



Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille – Université de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Sciences du médicament

Présentée et soutenue publiquement par

Béatrice COLIN

Le 27 septembre 2018

Développement d'un système rapporteur générique sensible, au double mode de lecture BRET/HCS pour l'étude du suivi de gènes rapporteurs, de l'activité de protéase virale, et des interactions protéine-protéine

Jury

Dr Ralf Jockers	Université de Paris	Rapporteur
Dr Angélique Levoye	Université de Paris	Rapporteur
Dr Laurent Heliot	Université de Lille	Examinateur
Pr Tarik Issad	Université de Paris	Examinateur
Pr Anne Muhr-Tailleux	Université de Lille	Examinatrice
Dr Cyril Couturier	Université de Lille	Directeur de thèse



Laboratoire Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants
INSERM U1177 - Institut Pasteur de Lille – Université de Lille
1, rue du Pr Calmette - 59000 Lille Cedex

Résumé

Développement d'un système rapporteur générique sensible, au double mode de lecture BRET/HCS, pour l'étude du suivi de gènes rapporteurs, de l'activité de protéases virales et des interactions protéine-protéine

De nombreux systèmes rapporteurs ont été développés pour répondre à différentes applications allant de l'étude des régions promotrices gouvernant l'expression de gènes au suivi de voies de signalisation ou encore à l'interaction de partenaires protéiques.

Dans le but initial de développer un test d'activité protéase ayant une sensibilité accrue, nous avons mis au point un système rapporteur permettant l'amplification du signal en développant un système basé sur l'utilisation d'une enzyme relais hyperactive, la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) qui vient couper une sonde protéique cible. La détection du signal se fait par deux modes de lecture compatibles avec le haut débit et conduit à un signal de type ON/OFF. Le transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET), permet de mesurer un signal à l'état basal, qui diminuera après clivage de la sonde par la protéase TEV. La microscopie de fluorescence à haut contenu ou HCS (High Content Screening) permettra d'observer le changement de localisation de la fluorescence de l'accepteur fluorescent de la sonde utilisée dans le transfert d'énergie, du noyau vers le cytoplasme des cellules, différenciant ainsi les cellules positives des négatives.

Ainsi, la grande sensibilité de notre système nous a amené à valider son utilisation de façon générique, en optimisant dans un premier temps la sonde BRET/HCS à la base du test par une série de délétions dans le but d'obtenir le meilleur transfert d'énergie possible, en délétant des acides aminés à l'extrémité C-terminale de l'accepteur et N-terminale du donneur d'énergie. Le contraste entre les deux états a également été amélioré afin de faciliter la lecture en HCS, en testant différentes séquences de localisation nucléaire. Grâce à cette nouvelle sonde, plusieurs preuves de concept dans des domaines variés ont pu être démontrées telles que i) le suivi de l'infection virale avec pour modèle l'infection par le virus de l'Hépatite C (HCV) ii) le suivi de l'expression de gènes rapporteurs avec comme modèle le récepteur TGR5 couplé aux protéines G, impliqué dans le diabète ainsi que iii) la détection d'interactions protéine/protéine avec pour modèle de développement l'interaction entre les protéines FRB et FKBP12 induite par la rapamycine. Les résultats réunis lors de cette thèse ont permis le développement d'un nouveau système rapporteur d'une sensibilité accrue utilisable dans différentes applications biologiques.

Mots-clés: BRET; HCS; protéase TEV; infection virale; gène rapporteur; interaction protéine-protéine.

Summary

Development of a sensitive generic reporter system, BRET/HCS dual-reading mode for gene reporter tracking, viral infection and protein-protein interaction monitoring

Several reporter systems have been developed in order to support fundamental scientific projects, from gene promoter regulation study, signaling pathway activation, or protein/protein interaction monitoring.

In order to enhance the sensitivity of a protease assay, we developed a new reporter system allowing signal amplification by optimizing a system based on the use of a hyperactive relay enzyme from Tobacco Etch Virus (TEV protease). The signal is detected by two methods compatible with high-throughput and leads to an ON/OFF signal. The Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) allows us to measure a signal at basal state, which will decrease upon cleavage of the probe by the protease. High Content Screening (HCS) Microscopy also allows the differentiation between positive and negative cells by a simple shift in the fluorescence acceptor location of the probe used in energy transfer, from the nucleus to the cytoplasm of the cells.

The high sensitivity of our approach now leads us to validate its use in a more generic way. This is why the project aimed at the optimization of the BRET probe at the origin of the test, by performing a serie of amino acid deletions at the N-terminus of the energy donor and the C-terminus of the energy acceptor to find the best probe in order to obtain the best energy transfer. The HCS contrast between the two states was also increased by testing different nuclear localization sequences. With this new probe, we tried to adapt the system to several fields of application like i) a viral infection test using the HCV protease as a proof of concept but also ii) the expression of a reporter gene with the TGR5, a G-coupled protein receptor as model and iii) the detection of protein-protein interactions. To demonstrate this concept, we used the well know interaction between FRB and FKBP12 proteins, induced by rapamycin. Results from this project will lead to the development of a new reporter system, auto-amplified and usable in a generic way, which a very high sensitivity is necessary.

Keywords: *BRET; HCS; TEV protease; viral infection ; reporter gene ; protein-protein interaction.*

« La persévérance est ce qui rend
l'impossible possible, le possible probable
& le probable réalisé »

Robert Half

« Ce qui compte, c'est le moral, la volonté, le but.
On ne grimpe pas avec ses cuisses et ses bras.
On grimpe avec ses tripes »

Mike Horn

A la mémoire de mon père Jean-Michel Colin

Préambule

Les travaux présentés dans cette thèse sont encore confidentiels à l'heure actuelle. Ainsi, la diffusion de ce document est limitée aux rapporteurs de cette thèse et la consultation par toute autre personne est soumise à l'autorisation du laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*, unité INSERM U1177.

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe du Professeur Benoit Deprez, au laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*, unité INSERM U1177.

Je tiens à remercier les trois tutelles du laboratoire : l'Université de Lille, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et l'Institut Pasteur de Lille, ainsi que la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques pour leur soutien logistique et financier. Je tiens également à remercier le Pôle de Recherche Interdisciplinaire pour le Médicament (PRIM) et la Société Accélétratrice du Transfert des Technologies (SATT) Nord pour le financement du projet, et enfin l'Université de Lille et le Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais pour le financement de cette thèse.

Les travaux exposés dans ce manuscrit ont été effectués au sein du laboratoire INSERM U1177. Cette thèse a été encadrée par le Docteur Cyril Couturier, du 1^{er} Octobre 2015 au 30 Septembre 2018, et financée par l'Université de Lille et le conseil régional de la région Nord Pas de Calais et l'INSERM. Les avancés sur les projets de recherche exposés dans cette thèse ont été possibles grâce à la tutelle de l'Université Lille, de l'INSERM et de l'Institut Pasteur de Lille. La tutelle pédagogique a été organisée par l'école doctorale Biologie Santé de Lille.

Remerciements

Monsieur Ralf Jockers

Je suis très honorée de l'intérêt que vous avez porté à ces travaux, notamment lors de mes deux comités de suivi, mais aussi en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. Veuillez recevoir toute ma gratitude.

Madame Angélique Levoye

Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse mais aussi d'être rapporteur de ce travail. Je vous en remercie grandement. Merci pour vos conseils avisés.

Monsieur Laurent Heliot

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger cette thèse mais aussi pour votre suivi et vos commentaires constructifs sur le projet lors de mes comités de suivi. Je vous en remercie sincèrement.

Monsieur Tarik Issad

Je vous adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger cette thèse.

Madame Anne Tailleux

Après avoir été dans mon jury lors du « grand jury » d'attribution des bourses de thèse, vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous en remercie sincèrement.

Monsieur Cyril Couturier

Je vous exprime toute ma gratitude et vous suis extrêmement reconnaissante pour l'encadrement et le soutien que vous m'avez apportés tout au long de ces années. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Que vous soyez proches ou loin, j'ai cette chance d'être extraordinairement entourée et j'ai eu l'occasion lors de ces trois années de rencontrer des personnes exceptionnelles qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Car la thèse est un travail de longue haleine, un marathon quotidien, mais celui-ci ne se court pas tout seul. Alors je vais essayer de remercier toutes ces personnes en bord de route qui vous tendent simplement la main, vous encouragent qu'il pleuve, qu'il vente, qu'il neige, et même quand tout va bien... Toutes ces personnes qui ont été présentes et qui ont aidé de près comme de loin à la concrétisation de ce beau projet.

A Benoit Deprez, Directeur du laboratoire, merci de m'avoir accueillie pour la première fois il y a 8 ans. L'adolescente de 18 ans que j'étais n'aurait jamais pensé être capable d'en arriver là un jour, mais ce fut une des expériences les plus enrichissantes de mon existence. Merci pour vos précieux conseils et les quelques discussions scientifiques que nous avons échangées lors de cette thèse ; elles ont toujours été bénéfiques et très constructives.

A Cyril, mon Directeur de thèse, « Doc », « Coach », « Chef manouche » et maintenant « Papa Couturier », sans qui rien de tout cela n'aurait été possible... Merci d'avoir cru en moi il y a 8 ans et de croire encore en moi. Tu es allé sans relâche chercher le meilleur de moi-même en me testant au quotidien. Je t'ai tendu la main et tu m'as pris le bras. Sans cesse, tu m'as fait dépasser mes limites, à la paillasse comme en course à pieds, en m'incitant à aller voir plus loin que le bout de mon nez... Peu de personnes avaient misé sur ce binôme, mais j'ai énormément appris à tes côtés et je sors grandie de cette aventure scientifique et humaine. Merci pour ce partage et cette transmission de connaissances, j'essaierai de passer le relais de la meilleure façon possible, (avec ma logique implacable, oui)!

A mon équipe pédagogique, Elisabeth, Marie-Françoise, Josette, Benoit, Ariane, merci pour toutes ces séances de travaux pratiques. Trois années passées à vos côtés, à enseigner la bactériologie à nos étudiants dans la bonne humeur! Ce fut une expérience extrêmement enrichissante et j'en garderai un très bon souvenir. J'espère pouvoir continuer à enseigner dans le futur car vous avez su me donner goût à ce métier. Un grand merci à Elisabeth, ma tutrice pédagogique, pour ta disponibilité et tes conseils, toujours prête à me guider! Promis, la sportive en carton que je suis, essaiera de ne plus se blesser ! Ariane, petite dernière, merci pour ta bonne humeur et cette dernière année de TP, Dommage que nous n'ayons pas été plus souvent ensemble mais merci d'avoir partagé cette expérience avec moi.

A ma Bret Dream Team. Vous avez été d'une aide précieuse et d'un soutien incroyable dans l'avancée de ce projet. Merci pour votre persévérance à toute épreuve, votre acharnement à la paillasse et toutes vos heures sup', mais aussi à ces quelques oublis de bactéries du dimanche soir... Alice (ma première binôme de thèse) & Anne-Laure (dite Lucette, Lucienne, la Grosse ou notre pièce rapportée préférée, c'est toi qui vois), vous m'avez permis de commencer ma thèse dans la joie et la bonne humeur. Que ce soit au labo ou en dehors, à cracher nos poumons ou pancakes au lac du Héron, à apprendre l'amertume à Lucette, à empêcher Alice de chanter dans son « saucisson » ou encore à comprendre le pourquoi de « rouler sur un chien à vélo » et à tous

ces « midis cagibi ». Merci d'être présentes dans ma vie au fil des années qui passent. Déjà 3 ans! Lille, Compi, Coïmbra, Bordeaux, Paris et j'en passe... quand et où vous voulez mes Lucettes. Tine, comme Alice, merci pour ce que tu as accompli sur le projet. Merci pour ta bonne humeur, ta grande classe naturelle (star de Pasteur encore 3 ans après!), ton calme et ta politesse à toute épreuve. Tous ces midis à manger des sandwichs et ton premier « Merde » quand tu as fait tomber ton premier gel. Quand tu veux à Gent ou ailleurs. Tuyu, petite dernière à avoir intégré l'équipe. Malgré ton caractère de têtue et ton incroyable maniaquerie malade « niak niak », tu as su faire décoller le projet comme Alice & Tine et je t'en remercie, cette aide fut précieuse. Super nounou est fière de son jeune Padawan. Manon, pièce semi-rapportée de la Bret Team, merci pour ton aide lors de ton stage de formation au clonage. Vivement le prochain barbecue ou repas de Noël annuel, maintenant que nous avons des jumelles à ajouter à cette brochette de filles. La bise à Léo & Aurélien, parce qu'on a quand même bien ri tous ensemble... A ce raté d'Escape game, à toutes ces soirées à Saint Maurice ou ailleurs et surtout à ce mystère non résolu de la soirée dés.

A mes co-thésards passés comme présents. Manuel, Hugues, je vous ai malheureusement peu connu, mais un grand merci pour l'aide que vous m'avez apportée lors de la préparation de ce projet ; il faut croire que si j'écris ces quelques lignes aujourd'hui, c'est que cela a porté ses fruits. Paul, Vanessa, si la fac n'avait pas été aussi loin, nous aurions peut-être eu plus d'occasion de discuter ; mais j'ai toujours apprécié les moments que nous avons passés ensemble. Marion, ma réelle co-thésarde, merci pour ces moments de partage, notamment en fin de thèse et ce soutien rédactionnel. Merci pour la colocation aux Journées Jeunes Chercheurs qui fut un grand moment. « Miss Tun » te salue! Léo, élu meilleur pipelet, merci pour tous ces moments de blabla, et surtout pendant cette fin de thèse avec « une image drôle par jour », quand tu veux pour trinquer autour d'un verre de Beaujolais nouveau (ou pas) ou tout simplement une bonne bière pas trop amère. Marine & Laëtitia, merci de m'avoir rejoint parmi les thésardes biologistes, je me sentais un peu seule. Merci pour votre disponibilité, ces midis, votre bonne humeur quotidienne, nos moments pipelette ou coups de gueule, toutes ces petites choses du quotidien que l'on oublie mais qui font du bien au moral. Ne changez rien. Et si vous avez un coup de mou pendant le reste de votre thèse, comptez sur moi, même de loin, pour vous rebooster et vous faire sourire, « Superthésardes »! Le plus important est de toujours croire en vous et en votre beau projet et de ne jamais rien lâcher. On se bat jusqu'au bout! A vous tous, je vous souhaite le meilleur pour la suite et quand vous voulez à Lille, ou autour du monde, qui sait où le vent nous portera.

A mes collègues des tous débuts, Julie & Val, merci pour votre bonne humeur quotidienne et les déboîtes que vous sortez à la pelle, j'ai toujours énormément ri à vos côtés et je vous remerciais déjà pour cela il y a 8 ans. Comme quoi, certaines choses ne changent pas, on prend juste un coup de vieux! Mais si c'est comme le vin, on est sur la bonne voie. Comptez-sur moi pour trinquer à nos 10 ans, ou pour partager un café, tout a commencé là et finira là! A mes Apteeus fitboys, Loïc & Simon. Simon, 91 power, merci d'avoir amené joie et vie dans le labo, pour tous ces moments gâteaux et ces bouteilles de Surfanios remplies! Et surtout n'oublie jamais :

l'Humain avant tout! Loïc, dire que je passais mon temps à te racketter du jetPei avant ma thèse et maintenant nous avons les jumeaux... Que de rebondissements en trois ans... Part serein, ils n'auront jamais faim, il y aura toujours beaucoup trop de Tupperware au congel'!

