguishing the real FRET signal from other elements that may alter this measurement, such as autofluorescence or the presence of multiple fluorophores in the sample, and it can then be used in more complex biological environments.

4.1.3 Lifetime-based approaches

Fluorescence lifetime is inherently quantitative and is most of the time independent of the concentration of the fluorophore. Furthermore, FRET-FLIM experiments need measurements of the donor fluorescence lifetime only (cf. Eqs. 5.16, 5.18, and 5.29), which makes it extremely valuable for simultaneous multibiosensor measurements. Lifetime measurement, however, requires dedicated and more sophisticated instruments than for ratiometric imaging. The measurement can be done in either the time domain (TD FLIM) or the frequency domain (FD FLIM) (Fig. 5.13). In

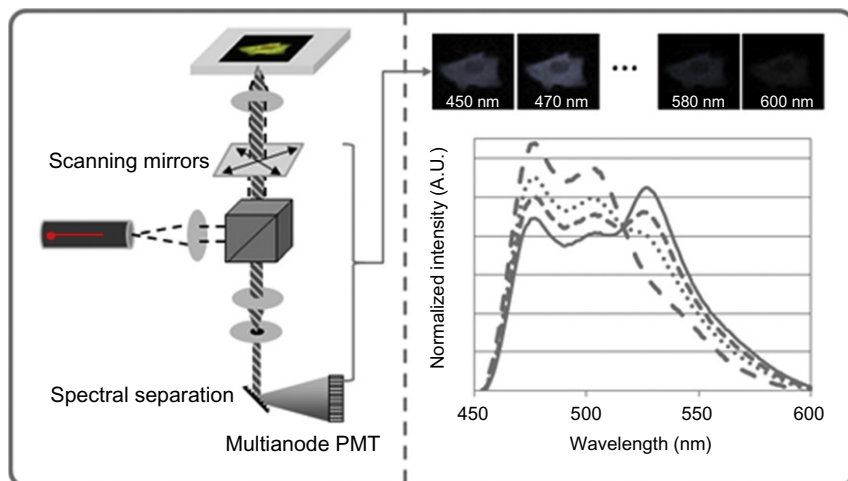


Figure 5.12 Simplified scheme of a confocal setup allowing spectral imaging in simultaneous mode. Briefly, a laser beam scans the specimen using scanning mirrors. The pinhole conjugated to the focal plane rejects light emitted by objects outside this focal plane, which results in optical sectioning. Spectral separation is then achieved by a grating combined to recycling systems, allowing minimal loss of light. The light is then collected using a multianode PMT. The fluorescence spectrum is recorded for each pixel.

the following sections, the two most representative techniques, time-correlated single-photon counting (TCSPC) for TD FLIM and phase and modulation measurements for FD FLIM are discussed in detail.

4.1.4 Time domain: TCSPC

Most TCSPC systems are implemented on a confocal microscope equipped with

- a pulsed laser source. The source must produce short laser pulses (from several hundred femtoseconds to picoseconds' width) with a frequency usually ranging from 10 to 80 MHz. It is interesting to note that the Ti:Sa laser matches these specifications, which can be of great help in deep and noninvasive biosensor imaging;
- detectors with a fast instrumental response. Optimal instrumental response function can be obtained using a multichannel plate or the latest generation of avalanche photodiodes (< 50 ps full-width at half-maximum), but they are extremely fragile and require careful handling. TCSPC manufacturers therefore provide more robust detectors, that is, optimized photomultiplier tubes, with an IRF of around 250 ps adapted

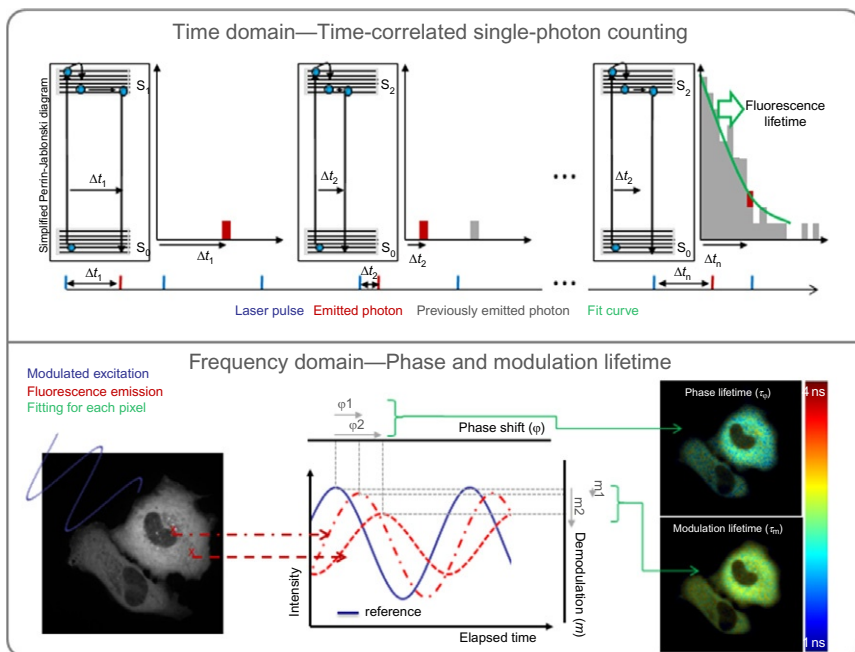


Figure 5.13 Principle of lifetime measurements. (A) In the time domain, a pulsed laser is used to excite fluorophores. The time between photon excitation and emission is measured and accumulated to get an histogram of photon emission time. Fluorescence lifetime is then estimated from the slope of this exponential decay. (B) In the frequency domain, a modulated excitation is used to excite the sample. Monitoring of the fluorescence phase and modulation shift compared to a reference with known fluorescence lifetime is used to calculate phase and modulation lifetimes.

for TCSPC experiments, which, however, necessitates particular attention during photon decay curves analysis;

- a photon counting card. All the systems rely on the same principle, which is based on a time amplitude converter. It consists in a linear voltage ramp started by the arrival of a photon and stopped by the next laser pulse. The output voltage will thus be proportional to the photon arrival time. However, the ramp is triggered only by a photon arrival followed by a laser pulse, which means that if two photons are acquired between two laser pulses, only the first photon will be measured. This is the “pulse pile-up” effect (Fig. 5.14A). To avoid this statistic selection of fastest photons, one has to limit the acquisition frequency to one-hundredth of the excitation frequency (giving rise to an error every 10,000 photons), which explains the longer acquisition time of this technique.

An example of such a setup²³ is presented in Fig. 5.14B.

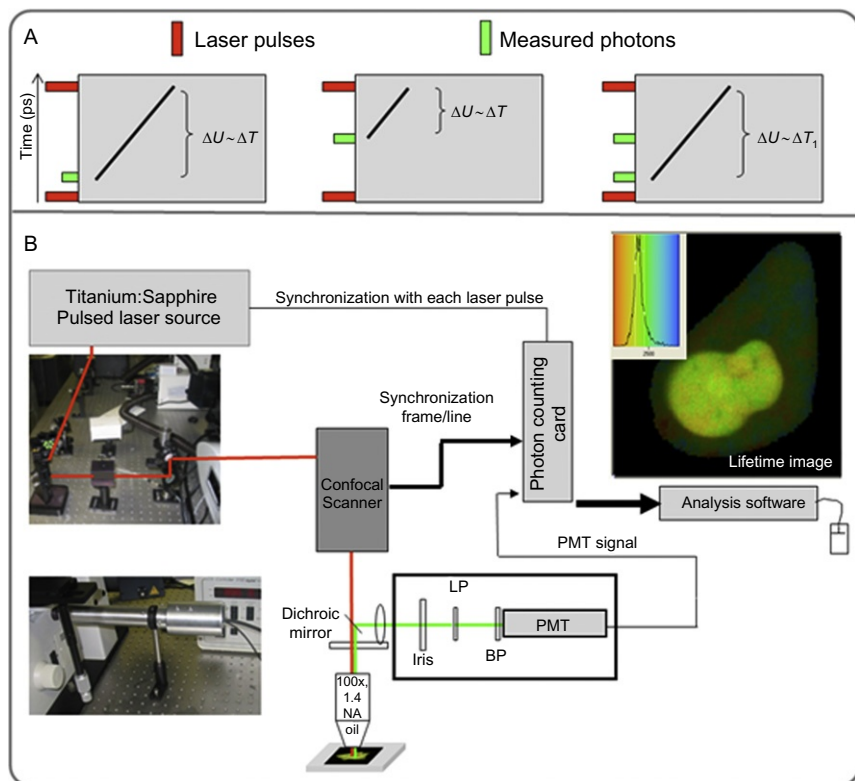


Figure 5.14 (A) Principle of the time amplitude conversion. On the left, a fast photon is measured and starts the linear tension ramp resulting on a large ΔU corresponding to the difference in time between a photon emission and the following laser pulse. While the excitation is at constant frequency, the measured ΔU allows the retrieval of the photon emission time. The same explanation is also valid for a slow photon (middle scheme). However, if two photons are emitted between two laser pulses, only the first one is measured. This effect, called “pulse pile-up,” induces an artifactual decrease in the measured fluorescence lifetime. (B) Scheme of a typical TCSPC acquisition setup with a laser source allowing two-photon excitation. Pictures on the left show the injection of the infrared laser in a confocal scan head (upper panel) and the detection module adapted on the descanned position of the confocal microscope.

4.1.5 Frequency domain: Phase and modulation

In many experimental FD FLIM systems described in the literature, the modulated excitation light source is composed of a laser (diode, solid-state, gas, or dye lasers) combined with an external modulator (either an acousto-optic or an electro-optic modulator).^{54–56} The advent of commercially available LEDs (light-emitting diodes), which can be directly modulated,

has contributed to the simplification of the instrumentation and reduced the cost of FD FLIM systems.^{57–59}

Measurement of the phase and modulation quantities can be performed with two approaches: the heterodyne and the homodyne methods. The heterodyne method is the preferred approach for accurately estimating fluorescence lifetime components in cuvette experiments. It has also been successfully applied in FLIM experiments in combination with scanning-mode and single-channel detectors (usually with a gain-modulated photomultiplier⁵⁴). This method is thus compatible with laser scanning microscopes (such as confocal and multiphoton microscopes), which offer high three-dimensional spatial resolution and good signal-to-noise ratios.

The homodyne method, which consists in modulating the excitation light and the detector at the same frequency, is routinely used in many biological and biophysical laboratories because it can be performed with wide-field detectors (such as a modulated intensified CCD camera). This approach has been implemented in classical wide-field fluorescence microscopy, which enables rapid FLIM image acquisition.^{57–60} However, one limitation inherent in this system is the nonconfocality of the excitation and, consequently, of the fluorescence emission. To improve the axial discrimination of the FD FLIM system, it can be simply combined with either a single-plane illumination strategy⁶¹ or a spinning disk module^{62,63} (an example of such an implementation is presented in Fig. 5.15).

Nowadays, several companies (ISS, Intelligent Imaging Innovations, Lambert Instruments) have introduced commercial FD FLIM systems that can be fully integrated with all commercial multiphoton, confocal, or wide-field microscopes.



5. DATA ANALYSIS

5.1. Ratiometric imaging

Data processing methods for reaching quantitative FRET measurements between two fluorescent molecules with ratiometric imaging have been exhaustively covered.^{64–66} Briefly, in order to correct for both varying, unknown concentrations of the donor and acceptor and instrumental artifacts (e.g., spectral bleed-through), a large number of methods have been proposed with different numbers of images and thus different levels of complexity.^{64,65,67} Among these, the most robust and widely used method requires the acquisition of three fluorescence images. In this case, the ratio R is defined by⁶⁸

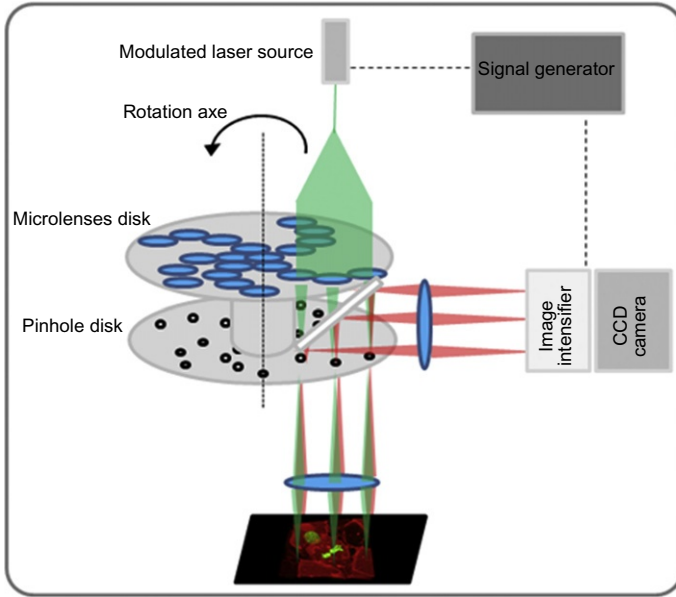


Figure 5.15 Scheme of a phase and modulation acquisition system adapted on a spinning disk system to ensure fast fluorescence lifetime measurement with optical sectioning capability.

$$R = \frac{I_{\text{FRET}} - \alpha \times I_{\text{Donor}} - \beta \times I_{\text{Acceptor}}}{I_{\text{Donor}}} \quad [5.27]$$

where I_{Acceptor} is the fluorescence intensity measured with an acceptor emission filter after acceptor excitation, I_{Donor} and I_{FRET} are fluorescence intensities measured, respectively, with the spectral bandpass of the donor and acceptor after donor excitation, and α and β are the correction factors for, respectively, the bleed-through of the donor into the acceptor emission filter after donor excitation and the bleed-through of the acceptor into the acceptor emission filter after donor excitation.

In the particular case of a single-chain biosensor, the expression (27) can be simplified. Indeed, donor and acceptor concentrations are identical, which implies that bleed-through correction factors α and β are linearly dependent and that fluorescence intensities I_{Acceptor} and I_{Donor} are proportional. Taking into account these simplifications, a straightforward calculation leads to

$$R = \frac{I_{\text{FRET}}}{I_{\text{Donor}}} - c \quad [5.28]$$

where c is a constant that is dependent on the fluorophore's properties. This constant, which is just an offset modification of the ratio R , does not give any supplementary information.

For a single-chain biosensor, the ratio R is then fully described by the ratio of the fluorescence intensities, $I_{\text{FRET}}/I_{\text{Donor}}$. Consequently, the third fluorescence image I_{Acceptor} (see Eq. 5.27) is not useful; this additional image acquisition will just increase the complexity of instrumentation, the time of acquisition (and thus the related movement artifacts), and the noise propagation in the ratio calculation.

Even though the expression of the ratio is extremely simple, the fact must be emphasized that obtaining reliable R values requires special care and numerous corrections, which have been exhaustively detailed elsewhere.^{68,69} Briefly, we need to compensate for instrumental artifacts (camera offset subtraction, shading or flat-field correction for the nonuniformity of the illumination, correction for misalignments between two fluorescence images due to chromatic aberration) and for chemical and biological artifacts (photobleaching correction for taking into account the different donor and acceptor photobleach rates⁷⁰, optional autofluorescence subtraction, correction for cell movement, or deformation between acquisition time).

Calculation of the corrected ratio R from acquired fluorescence images can be performed instantaneously pixel by pixel, and the calculated R values can be displayed with pseudocolor superimposed on the fluorescence intensity image in real time, making it possible to follow the biosensor activity^{71–73} (see Fig. 5.16). Ideally, for a sensor binding to a single molecule (such as fura-2), the ligand concentration $[L]$ is directly related to the ratio as⁷⁴

$$[L] \propto \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \quad [5.29]$$

where $R_{\min}$ and $R_{\max}$ are, respectively, the minimum and maximum ratios. However, regarding single-chain biosensors, it is usually not possible to have access to these ratios. In this case, the normalized ratio $\Delta R/R_{t_0}$ can be used to facilitate the comparison between all cell responses (cf. Fig. 5.16). This normalized ratio is defined by

$$\frac{\Delta R}{R_{t_0}} = \frac{|R - R_{t_0}|}{R_{t_0}} \quad [5.30]$$

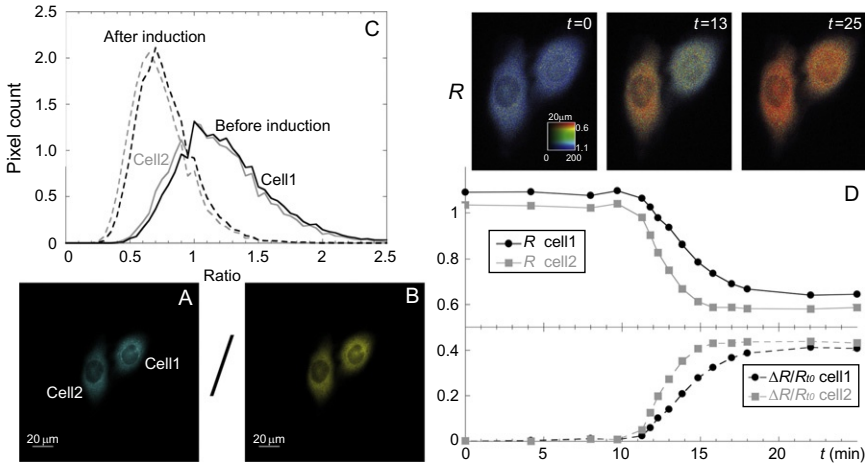


Figure 5.16 Data analysis for FRET imaging with a standard wide-field epi-fluorescence microscope. The fluorescence intensity images of living cells transfected with $T\text{Epa}^{\text{CV}}$ acquired with two distinct filters sets: donor emission and acceptor emission (after donor excitation) are shown, respectively, in (A) and (B). The resulting ratio R can be calculated pixel by pixel (after instrumental correction) and the ratio distributions of both cells are indicated in (C) before ($t=0$) and after induction ($t=25$ min). The mean ratio is extracted from these distributions for each cell and plotted as a function of time in (D). The corresponding ratio images are also represented in the upper part of the panel. Finally, also indicated in (D) is the normalized ratio $\Delta R/R_{t_0}$ which simplifies the comparison between cell responses.

where R_{t_0} is the initial ratio (measured at time $t=0$).

The fact that this normalized ratio (and the ratio R) gives just an indication of the relative changes between the biosensor “ON” and “OFF” states must be emphasized. In other words, determination of individual concentrations of both biosensor states with ratiometric imaging is not feasible in the cellular environment,⁷⁵ since all biosensors expressed are not optically active. In fact, the maturation and the photodegradation (photobleaching) of the two fluorescent proteins (donor and acceptor) are processed at different rates.^{70,76} This leads to a population of biosensors whose fluorescence emission is no more related to the physiological state of the cell (unresponsive donor-only and acceptor-only single-chain biosensors).

5.2. Fluorescence lifetime imaging

Unlike ratiometric imaging, which is based on fluorescence intensity being directly related to the fluorophore concentration (of both the donor and the acceptor), lifetime measurements are generally independent of these

concentrations. It allows determining quantitatively the proportion of interacting donor and the FRET efficiency in living cells.

5.2.1 Frequency-domain lifetime imaging

5.2.1.1 Recovering phase shift and modulation depth in single frequency experiments

The first step of FD FLIM data analysis consists in retrieving the phase and modulation values (φ and m) from fluorescent images acquired with either the heterodyne or the homodyne method (see [Section 4](#)).

With the heterodyne method, the detector is modulated at a frequency $\omega + \Delta\omega$ (where $\Delta\omega$ is a low frequency in the kilohertz range), which is slightly different from the modulation frequency ω of the excitation source. The resulting signal collected by the FLIM system ($S_{\text{heterodyne}}$) is thus modulated in time at the low frequency $\Delta\omega$:

$$S_{\text{heterodyne}} \propto 1 + \frac{m_{\text{ex}} m_{\text{de}} m}{2} \cos(\Delta\omega t + \Delta\phi - \varphi) \quad [5.31]$$

where $\Delta\phi$ is the phase shift between excitation and detection, m_{ex} and m_{de} are, respectively, the modulation amplitude of excitation and detection. By recording this signal $S_{\text{heterodyne}}$ at various time delays t and fitting it as a function of time with a cosine function of the low cross-correlation frequency $\Delta\omega$, we can extract the phase shift φ and modulation depth m for each pixel of the FLIM image.

In the homodyne implementation (when the frequencies of excitation and detection are identical), the collected signal, which is no longer modulated, is a direct current (DC) component defined by

$$S_{\text{homodyne}} \propto 1 + \frac{m_{\text{ex}} m_{\text{de}} m}{2} \cos(\Delta\phi - \varphi) \quad [5.32]$$

with m_{ex} and m_{de} , respectively, the modulation amplitude of excitation and detection. The phase shift $\Delta\phi$ between excitation and detection varies from 0 to 360° (2π) with K equally spaced intervals. For each phase shift $\Delta\phi$, the DC collected signal is recorded for each pixel of the FLIM image. By fitting this collected signal S_{homodyne} with a cosine function of $\Delta\phi$, the resulting phase φ and modulation m are calculated pixel by pixel (cf. [Fig. 5.17](#)).

5.2.1.2 Calculation of the fluorescence lifetime and data representation

Once the phase φ and modulation m have been determined for each pixel of the image, these m and φ values are further manipulated for evaluating the fluorescence lifetime of the sample. In order to obtain correct lifetime values

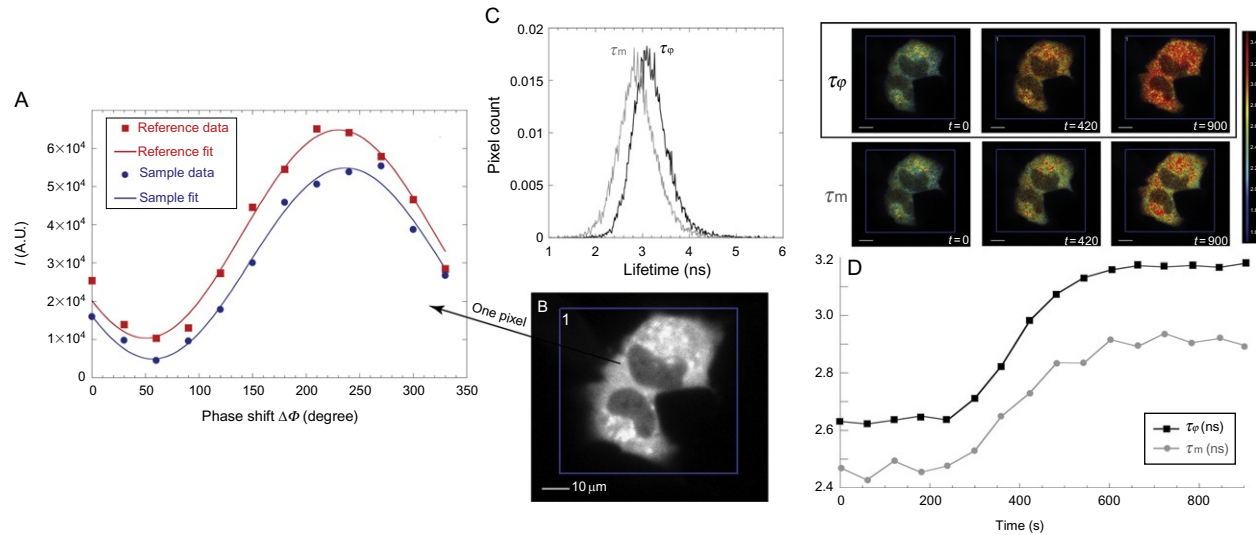


Figure 5.17 Data analysis of fluorescence lifetime measurements acquired with homodyne method. (A) Experimental reference and sample fluorescence intensities (dots) as a function of the phase shift $\Delta\phi$ between excitation and detection for one pixel; the corresponding fits from which the phase φ and modulation m are deduced are indicated with lines. (B) Fluorescence intensity image of living cells transfected with $T_{\text{Epac}}^{\text{VV}}$. Phase and modulation lifetime (τ_m and τ_ϕ) distributions for the selected area are represented in (C). Mean values are deduced from these distributions and their evolutions in time are shown in (D). Corresponding phase and modulation lifetime images are also displayed for three distinct times.

with both methods (heterodyne and homodyne method), calibration of the FLIM system with a reference of known fluorescence lifetime τ_{ref} is indispensable for taking into account the phase shift and modulation introduced by the electronics and optics (cf. Eqs. 5.31 and 5.32). The fluorescence lifetime of an unknown sample is then defined by⁷⁷

$$\tau_m = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{m_{\text{ref}}^2}{m^2} (1 + \omega^2 \tau_{\text{ref}}^2) - 1} \quad [5.33]$$

$$\tau_\varphi = \frac{1}{\omega} \tan(\varphi - \varphi_{\text{ref}} + \tan^{-1}(\omega \tau_{\text{ref}})) \quad [5.34]$$

where φ_{ref} and m_{ref} are, respectively, the phase and modulation values estimated from the reference. The fact that these fluorescence lifetimes (τ_m and τ_φ) are calculated for each pixel must be emphasized. The resulting FLIM image, which is displayed using a color scale, is usually superimposed on the intensity image in order to highlight the brightest regions (see Fig. 5.17).