Un grand merci à tous les membres du laboratoire que vous soyez biologistes : Florence, Morgane, Adrien, Sandrine... ou chimistes : Maryline, Julie, Rebecca, Vy, Geoffroy, Ronan, Valentin, Virgile, Mélissa, Xiao, Quentin, Alexandre, Céline, Damien, Nicolas... ou d'Apteeus, Térance, Camille, Isabelle... mais aussi Nathalie... et ceux que j'oublie... Vous avez fait partie de ma grande aventure à votre manière et j'ai apprécié échanger avec chacun de vous sur de nombreux sujets. Je n'oublie pas non plus tous les stagiaires ; certains auront marqué les esprits : Fanny ne change rien, tu es un personnage à part entière et ces 6 mois à tes côtés furent plus que ressourçant, ne lâche rien, ta détermination te mènera loin et ta bonne humeur en motivera plus d'un ; Aurélie, pour ton amour partagé de la Finlande, des voyages et ton retour parmi nous... Ainsi que tous les stagiaires que j'ai pu encadrer ces trois dernières années, car il y en aura eu! Même si je n'ai pas toujours été tendre avec vous, merci pour votre aide...

Mention spéciale à Marion, merci pour ces quelques moments à la paillasse à l'Institut Pasteur, ces quelques cafés, ces moments détentes et ces petits coups de gueule. A ton super fauteuil de thèse, qui m'aura permis d'être bien assise pendant une bonne partie de ma rédac'! Merci pour ta bonne humeur et compte sur moi, quand tout sera fini, pour te faire signe dès que je repasserai par le labo ou à Lille, pour un moment café, footing ou tout simplement brushing, car on ne sort jamais sans son sèche-cheveux!

A Baptiste, merci d'être venu me chercher dans mon coin à Pasteur, merci d'être devenu un ami sur qui compter, à toutes ces bouffes, à ces soirées, à ces quelques cours de chimie qui ne sont définitivement pas faits pour moi... mais surtout merci pour ces rencontres incroyables. Nico, Sophie, Mélanie, Katherine, César, Rosangela, Kamel... A tous ces diners partagés, ces mojitos, ces soirées vins et j'en passe. Nico, merci pour tout, de tes 30 ans à nos footings blabla à la Citadelle, au mariage de Kathe... Il ne me manquait plus qu'un grand frère pour compléter mon palmarès, et c'est chose faite. Frérot quand tu veux pour un titi! Sophie, « ma meuf » et tous nos points communs. Un immense merci pour tous ces cafés, soirées soupes ou verres de vin. Je n'oublierai jamais le soir de notre rencontre, à rentrer en Vlille sous le chant des oiseaux au petit matin. Merci d'être entrée dans ma vie, tu as été un énorme soutien en cette fin de thèse. Je sais que tu ne fais pas encore partie de mes « plus de 10 », mais que tu le deviendras, j'en suis certaine. Hâte de m'envoler vers Cuba avec toi!

Mention spéciale à toutes mes Catherine, d'une gentillesse infinie et toutes aussi incroyables les unes que les autres. Un immense (et le mot est faible) merci à Catherine P, tu es un véritable soutien au quotidien, toujours prête à aider, à rassurer, que ce soit avec du chocolat ou avec un prêt de vélo. Merci d'avoir veillé et pris soin de moi pendant cette thèse. Si j'avais été un peu plus chimiste, sache que j'aurais adoré travailler avec toi (n'hésite pas à me

former à l'ADME, je suis prête à m'adapter). Ne change rien, tu as un cœur en or! A ma marraine, Catherine B, tu ne t'en rappelles peut-être plus, mais j'espère que oui quand même, merci de m'avoir poussé dans cette voie il y a 9 ans... Je sais qu'aujourd'hui tu partages la même fierté que celle qu'aurait eue mon père. A ma « cousine allemande », Kathrin, merci pour ces moments depuis le début. Lille, Freiburg et Nantes, je suis contente de t'avoir retrouvée pendant ma thèse, même si avec toutes ces heures passées au téléphone, on ne peut pas vraiment dire que l'on se soit perdues de vue un jour. Merci pour ton rire communicatif, ta bonne humeur inaltérable et ton amour pour le fromage. Prochaine étape Koblenz! And my last but not least Katherine, thanks for everything, but especially for the sound of your empty glass of wine and your amazing laugh. Thanks for your beautiful wedding; it was a special moment of my thesis. See you soon, in Malaga, Lille or everywhere for a mojito, some good food and a piece of cake! One day, with you & Sophie, I will open my own pastry and you will be my official taster « Comer, comer ».

A mes sportifs du dimanche, en carton ou quasi professionnels et tous vos challenges fous. Car la thèse est un marathon, mais il y en aura eu du sport pour éliminer la pression! On pourrait croire que c'est grâce ou à cause de Cyril que je me suis mise à courir, mais en réalité c'est avec mes Lucettes Alice & Anne-Laure que tout a commencé. Mes Apteus fitboys ont vite repris le mouvement avec certains midis running (dont un épique : partis à trois, revenu à un). Simon pour les quelques séances de muscu qui ont fait mal, Loïc et toutes tes réclamations de kudos sur Strava... Coach pour ces quelques entraînements, à essayer de me faire courir à 4'30 du kilomètre, et surtout à notre course annuelle de 5km! Sophie, Mélanie, Nico & Baptiste à tous ces entraînements à la Citadelle, été comme hiver, de jour comme de nuit, voire à la lumière frontale. Marion, pour ces quelques séances de pioupiou, qui n'auront pas duré longtemps mais cela restera quand même un très bon souvenir (et bien sûr que tu fais partie de notre fine équipe de runners)! Marine & Laetitia, je pense qu'on ne peut que remercier David Pollet pour ces séances de sport du jeudi midi et tous ces muscles endoloris en fin de semaine... Je compte sur vous pour continuer ces deux prochaines années, on ne lâche rien les filles! Sophie, pour ces séances de piscine où tu me mets 200m dans la vue... Mélanie, merci, pour ce gros challenge vélo de Lille-Hardelot dans lequel tu m'as embarquée et à tous nos entraînements épiques... Ces moments ont vraiment reboosté ma fin de thèse. Merci pour ta bonne humeur, ta motivation et ta détermination incroyable. Quand tu veux sur les routes et si cela est possible, on remet cela l'année prochaine ! Sophie & Baptiste, à notre premier triathlon, et à ce week-end fort en rebondissements... Cette thèse m'aura coûté deux fractures de fatigue mais ce n'est rien à côté des limites que vous m'avez fait dépasser. Tout a commencé sans même une paire de baskets et cela se termine avec un semi-marathon, un challenge vélo et un premier triathlon réussi. Il semblerait que « cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse ». Prochains objectifs : triathlon, semi et qui sait, un jour peut-être, un marathon!

A Dorine & Damien. Dorine, ce fut une immense surprise de te retrouver ici à Lille et notre première soirée lilloise en témoigne. A toutes ces bières partagées au Drugstore, à la Capsule, ces repas, ces sorties ciné, ces quelques concerts et ces retrouvailles avec

Arthur & Elie... Merci pour tout les copains!

A Margaux & Alex. Il s'en est passé des choses durant cette thèse! Dire qu'il n'y a pas si longtemps je dormais sur le sol de votre bureau à Lambersart... Depuis, vous êtes devenus Mari & Femme ; on détapissait le papier peint de votre chambre avant que Marine ne parte vivre en Alaska, et maintenant la maison est finie... Je suis heureuse d'avoir vécu à ma manière ces grandes avancées de votre vie et j'espère pouvoir continuer à le faire ces prochaines années!

A mes copains de fac que je n'ai vus que trop peu ces dernières années... Boris, mon « Litou », mon premier et unique Binôme! Merci pour tout car si je sais tenir une pipette aujourd'hui c'est quand même grâce à toi. Max, Léo & Thomas, « Tic & Tac ». Du BTS à la fac, qu'est-ce que vous m'avez fait rire... A tous ces instants mémorables mais surtout un énorme big up à tous ceux passés à la BU! Max, merci pour ces moments passés en début de thèse, je te souhaite énormément de réussite dans ton aventure canadienne et je suis certaine que tu deviendras un super Docteur. Thomas, je te souhaite aussi le meilleur pour ta fin de thèse... Accrochez-vous les copains! Si un jour l'idée vous prend de fonder Biotalsac faites-moi signe, et promis on aura, en plus du Canada, une filiale dans un pays chaud pour Léo et tous ses cousins...!

A mes « plus de 10 », Alisson & Arthur. J'ai eu la chance de vous rencontrer dans l'un des endroits les plus incroyables d'une vie et j'en aurais des anecdotes à raconter à vos sujets, mais ces remerciements seraient alors beaucoup trop longs! Merci de faire partie de ma vie depuis toutes ces années et le temps qui passe n'y change rien... Merci pour tous ces concerts aux quatre coins de la France (bientôt AF à Nantes), tous ces vinyles écoutés et ces week-ends toujours si dépaysants et ressourçants ! A tous ces moments entre Paris, Lyon, Lille (Drugstore versus Lakson, chacun son passage obligé), Gent, le Cap Blanc Nez, notre retour en terre Kerlouanaise et Charrues... J'en aurai parcouru des kilomètres à vos côtés et c'est loin d'être terminé... Merci d'être toujours présents et surtout n'oubliez jamais de faire attention aux barres rocheuses, un orage n'est jamais bien loin. La bise à Mathilde, qui, je l'espère, aura l'occasion de lire ces remerciements, car elle et moi sommes d'accord sur l'importance de ce que véhicule cette partie.

A Marine, « ma meilleure ». Il se trouve que tu as l'énorme privilège d'être ma plus vieille copine que je n'en compte plus les années... J'ai eu l'immense chance de commencer ma thèse en même temps que la tienne, même si tu as préféré désertier à Paris et puis littéralement à l'autre bout du monde au moment où je remettais les pieds à Lille! Un immense merci pour ces rares moments passés à Lille, du nouvel an aux sushis sur le balcon! Un de mes plus grands regrets durant cette thèse aura été de ne pas avoir pris le temps de venir te voir en Alaska... Je te souhaite de même énormément de courage pour ta fin de thèse, car il en faut un sacré paquet, mais je sais que tu réussiras avec brio mon archéologue préférée!

A Emilie, ma « Mimi », ma « Jumelle ». Merci de faire partie de ma vie depuis toutes ces années. Tu es un soutien incroyable et la distance n'y change rien. Depuis cette rencontre dans la verrière de Guist'hau, nous avons partagé des moments d'une richesse incroyable.

Toutes ces routes du monde parcourues ensemble sont ce qui m'a le plus manqué ces 3 dernières années. Mais cette thèse n'a rien détruit, le Canada, les Alpes et Copenhague resteront des souvenirs gravés à vie. Quand tu veux pour une longue marche, un challenge rando dans n'importe quel pays. Je suis prête à reprendre la route et les sacs à dos comme au bon vieux temps, car il est temps! Never stop exploring, always on the Road!

A ma famille, ma mère, mes sœurs Véro & Laure et mon frère Bruno. Merci pour les week-ends famille qui ont fait du bien entre Lille, Nantes, La Rochelle & les Canaries. Laure, ma « Sistou », merci pour ton soutien sans faille et ta disponibilité à toute épreuve. Tu es bien la seule personne que je peux appeler à toute heure du jour et de la nuit pour une question existentielle inutile. A tous ces moments partagés ensemble, et à tous ceux à venir, merci d'être présente dans ma vie tout simplement, tu en es un pilier essentiel. Merci de toujours croire en moi.

A mon père Jean-Michel dit JMC, qui n'aura jamais eu la chance de savoir que j'ai continué ma route à la fac mais qui aurait été fier de moi quoiqu'il arrive et particulièrement aujourd'hui... Je te dédie ce manuscrit, tu ne m'as jamais autant manqué que ces dernières années...

Table des matières

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	1
Publications	1
Communications orales en anglais	1
Posters.....	1
TABLE DES ABREVIATIONS	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
Figures.....	5
Tableaux.....	7
I INTRODUCTION GENERALE.....	11
I.1 Objectifs du projet.....	11
I.2 Méthodes de transfert d'énergie	13
I.2.a Transfert d'énergie par radicaux libres de l'oxygène (AlphaScreen)	14
I.2.b Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer	15
I.2.b.1 Origine et paramètres du FRET	15
I.2.b.2 Caractéristiques photophysiques des fluorophores	16
I.2.b.3 Détection du signal de FRET et limites	19
I.2.b.4 Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) ou TR-FRET.....	19
I.2.c Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)	21
I.2.c.1 Origine du BRET.....	21
I.2.c.2 Paramètres influençant le signal de BRET.....	22
I.2.c.2.i Propriétés spectrales	22
I.2.c.2.ii Distance et orientation relative des partenaires	23
I.2.c.2.iii Importance du rapport Accepteur / Donneur.....	24
I.2.c.3 Mesure du signal de BRET.....	25
I.2.c.4 Différentes versions de BRET et applications	27
I.2.c.4.i Systèmes de BRET utilisant la Renilla luciférase.....	29
I.2.c.4.ii Systèmes de BRET avec d'autres luciférase	31
I.2.c.4.iii Nano-BRET	32
I.2.c.4.iv Le système LuxBRET chez les bactéries.....	33
I.2.c.4.v Autres luciférase et accepteurs fluorescents	34
I.2.c.5 Nano-lanternes	34
I.2.c.6 Avantages du BRET	36
I.3 Systèmes rapporteurs.....	38
I.3.a Systèmes rapporteur basés sur l'activité enzymatique	39
I.3.a.1 Chloramphénicol acétyltransférase (CAT)	39
I.3.a.2 β -galactosidase et opéron lactose.....	39
I.3.a.3 β -glucuronidase et gène GUS	40
I.3.a.4 Systèmes rapporteurs bioluminescents.....	41
I.3.a.4.i Luciférase de type « Flash and Glo »	41
I.3.a.4.ii Tests à double rapporteurs luciférase	42
I.3.a.5 Systèmes rapporteurs avec protéines quantifiables directement.....	42

I.4 Tests d'activités protéase	45
I.4.a Protéases : Définition et classification	45
I.4.b Reconnaissance et spécificité du substrat	46
I.4.c Cibler et inhiber les protéases	47
I.4.d Développement de tests protéases	48
I.4.d.1 Essais développés en RET	49
I.4.d.1.i FRET et tests d'activité protéase	49
I.4.d.1.ii BRET et tests d'activité protéase	50
I.4.e TEV protéase.....	51
I.4.e.i Origine	51
I.4.e.ii Auto-clivage	52
I.4.e.iii Approche Split-TEV.....	53
I.5 Interactions protéine-protéine	55
I.5.a Co-immunoprecipitation.....	55
I.5.b Technique GST pull-down	56
I.5.c Interactions par complémentation (PCA)	57
I.5.d Système double (Y2H) et triple (Y3H) hybride chez la levure	60
I.5.e Systèmes triple-hybride en cellules de mammifères MAPPIT et MASPIT	61
I.5.f Techniques de FRET et de BRET	63
I.5.g Comparatif des principales méthodes de détection des PPI.....	64
I.6 Mise en place du projet	66
II RESULTATS	69
II.1 Développement et optimisation d'une sonde protéique en BRET et en HCS	69
II.1.a En BRET	69
II.1.a.i Validation de l'activité de la protéase TEV	69
II.1.a.ii Choix des partenaires de BRET	70
II.1.a.ii.1 Recherche du meilleur signal de BRET	70
II.1.a.ii.2 Délétions simples des accepteurs et du donneur d'énergie	72
II.1.a.ii.3 Délétions croisées des accepteurs et du donneur d'énergie	73
II.1.a.ii.4 Sélection de la sonde la plus sensible en réponse à la protéase TEV	75
II.1.a.iii Amplification du système par le BRET	76
II.1.a.iii.1 Rapport de BRET	76
II.1.a.iii.2 Différents filtres et rapports de BRET	77
II.1.a.iii.3 Remarques et perspectives	78
II.1.b Adaptation de la sonde au modèle HCS	79
II.1.b.i Principe du HCS	79
II.1.b.1 Choix des séquences d'export et/ou d'import nucléaire.....	79
II.1.b.2 Utilisation de la meilleure sonde BRET pour la double lecture BRET/HCS	82
II.1.b.3 Comparaison des paramètres BRET/HCS.....	83
II.2 Outils développés lors du projet	85
II.2.a Lignées cellulaires stables et système CRISPR/Cas9	85
II.2.a.i Choix des vecteurs	85
II.2.a.ii Réalisation des lignées et sélection	87
II.2.b Optimisation de la technique de transfection transitoire pour le haut-débit	88
II.3 Utilisation de la sonde pour différentes applications	98
II.3.a Déclenchement du système rapporteur par la protéase cible.....	98