When using the FD FLIM system to record biosensor activity in living cells, evolutions in time of the phase and modulation lifetimes (τ_φ and τ_m) are sometimes represented.⁷³ However, this method gives just an indication of the relative changes between the two states of the biosensor. In fact, these phase and modulation lifetimes acquired during a single-frequency experiment do not correspond to the true lifetimes of the biosensor. To recover these true lifetime components, it is necessary to acquire multiple frequency FLIM images and to fit pixel by pixel the experimental phase φ and modulation m for each frequency ω with a function of ω .⁵⁹ Experimental data are usually adjusted to the theoretical values by minimizing an error function (using a Levenberg–Marquardt algorithm) without any *a priori* information on the lifetime components.^{59,78,79} If it can be assumed that the lifetime information is the same for all pixels of the FLIM image, data can be globally analyzed.^{80,81} In both cases, obtaining reliable lifetime components is time consuming and it is hardly accessible to the nonexpert.

5.2.2 Time-domain lifetime imaging

5.2.2.1 Extracting lifetime components

In time-domain methods, fluorescent samples are repeatedly excited by short pulses of light, and the resulting fluorescence intensity decay histograms can be recorded for each pixel of the FLIM image with different detectors (see Section 4). Regardless of the technique employed, experimental lifetime components are usually deduced by adjusting the experimental decay histograms with the theory. In TD FLIM, the theoretical detected

intensity profile $F(t)$, which is dependent on both the fluorescence sample and the instrumentation, is defined by Eq. (5.26).

This fitting procedure is usually performed with the least squares method (LSM), which consists in minimizing an error function χ^2 defined as the total squared differences between experimental data points x_i and theoretical values s_i deduced from Eq. (5.26):

$$\chi_{\text{LSM}}^2 = \frac{1}{N_d - p} \sum_{i=1}^{N_d} \frac{(s_i - x_i)^2}{x_i} \quad [5.35]$$

where N_d is the number of data points and p is the number of fitting parameters. The minimization of this error function is generally performed with the Levenberg–Marquardt algorithm, which has been implemented in most of the commercially available FLIM analysis software. This commonly used FLIM image analysis strategy is robust and gives reliable results when the number of photons is large^{8,11,23,82} (cf. Fig. 5.18).

However, if the total number of photons is low, the LS method becomes inaccurate because its error function assumes that the noise is described with a Gaussian instead of a Poisson distribution, which is incorrect. In the case of a small number of photons, a solution named “adaptive Monte Carlo data inflation” (AMDI) algorithm is used, which consists in inflating statistically the number of photons for being compatible with the LS method.¹¹ Another possibility, which is called the “maximum likelihood estimation” (MLE) method,^{82,83} is to modify the error function to take into account the Poisson noise distribution. This error function is now defined as⁸³

$$\chi_{\text{MLE}}^2 = \frac{2}{N_d - p} \sum_{i=1}^{N_d} (s_i - x_i) - \frac{2}{N_d - p} \sum_{i=1}^{N_d} x_i \ln \left(\frac{s_i}{x_i} \right) \quad [5.36]$$

It was demonstrated that both solutions (AMDI and MLE methods) give an accurate lifetime component estimation of multiexponential intensity decays with a reduced number of photons, in comparison with the LS method.^{11,82} Finally, it has been recently demonstrated that an alternative method based on Bayesian analysis enables the correct estimation of the lifetime of monoexponential decays with a few photons.⁸⁴ However, this method was never applied with multiexponential decays, which limits its application in the context of biosensor activity measurements.

5.2.2.2 Exploiting data

As already mentioned, the fluorescence intensity decay of a single-chain biosensor is described with multiexponential terms (cf. Eq. 5.10).

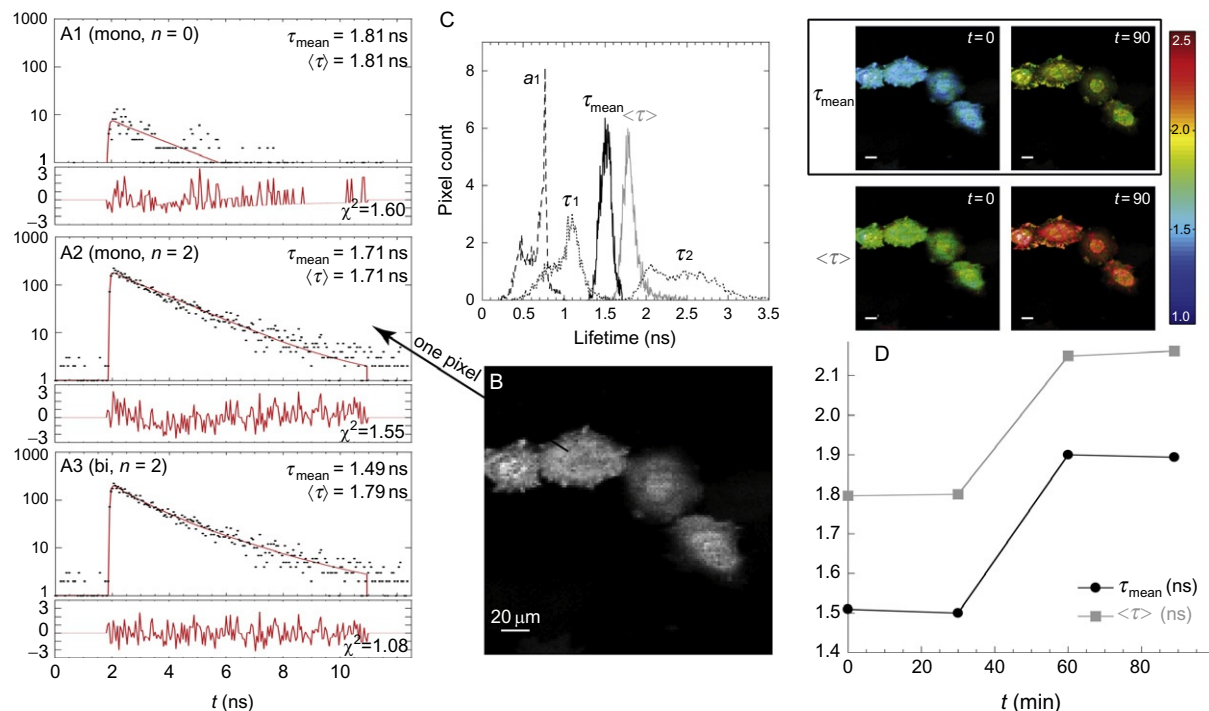


Figure 5.18 Data analysis of fluorescence lifetime measurements acquired with the time-correlated single-photon counting (TCSPC) method. (A1) Typical experimental intensity decay (dots) acquired in a few milliseconds per pixel (corresponding to an acquisition time of 300 s for the complete image represented in (B)); the fit obtained with standard least squares method (LSM) is indicated with a line. Because of the small photon count N , the error function (χ^2) is nonflat and elevated, indicating that the adjustment is not perfect. (A2) One possibility to increase N consists in applying a spatial binning of factor n (sum all pixels comprised in a $(2n + 1)^2$ squared region). In this case, the fit is slightly improved but χ^2 is still nonflat because the monoexponential model is not adapted. (A3) When the biexponential model is used, the fit is satisfactory, which means that the sample proportion and lifetime can be correctly estimated. (B) Fluorescence intensity image of living cells transfected with TEpac^{VV} . The distributions of all fitting parameters (a_1 , τ_1 , and τ_2) for the complete image are shown in (C). Also represented are the mean lifetime τ_m and the average lifetime $\langle \tau \rangle$ distributions. Their evolutions as a function of time are plotted in (D). The corresponding mean and average lifetime images are also displayed in the upper part of the panel.

Regardless of the fitting method employed (and as previously described), the final purpose of the FLIM data analysis is to correctly extract both the proportions and the lifetime components for each pixel of the image. This can be achieved preferentially without constraining any fitting parameters (cf. Fig. 5.18). However, for sample-emitted fluorescence whose intensity decay is multiexponential, the correct estimation of all parameters with a standard fitting method requires a large number of photons ($N > 100,000$ ⁸⁵). For decreasing this number and consequently the acquisition time and phototoxicity, we have already detailed in previous paragraphs two solutions based on algorithm implementation (MLE and AMDI). An alternative solution consists in reducing the number of fitting parameters by constraining one of them, for example, the donor lifetime, but it makes it necessary that the donor lifetime is monoexponential and that it has been precisely determined in a previous experiment (which requires a modified biosensor without acceptor). Another possibility is to analyze the data globally, but it is valid only if one can assume the lifetime information to be identical for all pixels of the FLIM image (or a selected area).^{86,87} In all cases, it requires expertise and computation time for obtaining reliable lifetime values with fitting methods.

Once the lifetime components have been correctly estimated, the resulting lifetime images are displayed using a color scale and are usually overlaid on the intensity image for weighting the lifetime value with the fluorescence intensity (cf. Fig. 5.18). However, due to the large number of parameters (proportion and lifetime components), it is not possible to represent the evolution of all of them. In order to simplify data representation, the mean lifetime τ_{mean} defined by Eq. (5.13) has been largely used in FRET experiments.^{8–11} However, the mean lifetime does not correspond to the correct average lifetime, which is defined by Eq. (5.12). This average lifetime has been recently used for biosensor activity recording.⁸⁸ However, the reader should be informed that this quantity is not monotonous as a function of the donor lifetime in the presence of the acceptor. In other words, one average lifetime value can be found with two distinct donor lifetimes in the presence of the acceptor for a fixed proportion of the interacting donor. Consequently, the knowledge of both the average lifetime and the fraction of the interacting donor is not enough to entirely characterize the fluorescent sample. Due to the nonuniqueness of the average lifetime, it is also necessary to combine it with another parameter (e.g., FRET efficiency).

5.2.3 Nonfitting-based approaches

In the previous section, it was mentioned that the correct analysis of the acquired fluorescent signal with fitting methods is time consuming and necessitates a high level of expertise. In order to simplify the analysis of FLIM images and to make it accessible to the nonexpert user, novel methods based on nonfitting approaches have been developed recently.^{89–92} This section limits the review to two approaches that are applicable to a large range of lifetime acquisition techniques: the minimal fraction of interacting donor (mf_D)⁹⁰ and the polar approach or phasor.^{89,91} The rapid lifetime determination, which is restricted to time-gated FLIM images with two temporal channels, is voluntarily omitted.^{93,94}

The minimal fraction of interacting donor mf_D , which was introduced by Padilla-Parra *et al.*,⁹⁰ can be applied with all TD FLIM techniques (TCSPC, time-gated, etc.). It is defined by

$$mf_D = \frac{1 - \langle \tau \rangle / \tau_2}{(\langle \tau \rangle / (2\tau_2) - 1)^2} \quad [5.37]$$

where τ_2 is the lifetime of the donor alone and $\langle \tau \rangle$ is the mean lifetime defined by Eq. (5.12) (see previous section). The computation of $\langle \tau \rangle$ is straightforward and can be performed pixel by pixel and recovered online during FLIM acquisition. When the lifetime of the donor alone τ_2 is mono-exponential and known (implying that it has been measured in a previous experiment which is typically not performed in a biosensor experiment), it can be deduced from Eq. (5.37) that the computation of the mf_D is a simple calculation that can be performed online on a standard computer. This is a major advantage when following the biosensor activity over time in live cells, since the user has immediate access to quantitative information, which is the minimal fraction of the interacting donor. This indicator varies between 0 when there is no interaction and 1 when all the donors interact. It is a robust indicator, but the reader is reminded that it gives information on the minimum of the interacting proportion alone and not on the exact quantity α_1 .

The polar approach or phasor is another nonfitting method that has been successfully applied in FLIM experiments. This method was initially described by Jameson *et al.*⁹⁵ and then successively improved by different groups.^{96–98} It consists in converting the lifetime image into a new two-dimensional histogram called “polar” or “phasor.” In this polar representation, each point that is defined with $[u; v]$ coordinates

corresponds to one pixel of the FLIM image and vice versa. Consequently, one FLIM image is transformed into a scatter diagram whose position gives an indication on the number of exponentials present in the intensity decay. For example, when the fluorescence emitted by the sample decays monoexponentially, the scatter diagram is localized on the semicircle centered at $[0.5, 0]$ with a radius of 0.5 (see Fig. 5.19). Short fluorescence lifetimes are close to the coordinates $[1, 0]$, whereas long lifetimes approach the origin $([0, 0])$. If multiple lifetime components are present in the sample, the scatter histogram is located inside the semicircle, which can be helpful for identifying a mixture of several molecular species or a FRET phenomenon.^{89,96} This approach can be applied with both FD⁹⁶

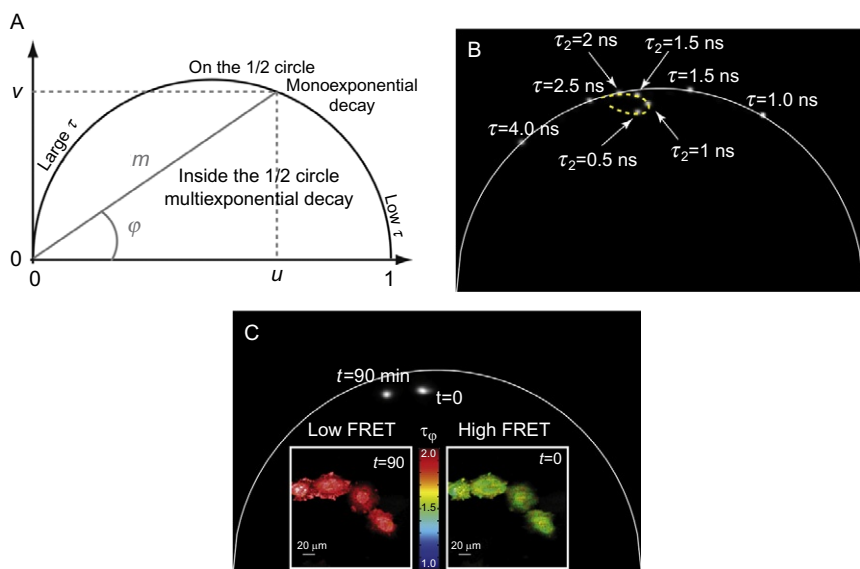


Figure 5.19 Data analysis of fluorescence lifetime measurements with the polar approach or phasor. (A) Illustration of the polar representation. Lifetime measurements of fluorescent sample with single-exponential decay are localized on the semicircle. If multiple lifetime components are present in the sample, the FLIM acquisitions are located inside the semicircle. (B) Example of the polar representation with simulated FLIM images. As expected, spots corresponding to FLIM images simulated with monoexponential decays are positioned on the semicircle whereas spots issues from simulated data with biexponential decays are inside. Also represented with dashed line is the FRET trajectory for a proportion of interacting donor $\alpha_1 = 0.5$. (C) Application of the polar representation to biosensor experiment realized in living cells transfected with $T^{\text{Epac}}^{\text{VV}}$. We can clearly distinguish two spots corresponding to both conformations of the biosensor (high FRET and low FRET). We have also displayed resulting phase lifetime images.

and TD^{89,92} FLIM acquisition systems and it has been recently used with biosensors.^{75,99}

In TD FLIM experiments, the u and v coordinates are, respectively, the cosine and sine transforms of the fluorescence intensity decay $I(t)$ and they are defined by

$$u = \frac{\int I(t) \cos(\omega t) dt}{\int I(t) dt} \quad [5.38]$$

$$v = \frac{\int I(t) \sin(\omega t) dt}{\int I(t) dt} \quad [5.39]$$

where ω is the laser repetition angular frequency.

For FD FLIM experiments, ω is the angular frequency of light modulation, and the u and v coordinates, which are directly related to the phase φ and modulation m measured with the FD FLIM system, are given by

$$u = m \cos(\varphi) \quad [5.40]$$

$$v = m \sin(\varphi) \quad [5.41]$$

In both cases (TD and FD FLIM experiments), determination of the $[u, v]$ coordinates can be performed instantaneously. However, the polar representation gives just visual information on the biosensor state and does not allow for obtaining really quantitative information on FRET parameters.

Recently, Leray and coworkers have demonstrated that it is possible to retrieve quantitatively the FRET parameters from the polar coordinates.⁹¹ In fact, the fraction of interacting donors α_1 and the fluorescence lifetime of the donor in the presence of the acceptor τ_1 can be analytically expressed as⁹¹

$$\tau_1 = \frac{1 - u - v\tau_2\omega}{\omega(v - u\tau_2\omega)} \quad [5.42]$$

$$\alpha_1 = \frac{\tau_2(1 + \tau_1^2\omega^2)(1 - u - u\tau_2^2\omega^2)}{(\tau_1 - \tau_2)(-1 + u + u\tau_1^2\omega^2 + \tau_1\tau_2\omega^2 + u\tau_2^2\omega^2 + u\tau_1^2\tau_2^2\omega^4)} \quad [5.43]$$

If the lifetime of the donor alone, τ_2 , is monoexponential and has been measured in a previous experiment (requiring a modified biosensor without acceptor), from Eqs. (5.42) and (5.43) both the lifetime of the donor in the

presence of the acceptor and the fraction of the interacting donor can be easily deduced. We emphasize the fact that these calculations can be performed during the time-lapse acquisition of the biosensor activity, which makes it possible to follow over time the evolution of both the FRET efficiency and the proportion of the interacting donor α_1 .



6. DESIGN AND OPTIMIZATION OF GENETICALLY ENCODED KARs

The design of a FRET biosensor for imaging biochemistry in living cells is based on the development of a single polypeptide capable of generating a conformational change that modulates FRET efficiency in response to a biochemical event, such as phosphorylation in this context.

A genetically encoded KAR is composed of the following key elements: an MRE consisting of a substrate peptide for the kinase of interest, a phosphoamino acid-binding domain to detect the target activity, and a reporting element consisting of a fluorescent protein-based FRET couple flanking the sensing element. These functional parts are joined together with linkers whose optimization is needed as they readily affect the overall dynamic range of the biosensor (Fig. 5.20).

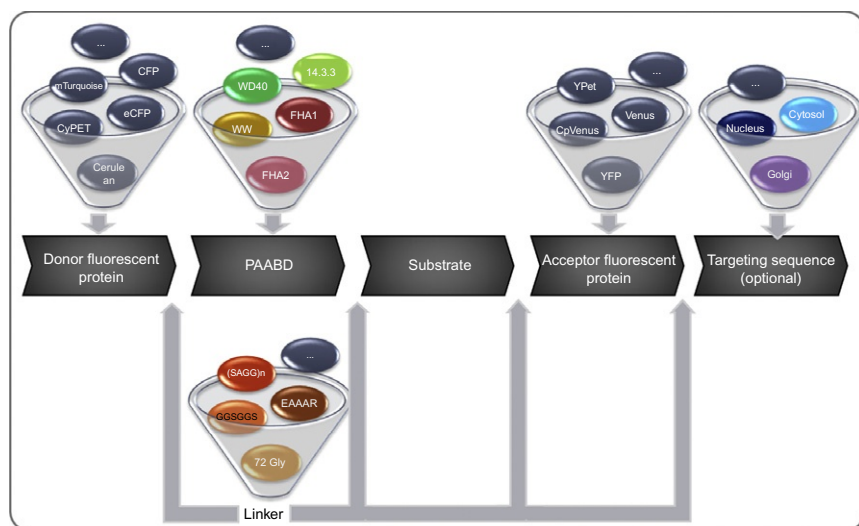


Figure 5.20 Necessary ingredients for making KARs.

The identification and/or optimization of the different components of a KAR are reviewed in this section. A range of KARs have been designed on this model, which allow activity monitoring of many tyrosine and serine/threonine kinases.

6.1. Substrate peptide identification

Many methodological approaches have proven to be useful to identify and characterize that a peptide sequence acts as a specific substrate for a kinase of interest.

The first approach identifies a specific substrate *in silico* by using databases of known substrate sequences of kinases such as UniProtKB/Swiss-Prot, which provide reliable protein sequences associated with a very high level of annotation and a high level of integration with additional databases. However, peptides selected by some knowledge-based libraries (such as UniProt, for instance) can have multiple phospho-acceptor sites. Other databases such as KinasePhos can predict phosphorylation sites within given proteins and provide information on the exact positioning of phosphorylation sites with a link to the corresponding catalytic protein kinases involved.⁴

Another approach relies on the use of the kinase target sequence from a protein known to be phosphorylated by the kinase of interest. Since many kinases have multiple isoforms, substrate sequence could be modified to be more specific toward a protein kinase isoform. The protein kinase C family, with its 10 members, is a good example.^{100,101} The first genetically encoded PKC (protein kinase C)-FRET-based reporter (CKAR, C-kinase activity reporter) is an effective reporter for all PKC isoforms,^{102,103} but each isoform has its own activity signature.¹⁰⁴ Kajimoto *et al.* have designed a new genetically encoded reporter based on the first CKAR but with an ultraspecific substrate to measure only PKC δ activity in different cell compartments. In order to make CKAR more selective for PKC δ , they selected 11 known substrates of PKC δ threonine as phospho-acceptor residues, and kept isoleucine at the position +3 to facilitate binding of the PAABD (see [Section 6.2](#)). Sensors with candidate substrate sequences were characterized *in vitro* and *in cellulo* (see [Section 6.6](#)) for specificity and selectivity. In spite of being time consuming, this kind of approach can provide highly specific and selective KARs.

The last approach enables the identification of protein kinase substrates through large-scale analysis using high-density peptide microarrays from various biological samples. The use of high-throughput technologies has

become an essential step to create and/or optimize a KAR especially when specific substrates of the kinase of interest are not yet known (for review see Ref. 105).

To this extent, two libraries have been established for substrate identification with peptide microarrays. First, knowledge-based libraries contain many small peptide sequences isolated from known proteins. The second library contains *de novo* synthesized peptides using either randomly generated peptides or a combinatorial approach. The first type of library allows the determination of phosphorylation sites using overlapping peptide scans from a known protein sequence. Furthermore, combinatorial and randomly generated peptide libraries are useful in detecting specific kinase substrates. Combinatorial libraries define one or more amino acids at fixed positions (e.g., isoleucine at +3 position after the unique phospho-acceptor residue), while other amino acids (except serine, threonine, tyrosine) are placed at randomized positions. The number of generated peptides is very high compared to that in knowledge-based libraries. Combinatorial libraries have successfully identified PKA (protein kinase A)^{106,107} and PKG (protein kinase G) substrates.^{107,108}

In some cases, a phosphorylation site cannot solely determine substrate specificity of protein kinases. Substrate specificity is also determined by short sequences named “docking sites,” which are specifically recognized by a kinase. Indeed, many studies report that docking sites dramatically increase the efficiency with which a substrate is phosphorylated by a kinase *in vitro* and *in cellulo*.^{109–111} The case of the kinase MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK is a good example because MAPK family members such as ERK, p38, and JNK have similar phosphorylation sites. Distinct docking sites for ERK, p38, and JNK have been identified. It ensures substrate targeting and can be used to design a KAR with high sensitivity and selectivity.

Erkus was the first genetically encoded FRET biosensor of ERK activity in different compartments of single living cells.¹¹² Erkus has a docking site (D domain) connected to the C-terminal of the sensor. This D domain is a common docking site contained in most known endogenous substrates of ERK and increases the probability of substrate phosphorylation by ERK.^{113,114} However, Harvey *et al.*⁴² have developed a new genetically encoded FRET-based biosensor extracellular regulated kinase activity reporter (EKAR) (EKARc and EKARn target cytoplasm and nucleus, respectively). As an improvement, EKAR exhibits a new ERK-specific docking site (FQFP) adjacent to the substrate, resulting in a FRET signal three times larger than that of Erkus, while other potential docking sites

tested in this context greatly reduced the FRET signal of the sensor. This shows that docking sites are very important in the design of new specific and selective KARs (see Ref. 115 for review), which was recently highlighted in a sensor for the M-phase promoting factor.¹¹⁶

6.2. Phosphoamino acid-binding domain

Upon specific phosphorylation, the PAABD recognizes and binds to the phosphorylated substrate, resulting in a conformational change of the polypeptide that somehow alters in the opposite way the fluorescence emission of the two fluorophores. The choice of a good PAABD is a key element of KAR design.¹¹⁷ Protein phosphorylation may lead to the formation of molecular signaling complexes through interactions between specific phosphorylated residues and binding domains. Several binding domains named “modular domains” and “adaptors molecules” have been well characterized and are able to activate a specific pathway. Activation of transmembrane receptors triggers phosphorylation on tyrosine residues, which results in the recruitment and binding of adapter molecules such as Src-homology 2/3 (SH2 SH3) and phosphotyrosine binding (PTB) domains. Similarly, signal transduction involves phosphorylation on serine/threonine residues and thus constitutes consensus sequences recognized by other adapter molecules including 14.3.3 proteins, forkhead-associated (FHA), domains WW domains, and WD40 domains. The phospho-acceptor residue within the substrate sequence then first guides the choice of the PAABD.

Several factors should be considered as they can affect the efficiency and the reversibility of the PAABD binding to the phosphorylated substrate. For example, in order to measure compartmentalized PKA activity in single living cells, Zhang *et al.*¹¹⁸ developed a genetically encoded A-kinase activity reporter (AKAR). This first-generation PKA sensor (AKAR1) used 14-3-3 as a PAABD. Because of the high binding affinity of this PAABD toward the phosphorylated substrate, once phosphorylated, the sensor was blocked in closed conformation, making it weakly sensitive to cellular phosphatase activity and thus irreversible and incompatible with dynamic measurements of PKA activity. To circumvent this problem, 14-3-3 was replaced by an FHA domain in subsequent versions of AKAR,¹¹⁹ yielding AKAR2. When tested in cells, it showed a better dynamic response and a reversible behavior. Similarly, an FHA domain was also used in the first Erk biosensor Erkus.¹¹² Shortly afterward, the development of EKAR⁴² saw the FHA domain replaced by a WW domain. Although both sensors followed the same design

principle, comparative analysis of EKAR and Erkus revealed that the dynamic response of EKAR was greatly improved; the dynamic range of EKAR was higher than that of Erkus.⁴²

Details regarding FHA and WW domains can be found in Refs. 120,121, respectively.

6.3. Optimal linker combinations in FRET-based biosensors

Manipulating the linkers (i.e., swapping the linker from one sensor to another) might prove to be an easier way and should be considered in the first instance. Making highly sensitive FRET biosensors remains difficult and requires fine-tuning. In spite of being time consuming, linker optimization is a crucial step in biosensor design. In fact, FRET efficiency depends essentially on the distance and the orientation of the two fluorophores (see Section 2),¹²² which places linkers at the heart of the dynamic range of biosensors. Linkers are mainly composed of amino acids such as glycine, proline, and alanine, which gives them full flexibility. The classical flexible linker consists of (GGSGGS)*n* which keeps fluorophores at a “safe” distance from one another,¹²³ and the rigid linker is composed of (EAAAR)*n* where FPs are held in “fixed” distance and orientation.

In order to optimize and accelerate the development of FRET-based biosensors, Ibraheem *et al.*¹²⁴ used a reliable high-throughput method by undertaking the optimization of a methylation-sensitive H3K27 sensor—H3K27-MetBio (trimethylation of lysine 27 of histone 3)—mainly based on changes in the length of the linkers. They focused on the optimization of the linker between the PAABD and the substrate. Screening of biosensor variants was performed in colonies of *Escherichia coli* through the generation of many hundreds of different linker combinations using several screening libraries. The efficiency of H3K27-MetBio was improved, with a FRET signal efficiency 2.3 times larger than the original sensor¹²⁴.

In a recent study, Piljic *et al.* focused on the optimization of linkers flanking the FPs.¹²⁵ They developed a reliable and rapid method to generate multiple genetically encoded FRET sensor variants and tested them in reversely transfected mammalian cells. Long linkers improve the flexibility of the sensor and favor orientation of the donor toward the acceptor fluorophore, even though, sometimes, certain short and rigid linkers produce a greater FRET signal.¹²⁵ Improvements of biosensors could also be achieved by varying the linker composition in amino acids using combinatorial and randomly generated linker libraries for detecting the most effective linker composition.

Finally, Komatsu *et al.* established highly sensitive FRET biosensor backbones. Their strategy completely abolished the dependence of the sensors on the orientation of the two fluorophores. Indeed, prediction of the exact orientation of the donor and the acceptor in an optimized sensor is rather difficult.^{103,126} Instead, they optimized biosensor backbones relying entirely on the distance between the fluorophores by modifying the linker between the PAABD and the substrate.¹²⁷ Regular repetitions of the motif (SAGG)*n* (where *n* is the number of repetitions (13–61)) and the 72 polyglycine linker¹²⁸ were utilized and compared.¹²⁷ All generated backbones highlighted that long and flexible linkers reduce the proportion of biosensors folding in the basal state, thereby improving the dynamic range of biosensors.

6.4. Choosing a FRET pair

Historically, the first FRET measurements were performed with the BFP and the enhanced green fluorescent protein (eGFP) as the FRET pair combination.^{1,129} Although these FPs meet the requirements for FRET measurements, BFP has an unfortunate tendency to bleach much faster than eGFP. The cyan fluorescent protein (CFP) and the yellow fluorescent protein (YFP) FRET pair quickly replaced the BFP–eGFP FRET pair to monitor Ca^{2+} variations in individual live cells.¹³⁰

The continuous improvement of fluorescent proteins, while beneficial for biosensor optimization, could become overwhelming, as the possible combinations seem endless. Nowadays, cloning procedures are much easier, thus easing up the process. The choice of a FRET pair should be guided by (1) up-to-date/optimized fluorophores, (2) which are red-shifted to minimize phototoxicity, and (3) have monoexponential lifetimes when considering FRET-FLIM measurement methods. The idea here is to tap into the distance (R_0) and eventually the dipole–dipole orientation (κ^2) in order to maximize FRET efficiency (see [Section 2](#))

6.4.1 Blue/yellow FRET pairs

This “original FRET pair” is still used in most biosensors today because of its good spectral properties. Many variants derived from these FPs have rapidly emerged and significantly increased FRET efficiency. The monomeric (m) Cerulean³⁴ and the mTurquoise2¹³¹ are the preferred variants of the CFP, while monomeric Citrine and Venus³⁷ have proved to be the most popular variants of the YFP. Cerulean has a better quantum yield, a higher extinction coefficient, a fluorescence lifetime with a single-exponential decay, and an

increased brightness than the conventional CFP (see Table 5.1). mCitrine shows better tolerance to pH variations and quenching by chloride ions, while Venus is characterized by a quicker maturation within cells.

Along these lines, a “sticky” FRET pair, known as CyPET (optimized eCFP for FRET) and YPet (optimized YFP for FRET), has been optimized from a cyan–yellow FRET pair by Daugherty’s lab in 2005, using a quantitative evolutionary strategy.¹³² The resulting FRET pairs showed a 20-fold ratiometric FRET signal change instead of the 3-fold for the parental pair, in a context where fluorophores were separated by a caspase 3 cleavable substrate. While this FRET pair provides substantial improvement in sensitivity and dynamic range for some biosensors,¹³² the poor folding and expression of CyPET at 37 °C limits its usefulness in living cell studies.³¹ Nevertheless, YPet remains one of the brightest YFPs and displays superior FRET efficiency when paired with a cyan donor fluorophore such as eCFP, alleviating any ill effects stemming from CyPET.^{127,133}

Lately, circularly permuted (cp) fluorophores have appeared as a good means to enhance the dynamic range of biosensors. These cp fluorophores have flourished in scientific reports as a solid solution for biosensor optimization.^{41,71} Technically, they consist of fluorescent proteins in which the N- and C-termini are fused together through a flexible linker. This protein engineering has allowed the emergence of other types of biosensors resting solely on the fluctuation of fluorescence properties upon binding of the analyte to a molecular switch positioned in the linker region.¹³⁴ Note that such fluorophores are more sensitive to their photochemical environment such as pH and temperature in this configuration/protein structure. The first biosensor successfully improved using this strategy is the Ca^{2+} indicator (yellow cameleon), exhibiting nearly sixfold increase in dynamic range of FRET efficiency upon Ca^{2+} binding to the biosensor.¹³⁵ Since then, cpFPs, in particular cpVenus, have been implemented in other biosensors, including AKAR3,⁴¹ AKAR4,⁷¹ and recently ^TEpac^{VV}.⁷³ The simple swapping of the CFP for the Cerulean as donor between AKAR3 and AKAR4 in combination with the cpVenus improves the dynamic range of the AKAR series. Indeed, AKAR4 shows a slight average difference in fluorescence lifetime in control experiments when compared to AKAR3 (Fig. 5.21).

6.4.2 Green/red FRET pairs

Since 2004, many other variants of fluorescent proteins have emerged with the discovery and characterization of a new red fluorescent protein (RFP) named *Discosoma* sp. red fluorescent protein (DsRed) isolated from the coral

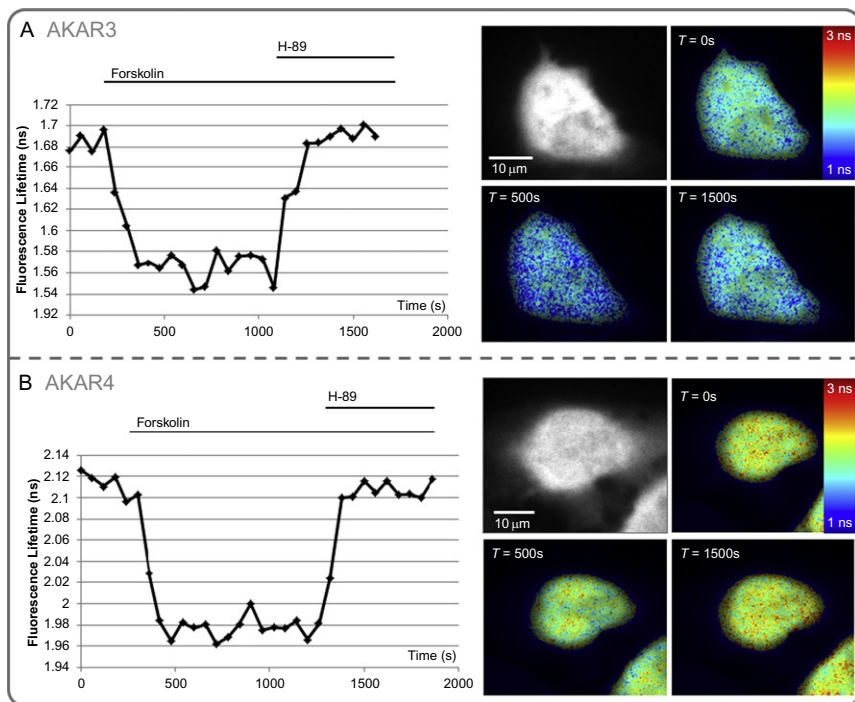


Figure 5.21 U2OS cells transfected with AKAR3 (A) or AKAR4 (B). PKA was activated using an adenylate cyclase activator (forskolin) and then inhibited with H-89. Lifetime measurements were performed in the frequency domain, as described in [Section 4](#). Graphs represent the average phase fluorescence lifetime measured for the entire cell as a function of time. Images represent intensity (top left) and phase lifetime (others) at specific times.

of *Dicosoma* genus in 1999.³⁸ Although red-shifted FP variants would undoubtedly result in lower phototoxicity upon biological sample illumination (less energy), they are not commonly employed for sensing application. The only example is the ERK biosensor EKAR⁴² in its green–red version which does not show a large dynamic range (unpublished results). However, a green–red FRET pair has proven its usefulness in the detection of molecular interaction by FRET-FLIM. Besides, even in their optimized versions, the intrinsic fluorescence properties of RFPs (oligomerization, quantum yield, brightness, etc.) do not stand a chance when compared with their yellow counterparts. Indeed, the historical FRET pair is cyan–yellow based and has received much attention directed toward its optimization. Ongoing efforts in developing red-shifted variants will most likely yield adequate acceptance and will prove themselves useful in multisensing approaches.

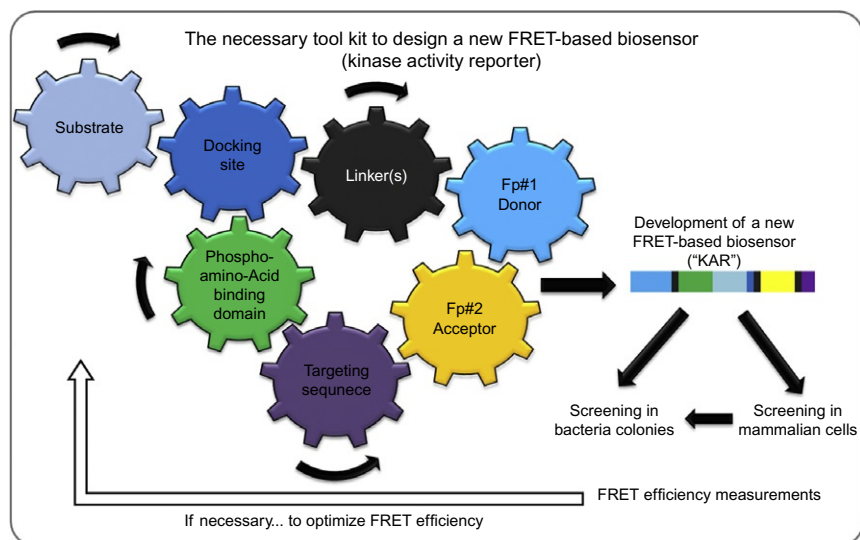


Figure 5.22 Overall methodology for creation and/or optimization of KAR biosensors.

In the light of opportunities offered by newly engineered FPs, many studies suggest alternatives to conventional FRET pairs. Combining the YFP or GFP as a donor with orange or red fluorescent proteins as acceptor is now possible. Although these FRET pairs have mostly been used in protein interactions studies, they have recently emerged as an alternative to the CFP/YFP FRET pair in biosensor design.⁴²

Figure 5.22 illustrates the process necessary for the creation and/or the optimization of KAR biosensors.

6.5. Targeting FRET biosensors to subcellular compartments

Biosensors can be directed at distinct subcellular compartments in order to gain information on the compartmentalized activity of a kinase of interest. This is achieved by adding an additional amino acid sequence at the N-terminal or C-terminal extremity of the sensor. Several subcellular targeting sequences have been isolated and are now well characterized (Table 5.3).

6.6. *In vitro* and *in cellulo* characterization of new FRET biosensors

Two paths can be exploited to test newly built and optimized biosensors: *in vitro* and *in cellulo*. Note that results from one approach may not necessarily be similar to those generated with the other one. However, characterization

Table 5.3 Listing of validated targeting sequences for biosenseur subcellular compartmentation

Subcellular targeted location	Targeting sequences	References
Cytosol	LALKLAGLDI (at C-terminal)	Gallegos <i>et al.</i> ¹⁰²
Nucleus	PKKRKVEDA (at C-terminal)	Gallegos <i>et al.</i> ¹⁰² Ananthanarayanan <i>et al.</i> ¹³⁶
Golgi	33 amino residues of eNOS (at N-terminal)	Sasaki <i>et al.</i> ¹³⁷ Gallegos <i>et al.</i> ¹⁰²
Endoplasmic reticulum	MLLPVLLLGLLGAAAD (at N-terminal) + KDEL (at C-terminal)	Palmer <i>et al.</i> ¹³⁸
Plasma membrane	MGCIKSK (at N-terminal)	Violin <i>et al.</i> ¹⁰³ Kunkel <i>et al.</i> ¹²⁶ Gallegos <i>et al.</i> ¹⁰²

References 102,103,126,136–138.

Adapted from Refs. 4.

remains the bottleneck through which every biosensor has to pass. Characterization is a crucial step, as it determines the efficiency of new FRET-based biosensors and thus requires several considerations. The results should provide evidence that the sensor generated is specific to the kinase of interest and should assess the dynamic range of the biosensor in the presence of the activator and/or inhibitor. This step usually relies on pharmacological agents, the availability and specificity of which can be limited.

6.6.1 In vitro characterization

Upon expression of biosensors, in a bacterial system, for instance, lysates are subjected to stringent purification procedures to retrieve only full-length protein from the truncated protein produced as a result of proteolytic degradation. Now, in solution (see Chapter 4) with the purified protein kinase of interest and ATP, in a 96-well plate screening format or in a spectrophotometer cuvette, the properties of the biosensor are evaluated. Ratiometric measurement methods (see Section 4.1.1 for details) are then employed under different experimental conditions: before and after addition of ATP and purified kinase, and control wells for baseline ratio determination.

In addition, phosphorylation levels of the biosensor expressed in mammalian cells can be estimated by immunoprecipitation and detected by

PhosphoTag western blotting. The overall amounts of expressed biosensors are then revealed by an anti-GFP antibody.¹²⁷

6.6.2 *In cellulo* characterization

In cellulo characterization consists of expressing the biosensor in a mammalian cell model and assessing the ratiometric signal in the presence of specific activators and inhibitors of the kinase of interest. Biosensor control constructs (earlier version or/and non-phosphorylatable biosensor) should undergo similar experimental conditions. Transient transfection of plasmid DNA encoding biosensors is an accessible and inexpensive approach, which is sufficient to produce biosensors using cellular transcriptional machinery. Kinase activity measurement in a cellular context can also evaluate the specificity of a biosensor candidate: kinase blockers should prevent the ratiometric response to activators, demonstrating the involvement of one specific kinase family in the process being studied. This strategy is more often seen as a complementary rather than an alternative method to evaluate FRET efficiency of candidate sensors.

In vitro and *in cellulo* characterizations are often used to evaluate quantitatively the effect of several kinase inhibitors to determine the most effective inhibitor of the kinase of interest. Indeed, they can serve as high-throughput screening to evaluate rapidly the effects of several pharmacological treatments on the activation or extinction of a particular pathway. For such assays, it is essential that the biosensor exhibits a robust and reproducible signal. This is generally assessed by the *Z*-factor, which is a statistical parameter that compares the dynamic range to data variation.¹²³ A schematic representation of such an experimental design is shown in Fig. 5.23.



7. CONSIDERATIONS FOR KAR MEASUREMENTS

7.1. Controlling acquisition systems

As previously described, several techniques allow quantifying FRET for KAR imaging. Each of them requires a dedicated setup and thus the corresponding characterization procedures. The most advanced acquisition techniques (spectral acquisition, TD and FD FLIM, etc.) mainly require rigorous characterization of the systems and optimized acquisition conditions as described in the literature.^{23,26,59,139} They can then be directly used for KAR imaging and yield unambiguous quantification of FRET efficiencies. Ratiometric imaging, despite being an easier acquisition procedure, can result in erroneous interpretation of FRET efficiency due to the classical drawbacks of quantitative fluorescence imaging. The

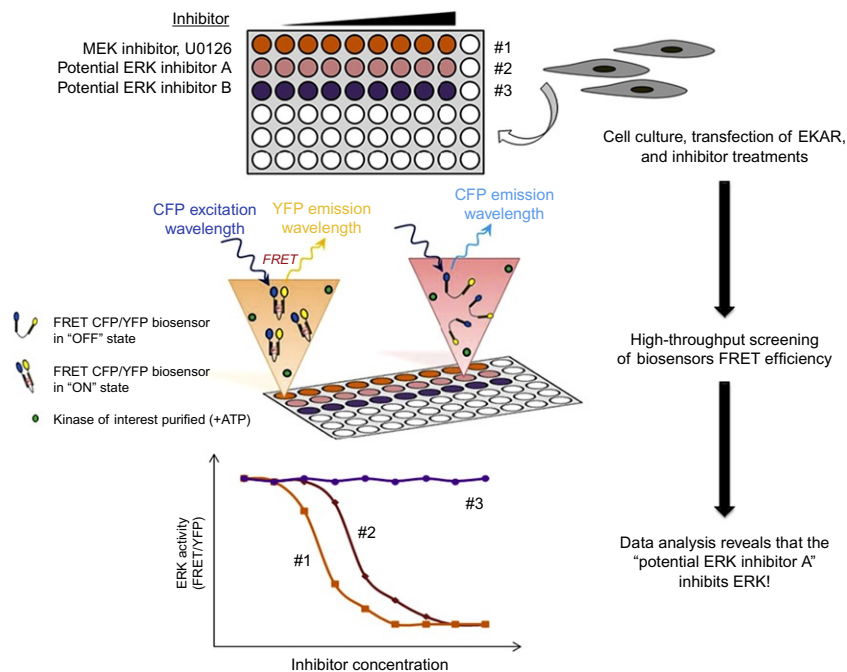


Figure 5.23 Schematic representation of the method for the evaluation of kinase inhibitor with the FRET-based biosensor EKAR by high-throughput screening.

apparent easier acquisition procedure makes it available to researchers who are unaware of the factors that might complicate fluorescence quantification. We will thus focus here on some key elements responsible for these misinterpretations.