II.3.a.i	Séparations subcellulaires de la sonde et de la protéase relai (TEVp).....	98
II.3.a.ii	Approche Split-TEV	100
II.4	Application : suivi de l'expression de gènes rapporteurs	103
II.4.a	Preuve de concept : modèle TGR5	103
II.4.a.i	Activation de la voie de signalisation de CRE par la forskoline	103
II.4.a.ii	Activation du récepteur par deux ligands spécifiques	104
II.4.b	Conclusions et perspectives	106
II.5	Application : suivi d'activité protéase	108
II.5.a	Preuve de concept : modèle HCV	108
II.5.a.i	Génération d'un vecteur bicistronique d'expression de la sonde et de l'effecteur	108
II.5.a.ii	Génération des mutants et choix de la sonde	109
II.5.a.iii	Conclusions et perspectives	111
II.5.b	Protéases cellulaires et preuve de concept.....	111
II.6	Application : interaction protéine-protéine.....	114
II.6.a	Preuve de concept : interactions FRB/FKBP	114
II.6.a.i	Choix des partenaires.....	114
II.6.a.ii	Approche « Linkers » et « Double TEV »	117
II.6.b	Conclusions et perspectives	119
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		123
III PARTIE EXPERIMENTALE		127
III.1	Clonages.....	127
III.1.a	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	127
III.1.b	Purification sur gel des produits de PCR.....	127
III.1.c	Mutagenèse dirigée	127
III.1.d	Transformation bactérienne.....	128
III.1.e	Criblage des colonies bactériennes.....	128
III.1.f	Culture de bactéries et extraction d'ADN plasmidique	129
III.1.g	Digestion des plasmides par des enzymes de restriction	130
III.1.h	Clonage par ligation.....	130
III.1.i	Dosage des acides nucléiques	131
III.1.j	Vérification des plasmides par séquençage	131
III.1.k	Logiciels utilisés.....	131
III.1.l	Liste des amorces utilisées	131
III.1.l.i	Application CRISPR/Cas9	131
III.1.l.ii	Application virus ZIKA.....	132
III.1.l.iii	Application Caspase3	132
III.1.l.iv	Application TEV / Split-TEV	132
III.1.l.v	Introduction de la séquence IRES	134
III.1.l.vi	tdTomato.....	135
III.1.l.vii	Constructions délétées YPet ; mVenus ; Rluc8 et amorces diverses	135
III.1.l.viii	Amorces diverses	136
III.1.m	Liste des constructions plasmidiques réalisées	136
III.2	Culture cellulaire.....	141
III.2.a	Entretien des lignées cellulaires HeLa et HEK.....	141
III.2.b	Transfections transitoires	141

III.2.c	Immunomarquage.....	142
III.2.d	Transfections stables et génération de lignées (Système CRISPR/Cas9)	143
III.3	Analyses statistiques.....	143
III.4	Techniques et modes de lecture.....	144
III.4.a	BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)	144
III.4.b	Microscopie à haut débit (INCell Analyzer 6000)	144
III.4.c	Transfection transitoire avec l'Echo550 (Labcyte)	144
III.4.c.i	Plasmides	145
III.4.c.ii	Extraction plasmidique.....	145
III.4.c.iii	Transfectants	145
III.4.c.iv	Echo550 transfection reverse.....	145
III.4.c.v	Culture cellulaire	146
III.4.c.vi	Fixation des cellules et stockage	146
III.4.c.vii	Acquisition et analyse d'images	146
III.5	Techniques d'analyse d'images.....	147
III.5.a	Logiciel ImageJ.....	147
III.5.a.i	Macro de visualisation des images.....	147
III.5.a.ii	Macro d'analyse des cellules marquées.....	148
III.5.a.iii	Macro d'analyse phénotypique	148
III.5.a.iv	Diagrammes informatiques des différentes macros d'analyse d'images	149
III.5.b	Logiciel Columbus	152
III.5.b.i	Détail du script d'analyse d'images des expériences d'optimisation de transfection à l'Echo	152
III.5.b.ii	Détail du script d'analyse d'images des expériences de co-transfection à l'Echo	153
III.5.b.iii	Détail du script d'analyse d'images du comptage des cellules marquées	155

Publications et communications

Publications

Béatrice Colin, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **High-throughput DNA plasmid transfection using acoustic droplet ejection technology**

SLAS Discovery – Application Note – Octobre 2018

Communications orales en anglais

Béatrice Colin, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **Validation of a new reporter system.** *Oral communication*, 17th André Verbert Day, Liliad Campus de la Cite Scientifique, Lille, France, September 14, 2017.

Posters

Béatrice Colin, Julie Charton, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **Validation of a high throughput reporter system.** *Flash Poster presentation*, 25th Young Research Fellows Meeting, University of Orléans, Orléans, France, March 5-7, 2018.

Béatrice Colin, Julie Charton, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **Validation of a high reporter system.** *Poster presentation*, Drug Discovery Day, Faculty of Pharmacy, Lille, France, December 7, 2017.

Béatrice Colin, Julie Charton, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **Validation of a high reporter system.** *Poster presentation*, 6th Annual Meeting of the GDR3545 G-protein coupled receptors from physiology to drugs, University René Descartes, Paris, France, November 8-10, 2017.

Béatrice Colin, Julie Charton, Benoit Deprez, Cyril Couturier. **Validation of a new amplified reporter system.** *Poster presentation*, 1st research day of the Pharmacy Faculty of Lille, Lille, France, July 10, 2017.

Table des abréviations

AAVS1	Adeno-Associated Virus Integration Site 1
ACE	Acétylcholinesterase
ADE	Acoustic Droplet Ejection
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AlphaScreen	Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNg	Acide Ribonucléique guide
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BALB/c	Laboratory-bred strain of the house mouse
BFP	Blue Fluorescent Protein / Protéine Fluorescente Bleue
BIFc	Biomolecular Fluorescence complementation
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
Ca²⁺	Calcium
Cas9	CRISPR associated protein 9 / protéine 9 associée à CRISPR
Caspase	Cysteine-Aspartic protease ou Cysteine-dependent aspartate-directed protease
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CFP	Cyan Fluorescent Protein / Protéine Fluorescente Cyan
ChikV	Chikungunya virus
CLZ	Cœlenterazine
CNL	Cyan Nanolantern
CO₂	Dioxyde de carbone
Co-IP	Co-immunoprecipitation
CRE	CREB Responsive Element
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cy3/Cy5	Cyanine3/Cyanine5
DFRAP	Donor Fluorescence Recovery After Acceptor Photobleaching
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	désoxyribonucléotides
DsRed	Discosoma Red
FKBP	FK506 Binding Protein
<i>Fluc</i>	<i>Firefly luciferase</i>
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRB	FKBP Rapamycin Binding domain
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
GAL4	Facteur de transcription (Famille galactose-induced genes)
GFP	Green Fluorescent Protein / Protéine Fluorescente Verte
<i>Gluc</i>	<i>Gaussia luciferase</i>

GP-BAR1	G protein coupled Bile Acid Receptor 1 (Autre nom, TGR5) G protein Bile Acid Activated Receptor 1
GST	Glutathione-S-Transferase
GUS	Glucuronidase
HCS	High Content Screening / Microscopie confocale automatisée à haut débit
HCV	Human Hepatitis C Virus / Virus de l'Hépatite C
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HeLa	Henrieta Lacks cells
HEV	Human Enterovirus
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HTRF	Homogenous Time Resolved Fluorescence
HTS	High Throughput Screening / Criblage à haut débit
Huh-7	Human Hepatoma cells
IPS1	Interferon Bêta Promotor Stimulator 1
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRES	Internal Ribosome Entry Site
JAK2	Janus Kinases 2
kDa	kilodalton
LC	Liquid Chromatography / Chromatographie Liquide
LuxAB	Luciferase bactérienne AB
Lyn	Lck/Yes Tyrosine Kinase
MAPPIT	Mammalian Protein-Protein Interaction Trap
MASPIT	Three-Hybrid Trap (adapté du système MAPPIT)
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NES	Nuclear Export Sequence
Nla	Protéine d'inclusion nucléaire
NLS	SV40 Nuclear Localization Sequence / Séquence de localisation nucléaire SV40
Nluc	<i>Nano luciferase</i>
O₂	Dioxygène
OB-R	Récepteur à la Leptine
ONL	Orange Nano-lantern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Protein Complementation Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reaction de Polymérisation en chaine
PEG	Polyéthylène glycol
PPI	Protein-Protein Interaction
PSA	Antigène Prostatique Spécifique
QDs	Quantum Dots
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RET	Resonance Energy Transfer / Transfert par Energie de Résonance
RFP	Red Fluorescent Protein / Protéine Fluorescente Rouge
Rluc	<i>Renilla luciferase</i>
Rluc8	Mutant de la <i>Renilla luciferase</i>
SERS	Spectroscopie Raman à surface renforcée
SH2	Src Homology 2

SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SPR	Surface Plasmon Resonance
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STS	Staurosporine
TEV	Tobacco Etch Virus
TEVp	Protéase du Tobacco Etch Virus
TGR5	Takeda G protein-coupled Receptor 5
TK	Tyrosine Kinase
TR-FRET	Time-Resolved FRET
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
Y2H / Y3H	Yeast Two-Hybrid / Yeast Three-Hybrid
YFP	Yellow Fluorescent Protein / Protéine Fluorescente Jaune
YNL	Yellow Nano-lantern
YPet	Yellow Fluorescent Protein for Energy Transfer

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Objectifs de la thèse et axes majeurs à développer	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2 : Différentes méthodes de transfert d'énergie par résonance.....	13
Figure 3 : Principe de l'AlphaScreen.....	14
Figure 4 : Caractéristiques du FRET.	16
Figure 5 : Protéines de la famille des GFPs.....	18
Figure 6 : Structure des lanthanides de terre rare.....	20
Figure 7 : Principe de la technologie HTRF ou TR-FRET	21
Figure 8 : Bioluminescence naturelle <i>in vivo</i> de la méduse et du corail de mer	22
Figure 9 : Caractéristiques du BRET : Propriétés spectrales	23
Figure 10 : Caractéristiques du BRET : Distance et orientation	23
Figure 11 : Importance du rapport YFP/ <i>Rluc</i>	24
Figure 12 : Test de saturation du donneur en BRET.....	25
Figure 13 : Mesure du signal de BRET	26
Figure 14 : Différentes versions de BRET.....	29
Figure 15 : Mutants de la <i>Rluc8</i> et différents substrats utilisés dans les études de BRET	34
Figure 16 : Développement des Nano-lanternes.....	35
Figure 17 : Imagerie de luminescence de souris BALB/c exprimant des tumeurs	36
Figure 18 : Principe de l'activation d'un gène rapporteur	38
Figure 19 : Opéron Lactose et test blanc/bleu	40
Figure 20 : Exemple du motif d'expression du gène <i>hemivenata-1</i> découvert par le transgène PETA2-GUS.....	41
Figure 21 : Quelques exemples exhaustifs de systèmes rapporteurs	43
Figure 22 : Reconnaissance et spécificité du substrat pour la protéase.....	46
Figure 23 : Exemple de différents tests protéases appliqués à la technique de FRET	50
Figure 24 : Exemple de différents tests protéase appliqués à la technique de BRET	50
Figure 25 : Protéase du Tobacco Etch Virus	51
Figure 26 : Approche Split-TEV	53
Figure 27 : Principe de la technique de Co-immunoprécipitation	56
Figure 28 : Technique « GST pull-down »	57
Figure 29 : Principe des tests de « Complémentation protéique »	58
Figure 30 : Exemples d'essais de complémentation de fluorescence	59
Figure 31 : Principe du double hybride chez la levure.....	60
Figure 32 : Principe du système triple hybride chez la levure	61
Figure 33 : Mammalian Protein-Protein Interaction Trap (Système MAPPIT)	62
Figure 34 : Exemples d'interactions protéine-protéine développées en BRET dans le cas des récepteurs liés aux protéines G.	63
Figure 35 : Exemples d'interactions protéine-protéine développées en BRET.....	64
Figure 36 : Récapitulatif des outils utilisés pour la mise en place du projet.....	66
Figure 37 : Protéase TEV et caractéristiques	69
Figure 38 : Alignement des séquences de la mVenus, YPet et GFP	71
Figure 39 : Orientation, distance et délétions YPet et <i>Rluc8</i>	72
Figure 40 : Délétions simples YPet, mVenus, <i>Rluc8</i> et effet sur le signal de BRET	73
Figure 41 : Signaux de BRET des différentes délétions croisées YPet, mVenus et <i>Rluc8</i>	74
Figure 42 : Effet dose réponse de la protéase TEV sur les meilleures sondes	75

Figure 43 : Transfert d'énergie émis par les partenaires de BRET.....	77
Figure 44 : Différents filtres et modification du ratio de BRET.....	78
Figure 45 : Nanolanternes.....	78
Figure 46 : Localisation de la sonde en présence des différentes séquences d'export et/ou d'import nucléaire.....	80
Figure 47 : Représentation schématique des différentes constructions après ajout du gène Puro ^R et localisation cellulaire de la YPet avant et après clivage par la TEVp.....	82
Figure 48 : Optimisation du paramètre HCS.....	82
Figure 49 : Comparaison des paramètres BRET/HCS pour la sonde optimisée.....	83
Figure 50 : Système CRISPR/Cas9 et vecteurs utilisés dans la réalisation de lignées cellulaires stables.....	86
Figure 51 : Lignée de cellules stables générée par le système CRISPR/Cas9.....	87
Figure 52 : Diagramme de comparaison des techniques de transfection manuelle et haut débit.....	88
Figure 53 : Localisation subcellulaire des différentes sondes et protéases TEV.....	98
Figure 54 : Localisation subcellulaire des différentes sondes TEVN et protéases TEVC.....	101
Figure 55 : Activation des gènes rapporteurs STAT3-TEV et CRE-TEV.....	103
Figure 56 : Activation de la voie de signalisation CRE-TEV par la Forskoline.....	104
Figure 57 : Activation du récepteur TGR5 humain ou murin.....	105
Figure 58 : Déclenchement du système par un processus biologique.....	108
Figure 59 : Représentation schématique des différents éléments du test.....	109
Figure 60 : Séquence IRES et différents mutants.....	110
Figure 61 : Effet de la force de l'IRES sur la coupure de la sonde en l'absence ou en présence de déclencheur.....	110
Figure 62 : Vérification du clivage de la sonde BRET par la protéase Caspase3.....	112
Figure 63 : Résultats en BRET obtenus suite au croisement des différentes constructions FRB/FKBP pour les approches « BRET direct » et « Split-TEV ».....	115
Figure 64 : Principe de l'interaction induite FRB/FKBP par la rapamycine pour le meilleur couple de protéines.....	116
Figure 65 : Hypothèses émises lors du développement de la preuve de concept.....	117
Figure 66 : Approche « Linkers » et « Double TEV ».....	118
Figure 67 : Différents modèles d'études développés avec l'approche Split-TEV.....	120
Figure 68 : Clivage d'une sonde FRET par l'approche Split-TEV.....	121
Figure 69 : Potentielles hypothèses à tester dans le cas de l'interaction protéine-protéine.....	122
Figure 70 : Bilan général du système générique proposé et ses différentes applications.....	123
Figure 71 : Exemple de représentation des différentes macros de visualisation.....	148
Figure 72 : Diagramme informatique de la macro de visualisation d'images.....	149
Figure 73 : Diagramme informatique de la macro d'analyse de cellules marquées.....	150
Figure 74 : Diagramme informatique de la macro d'analyse phénotypique.....	151
Figure 75 : Script d'analyse d'images Columbus utilisé lors des expériences d'optimisation de transfection à l'Echo550.....	152
Figure 76 : Script d'analyse d'images Columbus utilisé lors des expériences d'optimisation de co-transfection à l'Echo550.....	154
Figure 77 : Script d'analyse d'images du comptage des cellules marquées noyaux versus cytoplasme.....	155

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des fluorophores	17
Tableau 2 : Comparaison des méthodes de FRET et BRET.....	37
Tableau 3 : Différentes familles de protéases.....	45
Tableau 4 : Exemples de succès thérapeutiques dans.....	47
Tableau 5 : Exemples de supports pouvant être utilisés dans les techniques de « GST Pull down »	57
Tableau 6 : Comparaison des différentes méthodes d'identification des PPI	65
Tableau 7 : Valeurs des IC50 pour les différentes sondes en fonction des différentes formes de protéase	100
Tableau 8 : Valeurs des IC50 pour les différentes sondes-TEV _N en fonction des différentes formes de protéase TEV _C	102
Tableau 9 : Meilleures conditions d'activation du récepteur TGR5 humain ou murin en fonction des différents ligands testés.....	105
Tableau 10 : Principales étapes de l'analyse d'image.....	147

INTRODUCTION

I Introduction générale

I.1 Objectifs du projet

L'objectif de la thèse est de mettre au point un système générique sensible, générique, au mode de lecture unique, dans le but de mettre au point un système rapporteur permettant l'amplification du signal.

Le test que proposé dans cette thèse, repose sur une sonde compatible avec le haut débit (**Figure 1-1**), et la détection du signal pourra être réalisée *via* les techniques de BRET (transfert d'énergie de Bioluminescence) ou d'analyse d'image HCS pour microscopie automatisée à haut contenu. La première étape du projet consistera en la validation de cette sonde protéique afin d'obtenir le meilleur signal de BRET avant clivage par une protéase, la protéase TEV (Tobacco Etch Virus), décrite pour son hyperactivité. Le site de clivage de la protéase a été introduit entre les deux partenaires de BRET (accepteur et donneur) et permettra d'observer un changement d'état à la fois en BRET (diminution du signal après clivage), mais aussi en HCS avec un changement de compartiment cellulaire de notre protéine fluorescente, conférant à cette sonde un double mode de lecture.

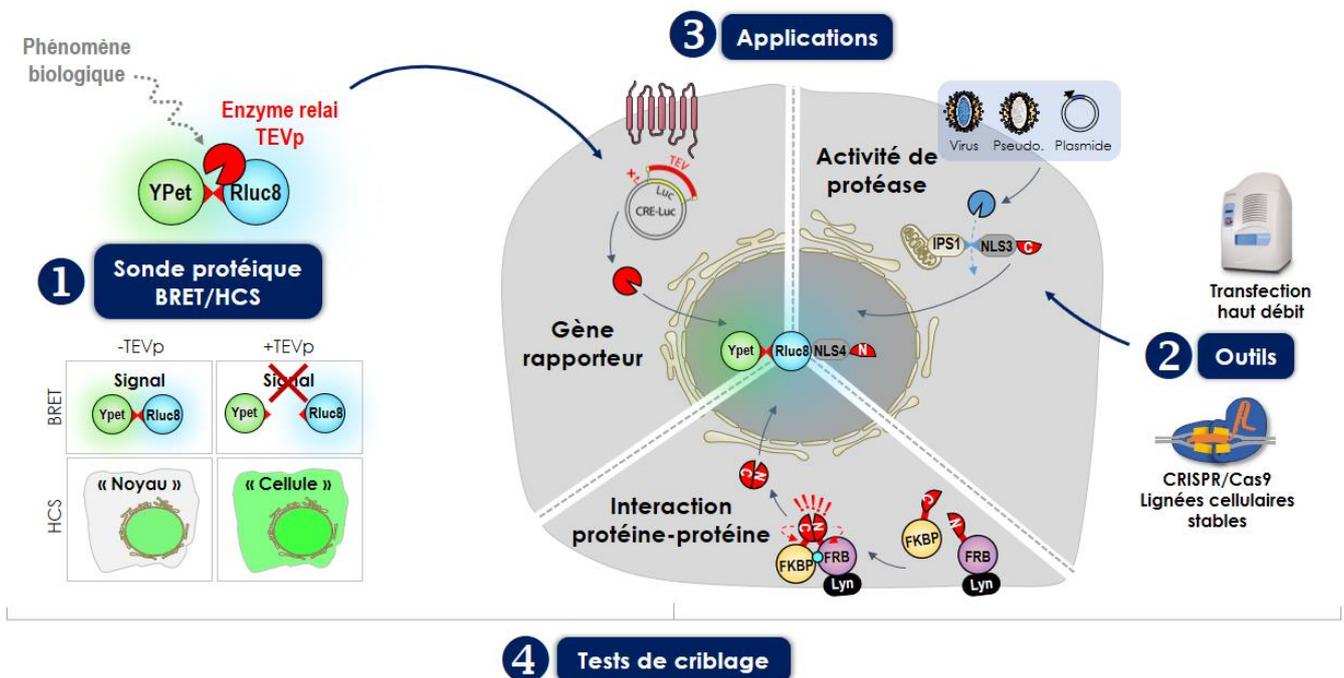


Figure 1 : Objectifs de la thèse et axes majeurs à développer.

① Optimisation d'une sonde protéique à la fois en BRET et en HCS et détermination du meilleur signal pour les deux méthodes. ② Développement d'outils haut débit permettant l'optimisation des manipulations à réaliser dans le cadre de cette thèse. ③ Validation de la sonde avec différentes applications telles que le suivi de gène rapporteur (Modèle d'étude : Récepteur TGR5 et activation de la voie CRE) ; Test d'activité de protéase (Modèle d'étude : protéase NS3-4 du virus de l'Hépatite C) ainsi que les interactions protéine-protéine (Modèle d'étude : Interaction FRB/FKBP12). Dans le but de mettre au point des tests de criblages haut débit (④)

La seconde partie de mon travail sera basée sur l'adaptation et la validation de cette sonde dans divers domaines tels que (1) le suivi de l'expression de gènes rapporteur (avec pour modèle d'étude le récepteur TGR5 couplé aux protéines G, disponible au laboratoire d'accueil), (2) l'infection virale (avec pour modèle le virus de l'hépatite C, HCV), et (3) la détection d'interactions protéine-protéine (avec l'interaction FRB/FKBP12 comme preuve de concept) (**Figure 1-③**). De plus des outils tels que la transfection haut-débit avec l'utilisation de l'Echo550 (Labcyte) mais aussi le système CRISPR/Cas9 nous permettrons d'améliorer le rendement des expériences en gagnant du temps sur les manipulations à mettre au point. L'amélioration de ces techniques fera l'objet d'une partie détaillée dans les résultats générés lors de cette thèse (**Figure 1-②**). La validation de ce système générique sensible au mode de lecture unique devrait permettre la mise en place de tests de criblage haut débit.

Ainsi, cette thèse sera découpée en plusieurs grands axes. En introduction, les méthodes de transfert d'énergie, les systèmes rapporteurs, les tests d'activité protéase ainsi que les principales méthodes de détection des interactions protéine-protéine seront développés, justifiant des techniques et méthodes utilisées en partie résultats.

I.2 Méthodes de transfert d'énergie

Des méthodes basées sur le transfert d'une énergie entre deux partenaires, un donneur et un accepteur d'énergie ont été développées au milieu du XXème siècle principalement par Théodor Förster¹.

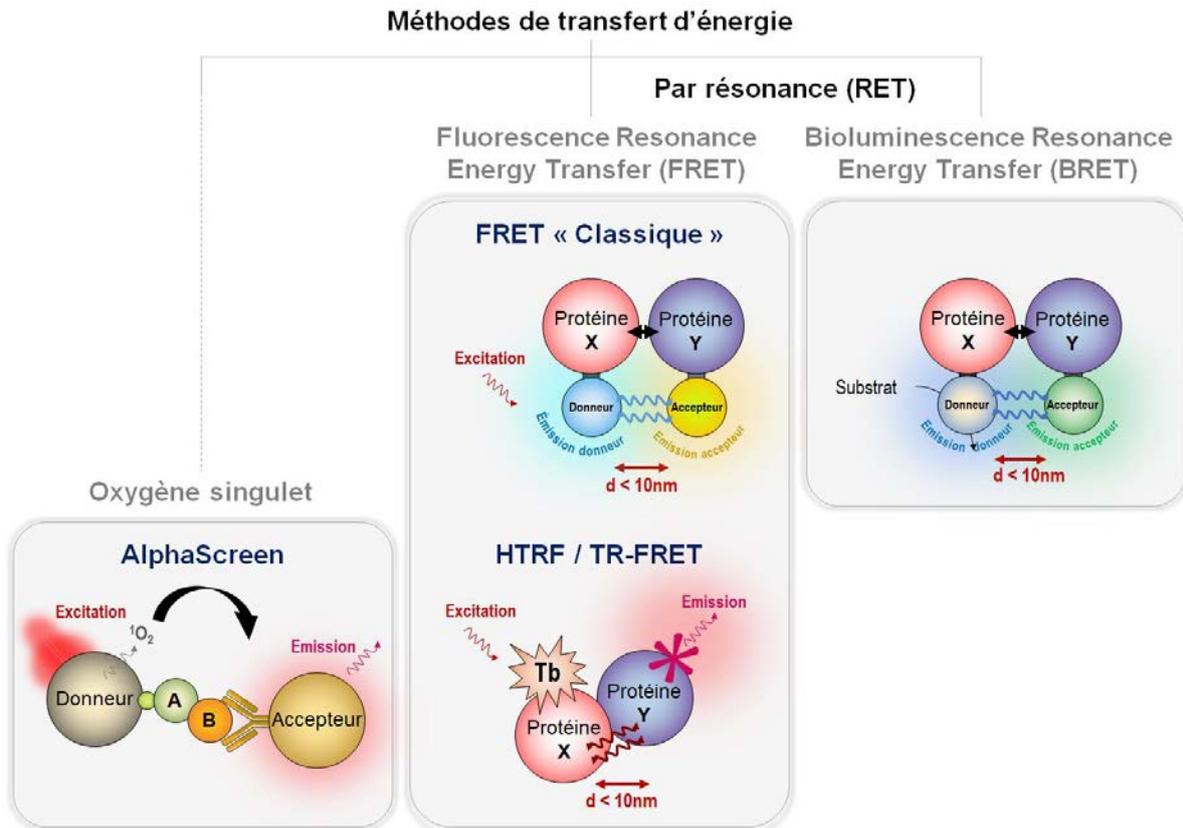


Figure 1 : Différentes méthodes de transfert d'énergie

AlphaScreen, Fluorescence Resonance Energy Transfer, Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, Bioluminescence Resonance Energy Transfer.

Les interactions en cellules vivantes peuvent être suivies par ces méthodes. Celles-ci reposent toutes sur le suivi d'interactions entre deux molécules : un donneur et un accepteur. Les différentes méthodes de transfert d'énergie par résonance sont représentées **Figure 2**. Le FRET, pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer¹ a été développé dans un premier temps, puis de nombreuses méthodes dérivées comme l'AlphaScreen³, le TR-FRET (Time resolved FRET), les techniques de fluorescence homogène en temps résolu HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) ou encore le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) ont pu être développées. Ces différentes méthodes homogènes sont détaillées ci-dessous.

I.2.a Transfert d'énergie par radicaux libres de l'oxygène (AlphaScreen)

L'AlphaScreen³, pour Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay en anglais, est une méthode d'immunodosage permettant la détection d'interaction protéine-protéine (**Figure 3**). Les protéines d'intérêt, notées A et B, se lient spécifiquement à des molécules comme la biotine ou à certains anticorps dirigés contre ces molécules, eux même liés aux billes donneur et accepteur. Quand une interaction biologique a lieu entre une protéine A et une protéine B, celle-ci rapproche les deux billes et une cascade de réactions en chaîne se produit. Après excitation laser de la bille donneur à 680nm, un photosensibilisateur contenu dans la bille va convertir le dioxygène ambiant en dioxygène excité. Le dioxygène singulet, qui diffuse librement dans le milieu, interagit avec un dérivé thioxène contenu dans la bille accepteur à proximité de la bille donneur (activé/excité). Il en résulte une chimioluminescence à 370 nm qui active les fluorophores contenus dans la bille accepteur. Ce fluorophore réémet ensuite de la lumière aux longueurs d'onde de 520 à 620 nm. En l'absence d'interaction biologique spécifique, l'état d'oxygène singulet produit par les molécules de donneur ne sera pas transféré (si l'accepteur n'est pas suffisamment proche du donneur, inférieur à 10nm) et donc seul un faible bruit de fond sera mesuré (**Figure 3**).

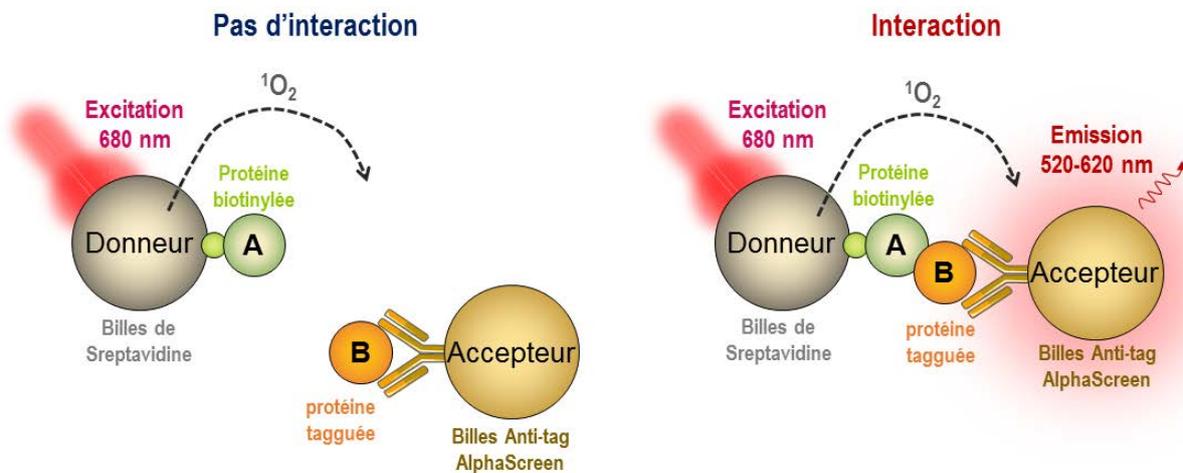


Figure 2 : Principe de l'AlphaScreen

Adapté de PerkinElmer (Roger Bosse, Chantal Illy, Daniel et Chelsky)

Cette technique est particulièrement utilisée dans la découverte de composés actifs en criblage à haut débit ou HTS (High Throughput Screening). Elle est appréciée pour la simplicité des protocoles de dosages ainsi que pour sa haute sensibilité et fournit un moyen polyvalent, sensible, homogène et miniaturisable pour le développement de ces tests de criblage⁴. Au cours de la dernière décennie, une grande variété d'applications ont été décrites allant de la détection d'analytes impliqués dans la signalisation cellulaire, aux interactions protéine-protéine⁵, protéine-peptide, protéine-acide nucléique ou protéine-petite molécule. De nombreux dosages HTS homogènes utilisent cette approche pour détecter la

génération de seconds messagers tels que l'accumulation d'AMP ou de GMP cyclique, l'inositol-1,4,5-triphosphate, ERK phosphorylée⁶, des ligands des récepteurs aux protéines G ou de tyrosine kinase, ou encore des modifications post-traductionnelle des protéines comme l'ubiquitination ou la phosphorylation^{4,7,8}.