Fluorescence microscopy is mainly used for qualitative imaging of protein, lipid, or nuclear acid distribution in cells. Indeed, quantifying the distribution of these molecules is highly complicated by various optical, physical, and biological parameters.¹⁴⁰ Many of them can be circumvented by ratiometric imaging and are not an issue in the case of KAR imaging. However, several parameters remain critical. For example, the properties of the illumination sources, the optics of the microscope, or the sensitivity and signal-to-noise ratio of the detectors can affect both fluorescence and ratio measurements. Some of these parameters can be easily optimized by a careful choice of the elements available on the acquisition systems. For instance, using apochromatic objectives with corrected chromatic aberration to avoid focusing the excitation wavelength at two different positions will prevent strong border effects. Others are more difficult to avoid (Fig. 5.24 gives several examples)

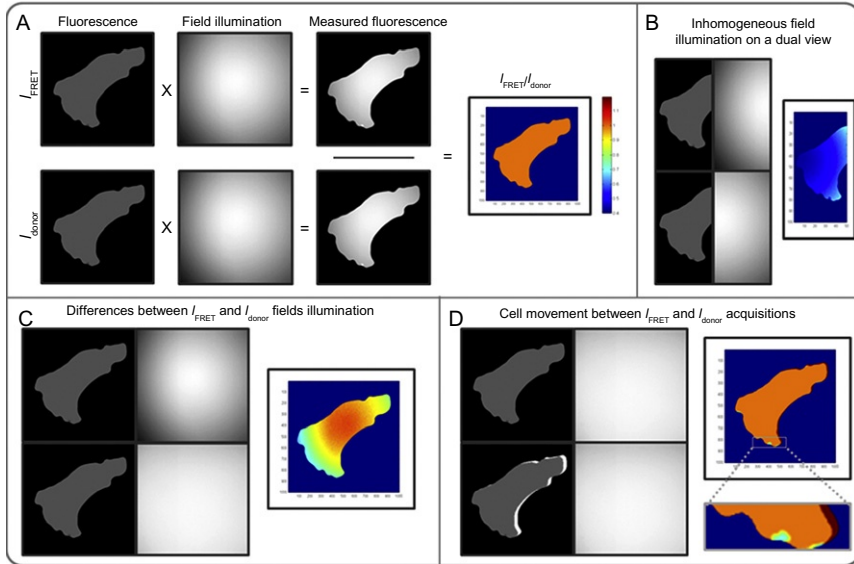


Figure 5.24 Field illumination and cell movement between I_{FRET} and I_{donor} acquisition channels effects on ratio imaging. For each panel, the cell exhibiting an equal I_{FRET} and I_{donor} is imaged through a nonhomogeneous field illumination and ratio image is calculated. Procedure is detailed in (A). The expected ratio value is thus equal to one for the whole image. In (B)–(D), we can see erroneous ratio images due to different sources of artifacts. See text for more details.

and will strongly depend upon the acquisition technique used for measuring the ratios (sequential ratio, SR; dual view ratio, DVR; dual channel ratio, DCR).

7.1.1 Field illumination

Nonhomogeneous field illumination and light collection is a classical problem encountered both in wide-field and in confocal microscopy and can yield to significant differences in intensity measurements from the center to the border of an image. We encourage users to verify the field homogeneity of the employed system using a reference sample. In ratio imaging, this may not be a major issue if the field nonhomogeneity is the same for the sequential ratio (this is most of the time the case for SR, Fig. 5.24A). Indeed, if each pixel of the emitted I_{FRET} and I_{donor} images is multiplied by a same factor, the ratio measurements will stay accurate despite nonhomogeneities in the field. On the contrary, for DVR or DCR, this may be a major issue because both images are measured on either two distinct detector parts or

two different cameras. Detector variability is thus spatially uncorrelated and may strongly impact the ratio values (Fig. 5.24B and C). It is thus absolutely necessary to suppress this field illumination inhomogeneity by acquiring reference images using fluorescent solutions. When differences in field illumination persist, corrections can be carried out by normalizing pixel intensities using reference images. This procedure is called “shading correction”.¹⁴¹

Besides correcting for spatial field inhomogeneities, shading correction also intrinsically calibrates the absolute ratio value. Shading images are acquired with a uniform sample of a fluorescent chromophore chosen to emit fluorescence at both wavelengths of interest. In the particular case of CFP-like and YFP-like chromophores, a suitable fluorescent dye is Coumarin 343, which emits at both wavelengths. When each acquired image is divided by its corresponding shading image, by definition the ratio of the Coumarin 343 dye is equal to 1.^{74,142} This method thus defines ratio values with respect to a reference chromophore and therefore defines the “balance” between the two channels. This procedure allows easier comparison between setups that may have different spectral sensitivities.

7.1.2 Image misregistration between acquisition channels

In the sequential ratio setup, the images acquired at two wavelengths may not be perfectly registered. This may be due to wedge effects caused by the nonparallel faces of the emission filter. This is easily corrected by the translation of one of the images by a few pixels, and algorithms exist that determine the optimal subpixel registration correction.¹⁴³ In addition, if the objective suffers from chromatic aberration, sequential ratio allows a focus correction by a fixed value which can be accurately determined using fluorescent beads. When cellular movement occurs at the timescale of the sequential acquisition, no correction can be applied and the system is just not fast enough for measuring the biological event of interest, and simultaneous detection with dual view or dual channels may be needed. In these configurations, in addition to the linear translation of one image with respect to the other, nonlinear deformation may occur as a result of different optical paths followed by both wavelengths, and it will be necessary to apply more elaborate algorithms that correct for image skewing. Misregistration effects are nonetheless a common cause of data misinterpretation and the experimenter should look carefully at the images for border effects which usually show a typical rainbow appearance (Fig. 5.24D)

7.2. Controlling biological samples

Parameters such as temperature or pH can directly affect the chromophore properties. In addition, these physical parameters plus other biologically relevant parameters (osmolarity, ion and metabolite concentrations, etc.) may alter the activity of signaling cascades (including kinases) and hence the measurements obtained with KAR biosensors. Experimental conditions must therefore be controlled in order to minimize the impact of such parameters.

7.2.1 Temperature

Concerning the temperature, experiments must be carried out at a stable temperature (usually 37 °C) inside thermostated space surrounding the whole microscope. These incubators require hours to warm up and reach a stable temperature and should always be turned on to ensure optimal stability. The temperature probe should be positioned as close as possible to the sample. The thermal inertia due to contact with both the objective and the microscope stage might need direct control with thermostatic controllers. While temperature probes are most of the time positioned in air, there can be a large difference between the average enclosure temperature and the sample temperature. Calibration of this difference must thus be performed by positioning the temperature probe in the medium.¹⁴⁴

7.2.2 Imaging media and perfusion

In long-term experiments, drying of the imaging medium modifies ionic concentrations and pH. A buffered medium can be used for short-term experiments (from 2–4 h depending on cell type). For longer measurements, the use of a CO₂ incubator and a perfusion system to renew the culture medium is recommended. In all cases, media containing phenol red should be avoided, as this molecule is slightly fluorescent and leads to an unwanted fluorescent signal. A phenol red-free medium must therefore be preferred. Details on the preparation of dedicated imaging media can be found in Refs. 42,51.

Perfusion systems are very useful to add drugs to the sample. Alternatively, drugs in a preheated medium can be applied manually in the dish with a Pasteur pipette. This can, however, lead to motion artifacts because of shear stress, and some practice is necessary.

7.2.3 Biosensor expression level

Transfection agents or electroporation is often chosen to transfect cells with biosensor plasmids. Viruses (e.g., adenoviruses or Sinbis) can be considered for kinase activity measurement in cells resistant to the classic transfection

method¹⁴⁵ or in tissue.¹⁴⁶ However, the biosensor expression level can induce differences in the amplitude response. Indeed, the FRET probes destabilize the reaction equilibrium between a kinase and its substrates. We therefore recommend performing measurements on cells with equivalent KAR expression levels. To avoid the variations caused by the sensor expression levels, the creation of a stable cell line might be an alternative.

7.2.4 Photoinduced effects

Photoinduced effects are another source of artifacts. Among these effects, the most obvious is cell death, which is easily noticeable by changes in cell morphology. Photostress is more tricky to observe and can result in cell autofluorescence. While autofluorescence spectra are broad and cannot be corrected by filters, and autofluorescence lifetime is very short and can be confused with a FRET event, both spectral and lifetime properties of autofluorescence can create artifacts in measurements with both intensity ratio- and lifetime-based techniques. The last photoinduced effect is photobleaching, which can also falsify measurements with all techniques, thereby leading to unacceptable errors in data interpretation. Extensive controls of photoinduced effect on cells expressing a KAR negative reference are thus indispensable (see [Section 7.2.5](#)).

These photoinduced effects depend on the laser power and the exposure time. Thus, it will be less critical for techniques that require a lower illumination power (P_{average} measured using a power meter). For example, ratiometric measurements will be less affected than FD FLIM experiments, and TSCPC is the most stressful method because of the time necessary to scan an entire cell. Since most biosensors are based on the CFP/YFP FRET pair (or their variants such as Cerulean, Turquoise, CyPET, Venus, circularly permuted Venus, YPet, etc.), we will focus on these fluorophores to exemplify the acquisition time and power required for each technique (performed on our systems).

In ratiometric measurements, after exciting the donor, the exposure time is set to ~ 500 and ~ 200 ms ($P_{\text{average}} < 1$ mW) for CFP and YFP, respectively, with our microscopy system.⁴⁸ As described in [Section 5](#), acquiring a channel with excitation and observation of YFP is a prerequisite in intermolecular FRET. It is, however, not recommended in the case of sensor imaging, because this optional correction step will increase both photoinduced effects and noise, without improving results. Acceptors excitation can, however, be useful in another way. Indeed, acceptor photobleaching can be a good negative control to recover a basal level after activation of

the kinase of interest. The photoinduced effect arising from this high-energy laser excitation must, however, be controlled.⁷¹

For FLIM, the acquisition time strongly depends on the technique used. For FD FLIM measurements using our setup, the exposure time of the donor is between 100 and 300 ms with a laser power $P_{\text{average}} = 4$ mW sent to a spinning disk system equipped with a $63\times$ oil objective (NA = 1.4). To achieve optimal compromise between the number of phase images and the accuracy of lifetime determination, 12 phase-shifted images are chosen. Moreover, achieving a good signal-to-noise ratio often requires averaging each images three times. From these constraints, the overall exposure time for one lifetime image can be between 3 s to almost 10 s. For time-resolved lifetime measurements with our system, a field scan takes about 5 min (still with an average laser power of a few milliwatts) and will require data binning to achieve a precise lifetime map whereas the measurements per pixel only takes few tens of milliseconds.

The choice of imaging technique thus depends on (i) the time resolution, (ii) the number of images needed, and (iii) the spatial resolution. For example, TCSPC can be used to obtain a precise image of the subcellular localization of kinase activity before and after the activation of the biological signal, while ratiometric measurement or phase and modulation technique will be preferred to achieve a precise estimate of kinase activity kinetics over time. The use of a biosensor targeted to subcellular compartment measured by ratio imaging can also be a solution to achieve precise activity localization without compromising acquisition speed.

In conclusion, we suggest avoiding any unnecessary exposure of fluorophores, especially the donor, in FLIM experiments; moreover, photobleaching of the CFP will occur faster than for YFP variants. For example (and if it is possible), find the focus using transmitted light rather than a mercury lamp. Because of the numerous possible photoinduced artifacts, negative controls are indispensable.

7.2.5 Negative control

Sensing applications require the creation of a control biosensor. Concerning KAR, the phosphorylable residue within the substrate (serine, threonine, or tyrosine) may be mutated to a nonphosphorylable amino acid such as glycine or alanine. Expressed in cells, it should not produce a FRET signal in response to the stimulation of the kinase of interest. It will therefore serve as negative control and provide the basal level of FRET signal in living cells. An example of such an experiment is presented in [Fig. 5.25](#). There is,

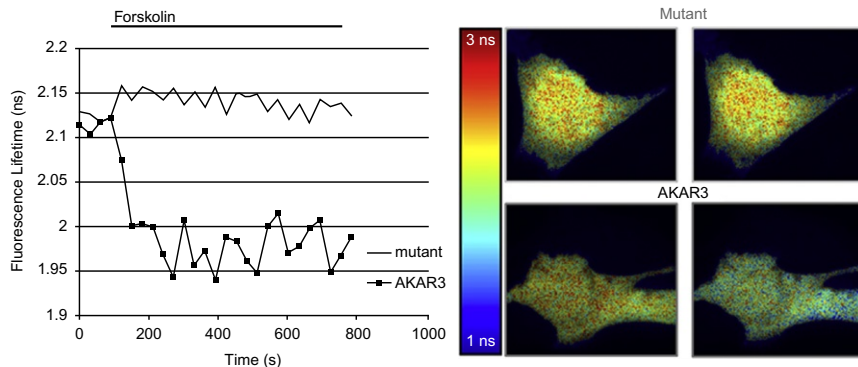


Figure 5.25 U2OS cells transfected with AKAR3 or AKAR3 inactive mutant. PKA was activated using an adenylate cyclase activator (forskolin, 12.5 μ M). Lifetime measurements were performed in the frequency domain as described in Section 4. Graphs represent the average phase fluorescence lifetime measured for the entire cell as a function of time. Experiments with either biosensor were performed separately, but are represented on the same graph for clarity. Images represent phase lifetime before (left panel) and after (right panel) induction.

unfortunately, no positive control for FRET measurements in living cells (all sensors are in folded position), but a strong induction using activating agents can be envisaged as an alternative. Molecular strategies for such a positive control should be envisioned in the near future, as both control biosensors could provide a complete sensing range.

7.3. Biosensor dynamic range and reproducibility

The dynamic range of a biosensor is a critical parameter to consider, and increasing this range is often the purpose of biosensor optimization. The dynamic range depends directly on the FRET efficiency and can be increased by switching fluorophores, improving linkers, and enhancing kinase binding to the biosensor (with the insertion of a docking domain, for example), as described earlier (see Section 6). Possessing the appropriate pharmacology allowing maximum stimulation and inhibition is essential for estimating this dynamic range. More than just control, the revealed amplitude (as well as other criteria such as sensitivity) directs the choice of the biosensor to use.

As another example, the EKAR⁴² shows a relatively low dynamic range, both for ratiometric or lifetime-based measures, compared to a cAMP biosensor (^TEpac^{VV}) recently published.⁷³ Indeed, cells expressing EKAR exhibit a 20% average $\Delta R/R$ and 120 ± 20 ps average $\Delta \tau$, while cells expressing ^TEpac^{VV} give a mean $\Delta R/R$ of more than 80% and a mean $\Delta \tau$

of 700 ± 50 ps, both after maximum stimulation and inhibition (10 cells per conditions, unpublished results). While these biosensors differ in their composition, the fluorophores of $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$ were optimized to improve FRET efficiency whatever the technique employed. Indeed, the donor fluorophore of $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$ (mTurquoise) is characterized by a phase lifetime of 3.7 ns¹⁴⁷ instead of 2.3 ns for Cerulean¹⁴⁸ in EKAR, which improved the dynamic range in FLIM. As an acceptor, $^T\text{Epac}^{\text{VV}}$ uses a dimer of CpVenus-Venus instead of a single Venus in EKAR, in order to improve detection of the sensitized emission (see [Section 6](#)).

After all these considerations related to fluorescence, FRET measurements, data analysis, creation/optimization of biosensor, and methodologies for kinase activity measurements, we would like to enlighten the reader about the way data are being employed today in systems biology approaches.



8. TOWARD QUANTITATIVE APPROACHES IN BIOLOGICAL PROCESSES

The molecular toolkit for kinases activity reporters is called to address the role of kinases in the orchestration of signal transmission within the cells. It remains challenging to understand how a signal pattern is organized and provides accurate integration and appropriate cellular decision while mobilizing common effectors in response to different inputs. Indeed, kinases such as Erk, PKA, and Akt are considered as common effectors and their spatiotemporal dynamics drives cellular functions. Receptors often act as organizers of signal integration, giving shape to the signal: transitory, sustained, all-or-none.

Regarding Erk, MAPK/Erk network exhibits plasticity, and different dynamical properties may arise from connections within this network. For instance, rewiring of the Erk pathway architecture in the context of NGF (nerve growth factor) or EGF (epidermal growth factor) stimulation in PC12 cells (model for neuron differentiation) is believed to build the dynamical response observed for these growth factors: transient or sustained MAPK/Erk cascade activation following EGF or NGF stimulation, respectively.^{149,150}

Similar dynamical properties of the MAPK/Erk pathway have been suspected to affect the signaling cascade involved in cell death.¹⁵¹ Actually, subcellular localization of the MAPK/Erk pathway components and dynamical spatiotemporal changes are believed to determine cell fate between proliferation and death.¹⁵² Sustained Erk activation, which is sufficient to induce cell death, is often associated with cell death mediated by ROS (reactive oxygen species)¹⁵³ because these radicals can suppress

protein-phosphatase activities of MKP (MAPK-specific phosphatases), exerting key roles in the regulation of MAPK/Erk dynamics.¹⁵⁴ Inhibition of MAPK/Erk activation using inhibitors against components of the MAPK cascade has a survival effect on cells induced to die following chemical or physical challenges. Forced MAPK/Erk cytosolic localization prevents the survival or a mitogenic response but potentiates activities of specific pro-apoptotic proteins such as DAPK (death-associated protein kinase),¹⁵⁵ Bik (bcl-2-interacting killer),¹⁵⁶ and PEA-15 (astrocytic phosphoprotein-15)¹⁵⁷ via the activation of the PI3K/Akt pathway. Depending on cell type and stimulus, compartmentalized MAPK activity will mediate either cell survival or cell death (see Ref. 3 for a review). Thus, spatial signatures for the signal propagation of the MAPK/Erk signaling pathway have begun to be explored both at the experimental and theoretical levels in many different cellular models, from gametes to tissues.^{158–160}

Scaffolding proteins and interactions of kinases with specific components of the cell architecture also determine the spatial and temporal integration of the cAMP/PKA signal.^{161–163} In addition, the simple spatial organization of the cell also determines the spatiotemporal organization of the signal, leading to differential activation within the cell compartment. Indeed, in the case of the cAMP/PKA signaling cascade, modeling studies¹⁶⁴ and imaging experiments^{165,166} have revealed the importance of cell morphology in the particular situation of neurons, where submembrane domains display faster and stronger responses than the bulk somatic cytosol.¹⁶⁶ It is therefore of great importance to address the question of intracellular signal integration, bearing in mind the multidimensional—space and time—parameters that determine the physiological outcome of an external signal.

Kinase activity reporter methodologies will definitely be able to generate enough data to be considered for modeling approaches. Still, while recording the dynamical pathway, which may exhibit variation from one cell to another, one needs to identify within these apparently variable responses reliable marks or features that are common between experiments and invariant to changes in cell morphologies or behaviors. These marks may be obtained through the acute stimulation/inhibition of a pathway,¹⁶⁷ but a response hierarchy may also be obtained from constitutive fluctuations in the activity of the biosensors.¹⁶⁸ The latter approach is performed in a nonperturbed pathway, under conditions closer to a physiological range than those in acute inhibition or activation. In concept, fluctuation analysis is quite scalable to a large number of components and requires further developed mathematical tools to ingrate this large set of component activities.



9. OUTLOOK AND PERSPECTIVE

9.1. What about multisensing?

In the prospect of detecting several parameters simultaneously in the same cell, the idea of using multiple probes is becoming more and more attractive. As the number of available tools is increasing, monitoring several modulators of the same pathway provides opportunities for the understanding of cell reaction dynamics. The principal challenge of these experiments is combining the well-chosen fluorophore pairs with the appropriate technique. Several parameters have to be considered and are well described and illustrated in the excellent review by Carlson and Campbell.¹⁶⁹

Piljic and Schultz¹⁷⁰ have presented such an example of multisensing applied to the monitoring of several effectors involved in the regulation of calcium chloride conductance. It was achieved in an epithelial cell line using simultaneously four biosensors, including three FRET-based ones. These refined experiments were performed by ratiometric imaging, taking advantage of (i) the spectral shift between the two FRET pairs (namely CFP/YFP and mOrange/mCherry) and (ii) the subcellular targeting of some of these sensors to spatially discriminate signals from each reporter.

Taking into account the complexity, dynamics, and stress reactivity of the cellular environment, measurements of molecular dynamics could require the combination of fluorescence analysis techniques (such as fluorescence lifetime, spectrum or intensity fluctuations analysis) and a multimodal microscopy method suitable for the different complexity degrees of the living matter: cells, tissues, and whole organism. So far, biosensor recording has been achieved using mainly ratiometric techniques; however, FRET-FLIM could emerge as an interesting alternative.

9.2. Kinase activity measurements in living animals

Studying kinase activity profiles in living tissue or animals provides new insights on cell behavior in the intact biological context. A few publications describe the use of FRET-based biosensors in living animals. For example, ATP levels in a transgenic worm (*Caenorhabditis elegans* expressing ATeam¹⁷¹), cAMP levels in the fruit flies (transgenic *Drosophila melanogaster* expressing GFP-PKA^{172,173}), as well as Rac GTPase activity in zebrafish (pRaichu RacFRET mRNA microinjected in *Danio rerio* embryos¹⁷⁴) have already been performed.

However, these first experiments have highlighted some difficulties. Indeed, biosensor overexpression can lead to abnormal embryonic development or lethality, depending on promoter strength, simply because the cAMP biosensor is built on an active PKA enzyme bearing its intact catalytic activity.¹⁷² It is therefore strongly suggested to use biosensors that have no biological effect, such as AKAR, and, indeed, the expression of these sensors have proved to be harmless and did not affect the memory processes in the living drosophila.¹⁷⁵ The depth at which measurements must be done, combined with the required low KAR expression levels, render measuring relevant variations more difficult.¹⁷⁴ The use of a two-photon excitation microscope, which increases the imaging depth and reduces the phototoxicity, must be preferred for opaque tissues or deep imaging for both ratio imaging and TD FLIM experiments, and indeed has provided new insights into cAMP/PKA signaling processes in living drosophila.¹⁷⁵

Generation of transgenic mice expressing FRET-based biosensor remains a challenge,¹⁷⁶ for example, because of the two fluorophore's cDNAs recombination.¹⁷⁷ Although this has already been done, the low expression levels (probably due to gene silencing) complicate the imaging procedure.¹⁷⁸ Nevertheless, transgenic mice were generated for some KARs including EKAR and AKAR (with a high expression level), and successful kinase activity measurements were realized notably in the auricular skin and small intestine.¹⁷⁷ Another line has been developed with a ubiquitous cAMP sensor expression which allowed direct cAMP measurement on a variety of primary cell preparations.¹⁷⁹ As a perspective, transgenic animals can be designed for ubiquitous or tissue-specific KAR expression. Furthermore, the combination of animals expressing a KAR and mutated/KO/overexpressing gene involved in the regulation of the kinase of interest can increase our understanding of regulatory networks.

While somewhat challenging in a practical way, kinase activity measurements, and biosensors in general, have helped scientists in better their understanding of biological processes. These tools allow the generation of data that can be exploited by the mathematician for modeling approaches of regulatory networks. Finally, since biosensor experiments are performed within an intact physiological context, new light is being shed onto the spatiotemporal dynamic of molecular effectors involved in the regulation cellular functions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was encouraged and supported by two CNRS national networks: the GDR2588 and the RTmFm, as well as the University Lille1. The opportunity for such a chapter arose thanks to the French biosensor workgroup. Financial contributions came from various

sources for equipment, bench fees, and PhD student grants. This work was funded by the CNRS, the University Lille1, the GEFLUC, the Nord-Pas de Calais Région Council, the European Regional Developmental Funds, a Leica Microsystems partnership, and the French Research Agency ANR 07-PFTV-01101. We are grateful to the imaging facility BICeL (Bio Imaging Center of Lille) and the Interdisciplinary Research Institute (IRI CNRS USR3078).