De plus, cette technique a évolué par la modification de la chimie de la bille accepteur de manière à ce que la lumière émise soit plus intense et spectralement mieux définie, pour réduire les interférences des matrices de fluides biologiques (sérum et plasma sanguin). Cette nouvelle technologie ou AlphaLISA est une alternative aux tests classiques d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et convient aux systèmes automatisés de distribution de fluides à haut débit. Ces tests homogènes d'AlphaScreen et d'AlphaLISA permettent de quantifier des processus cellulaires complexes en utilisant des tests simples au format microplaques. De grandes banques de composés peuvent ainsi être criblées à haut débit sur une large gamme de cibles thérapeutiques⁴.

I.2.b Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer

En comparaisons aux techniques d'AlphaScreen, le transfert d'énergie par résonance offre une résolution spatiale suffisamment importante pour conclure à une réelle interaction entre deux protéines. En effet, l'identification des interactions protéine-protéine (PPIs) ou encore l'étude des récepteurs et leur activation sont essentielles dans la compréhension de certains dérèglements cellulaires. Ces dernières années de nombreuses méthodes d'identification de ces interactions ont pu être développées mais elles restent parfois limitées, allant jusqu'à la détection d'interactions non spécifiques conduisant à une mauvaise interprétation des phénomènes biologiques. Pour réaliser une étude en RET plusieurs paramètres doivent être pris en considération comme : (i) le rapport signal sur bruit, (ii) la compatibilité spectrale du donneur, de l'accepteur et leur alignement spatial, (iii) le temps de désexcitation du donneur, (iv) le degré de polarisation de la lumière émise (v) l'autofluorescence et les perturbations spectrales liées au milieu réactionnel du test². Les résultats obtenus sont généralement représentés sous la forme d'un rapport de lumière émise à la longueur d'onde du donneur et de l'accepteur qui est impacté par ces différents facteurs. Ce mode ratiométrique permet donc l'élimination de la plupart des variations dues aux fluctuations de la lumière mesurée.

I.2.b.1 Origine et paramètres du FRET

La technologie FRET pour Fluorescence ou Förster Resonance Energy Transfer consiste en un transfert d'énergie non radiative, c'est-à-dire sans émission de lumière, entre deux molécules fluorescentes résultant d'une interaction dipôle-dipôle entre un donneur et un accepteur d'énergie. Une des premières caractéristiques de cette méthode est l'obligation

d'une compatibilité énergétique entre les deux partenaires, le spectre d'émission du donneur devant chevaucher le spectre d'absorption de l'accepteur (**Figure 4A**). Egalement, le donneur et l'accepteur doivent être suffisamment proches dans l'espace pour qu'un transfert d'énergie ait lieu mais aussi être dans une configuration spatiale compatible avec ce transfert d'énergie (**Figure 4B et 4C**).

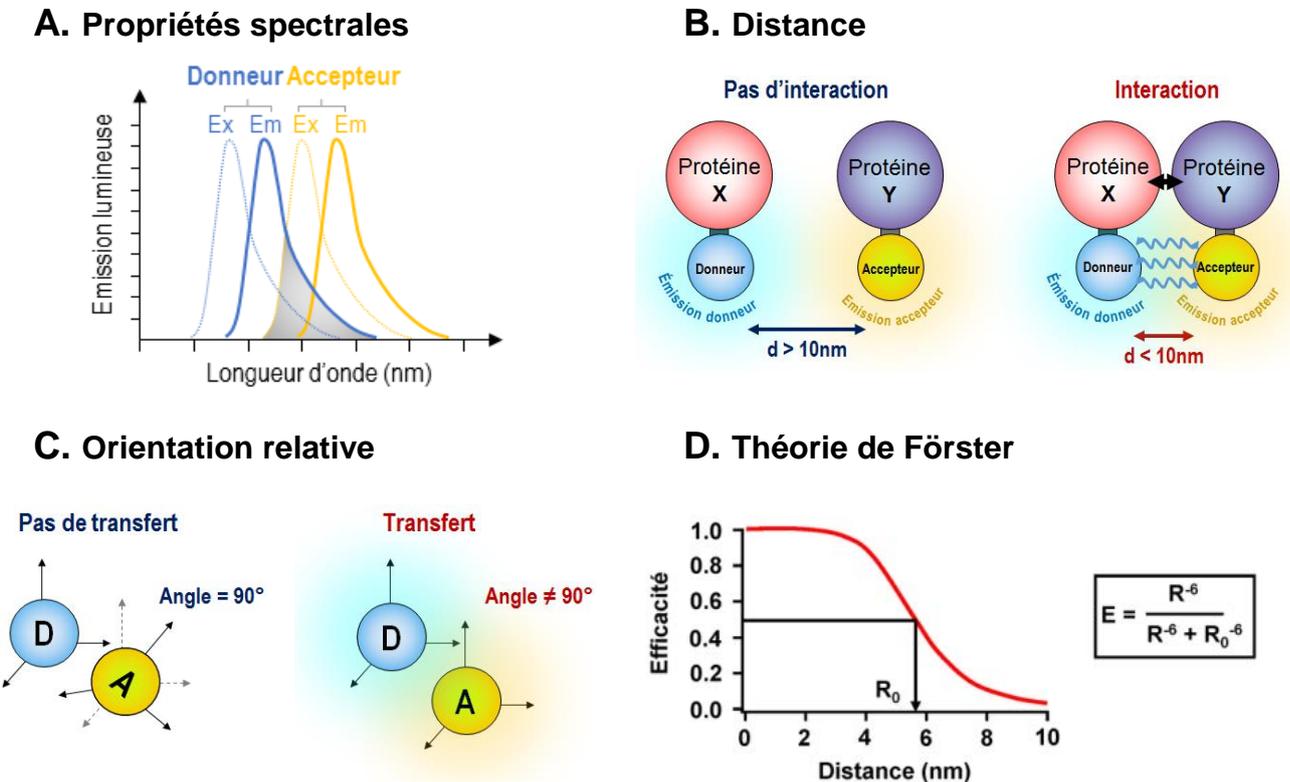


Figure 3 : Caractéristiques du FRET.

A] Pour avoir un transfert d'énergie optimal entre un donneur et un accepteur d'énergie, le spectre d'émission du donneur doit chevaucher le spectre d'excitation de l'accepteur. **B]** Le transfert d'énergie se produit uniquement lorsque le donneur et l'accepteur sont spatialement proches ($d < 10\text{nm}$). **C]** Orientation relative des deux partenaires de BRET. (D correspondant au donneur et A à l'accepteur). **D]** Théorie de Förster. Un transfert d'énergie est observé si la distance séparant les deux partenaires est inférieure à 1.8 fois le rayon de Förster⁹.

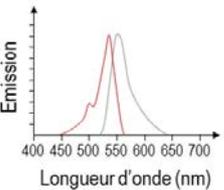
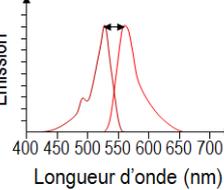
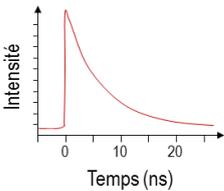
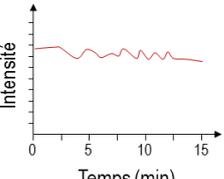
En accord avec la théorie décrite par Förster¹, le FRET est un processus qui dépend de la distance séparant le donneur et l'accepteur, avec R la distance effective qui sépare ces deux molécules et R_0 le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance donneur – accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50% (**Figure 4D**)². L'efficacité de transfert entre les partenaires tend vers zéro si R n'est pas compris entre 1 et 10nm ^{1,9,10}.

1.2.b.2 Caractéristiques photophysiques des fluorophores

Par définition toute molécule capable d'émettre un signal de fluorescence est qualifiée de fluorophore. Plusieurs types de fluorophores peuvent être définis allant des

fluorophores organiques aux protéines fluorescentes. Leurs principales caractéristiques sont décrites **Tableau 1**.

Tableau 1 : Caractéristiques des fluorophores

Spectre d'absorption et d'émission	Le spectre d'absorption est caractéristique d'une molécule dans un environnement donné et le spectre d'excitation de son éventuel centre fluorescent lui est très généralement identique. Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption	
Déplacement de Stokes (nm)	Différence de longueur d'onde entre le pic d'émission et le pic d'absorption. Il doit être le plus grand possible afin de s'affranchir de la contamination due à la source d'excitation pour les approches de transfert d'énergie.	
Coefficient d'extinction molaire ϵ	Absorption d'une molécule à une longueur d'onde donnée (entre 5000 et 250000cm ⁻¹ M ⁻¹)	
Rendement quantique Φ	Capacité du fluorophore à réémettre sous forme de lumière l'énergie absorbée lors du transfert. Celui-ci se caractérise sous forme de rapport en divisant le nombre de photons émis par ceux absorbés	$\frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$
Durée de vie à l'état excité	Correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. La plupart des fluorochromes ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. Plus ce temps sera court, meilleure sera la sensibilité du fluorochrome. Plusieurs excitations successives seront possibles car il repassera rapidement dans son état fondamental	
Brillance B	Quantité de lumière émise par fluorescence proportionnellement à une lumière d'excitation donnée. Plus un fluorophore est brillant, plus il sera facile de le détecter à de faibles concentrations dans la cellule	$\epsilon \times \Phi$
Photostabilité	La photostabilité correspond au nombre d'excitations que peut subir une molécule fluorescente avant d'être dégradée. Par exemple, la fluorescéine peut subir entre 10 ⁴ et 10 ⁵ excitations avant d'être détruite.	

La grande diversité des fluorophores organiques et leur petite taille (environ 1kDa), en font de très bons candidats pour les études de FRET. Initialement, les expériences de RET ont été réalisées sur des protéines d'intérêt purifiées et leur étiquetage avec ces fluorophores organiques ont été opéré *via* des traitements chimiques. Cependant, pour être utilisés en biologie *in cellulo*, il est assez difficile de coupler spécifiquement de manière directe des fluorophores organiques aux protéines cibles d'intérêt. Ils sont généralement couplés à des protéines qui vont permettre leur accrochage au niveau des protéines d'intérêt à étudier. Néanmoins, la limite de ces marquages protéiques est leur incapacité à traverser

les membranes plasmiques ce qui nécessite l'utilisation de méthodes invasives comme la perméabilisation, même douce, des membranes cellulaires, pour permettre leur pénétration et le marquage des protéines cibles.

Pour ce type d'applications biologiques, les études de FRET utilisent plus couramment des protéines fluorescentes de la famille des GFPs (Green Fluorescent Protein). Ces protéines ont été découvertes lors d'expériences chez la méduse dans les années 1960 (**Figure 5A**)¹¹. Les propriétés spectrales de ces protéines en font de très bons candidats : une séparation suffisante des pics d'excitation du donneur et d'émission de l'accepteur ainsi qu'un chevauchement des pics d'excitation et des pics d'émission supérieur à 30% permettant ainsi l'obtention de mesures indépendantes de fluorescence pour chaque fluorophore¹².

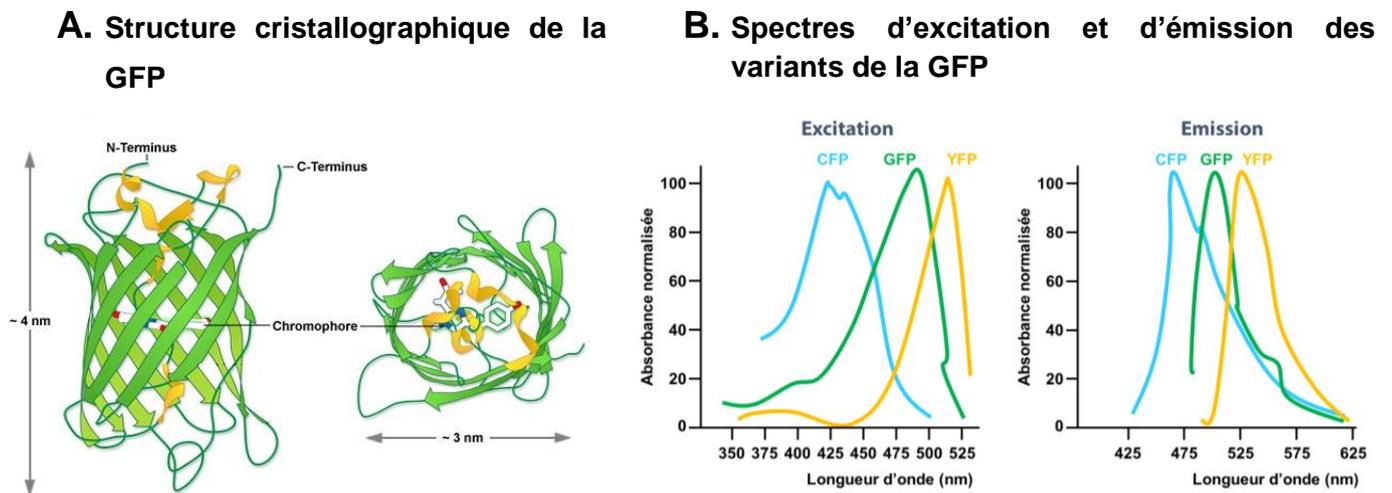


Figure 4 : Protéines de la famille des GFPs

A] Structure cristallographique de la GFP. **B]** Spectres d'excitation et d'émission des variants de la GFP⁹

Les tests de FRET utilisant des GFPs ont été déterminants en imagerie cellulaire dans l'étude de la compartimentalisation et de l'organisation fonctionnelle du mouvement des protéines en cellules vivantes¹³. De nombreux variants de ces protéines fluorescentes ont été mis en évidence ces dernières années. En remplaçant la structure de certains acides aminés à l'origine chromophore, il a été possible de modifier les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de la GFP. Parmi ces variants, la BFP (Blue Fluorescent Protein), la YFP (Yellow Fluorescent Protein) ou encore la CFP (Cyan Fluorescent Protein) sont les principales protéines fluorescentes utilisées dans les études de FRET (**Figure 5B**)^{9,14}. L'utilisation de ces différents mutants comme sondes moléculaires en font de très bons outils, ces dernières se fusionnant très facilement aux protéines cibles et pouvant être exprimées directement en cellules (*in vitro* et *in vivo*). Il est possible de suivre facilement en microscopie la localisation cellulaire de ces protéines grâce à leur forte intensité de fluorescence. Ces phénomènes de transfert d'énergie peuvent être visualisés directement en

cellule avec l'utilisation de protéines de fusion permettant ainsi de définir la nature des protéines en interaction et leur localisation cellulaire précise.

1.2.b.3 Détection du signal de FRET et limites

Les variations du signal de FRET sont mises en évidence en mesurant la diminution de la fluorescence du donneur et l'augmentation de celle de l'accepteur. Le signal de FRET est calculé à partir du rapport de l'émission de fluorescence de l'accepteur sur celle du donneur. La principale difficulté de la mesure de FRET reste le recouvrement des spectres d'excitation et d'émission des différents fluorophores utilisés. Ce manque de sélectivité est l'un des problèmes majeurs de cette technique avec pour conséquence un important bruit de fond et une baisse importante de sensibilité du test. Des couples de fluorophores utilisés couramment en FRET comme la fluoescéine avec la rhodamine ainsi que des protéines de la famille des CFP avec la YFP présentent ce type de limitations.

Des méthodes alternatives de détection ont alors dû être développées comme le photo-blanchiment ou pbFRET. Cette méthode consiste à éteindre l'émission du fluorophore donneur par exposition prolongée à une source lumineuse. Cette approche couplée à la microscopie confocale permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale dans l'extinction des fluorophores au sein d'un environnement cellulaire. Dans le cas du FRET, le photo-blanchiment du fluorophore donneur va entraîner une diminution de son intensité mesurée ou non en présence de l'accepteur. Si l'accepteur d'énergie est en étroite proximité avec le donneur, un phénomène de FRET va apparaître et entrer en compétition avec le phénomène de photo-blanchiment entraînant ainsi une résistance du donneur à celui-ci. Cette résistance permet ainsi la mise en évidence du transfert d'énergie.

Cette technique peut aussi être mise en place dans le cas du photo-blanchiment de l'accepteur ou DFRAP (Donor Fluorescence Recovery After Acceptor Photobleaching). Les émissions respectives du donneur et de l'accepteur sont mesurées avant et après photo-blanchiment de l'accepteur. L'augmentation de la fluorescence du donneur après la destruction de celle de l'accepteur permet de conclure à l'existence d'un phénomène de FRET entre ces deux protéines^{15,16}. Cependant, le photo-blanchiment de la GFP s'accompagne généralement d'un signal de fluorescence dans le canal de la CFP et cela en l'absence de ce donneur¹⁷.

1.2.b.4 Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) ou TR-FRET

Pour pallier au manque de sélectivité spectrale des fluorophores, impliquant une excitation simultanée du donneur et de l'accepteur par l'énergie excitatrice du donneur, des

tests plus sensibles ont été mis au point permettant l'amélioration spectrale et temporelle des signaux de FRET. Ces tests reposent sur l'utilisation de traceurs ou complexes formés par l'association d'un chromophore (cryptate ou chélate) et d'un cation lanthanide faisant partie du groupe des terres rares (europium, terbium). La principale caractéristique de ces molécules réside dans leur durée de vie de luminescence relativement longue, de l'ordre de la milliseconde, à l'inverse de celle des fluorophores organiques ou protéines fluorescentes, de l'ordre de la nanoseconde. Quatre fluorophores spécifiques peuvent être utilisés. L'élément central, le donneur, peut être un Cryptate europium (Eu^{3+} Cryptate) ou un cryptate de terbium (Cryptate Tb^{2+}). Naturellement, ces ions ne sont pas fluorescents et nécessitent une source lumineuse, ou cage, pour être excités. Cette cage agit comme une antenne et permet à la fois la collecte d'énergie et le transfert aux ions qui libèrent facilement cette énergie. L'avantage des cryptates est qu'ils ne sont pas soumis au phénomène de photoblanchiment qui affecte les fluorophores les plus conventionnels. Le terbium reste cependant plus lumineux que l'europium et augmente considérablement la détection du nombre de récepteurs de surface dans les dosages (**Figure 6**). Egalement, la distance doit être inférieure à 10nm pour que le transfert d'énergie ait lieu entre les deux partenaires.

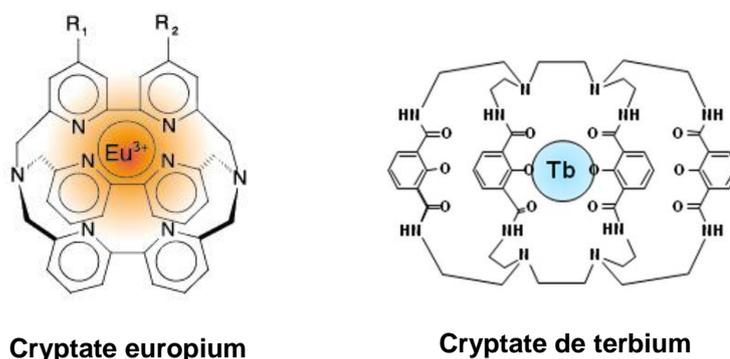


Figure 5 : Structure des lanthanides de terre rare

Grâce aux propriétés de ces ions lanthanides, des systèmes de détection de fluorescence en phase homogène ou HTRF pour Homogeneous Time-Resolved Fluorescence ont été développés. Ces systèmes reposent sur l'application d'un délai d'environ 50 à 150 ms entre l'excitation de l'échantillon par la source lumineuse et la mesure du signal émis, de façon à s'affranchir de tous les signaux de fluorescence parasites à courte durée de vie. Combiné à la technique de FRET, cela permet donc une amélioration en terme de sensibilité, de dosage et de robustesse sans compromettre l'avantage que l'HTRF apporte aux essais, une mesure miniaturisable avec un faible taux d'interférence des composés fluorescents (**Figure 7**)¹⁸.

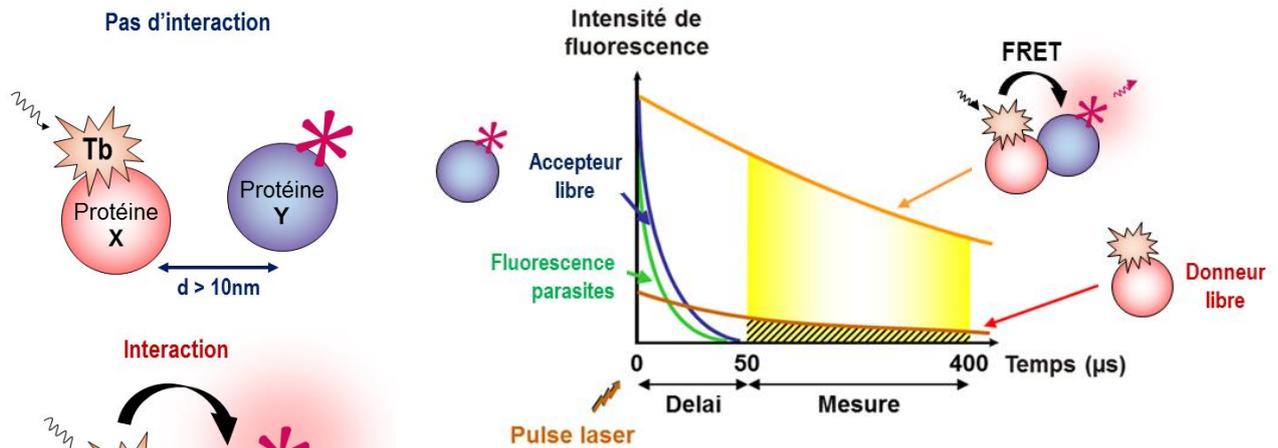


Figure 6 : Principe de la technologie HTRF ou TR-FRET

L'énergie envoyée par la source excitatrice de lumière est suivie après un court délai pour éviter toute perturbation préalable de fluorescence extérieure (composé, protéines, milieu). Adapté de Degorce et *al.*, 2009¹⁸

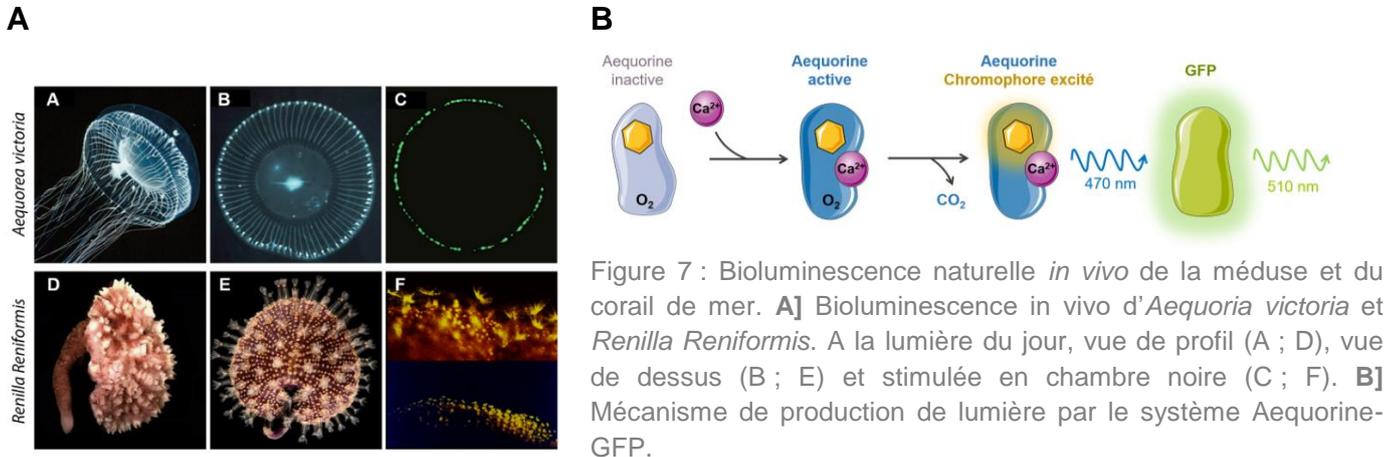
I.2.c Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)

I.2.c.1 Origine du BRET

La technologie de BRET pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer est également une méthode de transfert d'énergie basée sur le transfert d'une énergie non radiative entre un donneur bioluminescent et un accepteur d'énergie fluorescent. Initialement développée pour étudier l'interaction de protéines du rythme circadien chez la bactérie¹⁹, elle a rapidement été appliquée aux cellules de mammifères²⁰, aux cellules végétales²¹, ainsi qu'à la levure de bière²².

Ce phénomène de bioluminescence est observé naturellement chez certains organismes marins comme la méduse *Aequorea victoria* ou le corail *Renilla reniformis*. Le rôle de la protéine responsable de cette bioluminescence naturelle, l'aequorine, extraite et purifiée, a été démontré dans les années 60^{11,23,24}. L'aequorine est révélée être un complexe moléculaire formé d'une protéine de 21kDa ou apo-aequorine possédant 3 sites de haute affinité : un pour le calcium (Ca^{2+}), un pour le dioxygène (O_2) ainsi qu'un pour un chromophore, la coelenterazine. Lorsque le calcium se lie à ce complexe, un changement conformationnel a lieu, permettant l'oxydation de la coelenterazine en coelenteramide qui se retrouve alors dans un état excité. Le complexe ainsi formé est nommé BFP (Blue Fluorescent Protein). *In vitro*, la réaction se termine par la libération d'une molécule de CO_2 et l'émission d'une lumière bleue à 470 nm. En revanche, *in vivo*, l'extrémité de l'ombrelle, émet une émission de lumière verte et non bleue lorsque la méduse s'agit. Afin d'isoler la protéine responsable de cette émission verte plus de 10000 méduses ont été broyées^{11,23,24} pour mettre en évidence l'existence d'un transfert d'énergie de l'aequorine vers une protéine verte fluorescente : la GFP. La GFP contient un groupe chimique capable d'absorber la

lumière à une longueur d'onde donnée (excitation à 470 nm) pour ensuite la réémettre à une seconde longueur d'onde (émission à 510 nm). La découverte de la GFP, par le Docteur Osamu Shimomura¹¹ lui permettra de remporter le prix Nobel de Chimie quelques années plus tard, en 2008, pour la découverte de la GFP, avec deux de ses confrères américains Martin Chalfie et Roger Tsien (**Figure 8**).



Des mécanismes de bioluminescence semblables ont pu être identifiés dans d'autres organismes marins. Parmi eux, le corail de mer *Renilla reniformis* possède une enzyme de 36 kDa, la *Renilla luciferase (Rluc)*, capable de catalyser l'oxydation de la cœlenterazine en présence d'oxygène mais sans nécessité d'un cofacteur. *In vivo*, comme pour la méduse, *Renilla reniformis* possède une GFP (rGFP) qui permet un transfert d'énergie se traduisant par une émission dans le vert à 510 nm comme précédemment (**Figure 8**).

1.2.c.2 Paramètres influençant le signal de BRET

1.2.c.2.i Propriétés spectrales

Pour étudier une interaction protéine-protéine, les protéines d'intérêt sont fusionnées au donneur et à l'accepteur d'énergie. La particularité du BRET réside dans un premier temps dans la nature du donneur qui, en présence de son substrat, la cœlenterazine conduit à l'émission de lumière bleue à 480 nm. Pour que ce transfert soit optimal entre les deux partenaires, le spectre d'émission du donneur doit chevaucher le spectre d'excitation de l'accepteur (**Figure 9**). Comme pour le FRET, l'accepteur peut être une protéine fluorescente comme la GFP ou la YFP^{25,26}. Lorsque la *Rluc* et la YFP se trouvent à proximité, un transfert d'énergie peut avoir lieu entre les deux molécules, se traduisant par l'émission caractéristique d'une fluorescence à 530 nm (longueur d'onde de la YFP). En l'absence de toute interaction, l'ajout de cœlenterazine sur des cellules co-exprimant les protéines recombinantes se traduit par un spectre d'émission avec un pic centré à 480 nm. Toutefois si les deux protéines interagissent, un deuxième pic caractéristique apparaît correspondant à l'émission de la YFP excitée par le transfert d'énergie par résonance.

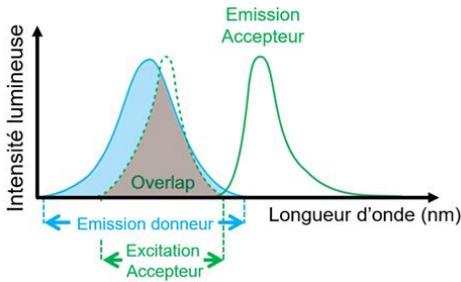


Figure 8 : Caractéristiques du BRET : Propriétés spectrales

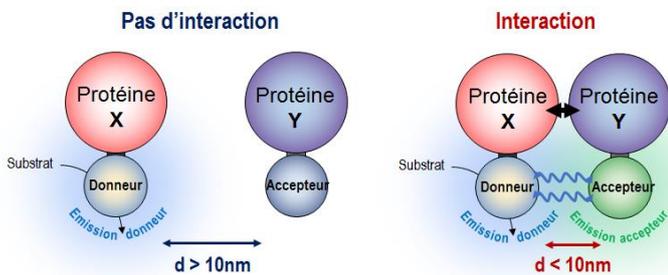
Pour avoir un transfert d'énergie optimal entre un donneur et un accepteur d'énergie, le spectre d'émission du donneur doit venir chevaucher le spectre d'excitation de l'accepteur.

1.2.c.2.ii Distance et orientation relative des partenaires

L'intensité du signal de BRET va dépendre de la distance et de l'orientation relative des deux partenaires, même s'il reste difficile à évaluer quand le donneur et l'accepteur sont mobiles.

Premièrement, la distance entre le donneur et l'accepteur doit être inférieure à 10nm (**Figure 10A**, cf Loi de Förster **Figure 4D**). Plus les partenaires sont proches dans l'espace, meilleur sera le transfert d'énergie. Deuxièmement, l'orientation relative (**Figure 10B**) des partenaires est un facteur à prendre en considération en raison de la nature de l'interaction dipôle-dipôle. Si les deux partenaires ne sont pas dans une configuration optimale, l'intensité du signal de BRET provenant du transfert d'énergie ne sera pas optimale. La distance peut donc être modulée par l'introduction d'un petit peptide de liaison entre les partenaires du BRET et la protéine étudiée. Différents peptides de 5 à 10 acides aminés principalement constitués de résidus glycines montrant une grande flexibilité peuvent être utilisés afin de faciliter une meilleure orientation des partenaires et le repliement correct des deux moitiés des protéines de fusion²⁷. La distance peut être inférieure à 10nm, mais si l'orientation des deux partenaires n'est pas optimale, le transfert d'énergie n'aura pas lieu entre les protéines fusionnées aux deux partenaires. Il en résulte que l'absence d'un signal de BRET ne signifie pas obligatoirement que les deux protéines étudiées n'interagissent pas entre elles.

A. Loi de Förster



B. Orientation relative

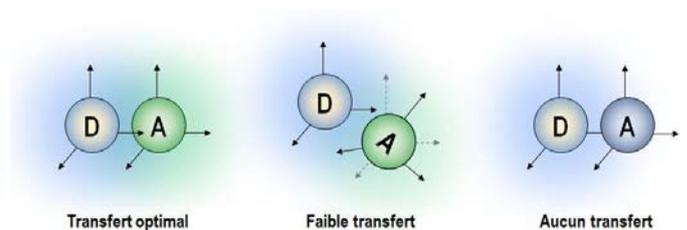


Figure 9 : Caractéristiques du BRET : Distance et orientation

A] Le transfert d'énergie se produit uniquement lorsque le donneur et l'accepteur sont spatialement proches (distance inférieure à 10nm). Ainsi en utilisant des protéines de fusion, le signal ne sera mesuré que lorsque les deux protéines étudiées interagiront physiquement. B] Un transfert d'énergie ne se produira que si les deux protéines sont dans une configuration optimale. (D : donneur / A : accepteur). Adapté de Bacart *et al.*, 2008²⁶.