REFERENCES

1. Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 1996;**6**(2):178–82.
2. Frommer WB, Davidson MW, Campbell RE. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* 2009;**38**(10):2833–41.
3. Riquet F, Vandame P, Sipieter F, Caillau-Maggio K, Spriet C, Héliot L, et al. Reporting kinase activities: paradigms, tools and perspectives. *BMB JBM* 2011;**1**(2):10–8.
4. Kunkel MT, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of kinase signaling visualized by targeted reporters. *Curr Protoc Chem Biol* 2009;**1**(1):17–8.
5. Valeur B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2001: Molecular Fluorescence: Principles and Applications.
6. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenium Publishers; 1999.
7. Periasamy A, Day RN. *Molecular imaging FRET microscopy and spectroscopy*. Oxford University Press, NY, pages 312; 2005.
8. Sun Y, Day RN, Periasamy A. Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Protoc* 2011;**6**(9):1324–40.
9. Camuzeaux B, Spriet C, Héliot L, Coll J, Duterque-Coquillaud M. Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**(4):1107–14.
10. Yockell-Lelièvre J, Spriet C, Cantin P, Malenfant P, Héliot L, de Launoit Y, et al. Functional cooperation between Stat-1 and ets-1 to optimize icam-1 gene transcription. *Biochem Cell Biol* 2009;**87**(6):905–18.
11. Trinel D, Leray A, Spriet C, Usson Y, Héliot L. Upgrading time domain FLIM using an adaptive Monte Carlo data inflation algorithm. *Cytometry A* 2011;**79**:528–37.
12. Pietraszewska-Bogiel A, Gadella TW. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology. *J Microsc* 2011;**241**(2):111–8.
13. Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* 1948;**2**:55–7.
14. Clegg RM, Murchie AI, Lilley DM. The 4-way DNA junction—a fluorescence resonance energy-transfer study. *Braz J Med Biol Res* 1993;**26**(4):405–16.
15. Clegg RM, Sener M, Govindjee M. From Förster resonance energy transfer to coherent resonance energy transfer and back (Invited Paper). In: Alfano Robert R, editor. 2010. *Proceedings of SPIE* Vol. 7561. p. 7561–2 article CID Number 75610C, 21 pages.
16. Steinberg IZ. Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. *Annu Rev Biochem* 1971;**40**:83–114.
17. Dale RE, Eisinger J, Blumberg WE. The orientation freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* 1979;**26**:161–94.
18. Dale RE, Eisinger J. Intramolecular energy transfer and molecular conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;**73**(2):161–3.
19. Haas E, Wilchek M, Katchalski-Katzir E, Steinberg IZ. Distribution of end-to-end distances of oligopeptides in solution as estimated by energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;**72**(5):1807–11.

20. Haas E, Katchalski-Katzir E, Steinberg IZ. Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarizations. *Biochemistry* 1978;**17**:5064–70.
21. Pantano S. In silico description of fluorescent probes in vivo. *J Mol Graph Model* 2008;**27**(4):563–7.
22. Campbell RE. Fluorescent-protein-based biosensors: modulation of energy transfer as a design principle. *Anal Chem* 2009;**81**(15):5972–9.
23. Waharte F, Spriet C, Heliot L. Setup and characterization of a multiphoton FLIM instrument for protein–protein interaction measurements in living cells. *Cytometry A* 2006;**69**(4):299–306.
24. Peter M, Ameer-Beg SM, Hughes MK, Keppler MD, Prag S, Marsh M, et al. Multiphoton-FLIM quantification of the EGFP-mRFP1 FRET pair for localization of membrane receptor–kinase interactions. *Biophys J* 2005;**88**(2):1224–37.
25. Nagy P, Bene L, Balázs M, Hyun WC, Lockett SJ, Chiang NY, et al. EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry* 1998;**32**(2):120–31.
26. Spriet C, Trinel D, Waharte F, Deslee D, Vandenbunder B, Barbillat J, et al. Correlated fluorescence lifetime and spectral measurements in living cells. *Microsc Res Tech* 2007;**70**(2):85–94.
27. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992;**111**(2):229–33.
28. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;**59**:223–39.
29. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998;**67**:509–44.
30. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 2007;**120**(Pt 24):4247–60.
31. Wang Y, Shyy JY, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing. *Annu Rev Biomed Eng* 2008;**10**:1–38.
32. Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995;**20**(11):448–55.
33. Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 2002;**296**(5569):913–6.
34. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 2004;**22**(4):445–9.
35. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995;**373**(6516):663–4.
36. Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**(5):2135–40.
37. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 2002;**20**(1):87–90.
38. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999;**17**(10):969–73.
39. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**(12):7877–82.
40. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004;**22**(12):1567–72.
41. Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**348**(2):716–21.

42. Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, et al. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**(49):19264–9.
43. Dunn TA, Wang CT, Colicos MA, Zaccolo M, DiPilato LM, Zhang J, et al. Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. *J Neurosci* 2006;**26**(49):12807–15.
44. Davidson MW, Campbell RE. Engineered fluorescent proteins: innovations and applications. *Nat Methods* 2009;**6**(10):713–7.
45. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005;**2**(12):905–9.
46. Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003;**21**(11):1387–95.
47. Jares-Erijman EA, Jovin TM. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol* 2006;**10**(5):409–16.
48. Depry C, Zhang J. Visualization of kinase activity with FRET-based activity biosensors. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;**Chapter 18**: Unit 18.15.
49. Jalink K, van Rheenen J. (2009) FilterFRET: quantitative imaging of sensitized emission. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* vol. 33: FRET and FLIM techniques. Ed. Gadella, T.W.J. Academic Press, Burlington, pp. 289–349.
50. Schechter MB, Burger G. Widefield application letter: FRET sensitized emission wizard widefield. *reSOLUTION*, vol. 4; 2009.
51. Borner S, Schwede F, Schlipp A, Berisha F, Calebiro D, Lohse MJ, et al. FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat Protoc* 2011;**6**(4):427–38.
52. Hempel CM, Vincent P, Adams SR, Tsien RY, Selverston AI. Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuit. *Nature* 1996;**384**(6605):166–9.
53. Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral imaging: principles and applications. *Cytometry A* 2006;**69**(8):735–47.
54. Booth MJ, Wilson T. Low-cost, frequency-domain, fluorescence lifetime confocal microscopy. *J Microsc (Oxford)* 2004;**214**:36–42.
55. Gadella TWJ, Jovin TM, Clegg RM. Fluorescence lifetime imaging microscopy (Flim)—spatial-resolution of microstructures on the nanosecond time-scale. *Biophys Chem* 1993;**48**(2):221–39.
56. Gratton E, Breusegem S, Sutin J, Ruan QQ. Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods. *J Biomed Opt* 2003;**8**(3):381–90.
57. Herman P, Maliwal BP, Lin HJ, Lakowicz JR. Frequency-domain fluorescence microscopy with the LED as a light source. *J Microsc (Oxford)* 2001;**203**:176–81.
58. van Geest LK, Stoop KWJ. FLIM on a wide field fluorescence microscope. *Lett Pept Sci* 2003;**10**(5–6):501–10.
59. Leray A, Riquet FB, Richard E, Spriet C, Trinel D, Heliot L. Optimized protocol of a frequency domain fluorescence lifetime imaging microscope for FRET measurements. *Microsc Res Tech* 2009;**72**(5):371–9.
60. Schneider PC, Clegg RM. Rapid acquisition, analysis, and display of fluorescence lifetime-resolved images for real-time applications. *Rev Sci Instrum* 1997;**68**(11):4107–19.
61. Greger K, Neetz MJ, Reynaud EG, Stelzer EH. Three-dimensional fluorescence lifetime imaging with a single plane illumination microscope provides an improved signal to noise ratio. *Opt Express* 2011;**19**(21):20743–50.
62. Van Munster EB, Goedhart J, Kremers GJ, Manders EMM, Gadella TWJ. Combination of a spinning disc confocal unit with frequency-domain fluorescence lifetime imaging microscopy. *Cytometry A* 2007;**71A**(4):207–14.
63. Buranachai C, Kamiyama D, Chiba A, Williams BD, Clegg RM. Rapid frequency-domain FLIM spinning disk confocal microscope: lifetime resolution, image improvement and wavelet analysis. *J Fluoresc* 2008;**18**:929–42.

64. Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 1998;**74**:2702–13.
65. Xia Z, Liu Y. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J* 2001;**81**:2395–402.
66. Hoppe A, Christensen K, Swanson JA. Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells. *Biophys J* 2002;**83**:3652–64.
67. Jalink K, van Rheenen J. FilterFRET: quantitative imaging of sensitized emission. In: Gadella TWJ, editor. *FRET and FLIM techniques*. Burlington: Academic Press; 2009.
68. Hodgson L, Shen F, Hahn K. Biosensors for characterizing the dynamics of Rho family GTPases in living cells. *Curr Protoc Cell Biol* 2010;**46**:14.11.1–14.11.26.
69. Brito M, Guiot E, Vincent P. Imaging PKA activation inside neurons in brain slice preparations. *Neuromethods*, 2012;**68**:237–50.
70. Hodgson L, Nalbant P, Shen F, Hahn K. Imaging and photobleach correction of mero-CBD, sensor of endogenous Cdc42 activation. *Methods Enzymol* 2006;**406**:140–56.
71. Depry C, Zhang J. Visualization of kinase activity with FRET-based activity biosensors. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;**18**:18.15.1–18.15.9.
72. Ting AY, Kain KH, Klemke RL, Tsien RY. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *PNAS* 2001;**98**(26):15003–8.
73. Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TWJ, Jalink K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* 2011;**6**(4):e19170.
74. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;**260**(6):3440–50.
75. Hinde E, Dignan MA, Welch C, Hahn KM, Gratton E. Biosensor Förster resonance energy transfer detection by the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy. *Microsc Res Tech* 2011;**75**(3):271–81.
76. Llères D, Swift S, Lamond AI. Detecting protein–protein interactions in vivo with FRET using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Curr Protoc Cytom* 2007;**12**:12.10.1–12.10.19.
77. Elder AD, Frank JH, Swartling J, Dai X, Kaminski CF. Calibration of a wide-field frequency-domain fluorescence lifetime microscopy system using light emitting diodes as light sources. *J Microsc (Oxford)* 2006;**224**:166–80.
78. Squire A, Verveer PJ, Bastiaens PIH. Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy. *J Microsc* 2000;**197**:136–49.
79. Lakowicz JR, Laczkó G, Cherek H, Gratton E, Limkeman M. Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data. *Biophys J* 1984;**46**:463–77.
80. Verveer PJ, Bastiaens PIH. Evaluation of global analysis algorithms for single frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data. *J Microsc* 2003;**209**(1):1–7.
81. Esposito A, Gerritsen HC, Wouters FS. Fluorescence lifetime heterogeneity resolution in the frequency domain by lifetime moments analysis. *Biophys J* 2005;**89**:4286–99.
82. Maus M, et al. An experimental comparison of the maximum likelihood estimation and nonlinear least-squares fluorescence lifetime analysis of single molecules. *Anal Chem* 2001;**73**(9):2078–86.
83. Laurence TA, Chromy BA. Efficient maximum likelihood estimator fitting of histograms. *Nat Methods* 2010;**7**(5):338–9.
84. Barber PR, Ameer-Beg SM, Pathmanathan S, Rowley M, Coolen ACC. A Bayesian method for single molecule, fluorescence burst analysis. *Biomed Opt Express* 2010;**1**(4):1148–58.
85. Köllner M, Wolfrum J. How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements? *Chem Phys Lett* 1992;**200**:199–204.

86. Barber PR, Ameer-Beg SM, Gilbey J, Carlin LM, Keppler M, Ng TC, et al. Multiphoton time-domain fluorescence lifetime imaging microscopy: practical application to protein–protein interactions using global analysis. *J R Soc Interface* 2009;**6**:S93–S105.
87. Grecco HE, Roda-Navarro P, Verveer PJ. Global analysis of time correlated single photon counting FRET-FLIM data. *Opt Express* 2009;**17**(8):6493–508.
88. Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, et al. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *PNAS* 2008;**105**(49):19264–9.
89. Digman MA, Caiola VR, Zamai M, Gratton E. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophys J* 2008;**94**(2):L14–L16.
90. Padilla-Parra S, Auduge N, Coppey-Moisan M, Tramier M. Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells. *Biophys J* 2008;**95**(6):2976–88.
91. Leray A, Spriet C, Trinel D, Heliot L. Three-dimensional polar representation for multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy. *Cytometry A* 2009;**75**(12):1007–14.
92. Leray A, Spriet C, Trinel D, Blossey R, Usson Y, Heliot L. Quantitative comparison of polar approach versus fitting method in time domain FLIM image analysis. *Cytometry A* 2011;**79A**(2):149–58.
93. Elson DS, Munro I, Requejo-Isidro J, McGinty J, Dunsby C, Galletly N, et al. Real-time time-domain fluorescence lifetime imaging including single-shot acquisition with a segmented optical image intensifier. *New J Phys* 2004;**6**:180.
94. Ballew RM, Demas JN. An error analysis of the rapid lifetime determination method for the evaluation of single exponential decays. *Anal Chem* 1989;**61**:30–3.
95. Jameson DM, Gratton E, Hall RD. The measurement and analysis of heterogeneous emissions by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Appl Spectrosc Rev* 1984;**20**(1):55–106.
96. Clayton AH, Hanley QS, Verveer PJ. Graphical representation and multicomponent analysis of single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data. *J Microsc* 2004;**213**(Pt 1):1–5.
97. Redford GI, Clegg RM. Polar plot representation for frequency-domain analysis of fluorescence lifetimes. *J Fluoresc* 2005;**15**(5):805–15.
98. Fereidouni F, Esposito A, Blab GA, Gerritsen HC. A modified phasor approach for analyzing time-gated fluorescence lifetime images. *J Microsc* 2011;**244**(3):248–58.
99. Eichorst JP, Huang H, Clegg RM, Wang Y. Phase differential enhancement of FLIM to distinguish FRET components of a biosensor for monitoring molecular activity of membrane type 1 matrix metalloproteinase in live cells. *J Fluoresc* 2011;**21**:1763–77.
100. Kazi JU, Soh JW. Isoform-specific translocation of PKC isoforms in NIH3T3 cells by TPA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**364**(2):231–7.
101. Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 2000;**21**(5):181–7.
102. Gallegos LL, Kunkel MT, Newton AC. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 2006;**281**(41):30947–56.
103. Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol* 2003;**161**(5):899–909.
104. Kajimoto T, Sawamura S, Tohyama Y, Mori Y, Newton AC. Protein kinase C {delta}-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases. *J Biol Chem* 2010;**285**(53):41896–910.
105. Thiele A, Stangl GI, Schutkowski M. Deciphering enzyme function using peptide arrays. *Mol Biotechnol* 2011;**49**(3):283–305.
106. Luo K, Zhou P, Lodish HF. The specificity of the transforming growth factor beta receptor kinases determined by a spatially addressable peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**(25):11761–5.

107. Tegge WJ, Frank R. Analysis of protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper (SPOT-method). *Methods Mol Biol* 1998;**87**:99–106.
108. Dostmann WR, Tegge W, Frank R, Nickl CK, Taylor MS, Brayden JE. Exploring the mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. *Pharmacol Ther* 2002;**93**(2–3):203–15.
109. Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L. Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem J* 2003;**370**(Pt 3):1077–85.
110. Fernandes N, Bailey DE, Vanvraken DL, Allbritton NL. Use of docking peptides to design modular substrates with high efficiency for mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase. *ACS Chem Biol* 2007;**2**(10):665–73.
111. Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* 1999;**13**(2):163–75.
112. Sato M, Kawai Y, Umezawa Y. Genetically encoded fluorescent indicators to visualize protein phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in single living cells. *Anal Chem* 2007;**79**(6):2570–5.
113. Sharrocks AD, Yang SH, Galanis A. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**(9):448–53.
114. Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem* 1999;**274**(5):2893–8.
115. Holland PM, Cooper JA. Protein modification: docking sites for kinases. *Curr Biol* 1999;**9**(9):R329–R331.
116. Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol* 2010;**189**(2):247–59.
117. Ibraheem A, Campbell RE. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Curr Opin Chem Biol* 2010;**14**(1):30–6.
118. Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**(26):14997–5002.
119. Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY. Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 2005;**437**(7058):569–73.
120. Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, et al. The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell* 2000;**6**(5):1169–82.
121. Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 1999;**283**(5406):1325–8.
122. Nagai T, Miyawaki A. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**319**(1):72–7.
123. VanEngelenburg SB, Palmer AE. Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol* 2008;**12**(1):60–5.
124. Ibraheem A, Yap H, Ding Y, Campbell RE. A bacteria colony-based screen for optimal linker combinations in genetically encoded biosensors. *BMC Biotechnol* 2011;**11**:105.
125. Piljic A, de Diego I, Wilmanns M, Schultz C. Rapid development of genetically encoded FRET reporters. *ACS Chem Biol* 2011;**6**(7):685–91.
126. Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *J Biol Chem* 2005;**280**(7):5581–7.

127. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, et al. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell* 2011;**22**(23):4647–56.
128. Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, Voigt CA. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 2009;**461**(7266):997–1001.
129. Mitra RD, Silva CM, Youvan DC. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* 1996;**173**(1 Spec No):13–7.
130. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997;**388**(6645):882–7.
131. Goedhart J, von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimousin M, Joosen L, Hink MA, et al. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* 2012;**3**:751.
132. Nguyen AW, Daugherty PS. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* 2005;**23**(3):355–60.
133. Ouyang M, Sun J, Chien S, Wang Y. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**(38):14353–8.
134. Kawai Y, Sato M, Umezawa Y. Single color fluorescent indicators of protein phosphorylation for multicolor imaging of intracellular signal flow dynamics. *Anal Chem* 2004;**76**(20):6144–9.
135. Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**(29):10554–9.
136. Ananthanarayanan B, Ni Q, Zhang J. Signal propagation from membrane messengers to nuclear effectors revealed by reporters of phosphoinositide dynamics and Akt activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**(42):15081–6.
137. Sasaki K, Sato M, Umezawa Y. Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells. *J Biol Chem* 2003;**278**(33):30945–51.
138. Palmer AE, et al. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**(50):17404–9.
139. Spriet C, Trinel D, Riquet F, Vandenbunder B, Usson Y, Heliot L. Enhanced FRET contrast in lifetime imaging. *Cytometry A* 2008;**73**(8):745–53.
140. Dunn KW, Mayor S, Myers JN, Maxfield FR. Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology. *FASEB J* 1994;**8**:573–83.
141. Tomazevic D, Likar B, Pernus F. Comparative evaluation of retrospective shading correction methods. *J Microsc* 2002;**208**(Pt 3):212–23.
142. Tsien RY, Harootunian AT. Practical design criteria for a dynamic ratio imaging system. *Cell Calcium* 1990;**11**(2–3):93–109.
143. Thevenaz P, Ruttimann UE, Unser M. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* 1998;**7**(1):27–41.
144. Dross N, Spriet C, Zwerger M, Muller G, Waldeck W, Langowski J. Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. *PLoS One* 2009;**4**(4):e5041.
145. Liu S, Zhang J, Xiang YK. FRET-based direct detection of dynamic protein kinase A activity on the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;**404**(2):581–6.
146. Castro LR, Gervasi N, Guiot E, Cavellini L, Nikolaev VO, Paupardin-Tritsch D, et al. Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci* 2010;**30**(17):6143–51.

147. Goedhart J, van Weeren L, Hink MA, Vischer NO, Jalink K, Gadella Jr TW. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat Methods* 2010;**7**(2):137–9.
148. Kremers GJ, Goedhart J, van Munster EB, Gadella Jr TW. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry* 2006;**45**(21):6570–80.
149. Kriegsheim A, Preisinger C, Kolch W. Mapping of signaling pathways by functional interaction proteomics. *Methods Mol Biol* 2008;**484**:177–92.
150. Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 2007;**9**(3):324–30.
151. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 2009;**8**(8):1168–75.
152. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 2005;**118**(Pt 14):2997–3002.
153. Dong J, et al. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**287**(5):F1049–F1058.
154. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 2008;**60**(3):261–310.
155. Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF, et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J* 2005;**24**(2):294–304.
156. Mebratu YA, Dickey BF, Evans C, Tesfaigzi Y. The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN γ -induced cell death. *J Cell Biol* 2008;**183**(3):429–39.
157. Trecia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, et al. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 2003;**23**(13):4511–21.
158. Maeder CI, Hink MA, Kinkhabwala A, Mayr R, Bastiaens PI, Knop M. Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nat Cell Biol* 2007;**9**(11):1319–26.
159. Blosssey R, Bodart JF, Devys A, Goudon T, Lafitte P. Signal propagation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes: role of bistability and ultrasensitivity for a mixed problem. *J Math Biol* 2012;**64**(1–2):1–39.
160. Kholodenko BN, Birtwistle MR. Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009;**1**(1):28–44.
161. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004;**84**(1):137–67.
162. Willoughby D, Cooper DM. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* 2007;**87**(3):965–1010.
163. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;**5**(12):959–70.
164. Neves SR, Tsokas P, Sarkar A, Grace EA, Rangamani P, Taubenfeld SM, et al. Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* 2008;**133**(4):666–80.
165. Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D, et al. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J Neurosci* 2007;**27**(11):2744–50.

166. Vincent P, Castro L, Gervasi N, Guiot E, Brito M, and Paupardin-Tritsch D. PDE4 control on cAMP/PKA compartmentation revealed by biosensor imaging in neurons. *Hormone and Metabolic Research*, 2012. in press.
167. Taylor RJ, Falconnet D, Niemisto A, Ramsey SA, Prinz S, Shmulevich I, Galitski T, et al. Dynamic analysis of MAPK signaling using a high-throughput microfluidic single-cell imaging platform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**(10):3758–63.
168. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 2009;**461**(7260):99–103.
169. Carlson HJ, Campbell RE. Genetically encoded FRET-based biosensors for multi-parameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol* 2009;**20**(1):19–27.
170. Piljic A, Schultz C. Simultaneous recording of multiple cellular events by FRET. *ACS Chem Biol* 2008;**3**(3):156–60.
171. Kishikawa J, Fujikawa M, Imamura H, Yasuda K, Noji H, Ishii N, et al. MRT letter: expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. *Microsc Res Tech* 2011;**75**(1):15–9.
172. Lissandron V, Rossetto MG, Erbguth K, Fiala A, Daga A, Zaccolo M. Transgenic fruit-flies expressing a FRET-based sensor for in vivo imaging of cAMP dynamics. *Cell Signal* 2007;**19**(11):2296–303.
173. Lissandron V, Terrin A, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Pantano S, et al. Improvement of a FRET-based indicator for cAMP by linker design and stabilization of donor-acceptor interaction. *J Mol Biol* 2005;**354**(3):546–55.
174. Kardash E, Bandemer J, Raz E. Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nat Protoc* 2011;**6**(12):1835–46.
175. Gervasi N, Tchenio P, Preat T. PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 2010;**65**(4):516–29.
176. Fan-Minogue H, Cao Z, Paulmurugan R, Chan CT, Massoud TF, Felsher DW, et al. Noninvasive molecular imaging of c-Myc activation in living mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**(36):15892–7.
177. Kamioka Y, Sumiyama K, Mizuno R, Sakai Y, Hirata E, Kiyokawa E, et al. Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct Funct* 2012;**37**:65–73.
178. Yamaguchi Y, Shinotsuka N, Nonomura K, Takemoto K, Kuida K, Yosida H, et al. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J Cell Biol* 2011;**195**(6):1047–60.
179. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, et al. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* 2009;**7**(8):e1000172.

- **Ploidy in Mitosis and Meiosis: A Role of MAPK/Erk Network.**

Franck Riquet, Pauline Vandame, & Jean-Francois Bodart. Aneuploidy : etiology, disorders, and risk factors. Editors : Salvatore de Rossi and Filippo Bianchi. 2011.