1.2.c.2.iii Importance du rapport Accepteur / Donneur

Le dernier paramètre pouvant moduler le signal de BRET est le ratio entre la quantité d'accepteur et le donneur d'énergie. Les interactions protéine-protéine se produisent dans un espace donné, généralement délimité, comme les organelles, les membranes ou le cytoplasme des cellules. Il est évident que deux protéines qui n'interagissent pas se rencontreront plus facilement si leur concentration augmente dans un espace donné, ce qui conduit à un signal de BRET détectable mais non spécifique (**Figure 11**). Ce signal généralement très faible, peut progressivement augmenter, de façon linéaire, en présence d'une concentration croissante d'accepteur fluorescent contrairement au signal spécifique de BRET qui atteindra une valeur plateau plus importante plus rapidement correspondant à une saturation complète des molécules de donneur liées aux accepteurs.

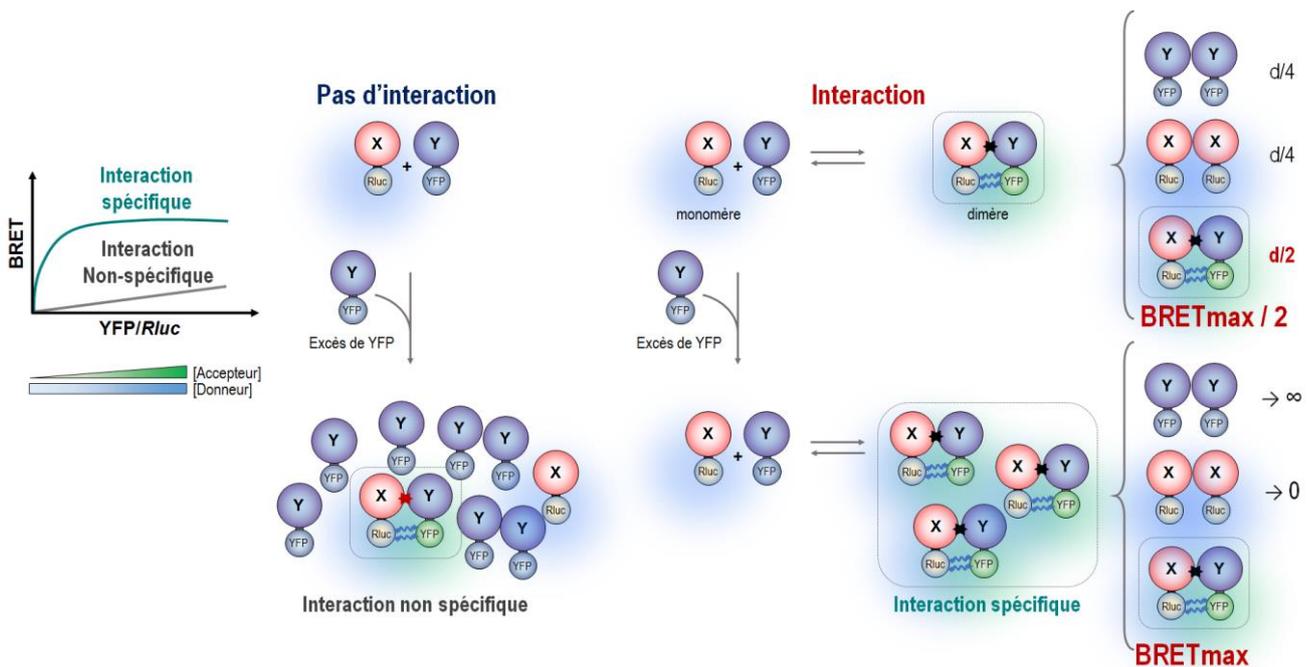


Figure 10 : Importance du rapport YFP/Rluc
Adapté de Bacart *et al.*, 2008²⁶

Si l'accepteur est en excès, la quantité de dimère maximale, correspondant au BRET maximal (BRETmax), tendra vers la quantité de monomère initiale traduisant une interaction de toutes les molécules de donneur avec les accepteurs. Un monomère de donneur, nommé X, peut interagir avec un monomère d'accepteur Y formant ainsi le dimère XY. Chaque monomère peut également interagir avec lui-même, formant ainsi des dimères de donneurs XX, ou encore des dimères d'accepteurs YY. Si Y est en excès, les dimères YY tendront vers l'infini tandis que la quantité de dimères XX tendra vers zéro. Quand la quantité de YFP n'est pas en excès, la formation de dimère de donneurs peut interférer dans le pic du donneur ce qui va perturber le signal de BRET. Si l'accepteur est présent en excès la quantité de dimère de donneurs tendra vers zéro, la mesure du signal de BRET ne sera pas

faussée. Il est assez difficile de déterminer le nombre de moles précises de donneur et d'accepteur. La valeur de BRET maximale se verra divisée par deux si l'affinité XX et YY est la même et celle-ci correspond au rapport 1 sur 1 indiquant le pourcentage de dimères dans les cellules (constitutifs ou induits) (**Figure 12**)²⁶.

En effet, à rapport équimolaire, si toutes les molécules de donneurs et d'accepteurs interagissent ensemble, un signal de BRET maximal est observé. Cependant, ce phénomène a rarement lieu et les molécules de donneurs libres conduisent à la diminution de cette valeur maximale de BRET. Pour obtenir le signal de BRET le plus élevé possible, la protéine de fusion accepteur doit donc être fortement exprimée par rapport au donneur d'énergie, pour diminuer la proportion de donneur libre. Pour assurer le suivi des effets de composés actifs, il faut limiter le titrage du composé par un excès de molécules accepteur. Il est donc idéal de se placer dans une fenêtre où le signal de BRET est suffisamment élevé (**Figure 12**). De plus, ce dernier paramètre guidera le choix de la conception des protéines de fusion. Comme la proportion de donneur libre conduira à diminuer le signal BRET, celui-ci doit être le plus bas possible et la fusion à une protéine X où Y correspondra au rapport global des complexes X / Y par rapport aux protéines X ou Y sont libres ou engagés dans d'autres complexes que celui étudié^{26,28-31}.

1.2.c.3 Mesure du signal de BRET

Expérimentalement, le BRET est déterminé ratiométriquement en divisant l'émission de l'accepteur à 530 nm par l'émission du donneur à 480 nm. Ce mode ratiométrique permet d'éliminer les variations du signal dues aux fluctuations de la lumière émise (interférence optique des milieux, variation du nombre de cellules, volume de l'essai). L'utilisation de la coelenterazine-h comme source excitatrice permet de s'affranchir de toute source extérieure de lumière, limitant ainsi les problèmes de photo-blanchiment des GFP, d'effet de filtre des milieux à la longueur d'onde d'excitation du donneur ou encore d'excitation simultanée de l'accepteur. Le signal de BRET est mesuré directement après ajout du substrat et la mesure est répétée plusieurs fois pour couvrir une fenêtre de temps allant de 15 minutes à 4 heures.

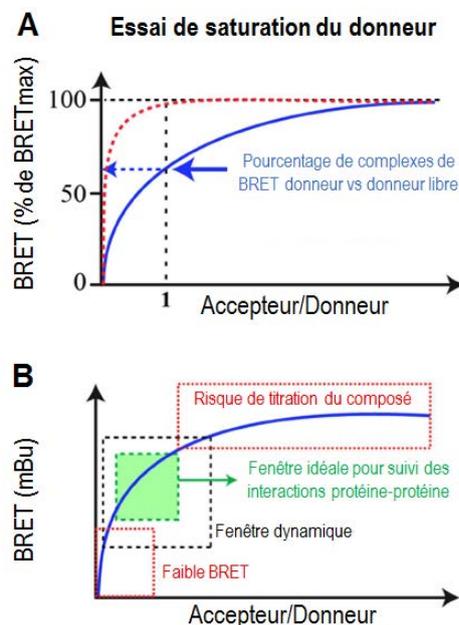
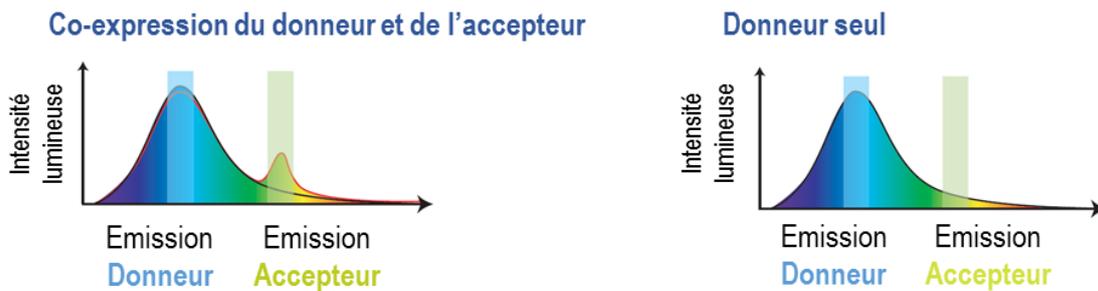


Figure 11 : Test de saturation du donneur en BRET

A] Courbe de saturation du donneur dans la formation de dimères : en rouge, courbe théorique si 100% des donneurs interagissent avec les accepteurs ratios 1/1. En bleu, courbe obtenue dans le cas des essais de saturation montrant un pourcentage faible de complexes donneur/accepteur dans les cellules. **B]** Courbe de saturation du donneur pour l'analyse des interactions protéines dans les tests de criblage. En noir, fenêtre dynamique du suivi des interactions en BRET. En rouge, les deux zones à éviter dans ces essais. En vert, la fenêtre idéale à choisir pour réaliser un test de criblage optimal³⁰.

Le ratio de BRET est calculé en divisant la lumière émise à la longueur d'onde de l'accepteur sur celle émise par le donneur. Afin de corriger le bruit de fond dû au pic de chevauchement entre le signal du donneur et celui de l'accepteur, le ratio de BRET est toujours déterminé en calculant l'expression du donneur seul pour déterminer les taux d'expression relatifs du donneur et de l'accepteur. Dans le rapport de BRET, la valeur de *Rluc* prend en compte l'émission de toutes les *Rluc*, qu'elles soient ou non en interaction avec des accepteurs YFP. Toutefois, les valeurs mesurées de YFP données par l'appareil correspondent seulement à la réémission du signal provenant d'émissions à la longueur d'onde des YFP incluses dans le transfert d'énergie. Pour obtenir une valeur réelle du signal de toutes les YFP, une mesure de fluorescence est effectuée au préalable. Le ratio peut ainsi être calculé et correspond à la valeur des YFP attachées aux *Rluc* sur la valeur totale des *Rluc* pour chaque condition. Le résultat est exprimé en milliBRET (mBRET) en multipliant le ratio par 1000 après soustraction du bruit de fond de la *Rluc* seule (**Figure 13**)²⁶.



$$\text{Ratio de BRET (A + D)} = \frac{\text{Lumière émise par l'accepteur } \lambda}{\text{Lumière émise par le donneur } \lambda}$$

$$\text{Bruit de fond du BRET (D)} = \frac{\text{Lumière émise par l'accepteur } \lambda}{\text{Lumière émise par le donneur } \lambda}$$

$$\text{Signal de BRET (mBRET)} = (\text{Ratio de BRET} - \text{Bruit de fond du BRET}) \times 1000$$

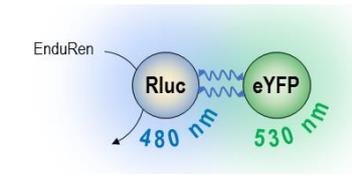
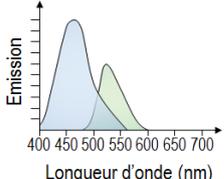
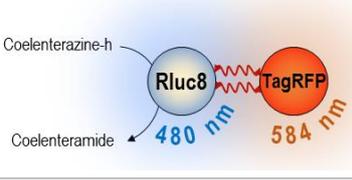
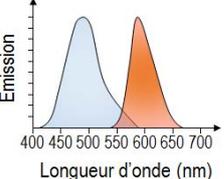
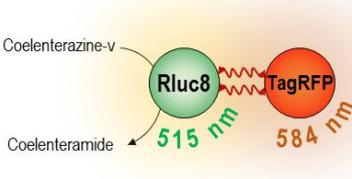
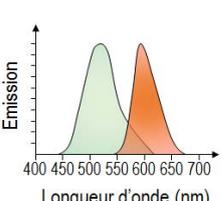
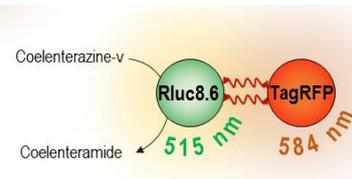
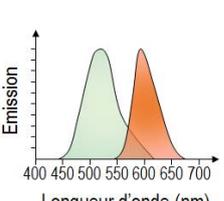
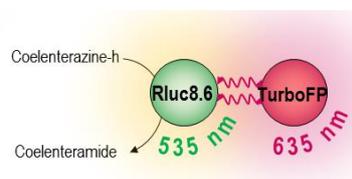
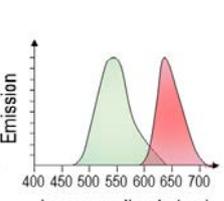
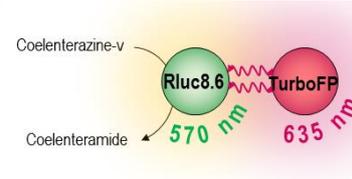
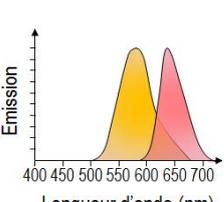
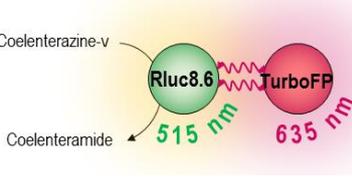
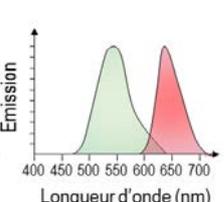
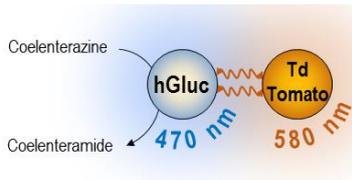
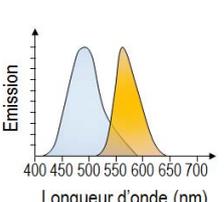
Figure 12 : Mesure du signal de BRET

1.2.c.4 Différentes versions de BRET et applications

Depuis la découverte de l'aéquierine chez la méduse et le premier test de BRET développé par Xu *et al* en 1999³², plusieurs versions de BRET ont pu être développées, basées sur la modification du substrat utilisé ainsi que sur la nature du couple donneur/accepteur³³⁻³⁵. Un résumé des différentes versions est présenté **Figure 14**.