In: Aneuploidy: ...

ISBN: 978-1-62100-070-9

Editors: S. de Rossi and F. Bianchi

©2011 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter II

Ploidy in Mitosis and Meiosis: A Role of MAPK/Erk Network

*Franck B. Riquet, Pauline Vandame and
Jean-François Bodart **

EA4479 Laboratoire de Régulation des Signaux de Division University of
Lille 1, Cell Signalomics Group, Parc de la Haute Borne, France

Abstract

Genetic unbalances resulting in gain or loss of chromosomes may affect cell evolution towards unregulated growth characteristics and diminished response to apoptosis, cellular damage and cell cycle checkpoints. Besides their dependency towards oncogenes, evidences have been raised towards the idea that cancers might also be dependent upon various abnormal assortments of chromosomes, aneuploidy or even polyploidy.

In addition to their roles in transcription up-regulation at G1/S, which have been shown to be involved in tumorigenesis, Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) from the Extracellular Regulated Kinase (Erk) group may recruit transcription-independent transduction mechanisms involved in cell

* corresponding author : telephone (33)320436867 ;Fax (33)320434038 ; e-mail : jean-francois.bodart@univ-lille1.fr , EA4479 Laboratoire de Régulation des Signaux de Division University of Lille 1, USR 3078 CNRS, Cell Signalomics Group, Parc de la Haute Borne, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

reorganization at division and particularly in genetic material segregation. While the role of Erk in M-phase cellular reorganization may be discussed in mammalian cells, meiotic models, including urochordates, molluscs, amphibian and mammals female gametes, have provided case studies where the deregulation of the Erk network lead to catastrophic events or uncontrolled division cycles.

This chapter describes the functions explored for MAPK/Erk during M-phase cellular reorganization and the network of its regulators. The role of a particular MAPKKK, Mos, with regards to their involvement in genomic stability and ploidy, will be addressed and discussed.

Keywords: Aneuploidy, Mitosis, Meiosis, Erk, Mos, p53, polyploidy, genomic instability

1. Crucial to Cell Integrity, Genomic Stability is Controlled Throughout Cell Cycle

1.1. Genomic Stability

The ability to dissect the cancer genome has revealed extensive genetic changes both at the chromosomal and the nucleotide levels. These changes have been referred to genetic or genomic instability. Genetic instability may be observed under different forms and debates have arisen whether this genetic instability represents the cause or the consequence of tumorigenesis. Aneuploidy, designating an abnormal number of chromosomes, is opposed to euploidy, which refers to a normal set of chromosomes that is either diploid or an exact multiple of the diploid number. Several evidences have underlined the role of aneuploidy in precocious steps in carcinogenesis [1]: (i) Aneuploidy is ubiquitous in solid cancer, (ii) carcinogens cause aneuploidy, (iii) aneuploidy leads to unbalance dosage or expression of thousands of normal genes, and (iv) aneuploidy immortalizes cells. According to this model, random, but minor and non-cancerous, aneuploidy first accumulates in an emerging population of cells. Then, aneuploid cells ‘autocatalytically’ generate new karyotypes, including lethal, pre-neoplastic or neoplastic ones [2]. The latter are characterized by high genomic instability and malignancy. The degree of malignancy appears to be also proportional to the degree of aneuploidy in cancer cells and attention has now been focused on mechanisms driving aneuploidy or more widely, on

genomic instability, since genomic integrity is a crucial issue to any therapeutically approaches dealing with tumorigenesis and long term survival of treated-patients.

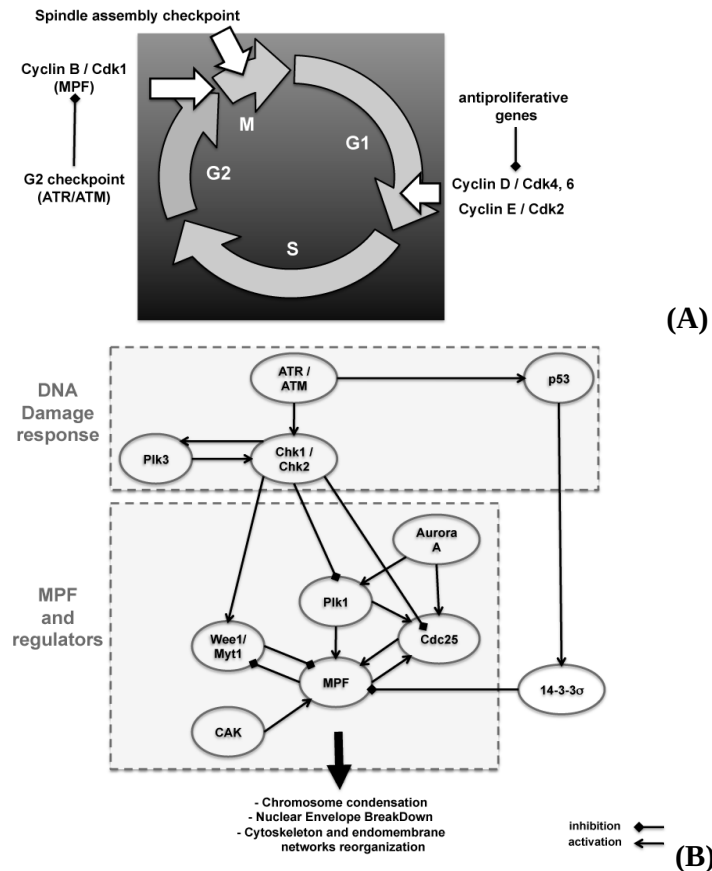


Figure 1. Cell cycle and regulatory machinery to M-Phase entry. A, basic scheme for cell cycle, with regulatory checkpoints at G1/S, G2/M, metaphase-anaphase and to DNA damage at G2. B, MPF regulation and DNA damage response. Main regulators are mentioned, which are discussed in the different sections of this chapter. G1/S transition is driven by the association of Cdks (2,4,6) with G1-Cyclins D and E. At G2/M transition, MPF is activated by dual-phosphatase Cdc25 and CAK (Cdk Activating Kinase), which promotes Thr161 phosphorylation and association of the two subunit of the MPF dimer. An autoamplification loop exists between MPF and Cdc25, which is also regulated by phosphorylation driven by Plk1. MPF is negatively regulated by kinases Myt1 and Wee1. DNA damage response is linked to M-phase entry machinery, and upon ATR/ATM

activation, can delay or inhibit MPF activation, through Cdc25 inhibition or Wee1/Myt1 activation.

1.2. Failures in the Mitotic Machinery

The cell cycle is controlled in a way to avoid “madness” at the helm. Nevertheless the intrinsic robustness of the cell cycle and redundancies within the network, which are both in charge of the control checkpoints, enable transgression and progression in “wrong” ways, which could result, for instance, in aneuploidy. Then, unbalance in the number of chromosomes is thought to result in failure of the organization or disorganization of the mitotic spindle, or in failure in the tight control of cell cycle progression. Four main phases, in addition to G0 or quiescence, may be distinguished: the phase Gap 1 (G1) precedes the replication and duplication of chromosomes (S-Phase), while the Gap 2 (G2) phase prepares the division of M-Phase (mitosis), which can be controlled either at its entry, at the G2/M border by mitogen signals, or at the metaphase-anaphase transition, prior to chromosome segregation (figure 1A). The events driving cell division itself are timely and spatially strictly controlled. Cell division aims at taking the duplicated genome and ensuring its equal distribution to each daughter cell. Cell division even culminates in the partition of the condensed chromosomes, which is achieved by the mitotic spindle. This complex machinery exhibits a bipolar geometry between centromeres or MicroTubules-Organizing Centers (MTOC) that enable correct segregation of the genetic material.

Spindle morphogenesis and cell reorganization at G2/M, which includes nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, disappearance of Golgi apparatus and reorganization of endomembrane system, are complex events requiring the coordination of a regulatory network of protein through post-translationnal modifications (phosphorylation, ubiquitynation, farnesylation,...) or through stimulation of protein synthesis. Protein kinases play key roles in these phenomena. Protein kinases covalently transfer the γ -phosphate of ATP to recipient amino acid side chains on target proteins. These processes can be mediated by Serine / Threonine kinases (on Serine or Threonine residues) or by Tyrosine kinases (on Tyrosine residues). Mitotic decision is tightly linked to the activation of MPF (M-phase Promoting Factor). MPF is a universal heterodimer composed of at least one regulatory subunit, the cyclin B, and a catalytic subunit, cdk1. Its existence was first reported in the Northern Leopard Frog, *Rana pipiens*, through the pioneer experiments of

Yoshio Masui [3], and the conundrum of its nature was solved at the biochemical level more than a decade and a half later, in *Xenopus* oocytes [4]. Cyclin B levels are periodically regulated by transcription-translation / degradation cycles while Cdk1 has to be (1) phosphorylated on Thr 161 on its T-loop to produce an active kinase, and (2) to be dephosphorylated on Thr14 and Tyr15 for activation. The latter residues are targeted by antagonistic inhibitory kinases (Wee1, Myt1) and activatory dual-phosphatase Cdc25 (figure 1B) [5,6]. Similar mechanisms are involved in progression through G1 and S since the latter is closely associated to the activation and mobilization of so called Cyclin G1 (Cyclins D and E) and Cdks 2,4 and 6.

Phosphorylation of protein kinases target proteins results in changes in proteins activities, interactions, localizations, or stability, thereby propagating a signal, which influences cellular decisions and functions. Signaling cascade propagation through mobilization of protein kinases is tightly controlled by combinations of regulation motifs, including feedforward and feedback mechanisms, which ensure irreversible, sustained or transitory decisions [7-9]. These mechanisms are closely controlled to prevent aberrant protein kinases activation or inactivation, and cellular decisions are themselves subjected to regulatory checkpoint like those controlling cell cycle progression throughout replication and division [5,6]. Deregulation of these pathways lead to severe pathologies such as carcinogenesis. Cells with more than two centrosomes during mitosis may assemble multipolar spindles that unequally distribute chromosomes to the daughter cells. Cells with persistent chromosomal abnormalities may undergo cell death, but some of them would survive and become malignant clones bearing defective genomic informations. These cells can be characterized by gains or losses of whole chromosomes along with karyotypic alteration such as nuclear pleomorphism and multi/giant-nucleated cells [10,11].

2. MAPK Network Members are Involved in Genomic Stability

2.1. MAPK, a Node in a Network for Signal Integration

The Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) / Extracellular regulated kinases (Erk) network is considered as one of the most important node in

proliferation and thus, in cell cycle control and cancer models. Typically, the MAPK/Erk cascade is a highly conserved signaling pathway throughout eukaryotic cells, bridging cell surface receptors to diverse executor proteins, integrating signals and modulating many aspects of cell life such as cell cycle, survival, differentiation and cell migration.

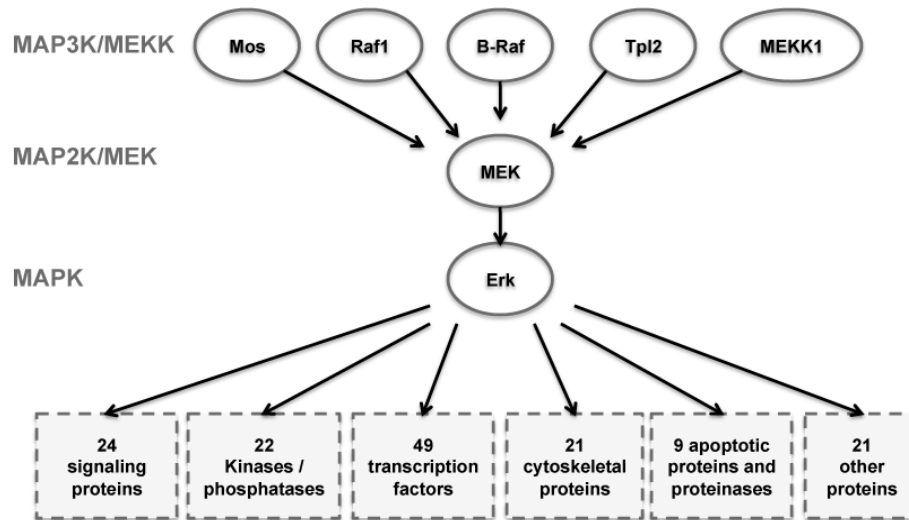


Figure 2. MAPK/Erk network. Erk cascade is built from three layers activated upon the activation of a signaling complex (upstream levels of regulation like GTPases have not been added not to increase the complexity of this interacting network), and serves as a node to integrate cell response. More than 160 substrates have been identified for Erk and may be grouped. See text for details about isoforms of MEK and Erk.

Being crucial element in the network of signal integration, the MAPK cascade (figure 2) consists of three layers, each one being composed of a kinase (MAPKKK or MAP3K, MAP2K or MEK and MAPK/Erk). The MAP3K tier of the cascade contains a few components, which include Raf-kinases, Mos, Tpl2 and MEKK1, and operates under distinct and different conditions [12]. The two other tiers of the cascade contain two groups of closely related proteins. First, the 45 kDa MEK1, 46 kDa MEK2, and 43 kDa MEK1b, which lacks 26 amino-acids in its kinase domain and has been suggested to be an inactive MEK1 isoform [13,14], is an evolutionarily conserved group of proteins sharing high degrees of homology [15,16]. MEK1 and MEK2 are mostly cytoplasmic where they interact with the downstream layer of Erk cascade through a N-terminal domain, providing cytoplasmic anchoring and rapid Erk1/2 activation upon

mobilization of the cascade [17,18]. Second, the MAPK tier includes 44 kDa Erk1 and 42 kDa Erk2, which share 70 % of homology [19]. It is to note that several alternatively spliced variants of Erk have been described: rodent Erk1b [20], primate Erk1c [21,22] and primate Erk2b [23]. Differences in the role of MEK and Erk have been described elsewhere (i.e. [24]) and will not be further discussed here.

This network acts as a transducer activated by several key growth factors or oncogenes. There have been compelling evidences for the involvement of MAPK/Erk in pathogenesis progression and oncogenic behavior in many human tumors including breast carcinoma, glioblastoma, as well as primary tumor cells derived from kidney, colon and lung tissues [25-29]. Deregulation of the MAPK/Erk pathway due to alterations affecting the expression or function of a number of pathway components has long been associated with numerous pathologies including cancers, resulting in the constitutive activation of ERK and continual cell proliferation [30,31]. Nevertheless, while involvement of Raf (MAPK kinase kinase/MAP3K/MEKK)-MEK (MAPK kinase/MAP2K)-Erk cascade has been considered for control of growth signals, cell survival, tumor progression and invasion (angiogenesis and loss of cell adhesion), aneuploidy and its consequences has not received much attention.

2.2. Requirement for MAPK/Erk in G2/M Progression in Mitotic Models

Contribution of MAPK/Erk to cell cycle G2/M transition has been explored in somatic cells. Treatment of synchronized mouse NIH 3T3 cells with U0126 has been reported to lead to spindle defects: chromosome misalignment, abnormal chromosome segregation and multipolar spindles [32]. In contrast, spindle assembly in HeLa and RPE1 cells was not affected by MEK 1/2 inhibition with U0126 or PD184352 [33]. These results were confirmed by observations made by Shinohara and co-workers [34] in NIH3T3, HeLa, Ptk or RPE1 cells, where inhibition of Erk activity seemed to have no deleterious effects on spindle assembly. These contradictory observations have shaped the hypothesis that negative deregulation of MAPK activity drives catastrophic events during M phase progression.

Nevertheless, the involvement of the MAPK/Erk network in mitosis regulation has been more clearly established since then [35]. There is a body of

evidences demonstrating that upon pharmacologic inhibition, siRNA mediated or dominant negative MEK1 strategies, there is a noticeable delay in G2/M kinetics [36-40]. Consistent with the lack of Erk1/2 activation, down regulation of mitotic Ser/Thr kinases, such as Cdk1, Plk1, Aurora A and B, can be observed [39]. Similarly, when treated by Erk1/2 inhibitors, bladder cancer cells lines exhibit G2 arrest, presumably linked to the loss of Cyclin B1 expression [41]. In addition to above-mentioned mitotic regulators, Erk network has been involved in the regulation of Cdc25 [42,43] CENP-E [44], SWI/SNF [45] and Plk3 [46]. Noteworthy, this network has also been involved in the Golgi apparatus fragmentation during mitosis [47,48]. Finally, formation of centromere-containing micronuclei induced in Chinese hamsters fibroblasts by alkylating agents (Methylnitrosurea, MNU) was suggested to be linked together with the inhibition of Rsk [49].

2.3. Antagonistic Effects of Erk Pathway : Towards Genomic Integrity

MAPK is activated in a variety of transformed cells and the MEK-MAPK pathway also mediates, if not totally, transformation induced by Ras, Raf and other oncoproteins [50]. Induction of ectopic H-Ras expression in p53^{-/-} NIH3T3 cells drives premature entry into S phase, increase permissivity for gene amplification and generation of aberrant chromosomes within one cell cycle [51,52]. Thus, oncogenic H-Ras has been shown to induce karyotypic instability: when overexpressed, oncogenic Ras also generates chromosomes aberrations in rat mammary carcinoma cells, rat prostatic tumors cells [53] and in human colon carcinoma cell lines [54]. These chromosomes aberrations lead to improper chromosome segregation and subsequent exclusion of chromosomes from daughter nuclei [55,56]. Predominant defects induced by v-Ras are (i) formation of mitotic bridges, resulting from the acquisition of one or more centromeres, and (ii) centrosome amplification, which results in the formation of multiple mitotic spindles and chromosomes missegregation [57,58]. On one hand, Saavedra and coworkers stressed that transformed phenotypes associated with high genomic instability induced by Ras [micronuclei formation, abnormal centrosome amplification and DNA bridges] were strongly dependent upon MAPK activity [58]. On the other hand, NIH3T3 cells transformed by H-Ras V12 produce large amount of reactive oxygen species (ROS) superoxide [59],

and induction of chromosomal instability by H-Ras V12 might also be dependent upon ROS production, since it can be rescued by N-acetyl-cysteine, a ROS scavenger [60,61].

In addition to studies on the role of the cascade Ras-Raf-MEK-Erk on promoting genomic instability, there have been evidences that Erk sustained activity was also involved in genomic instability induced by other carcinogens such as hepatitis B virus X oncoprotein (HBx) and arsenite. Integration of Hepatitis B virus has been suggested to facilitate genetic alterations of the host genome at stages of chronic viral hepatitis and cirrhosis, thereby increasing the risk for hepatocarcinoma development [62]. Ectopic expression of HBx in hepatoma cells leads to multinucleated cell population increase, resulting from aberrant mitosis progression, and to chromosomal aberrations like chromosomes rearrangement and micronuclei formation [63-66]. Similarly, ectopic expression of HBx in Chang liver cell line induced multipolar spindle formation and chromosomal missegregation during mitosis but also increased cell population with multinuclei or micronuclei. These effects, related to centrosome amplification, were mediated by the Ras-MEK-Erk pathway [67].

Arsenite induces injuries like chromosomal aberrations [68], micronuclei [69] and aneuploidy [70]. Arsenite activates Ras, Raf and Erk, through EGF receptor activation, in Src-dependent and ligand independent manner [71]. Under exposure to arsenite, genomic action of Erk involves the transcription of c-fos and c-jun and the DNA binding activity of AP-1 in the promotion of anchorage-independent growth [72] whereas transcription-independent and multi-functions of Erk contribute to genomic instability [73].

Though MAPK/Erk signals is clearly involved in genomic stability, it may also exert a protective role in maintaining genomic stability under a variety of carcinogens such as cadmium [74] or ionizing radiations [75], and protecting cell from aneuploidy through delaying cell cycle progression. Indeed, activation of the MAPK/Erk network either by growth factors or phorbol esters has been involved in G2-phase delay [76]. Several mechanisms have been proposed for this G2-delay, implicating (1) cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 [76] or (2) response to DNA damage machinery with ATM and related ATR-dependent pathways, which are upstream regulators of signal negatively controlling the activation of mitotic cyclin/Cdks through the action of Chk1 and Chk2 [77,78]; or (3) MEK-dependent pathway destabilizing Cdc25B by increasing the phosphorylation of residue Ser249 [43]. In response to stresses that trigger G2 delay through ATR/ATM signaling (figure 1) or extracellular stresses driving MAPK/Erk

network activation, entry into mitosis would be delayed until intercellular / extracellular stresses have been solved. In this context, such delay in G2-phase is thought to provide enough time i.e. for reparation [79]. Such delay induced by MAPK/Erk has been reported to be required to maintain genomic integrity, or at least, not to increase the rate of chromosomal aberrations. Indeed, Rsk knock-down lead to an increase in the HGF-induced chromosomal defects [80]. Then, in contrast to pathological contexts induced by Ras and MAPK/Erk network, increased MAPK activity may also be linked to maintenance of genomic integrity and decreased activity may be associated to increase in chromosomal defects. Nevertheless, the relationship between growth factor-induced delay in G2/M, mitotic regulator and MAPK/Erk, as well as the physiological significance of such delay, remain to be fully clarified.

3. MAPK Pathway in G2/M, Lessons from Vertebrates Gametes

In addition to its role in transcription up-regulation at G1/S, which is largely involved in tumorigenesis, the notion that MAPK/Erk pathway exerted functions in cell reorganization at M-phase and genetic material segregation, came primarily from studies in vertebrates oocytes. Oocytes have offered for many decades biochemical and physiological playgrounds, where kinases network could be explored in absence of p53-dependent checkpoints that exist in somatic cells.

3.1. MAPK Activation in the South African Clawed *Xenopus* Oocytes, a Case of Study for Physical Properties of MAPK Activation

Oocytes from many species have provided numerous insights in spindle morphogenesis and provide physiological model for chromosome segregation, which does not rely on transcription. In many species, MAPK/Erk network has appeared as a crucial component in the network regulating meiosis (figure 3, 4). In vertebrates' oocytes, the oncoprotein Mos acts as the upstream activator of MEK and MAPK/Erk levels. This oocyte-expressed kinase appeared early during animal evolution and functioned ancestrally in regulating specializations

of female meiosis [81]. Once accumulated, Mos phosphorylates MEK, which in turn activates MAPK/Erk by dual phosphorylation of a TEY motif [82]. In amphibian, Mos-activated cascade prevents DNA synthesis during meiosis and promotes spindle morphogenesis as well as the cytostatic activity present in metaphase-II arrested oocytes [83-86]. In this model, physiological role of Raf has been minored and Mos is thought to literally hijack the control of the MAPK cascade. A specific all-or-none response for MAPK/Erk activation is observed in these oocytes, in contrast to the gradual response of MAPK/Erk to external stimuli in mammalian somatic cells. The cascade arrangement of the signaling network generates the steepness of MAPK/Erk response in *Xenopus* oocytes. The physical properties of the cascade, which includes ultrasensitivity, bistability and irreversibility [87-91], are thought to mainly arise for bistability and ultrasensitivity from the existence of a feed-back loop motif. Indeed, the Mos-MEK-MAPK/Erk network has been found to be embedded in a positive feed-back loop, driven by MAPK/Erk itself [88,92-94] and / or through MPF action [95-97], which promotes both Mos stability and synthesis.

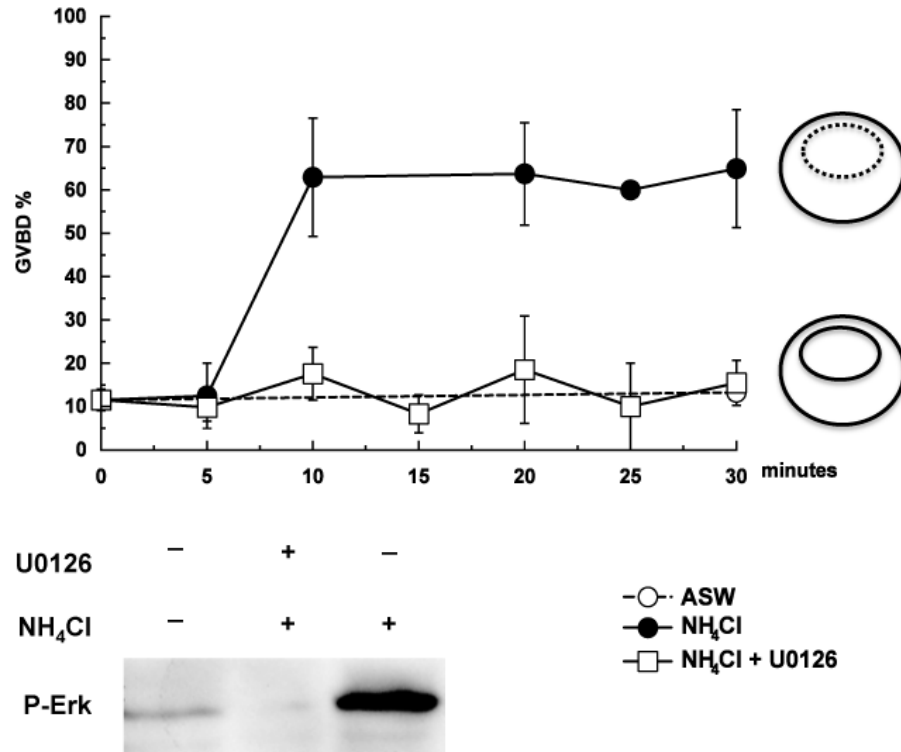


Figure 3. MAPK inhibition prevents M-phase entry in mollusk *Patella vulgata*. *Patella* is a rare model where MAPK is required for meiotic resumption and breakdown of oocyte nucleus, or germinal vesicle. Indeed, when MAPK activation is impaired by U0126, the germinal vesicle remains intact and no spindle formation is observed in these conditions (ASW, Artificial Sea Water, U0126, Chemical inhibitor of MEK; GVBD: Germinal Vesicle BreakDown).

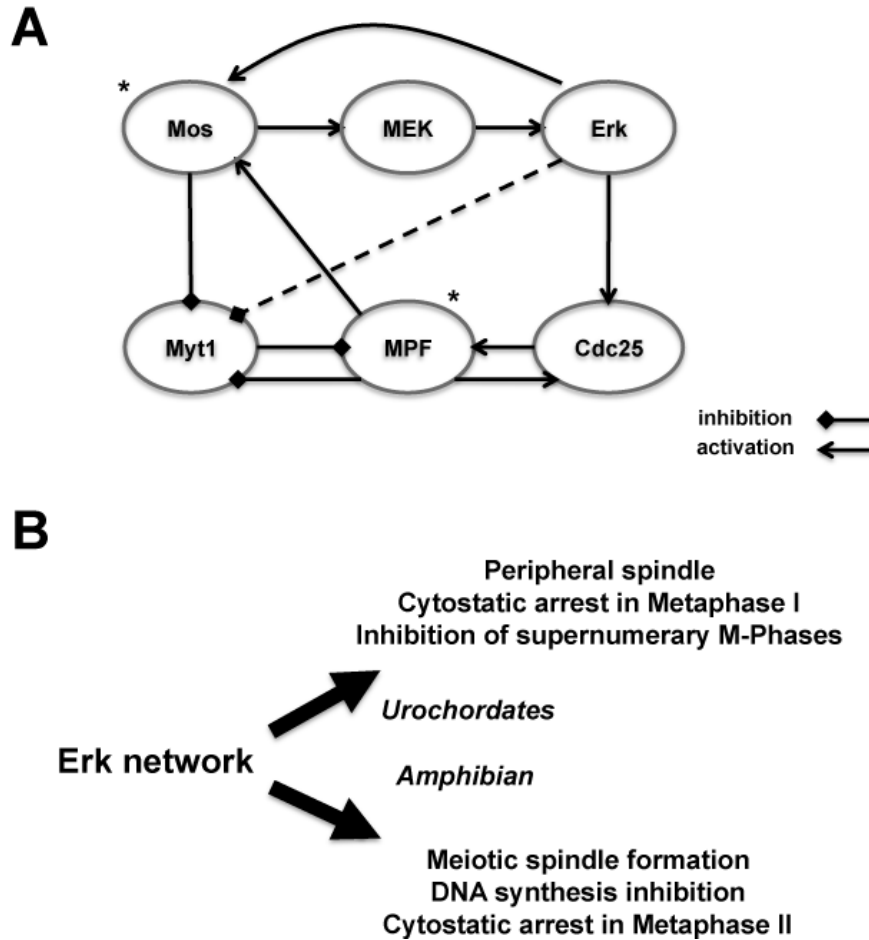


Figure 4. Multiple roles of MAPK/Erk network in meiosis and interplay with MPF pathways. A, Interplay between MAPK/Erk and MPF pathways in *Xenopus* oocytes. Oocyte M-Phase initiation machinery activates these pathways through Mos and Cyclin B synthesis (*). The MAPK/Erk cascade is embedded in a positive feedback loop from MAPK to Mos. Since MPF and MAPK/Erk pathways are intimately linked, the latter exhibits a typical dynamics, which depends partially on MPF dynamics. B, Multiple and conserved role for MAPK/Erk in Urochordates and Amphibian.

3.2. Role of MAPK/Erk Network in Spindle Organization

MAPK/Erk activity has been suggested to be required for functional spindle assembly checkpoint in oocyte extracts [98-100]. Though presence of MAPK/Erk on kinetochores has been suspected in somatic cells [101], proteomic studies failed to find MAPK/Erk associated to isolated human metaphase chromosomes [102]. Thus, whether MAPK/Erk in its active form is a component of kinetochore, and whether it is required for spindle assembly checkpoint function, remains somehow controversial.

From observations made in many species like starfish, jellyfish, urochordates, amphibian and mice, it is thought that control in meiotic spindle morphogenesis and positioning and chromatin organization are conserved functions for Mos and MAP/Erk network. First observations were made in nullizygous mice for Mos, where MEK activation is impaired and interphase-like structure for microtubules and chromosomes may be found between meiotic division, as well as formation of monopolar half-spindle [103-106]. Similar observations were made in other biological systems. MAPK/Erk cascade regulates spindle bipolarity through its direct or indirect effects on microtubule dynamics in amphibian oocytes [86,107]. No bipolar spindle anchored at the plasma membrane is observed when MAPK/Erk activity is inhibited by chemical inhibitors of MEK such as U0126 [32,108,109]. *Rana japonica* oocytes treated with U0126 also fail to organize a Microtubule Organizing Center (MTOC) at the bottom of the germinal vesicle and chromosomes are only partially condensed [110]. MAPK inhibitors, both *in vitro* [32] and *in vivo* [86], lead to the formation of monopolar spindle or aster-like structures, attesting the failure to establish a bipolar organization (figure 5). Similarly, when Mos accumulation is prevented *in vivo*, *Xenopus* oocytes exhibit aster-like structures. Such structures remain to be fully characterized but do not enable oocytes to properly segregate their genomic content [86]. Finally, the latter observation stressed by inhibiting the network at different levels that Mos and MAPK/Erk were playing distinct but complementary roles in spindle morphogenesis [86], suggesting that MAPK/Erk was made up with functional modules [111], which may exert distinct actions at different levels of spindle organization and potentially result, when deregulated, in different type of aneuploidy. Such particular role for Mos may contribute to the chromosome instability of tumor cells exhibiting an up-regulation of Mos.

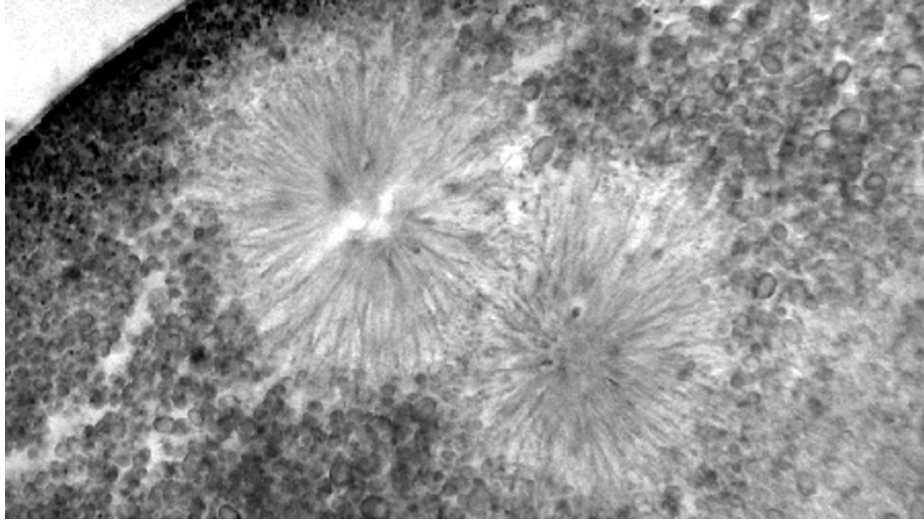


Figure 5. Aster formation in absence of MAPK activity in *Xenopus* oocytes.

4. Mos, Particularities of a MAPKKK in Tumor Cells and Gametes

4.1. Transformation and Aneuploidy Driven By Mos

Recombinant v-Mos was among the first oncogenes shown to transform cells efficiently in DNA transfection assays [112,113]. v-Mos and c-Mos have been demonstrated to bear essentially similar biological activities [112]. Moreover, their inappropriate expressions have been shown to be sufficient for morphological transformation [112-115]. When constitutively expressed, Mos could induce either cell death or oncogenic transformation, depending on its expression level [116]. Infection of Swiss 3T3 with Mo-MuSV (Moloney Murine Sarcoma Virus) causes a large percentage of the cells to round-up and detach from the monolayer to form floating cells [117,118]; only the remaining attached cells grow as morphologically transformed cells. When transformed by v-Mos, cells exhibit genetic instability [119], and binucleated tumor cells were one of the earliest unexplained histopathological observations found in Mo-MuSV-induced sarcomas in mice [120].

Mos associates with microtubules [121,122] and kinetochores [123]. When a bacterially expressed maltose-binding protein (MBP)-Mos *Xenopus* fusion protein is microinjected into potoroo epithelial cells (PtK1), it blocks mitosis by preventing normal metaphase spindle organization. Localization of Mos fusion protein at kinetochores was proposed to result in congression failure and in increased chromosomal instability [123]. Among the growth arrested floating cells induced by v-Mos infection in Swiss 3T3, one third, which DNA content was 4C, were binucleated and underwent nuclear division [karyokinesis] but not cytokinesis. In the floating cells precursors, mitotic spindle lacked astral microtubules and the spindle apparatus was asymmetrically positioned with one spindle pole juxtaposed to the cell membrane, reminding the spindle topology during oocyte meiosis [116]. Apoptosis and growth arrest induced by Mos-MAPK in these conditions appeared to be p53 dependent [124]. p53^{-/-} MEF (Mouse Embryo Fibroblasts) display abnormal mitotic spindles with three or more spindle poles [125] and chromosome instability is often observed in tumor cells lacking p53 [127-129]. In the absence of p53, Mos-induced apoptosis during S phase was abrogated and cells continued to cycle: nonpartitioning chromosomes and multinucleation cells rate were dramatically enhanced by Mos-MAPK [130].

Thus, surimposing a meiotic program, which orchestrates sister chromatid exchange and chromosome segregation in a unique way, on a mitotic cell cycle could possibly influence and compromise somatic cell checkpoint functions [130]. Nevertheless it is quite unlikely that Mos-driven transformation depends upon Mos distinct functions and that chromosomal changes are causatively related to oncogenic transformation. Mos-driven transformation depends mainly upon its ability to activate the MAPK cascade. Indeed, MEK overexpression is sufficient to induce transformation [131] and greatly enhances Mos transformation activity [132,133] whereas co-expression of dominant negative MEK1 or CL100 MAPK-phosphatase both inhibit Mos-driven transformation [132,133].

4.2. Number of M Phases Cycles: Does Mos Rule the Limits?

Mitotic exit is irreversible and irremediably followed by interphase, based on the degradation mechanisms of Cyclin B [5,6,134]. This is not the case during meiosis, where exit from the first meiotic division is not followed by interphase

and replication but immediately followed by the onset of a second division. This lack of irreversibility has raised the question how oocytes limit the number of M phases to just two during maternal meiosis. Switching off the activity Mos – MAPK/Erk network appeared as an attractive hypothesis for ruling the number of M phases, though it was clear from studies in jellyfish, starfish and amphibian that this mechanisms could not be a universal one. First evidences supporting this hypothesis was recorded in mouse oocytes where maintaining MAPK activity inhibits pronucleus formation [135,136] and where entry in meiosis III is observed in presence of high level of MAPK/Erk activity [137]. The hypothesis that Mos-MAPK/Erk network could be the determining factor limiting the number of meiosis to two was recently more formally tested in urochordates, which are at the crossroad between invertebrates and vertebrates [138]. In ascidian eggs, prolonging MAPK activity by expressing murine Mos leads to entry into supernumerary rounds of M phases, as attested by the increased number of polar bodies [138]. Then, urochordates offer an attractive model to gather new observations on conserved role of MAPK/Erk on spindle morphogenesis and to decipher the mechanisms leading to uncontrolled division and polyploidy since the successive rounds of M phases observed in this cases occur without intervening replication.

Tetraploidization has been associated with the overexpression of meiotic-specific proteins such as Mos [120,134]. As mentioned earlier, p53^{-/-} cells tolerate high levels of Mos in contrast to control one [126,139], suggesting that the stress generated by ectopic expression of Mos may kill cells or arrest their cell cycle if the p53 system is running intact. Inactivation of p53 could favor the presence of supernumerary centrosomes [126,140] and increase cell survival to tetraploidization [141,142]. Absence of p53 exerts also a permissive role on the up-regulation at the post-transcriptional level of Mos, which can be observed [125,139,143]. Survival of p53^{-/-} cells overexpressing Mos is clearly associated to an unstable phenotype, with gradual increase the number of sub-tetraploid cells. Knockdown strategies in these conditions prevented multipolar mitoses and brought genome-stabilizing effects [144]. Though exact mechanisms remain to be deciphered, Mos has been then propose to act as an inhibitor of centrosome clustering, inhibiting then the coalescence of supernumerary centrosomes that allows occurrence of normal bipolar mitoses of tetraploid cells [144].

Concluding Remarks

The role of MAPK/Erk network in genomic integrity has been underlined in different models, though the effects of MAPK/Erk may be either protective towards genomic integrity by slowing down cell division or promoting genomic instability. The controversy that arise on the role of this network of kinases on aneuploidy and cell cycle control may be linked to cell dependent lineage or due to the dynamic of the network, which may be modulated according to external and internal stresses. Further work on the interplay between MAPK and MPF pathways will provide new insight on how MAPK may exert an influence on G2/M transition in somatic cells. Interestingly, meiotic MAPKKK Mos seems to play distinct and original role in spindle morphogenesis and aneuploidy through the regulation of ploidy cycles. Substrates targeted by MAPK/Erk and Mos remains to be identified to further understand their respective roles in aneuploidy and tumorigenesis.

Acknowledgments

We thank Drs R. Beaujois, C. Russo, M. Jeseta, J.P. Vilain and R. Blossey for fruitfull discussions. Our work was supported by the 'Ligue Régionale contre le Cancer' and the University of Lille 1.

References

- [1] Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle*. 2003 May-Jun;2(3):202-10.
- [2] Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000 Oct;47(2):81-107.
- [3] Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*. 1971 Jun;177(2):129-45.
- [4] Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(9):3009-13.

-
- [5] Nurse P A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; 100: 71-78.
- [6] Morgan D *The Cell Cycle. Principles of Control*. 2007; OUP/New Science Press Primers in Biology.
- [7] Novak B, Tyson JJ, Gyorffy B, Csikasz-Nagy A, Irreversible cell-cycle transitions are due to systemslevel feedback. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:7248.
- [8] Tyson JJ, Novak B Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol*. 2008; 18:R759-R768.
- [9] Csikasz-Nagy A, Kapuy O, Toth A, Pál C, Jensen LJ, Uhlmann F, Tyson JJ, Novák B Cell cycle regulation by feedforward loops coupling transcription and phosphorylation. *Mol Syst Biol*. 2009; 5:236.
- [10] Salisbury JL, D'Assoro AB, Lingle WL. Centrosome amplification and the origin of chromosomal instability in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004 Jul;9(3):275-83.
- [11] D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene*. 2002 Sep 9;21(40):6146-53.
- [12] [12] Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*. 2005 Oct;31(2):151-74.
- [13] Seger R, Seger D, Lozeman FJ, Ahn NG, Graves LM, Campbell JS, Ericsson L, Harrylock M, Jensen AM, Krebs EG. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem*. 1992 Dec 25;267(36):25628-31.
- [14] Zheng CF, Guan KL. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):23933-9.
- [15] Bendetz-Nezer S, Seger R. Role of non-phosphorylated activation loop residues in determining ERK2 dephosphorylation, activity, and subcellular localization. *J Biol Chem*. 2007 Aug 24;282(34):25114-22.
- [16] Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, Yan C, McConnell P, Spessard C, Banotai C, Mueller WT, Delaney A, Omer C, Sebolt-Leopold J, Dudley DT, Leung IK, Flamme C, Warmus J, Kaufman M, Barrett S, Tecle H, Hasemann CA. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Dec;11(12):1192-7. Epub 2004 Nov 14. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Mar;12(3):278.

- [17] Jaaro H, Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3742-7.
- [18] Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):110-6.
- [19] Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991 May 17;65(4):663-75.
- [20] Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R. ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):15799-808.
- [21] Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R. Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol*. 2004 Nov;24(22):10000-15.
- [22] Shaul YD, Gibor G, Plotnikov A, Seger R. Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes Dev*. 2009 Aug 1;23(15):1779-90.
- [23] Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*. 1991 Nov 25;266(33):22159-63.
- [24] Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1213-26.
- [25] Wang X, Wang Q, Hu W, Evers BM. Regulation of phorbol ester-mediated TRAF1 induction in human colon cancer cells through a PKC/RAF/ERK/NF-kappaB-dependent pathway. *Oncogene*. 2004 Mar 11;23(10):1885-95.
- [26] Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2005 May;6(5):322-7.
- [27] Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*. 1999 Jan 21;18(3):813-22.

-
- [28] Salh B, Bergman D, Marotta A, Pelech SL. Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1B):741-8.
- [29] Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D, Pelech S. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1B):731-40.
- [30] Bodart JF, Chopra A, Liang X, Duesbery N. Anthrax, MEK and cancer. *Cell Cycle.* 2002 Jan;1(1):10-5.
- [31] Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J.* 2005 Dec 1;392(Pt 2):249-61.
- [32] Horne MM, Guadagno TM. A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J Cell Biol.* 2003 Jun 23;161(6):1021-8.
- [33] Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):475-86.
- [34] Shinohara M, Mikhailov AV, Aguirre-Ghiso JA, Rieder CL. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity is not required in mammalian cells during late G2 for timely entry into or exit from mitosis. *Mol Biol Cell.* 2006 Dec;17(12):5227-40.
- [35] Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1299-310.
- [36] Liu X, Yan S, Zhou T, Terada Y, Erikson RL. The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene.* 2004 Jan 22;23(3):763-76.
- [37] Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG. Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol.* 2002 Oct;22(20):7226-41.
- [38] Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11335-40.
- [39] Factor VM, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, Conner EA, Thorngren SS. Loss of c-Met disrupts gene

- expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One*. 2010 Sep 16;5(9).
- [40] Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI, Khavari PA. Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol*. 2009 May 4;185(3):409-22.
- [41] Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, Koul HK. Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 2009 Jun;34(6):1557-64.
- [42] Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1119-32.
- [43] Astuti P, Pike T, Widberg C, Payne E, Harding A, Hancock J, Gabrielli B. MAPK pathway activation delays G2/M progression by destabilizing Cdc25B. *J Biol Chem*. 2009 Dec 4;284(49):33781-8.
- [44] Zecevic M, Catling AD, Eblen ST, Renzi L, Hittle JC, Yen TJ, Gorbsky GJ, Weber MJ. Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol*. 1998 Sep 21;142(6):1547-58.
- [45] Sif S, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kingston RE. Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev*. 1998 Sep 15;12(18):2842-51.
- [46] Xie S, Wang Q, Ruan Q, Liu T, Jhanwar-Uniyal M, Guan K, Dai W. MEK1-induced Golgi dynamics during cell cycle progression is partly mediated by Polo-like kinase-3. *Oncogene*. 2004 May 6;23(21):3822-9.
- [47] Kano F, Takenaka K, Yamamoto A, Nagayama K, Nishida E, Murata M. MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. *J Cell Biol*. 2000 Apr 17;149(2):357-68.
- [48] Feinstein TN, Linstedt AD. Mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent Golgi unlinking occurs in G2 phase and promotes the G2/M cell cycle transition. *Mol Biol Cell*. 2007 Feb;18(2):594-604.
- [49] Campagna M, Beffy P, Del Carratore R, Hauri L, Simi S, Bonatti S, Simili M. Diethylsulphate and methylnitrosourea affect different targets in Chinese hamster fibroblasts: possible mechanisms of aneuploidy induction by these agents. *Mutagenesis*. 2003 Sep;18(5):405-10.

-
- [50] Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):179-85.
- [51] Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):5124-8.
- [52] Wani MA, Xu X, Stambrook PJ. Increased methotrexate resistance and dhfr gene amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2504-8.
- [53] Ichikawa T, Schalken JA, Ichikawa Y, Steinberg GD, Isaacs JT. H-ras expression, genetic instability, and acquisition of metastatic ability by rat prostatic cancer cells following v-H-ras oncogene transfection. *Prostate*. 1991;18(2):163-72.
- [54] de Vries JE, Kornips FH, Marx P, Bosman FT, Geraedts JP, ten Kate J. Transfected c-Ha-ras oncogene enhances karyotypic instability and integrates predominantly in aberrant chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 May;67(1):35-43.
- [55] Hagag N, Diamond L, Palermo R, Lyubsky S. High expression of ras p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells. *Oncogene*. 1990 Oct;5(10):1481-9.
- [56] Wani MA, Denko NC, Stambrook PJ. Expression of Rap 1 suppresses genomic instability of H-ras transformed mouse fibroblasts. *Somat Cell Mol Genet*. 1997 Mar;23(2):123-33.
- [57] Denko N, Stringer J, Wani M, Stambrook P. Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras. *Somat Cell Mol Genet*. 1995 Jul;21(4):241-53.
- [58] Saavedra HI, Fukasawa K, Conn CW, Stambrook PJ. MAPK mediates RAS-induced chromosome instability. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31;274(53):38083-90.
- [59] Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. 1997 Mar 14;275(5306):1649-52.
- [60] Woo RA, Poon RY. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev*. 2004 Jun 1;18(11):1317-30.

- [61] Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 1999 Mar 19;274(12):7936-40.
- [62] Dore MP, Realdi G, Mura D, Onida A, Massarelli G, Dettori G, Graham DY, Sepulveda AR. Genomic instability in chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2001 Jul;32(7):698-703.
- [63] Livezey KW, Negorev D, Simon D. Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutat Res*. 2002 Aug 29;505(1-2):63-74.
- [64] Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):8730-40.
- [65] Oguey D, Dumenco LL, Pierce RH, Fausto N. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249. *Hepatology*. 1996 Nov;24(5):1024-33.
- [66] Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Apr;15(4):357-68.
- [67] Yun C, Cho H, Kim SJ, Lee JH, Park SY, Chan GK, Cho H. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res*. 2004 Mar;2(3):159-69.
- [68] Jha AN, Sharma T. Distribution pattern and dose-response-relationship of chromosome aberrations in human lymphocytes induced in vitro by 60Co gamma-rays and 110 kV X-rays. *Indian J Exp Biol*. 1992 Jan;30(1):42-7.
- [69] Yih LH, Ho IC, Lee TC. Sodium arsenite disturbs mitosis and induces chromosome loss in human fibroblasts. *Cancer Res*. 1997 Nov 15;57(22):5051-9.

-
- [70] Yih LH, Lee TC. Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts. *Mutat Res*. 1999 Mar 15;440(1):75-82.
- [71] Simeonova PP, Luster MI. Arsenic carcinogenicity: relevance of c-Src activation. *Mol Cell Biochem*. 2002 May-Jun;234-235(1-2):277-82.
- [72] Huang C, Ma WY, Li J, Goranson A, Dong Z. Requirement of Erk, but not JNK, for arsenite-induced cell transformation. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14595-601.
- [73] Li JP, Lin JC, Yang JL. ERK activation in arsenite-treated G1-enriched CL3 cells contributes to survival, DNA repair inhibition, and micronucleus formation. *Toxicol Sci*. 2006 Jan;89(1):164-72.
- [74] Chao JI, Yang JL. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest. *Chem Res Toxicol*. 2001 Sep;14(9):1193-202.
- [75] Yacoub A, Park JS, Qiao L, Dent P, Hagan MP. MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion. *Int J Radiat Biol*. 2001 Oct;77(10):1067-78.
- [76] Dangi S, Chen FM, Shapiro P. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in G2 phase delays mitotic entry through p21CIP1. *Cell Prolif*. 2006 Aug;39(4):261-79.
- [77] O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol*. 2000 Jul;10(7):296-303.
- [78] Yan Y, Spieker RS, Kim M, Stoeger SM, Cowan KH. BRCA1-mediated G2/M cell cycle arrest requires ERK1/2 kinase activation. *Oncogene*. 2005 May 5;24(20):3285-96.
- [79] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
- [80] Nam HJ, Kim S, Lee MW, Lee BS, Hara T, Saya H, Cho H, Lee JH. The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations. *Cell Signal*. 2008 Jul;20(7):1349-58.
- [81] Amiel A, Leclère L, Robert L, Chevalier S, Houliston E. Conserved functions for Mos in eumetazoan oocyte maturation revealed by studies in a cnidarian. *Curr Biol*. 2009 Feb 24;19(4):305-11.

- [82] Ferrell JE Jr, Bhatt RR. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):19008-16.
- [83] Sagata N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays.* 1997 Jan;19(1):13-21.
- [84] Baert F, Bodart JF, Bocquet-Muchembled B, Lescuyer-Rousseau A, Vilain JP. Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12;278(50):49714-20.
- [85] Dupré A, Jesus C, Ozon R, Haccard O. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):4026-36.
- [86] Bodart JF, Baert FY, Sellier C, Duesbery NS, Flament S, Vilain JP. Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol.* 2005 Jul 15;283(2):373-83.
- [87] Angeli D, Ferrell JE Jr, Sontag ED. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 17;101(7):1822-7.
- [88] Ferrell JE Jr, Machleder EM. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1998 May 8;280(5365):895-8.
- [89] Huang CY, Ferrell JE Jr. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10078-83.
- [90] Russo C, Beaujois R, Bodart JF, Blossey R. Kicked by Mos and tuned by MPF-the initiation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes. *HFSP J.* 2009 Dec;3(6):428-40.
- [91] [Russo C, Giuraniuc C, Blossey R and Bodart JF. On the equilibria of the MAPK cascade: Cooperativity, modularity and bistability. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2009. 388(24) 5070-5080.
- [92] Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude GF. Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol.* 1996 Nov 1;179(2):485-92.
- [93] Howard EL, Charlesworth A, Welk J, MacNicol AM. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA

- cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1990-9.
- [94] Keady BT, Kuo P, Martínez SE, Yuan L, Hake LE. MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci.* 2007 Mar 15;120(Pt 6):1093-103.
- [95] Castro A, Peter M, Lorca T, Mandart E. c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. *Biol Cell.* 2001 Sep;93(1-2):15-25.
- [96] Paris J, Swenson K, Piwnica-Worms H, Richter JD. Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1697-708.
- [97] Nebreda AR, Hunt T. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 1993 May;12(5):1979-86.
- [98] Takenaka K, Gotoh Y, Nishida E. MAP kinase is required for the spindle assembly checkpoint but is dispensable for the normal M phase entry and exit in *Xenopus* egg cell cycle extracts. *J Cell Biol.* 1997 Mar 10;136(5):1091-7.
- [99] Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):475-86.
- [100] Chung E, Chen RH. Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):748-53.
- [101] Willard FS, Crouch MF. MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cell Signal.* 2001 Sep;13(9):653-64.
- [102] Uchiyama S, Kobayashi S, Takata H, Ishihara T, Hori N, Higashi T, Hayashihara K, Sone T, Higo D, Nirasawa T, Takao T, Matsunaga S, Fukui K. Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):16994-7004.
- [103] Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Géraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development.* 1996 Mar;122(3):815-22.
- [104] Tong C, Fan HY, Chen DY, Song XF, Schatten H, Sun QY. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes:

- microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res.* 2003 Oct;13(5):375-83.
- [105] Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, Sato E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod.* 1996 Dec;55(6):1315-24.
- [106] Yu LZ, Xiong B, Gao WX, Wang CM, Zhong ZS, Huo LJ, Wang Q, Hou Y, Liu K, Liu XJ, Schatten H, Chen DY, Sun QY. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1;6(3):330-8.
- [107] Gotoh Y, Masuyama N, Dell K, Shirakabe K, Nishida E. Initiation of *Xenopus* oocyte maturation by activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25898-904.
- [108] Bodart JF, Gutierrez DV, Nebreda AR, Buckner BD, Resau JR, Duesbery NS. Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Dev Biol.* 2002 May 15;245(2):348-61.
- [109] Gross SD, Schwab MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Qian YW, Maller JL. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol.* 2000 Apr 20;10(8):430-8.
- [110] Kotani T, Yamashita M. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev Biol.* 2002 Dec 15;252(2):271-86.
- [111] Blossey R, Russo C, Bodart JF *Modularity within the MAPK Cascade Network*, in *Onogene Proteins :new research*, Edts Malloy AH and Carson EC.
- [112] Blair DG, Oskarsson M, McClements WL, Vande Woude GF. The long terminal repeat of Moloney sarcoma provirus enhances transformation. *Haematol Blood Transfus.* 1981;26:460-6.
- [113] Blair DG, Oskarsson MK, Seth A, Dunn KJ, Dean M, Zweig M, Tainsky MA, Vande Woude GF. Analysis of the transforming potential of the human homolog of mos. *Cell.* 1986 Aug 29;46(5):785-94.
- [114] Yew N, Oskarsson M, Daar I, Blair DG, Vande Woude GF. mos gene transforming efficiencies correlate with oocyte maturation and cytostatic factor activities. *Mol Cell Biol.* 1991 Feb;11(2):604-10.

-
- [115] Brown RL, Horn JP, Wible L, Arlinghaus RB, Brinkley BR. Sequence of events in the transformation process in cells infected with a temperature-sensitive transformation mutant of Moloney murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Sep;78(9):5593-7.
- [116] Fukasawa K, Rulong S, Resau J, Pinto da Silva P, Woude GF. Overexpression of mos oncogene product in Swiss 3T3 cells induces apoptosis preferentially during S-phase. *Oncogene*. 1995 Jan 5;10(1):1-8.
- [117] Fischinger PJ, Haapala DK. Quantitative interactions of feline leukaemia virus and its pseudotype of murine sarcoma virus in cat cells: requirement for DNA synthesis. *J Gen Virol*. 1971 Nov;13(2):203-14.
- [118] Papkoff J, Nigg EA, Hunter T. The transforming protein of Moloney murine sarcoma virus is a soluble cytoplasmic protein. *Cell*. 1983 May;33(1):161-72.
- [119] Steffen M, Scherdin U, Vértés I, Boecker W, Dietel M, Hölzel F. Karyotype instability and altered differentiation of rat sarcoma cells after retroviral infection. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992 Jan;4(1):46-57.
- [120] Perk K, Moloney JB. Pathogenesis of a virus-induced rhabdomyosarcoma in mice. *J Natl Cancer Inst*. 1966 Nov;37(5):581-99.
- [121] Zhou RP, Oskarsson M, Paules RS, Schulz N, Cleveland D, Vande Woude GF. Ability of the c-mos product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science*. 1991 Feb 8;251(4994):671-5.
- [122] Bai W, Singh B, Yang Y, Ramagli LS, Nash M, Herzog NK, Arlinghaus RB. The physical interactions between p37env-mos and tubulin structures. *Oncogene*. 1992 Mar;7(3):493-500.
- [123] Wang XM, Yew N, Peloquin JG, Vande Woude GF, Borisy GG. Mos oncogene product associates with kinetochores in mammalian somatic cells and disrupts mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8329-33.
- [124] Fukasawa K, Vande Woude GF. Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol*. 1997 Jan;17(1):506-18.
- [125] Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1744-7.

- [126] Carder P, Wyllie AH, Purdie CA, Morris RG, White S, Piris J, Bird CC. Stabilised p53 facilitates aneuploid clonal divergence in colorectal cancer. *Oncogene*. 1993 May;8(5):1397-401.
- [127] Donehower LA. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin Cancer Biol*. 1996 Oct;7(5):269-78.
- [128] Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):923-35.
- [129] Martínez-Cruz AB, Santos M, García-Escudero R, Moral M, Segrelles C, Lorz C, Saiz C, Buitrago-Pérez A, Costa C, Paramio JM. Spontaneous tumor formation in Trp53-deficient epidermis mediated by chromosomal instability and inflammation. *Anticancer Res*. 2009 Aug;29(8):3035-42.
- [130] Fukasawa K, Murakami MS, Blair DG, Kuriyama R, Hunt T, Fischinger P, Vande Woude GF. Similarities between somatic cells overexpressing the mos oncogene and oocytes during meiotic interphase. *Cell Growth Differ*. 1994 Oct;5(10):1093-103.
- [131] Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*. 1994 Aug 12;265(5174):966-70.
- [132] Okazaki K, Sagata N. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J*. 1995 Oct 16;14(20):5048-59.
- [133] Okazaki K, Sagata N. MAP kinase activation is essential for oncogenic transformation of NIH3T3 cells by Mos. *Oncogene*. 1995 Mar 16;10(6):1149-57.
- [134] Potapova TA, Daum JR, Pittman BD, Hudson JR, Jones TN, Satinover DL, Stukenberg PT, Gorbsky GJ. The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature*. 2006 Apr 13;440(7086):954-8.
- [135] Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod*. 1995 Sep;53(3):692-9.
- [136] Moos J, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS. Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. *Dev Biol*. 1996 May 1;175(2):358-61.

-
- [137] Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Géraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*. 1996 Mar;122(3):815-22.
- [138] Dumollard R, Levasseur M, Hebras C, Huitorel P, Carroll M, Chambon JP, McDougall A. Mos limits the number of meiotic divisions in urochordate eggs. *Development*. 2011 Mar;138(5):885-95.
- [139] Kalejs M, Ivanov A, Plakhins G, Cragg MS, Emzinsh D, Illidge TM, Erenpreisa J. Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe. *BMC Cancer*. 2006 Jan 9;6:6.
- [140] Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene*. 1999 Mar 18;18(11):1935-44.
- [141] Castedo M, Ferri K, Roumier T, Métivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods*. 2002 Jul 1;265(1-2):39-47.
- [142] Senovilla L, Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Joza N, Younes AB, Rello-Varona S, Castedo M, Kroemer G. p53 represses the polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. *Cell Cycle*. 2009 May 1;8(9):1380-5.
- [143] Gorgoulis VG, Zacharatos P, Mariatos G, Liloglou T, Kokotas S, Kastrinakis N, Kotsinas A, Athanasiou A, Foukas P, Zoumpourlis V, Kletsas D, Ikonomopoulos J, Asimacopoulos PJ, Kittas C, Field JK. Deregulated expression of c-mos in non-small cell lung carcinomas: relationship with p53 status, genomic instability, and tumor kinetics. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):538-49.
- [144] Vitale I, Senovilla L, Jemaà M, Michaud M, Galluzzi L, Kepp O, Nanty L, Criollo A, Rello-Varona S, Manic G, Métivier D, Vivet S, Tajeddine N, Joza N, Valent A, Castedo M, Kroemer G. Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *EMBO J*. 2010 Apr 7;29(7):1272-84.

Annexes

1. Macro ImageJ pour l'analyse des ratios YFP/CFP sur des expériences de time lapse en videomicroscopie

Une macro ImageJ est un programme informatique qui permet d'automatiser une série de commandes disponibles dans le logiciel ImageJ.

Cette macro nécessite l'installation des plugins suivants :

- WaitForUser (source : <http://www.mri.cnrs.fr/index.php?m=62&c=71>)
- RatioPlus (source : <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/ratio-plus.html>)
- Nucmed (source : http://www.med.harvard.edu/jpnm/ij/plugins/NucMed_Image_LUTs.html)
- MultiStackReg1.45 (source : http://robertcudmore.org/software/bAlignBatch_v3.html)

```
rename("image1");
run("Split Channels");
//fermer l'image de transmission
selectWindow("C3-image1");
close();
// selection de la region d'interet et soustraction du bruit de fond
run("ROI Manager...");
selectWindow("C2-image1");
waitForUser("ROI", "Avez-vous defini votre ROI?");
roiManager("Select", 0);
selectWindow("C1-image1");
roiManager("Select", 0);
run("Crop");
run("Subtract Background...", "rolling=100 stack");
selectWindow("C2-image1");
run("Crop");
run("Subtract Background...", "rolling=100 stack");
// realigner les des deux canaux
run("MultiStackReg", "stack_1=C1-image1 action_1=[Use as Reference] file_1=[]
stack_2=C2-image1 action_2=[Align to First Stack] file_2=[] transformation=[Rigid Body]");
// conversion 32bit et filtre median radius 1
run("32-bit");
run("Smooth", "stack");
selectWindow("C1-image1");
run("32-bit");
run("Smooth", "stack");
// definir l'image YFP qui presente la plus forte valeur d'intensite
selectWindow("C2-image1");
run("Measure Stack");
```

```
run("Summarize");
waitForUser("max du max", "trouver la slice avec le max intensity");
x=getNumber("slicemax", 1);
setSlice(x);
IJ.deleteRows(0, 2000);
//Appliquer un seuil et convertir le fond en NaN
run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
waitForUser("Threshold", "d?finir le threshold et click OK");
run("NaN Background", "stack");
// Calculer le ratio
run("Ratio Plus", "image1=C2-image1 image2=C1-image1 background1=0
clipping_value1=0 background2=0 clipping_value2=0 multiplication=1");
run("Measure Stack");
run("Lookup Tables", "resource=Lookup_Tables/ lut=[Blue Green Red]");
run("Measure")
```

2. Macro ImageJ pour l'analyse des ratios YFP/CFP des expériences de microscopie confocale

Cette macro nécessite l'installation des plugins suivants :

- WaitForUser (source : <http://www.mri.cnrs.fr/index.php?m=62&c=71>)
- RatioPlus (source : <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/ratio-plus.html>)
- Nucmed (source : http://www.med.harvard.edu/jpnm/ij/plugins/NucMed_Image_LUTs.html)
- MultiStackReg1.45 (source : http://robertcudmore.org/software/bAlignBatch_v3.html)

```
rename("image1");
run("Stack to Images");
selectWindow("image1-0002");
run("Yellow");
selectWindow("image1-0001");
run("Cyan");
selectWindow("image1-0001");
// soustraction du bruit de fond (cette étape peut également être réalisée manuellement)
run("Subtract Background...", "rolling=200 stack");
selectWindow("image1-0002");
run("Subtract Background...", "rolling=200 stack");
// réaligement des canaux
run("MultiStackReg", "stack_1=image1-0001 action_1=[Use as Reference] file_1=[] stack_2=image1-0002 action_2=[Align to First Stack] file_2=[] transformation=[Rigid Body]");
//conversion 32 bit et filter median radius 2
run("32-bit");
run("Median...", "radius=2");
```



```
selectWindow("image1-0001");
run("32-bit");
run("Median...", "radius=2");
selectWindow("image1-0002");
// appliquer un seuil sur l'image YFP
run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
waitForUser("Threshold", "définir le threshold et click OK!");
run("NaN Background", "stack");
//calculer le ratio
run("Ratio Plus", "image1=image1-0002 image2=image1-0001 background1=0 clipping_value1=0
background2=0 clipping_value2=0 multiplication=1");
//appliquer une échelle de couleur
run("Lookup Tables", "resource=Lookup_Tables/ lut=[Blue Green Red]");
run("Brightness/Contrast...");
```

3. Macro ImageJ pour l'analyse des ratios YFP/CFP sur des expériences de mesure de FRET en bactérie

Cette macro fonctionne sous Fiji et nécessite uniquement l'installation du plugin suivant :

- WaitForUser (source : <http://www.mri.cnrs.fr/index.php?m=62&c=71>)

```
// Ouvrir une image
//Renommer les images: attention l'ordre d'acquisition doit être DIC, YFP, FRET puis CFP
rename("image1");
run("Split Channels");
selectWindow("C3-image1");
rename("b.tif");
selectWindow("C2-image1");
rename("a.tif");
selectWindow("C4-image1");
rename("c.tif");
selectWindow("C1-image1");
close();
// Définir une région d'intérêt puis cliquer sur Add dans le ROI manager
run("ROI Manager...");
waitForUser("ROI", "Define a ROI and then click Add");
selectWindow("b");
roiManager("Deselect");
roiManager("Select", 0);
selectWindow("a");
roiManager("Deselect");
roiManager("Select", 0);
selectWindow("c");
```

```
roiManager("Deselect");
roiManager("Select", 0);
run("Crop");
selectWindow("a");
run("Crop");
selectWindow("b");
run("Crop");
// conversion 32 bit et filtre médian radius 1 pour tous les canaux
selectWindow("a");
run("32-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Smooth");
selectWindow("c");
run("32-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Smooth");
selectWindow("b");
run("32-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Smooth");
// réaligner les canaux
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
run("StackReg", "transformation=[Rigid Body]");
run("Stack to Images");
// Appliquer un seuil sur chaque image, le seuil pour les canaux CFP et FRET et automatique, celui de
la YFP est réalisé manuellement
run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
waitForUser("Threshold", "définir le threshold et click OK!");
run("NaN Background");
selectWindow("b");
setAutoThreshold("Li dark");
run("NaN Background");
selectWindow("c");
setAutoThreshold("Li dark");
run("NaN Background");
// Pour calculer les coefficients de compensation spectrale on peut arrêter la macro ici et mesurer
l'intensité des différents champs. Pour le coefficient du donneur D= intensité canal b/ intensité canal
c. Pour le coefficient de l'accepteur A= intensité canal b/ intensité canal a.
//c est ensuite multiplié par D et a est multiplié par A dans le calcul suivant  $1 + (b - c * D - a * A) / a$ 
selectWindow("c");
run("Multiply...", "value=1.04");
selectWindow("a");
run("Duplicate...", "title=a-1");
selectWindow("a-1");
run("Multiply...", "value=0.78");
imageCalculator("Subtract create 32-bit", "b", "c");
selectWindow("Result of b");
imageCalculator("Subtract create 32-bit", "Result of b", "a-1");
selectWindow("Result of Result of b");
imageCalculator("Divide create 32-bit", "Result of Result of b", "a");
selectWindow("Result of Result of Result of b");
```

```
run("Add...", "value=1");  
//ensuite pour afficher les images avec l'échelle de couleur approprié  
setMinAndMax(0, 1.5);  
run("Fire");
```

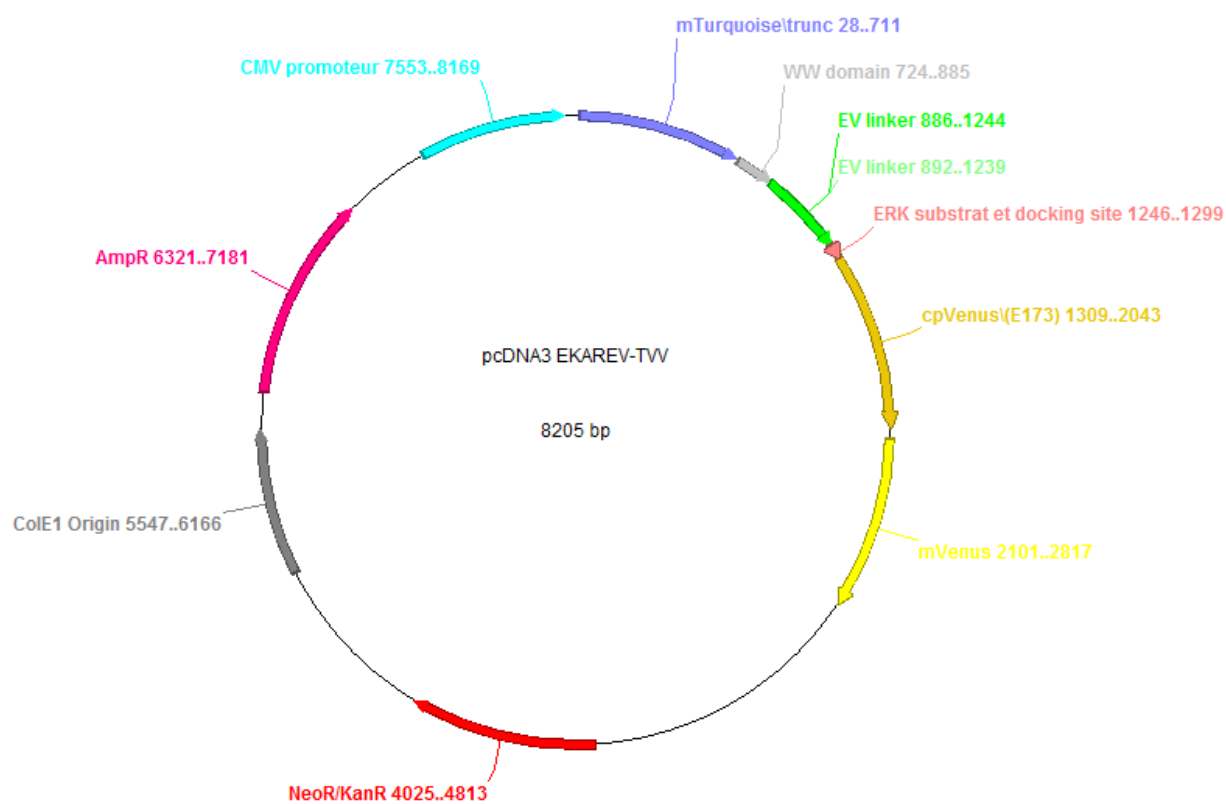
4. Carte du plasmide pCAGGS-AKAREV



Le plasmide pCAGGS provient de l'étude suivante : (Niwa et al., 1991).

Le promoteur CAG est une construction qui fusionne la séquence « enhancer » du promoteur du Cytomégalo virus (CMV) fusionné au promoteur de la β -actine du poulet.

5. Carte du plasmide pcDNA3 EKAREV-TVV



6. Carte du plasmide pcDNA3 EKAR-TVV