Version	Couple de partenaires	Propriétés spectrales	Applications	Référence
A. BRET1			<ul style="list-style-type: none"> -Recherche fondamentale -Criblage -Etude des RCPG -Imagerie cellulaire 	26,32
B. BRET2			<ul style="list-style-type: none"> -Recherche fondamentale -Criblage -Etude des RCPG -Imagerie cellulaire -Imagerie <i>in vivo</i> 	26,36
C. enhanced BRET2			<ul style="list-style-type: none"> -Recherche fondamentale -Criblage -Imagerie cellulaire -Imagerie <i>in vivo</i> 	26,34
D. BRET3 (1)			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage 	37
E. BRET³ (2)			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage 	26,38
F. BRET3.1			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage 	37

I Introduction générale

G.	eBRET			<ul style="list-style-type: none"> -Recherche fondamentale -Criblage -Imagerie cellulaire 	39
H.	BRET4			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	40
I.	BRET4.1			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	41
J.	BRET5			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	41
K.	BRET6			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	41
L.	BRET6.1			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	41
M.	BRET7			<ul style="list-style-type: none"> -Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 	40
N.	GlucBRET			<ul style="list-style-type: none"> -Imagerie <i>in vivo</i> 	42

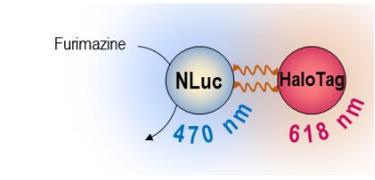
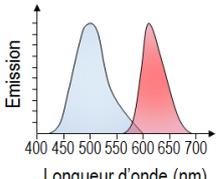
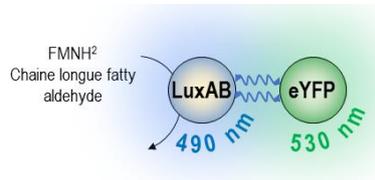
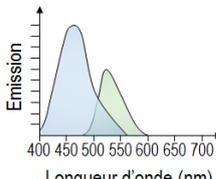
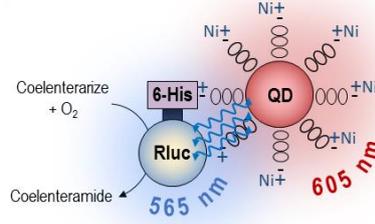
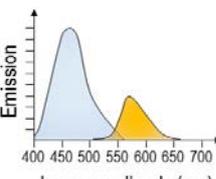
O.	NanoBRET			-Alternative au BRET1 43
P.	LuxBRET			-Utilisation en bactéries -Etude des interactions protéine-protéine 44
Q.	QD-BRET			-Criblage -Imagerie <i>in vivo</i> 26

Figure 13 : Différentes versions de BRET

Chaque version est caractérisée par un couple donné de partenaires compatibles pour le BRET. Propriétés spectrales et applications. Adapté de Bacart *et al.*, 2008⁴⁵, de Dragulescu-Andrasi *et al.*, 2011⁴¹, Borroto-Escuelaa *et al.*, 2013⁴⁶ et de Sun *et al.*, 2016⁴⁷

1.2.c.4.i Systèmes de BRET utilisant la *Renilla luciférase*

La version originale de BRET nommé BRET1 (**Figure 14A**) utilise la coelenterazine-h comme substrat de la *Rluc*. L'émission maximale est observée pour une longueur d'onde de 480 nm, adaptée à l'excitation de la eYFP (enhanced YFP) ou à ses différents variants : la YFP topaz^{31,48-51}, la YFP citrine⁵²⁻⁵⁴, la YFP mVenus^{55,56} et la YPet^{14,57} qui vont réémettre la lumière à 530 nm. Cette version particulièrement adaptée aux tests de saturation de BRET est caractérisée par un fort signal de BRET ainsi qu'une longue durée de vie.

Des modifications dans la structure du substrat de la *Rluc* ont pu aboutir à la deuxième génération de méthodes de BRET nommées BRET2 (**Figure 14B**). La bisdeoxy-coelenterazine (DeepBlueC™), ou la didéhydro-coelenterazine (coelenterazine-400a) sont utilisées dans ces versions et permettent un décalage de l'émission de la lumière maximale de la *Rluc* à 395 nm³⁶. Ces versions couplent la *Rluc* à la GFP2 (ou GFP10) et ont l'avantage par rapport à la version précédente, d'utiliser des partenaires possédant une meilleure séparation spectrale au niveau des pics d'excitation et d'émission. Cette version a un intérêt dans le développement de tests de criblage où des rapports signal sur bruit élevés sont requis. En revanche, elle reste limitée par l'utilisation du DeepBlueC™ qui entraîne une diminution de l'intensité lumineuse, 100 à 300 fois plus faible par rapport au BRET1. Pour remédier à ce problème et augmenter l'expression de la *luciférase*, de nouveaux mutants de

la *Rluc* ont été développés comme la *Rluc8*, un variant contenant huit substitutions d'acides aminés et possédant une émission lumineuse 6 à 8 fois plus importante que la *Rluc*. Dans cette nouvelle version eBRET2, pour enhanced BRET2 (**Figure 14C**), le signal de BRET est 5 à 30 fois plus intense que la version de BRET2³⁴ et combine la forte résolution spectrale, à un meilleur rendement quantique. Une autre version nommée eBRET (**Figure 14G**), pour BRET étendu, à ne pas confondre avec l'eBRET2, est une version améliorée de BRET1 faisant intervenir le couple *Rluc*/eYFP en présence d'une autre version de la cœlenterazine, l'EnduRen. Ce substrat permet un suivi en temps réel des interactions récepteur-récepteur pendant de longues périodes de temps, offrant ainsi une meilleure stabilité dans le temps, une méthode avantageuse pour les applications de criblage à haut débit.

Les versions de BRET1 et BRET2 restent les plus populaires et les plus couramment utilisées dans de nombreuses études d'interactions protéine-protéine notamment dans l'étude des récepteurs liés aux protéines G (RCPG). Ces protéines transmembranaires monomères très diverses portent une grande variété de fonctions et ciblent plus de 50% des médicaments du marché. Après activation du récepteur et déclenchement d'une série de processus et d'interactions dynamiques entre les ligands externes et les voies internes, le BRET est l'un des outils essentiels pour l'étude de ces récepteurs. Cependant, quand il s'agit d'imagerie cellulaire et de détection de la couche profonde des PPI, l'utilisation des méthodes de BRET1 et 2 reste limitée car grandement entravée par des systèmes d'émission à courtes ondes comme dans la plupart des tissus.

Afin d'étendre la méthode de BRET à l'imagerie cellulaire des tissus profonds et ses applications⁴¹, les versions de BRET3 à BRET7 (**Figure 14D à 14M**) ont été développées en utilisant diverses protéines fluorescentes rouges comme accepteurs fluorescents, réduisant ainsi l'autofluorescence des tests de BRET. Dans les versions de BRET3, l'utilisation d'un substrat analogue, la cœlenterazine-v permet le déplacement de l'émission de la *Rluc8* dans le rouge passant ainsi d'une longueur d'onde de 480 nm (**Figure 14D**) à 515 nm (**Figure 14F**). De plus, l'accepteur fluorescent Tag-RFP utilisé dans les versions de BRET4 et 5 (**Figure 14H, 14I et 14J**) permet un déplacement plus important de l'émission lumineuse dans le rouge⁴¹. Après la découverte de la *Rluc8* en 2007, un autre variant permettant le déplacement de l'émission lumineuse dans le rouge a été identifié la *Rluc8.6*⁵⁸. Ce nouveau mutant a été couplé à différents accepteurs fluorescents tels que des variants de la RFP, la mOrange, la TagRFP⁵⁹, et la TurboFP635⁶⁰ et différents analogues de substrats ont été testés permettant ainsi le développement des versions 4 à 7 de BRET^{40,41}.

Ces systèmes au décalage d'émission dans le rouge lointain ont été mis au point et validés dans de nombreux organismes comme celui de la souris, des plantes ou encore dans les tissus cellulaires humains. Les résultats de ces différentes versions de BRET offrent

un plus grand potentiel d'applications *in vivo* en raison du fort signal de BRET dans le rouge lointain, à forte résolution spectrale.

Enfin, une dernière version utilisant la *Rluc* ainsi que les quantum dots (QDs) comme accepteurs d'énergie a aussi été développée (**Figure 14Q**). Ces nanocristaux ont la particularité d'être excités à n'importe quelle longueur d'onde d'émission, des ultraviolets à l'infrarouge, leur émission lumineuse étant dépendante de leur diamètre. Les QDs n'ont été utilisés que dans les études de BRET1, ou ceux-ci sont directement reliés à la *Rluc* et injectés *in vivo* chez des souris⁴⁵. Une des principales limites de cette version reste la large taille des particules (de 1.5 à 6 nm), ainsi que leur incapacité à être produites en cellules vivantes. Un étiquetage moléculaire peut être réalisé *in vitro*, avec l'introduction d'un assemblage QD-*Rluc8*. Une étiquette histidine (6xHis tag) est couplée à la *Rluc8* et celle-ci peut s'associer avec le QD qui présente des groupements carboxyles en surface (QD-COOH). En présence de cations nickel (Ni^{2+}), les QD-COO⁻ vont pouvoir lier le tag histidine permettant ainsi l'interaction³⁷. L'avantage majeur de cette méthode reste la très nette séparation des pics d'émission du donneur et de l'accepteur, ce qui est très souhaitable lors de tests de criblages.

1.2.c.4.ii Systèmes de BRET avec d'autres luciférases

Un test de BRET3 utilisant la *Firefly luciferase (Fluc)* a été développé. A l'inverse de la *Rluc*, la *Fluc* oxyde la D-luciférine et génère une lumière orange à un pic d'émission de 565 nm, émission plus durable et brillante comparée à celle de la *Rluc*. Cette version est aussi adaptée aux études d'interactions protéine-protéine dans les tissus profonds et met en jeu le couple *Fluc / DsRed* (**Figure 14E**). Cette luciférase est rapidement devenue moins populaire que les versions développées avec la *Rluc* en particulier à cause de sa grande taille de 62 kDa quasiment deux fois supérieure à celle de la *Rluc* limitant ainsi son utilisation pour l'étiquetage des protéines d'intérêt. De plus, l'activité de la *Fluc* est ATP-dépendante et nécessite l'utilisation de co-facteurs et de magnésium. L'émission de cette protéine est sensible à la température et aux forces ioniques, le spectre d'émission est décalé vers le rouge si la température augmente, ce qui signifie que la distance de Förster n'est pas constante³⁸. Ces inconvénients ont entraîné le développement et l'amélioration de ces différentes versions de BRET. Néanmoins, les travaux continuent dans la recherche de la meilleure luciférase et certains essais de BRET ont pu être mis en place avec la découverte d'une nouvelle espèce marine de luciférase appelée *Gaussia luciferase (Gluc)*. La *Gluc*, de petite taille est l'une des plus petites luciférases connues (20 kDa) et comme la *Rluc* utilise également la coelenterazine comme substrat et émet de la lumière à 475 nm. La *Gluc*, lorsqu'elle est exprimée dans les cellules est aussi très brillante, 100 fois plus lumineuse que la *Rluc* ce qui en fait un outil très puissant pour les tests de BRET1. Elle peut également être

couplée à la tdTomato (**Figure 14N**). Une des limites de la *Gluc* reste son exclusivité pour la coelenterazine native : les alternatives de substrat^{39,61-63} comme la coelenterazine-h ou -v, ou le ViviRen ne sont pas compatibles avec la *Gluc*. Pourtant, la coelenterazine native reste très instable en raison de son autoluminescence et il n'existe pas encore à ce jour de mutant avec un décalage d'émission dans le rouge. Des recherches doivent être menées dans ce domaine pour promouvoir l'utilisation de la *Gluc* d'une manière plus large et plus polyvalente^{64,65}.

1.2.c.4.iii Nano-BRET

La *luciférase* idéale devrait être monomérique, de petite taille, stable, polyvalente et versatile. Une telle luciférase semble difficile à trouver dans la nature. Aussi, afin d'obtenir de meilleures candidates, la compagnie Promega a développé une luciférase artificielle, la *NanolucTM* (*Nluc*) combinant ces différents critères. Cette dernière s'est vue rapidement utilisée dans les études de BRET^{43,66}.

La *Nluc* utilise comme substrat la Furimazine, très stable, avec un temps de demi-vie de plus de 2 heures comparé à 25 min pour la coelenterazine utilisée par la *Gluc*. Cette stabilité ne permet pas seulement une observation plus longue mais aussi une plus faible autoluminescence, permettant d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit et donc une meilleure sensibilité. Dans les essais de NanoBRET la forte brillance et le faible signal de fond de fluorescence font de la *Nluc* un candidat idéal pour le couplage avec d'autres protéines fluorescentes mais aussi avec des Halo-Tag, augmentant ainsi la flexibilité des essais. Les Halo-Tag sont des protéines spécialement conçues pour être accordées à différentes fonctions. Ce ne sont pas des protéines fluorescentes mais elles peuvent le devenir par addition de dyes (partie fluorescente). En choisissant d'utiliser cette technologie en BRET, il est possible de tester différents dyes, en particulier dans le rouge lointain, dans le but d'obtenir un meilleur signal et une meilleure séparation des pics d'émission et d'excitation. Ces systèmes de *Nluc* / Halo-Tag ont généralement un rapport de BRET assez faible, la luciférase étant trop forte, diminuant ainsi le signal ratiométrique par rapport aux systèmes classiques. L'ensemble des systèmes de BRET basés sur la *Nluc* possèdent une excellente sensibilité, une bonne stabilité et une polyvalence qui en font de bons remplaçants pour de nombreux systèmes de BRET classiques basés sur la *Rluc*. Un des inconvénients de la *Nluc* néanmoins est qu'elle ne possède pas encore de version dans le rouge lointain, c'est pourquoi les systèmes de BRET utilisant la *Rluc* ou la *Fluc* sont toujours utilisés dans le cas des applications d'imagerie cellulaire *in vivo*.

1.2.c.4.iv Le système LuxBRET chez les bactéries

Même si les systèmes classiques de BRET reposant sur l'utilisation de la *Rluc* et de la *Nluc* sont très efficaces et adaptés dans la plupart des cas, ils représentent un coût très élevé en raison du substrat utilisé. La coelenterazine reste à ce jour l'un des substrats les plus coûteux du marché. De plus, ce sont des molécules sensibles à la lumière, à la chaleur et à l'oxygène ce qui implique un stockage particulier et approprié.

De tous les systèmes de bioluminescence décrits, le système de luciférase bactérienne Lux est l'un des seuls à être autonome et à pouvoir produire à la fois la luciférase et son substrat à partir d'un opéron unique. Le système Lux le plus connu provient de *Photobacterium luminescens*; il est codé par l'opéron lux, une série de cinq gènes contrôlés par un seul promoteur. Dans cet opéron, LuxA et LuxB codent pour la luciférase bactérienne LuxAB, une luciférase dimérique avec deux sous-unités de 37 et 40 kDa. LuxAB catalyse l'oxydation d'acides gras à longue chaîne comme le décanal et la flavine mononucléotide réduite (FMNH₂) pour produire une lumière cyan avec un pic d'émission à 490 nm. Le substrat de cette longue chaîne d'acides gras peut être synthétisé par une enzyme produite par les 3 autres gènes de l'opéron, et la flavine mononucléotide existe en grande quantité dans les organismes. La luciférase bactérienne n'étant codée que par deux gènes, il est également possible d'ajouter le substrat à l'extérieur pour une meilleure faisabilité des essais. En raison de la structure simple de l'aldéhyde gras par rapport à celle de la coelenterazine ou de la D-luciférine, le substrat de LuxAB peut être synthétisé à l'échelle industrielle à moindre coût. Néanmoins cette méthode de BRET possède certains désavantages dont la taille importante de la LuxAB (77 kDa) rendant, comme pour la *Fluc*, son utilisation difficile lorsqu'elle est fusionnée avec des protéines d'intérêt. De plus, comparé à la *Rluc* native, cette protéine est moins brillante et possède un rendement quantique élevé. Enfin, comme pour les autres luciférases, son émission dans le bleu rend son utilisation impossible dans les techniques d'imagerie *in vivo*.

Le point fort de cette méthode reste l'unique et irremplaçable avantage du substrat dans la mesure où les voies de biosynthèse de la coelenterazine et de la D-luciférine restent mal identifiées et pour lesquelles de nombreuses enzymes seraient impliquées. En 2003, une étude sur la luciférase bactérienne a démontré qu'un transfert d'énergie était possible entre la LuxAB et la YFP⁶⁷ et en 2014, Cui *et al.*, ont décrit le premier système de BRET basé sur l'interaction entre la LuxAB et la YFP (**Figure 14P**)⁴⁴. Ce système, uniquement conçu pour les bactéries, utilise les gènes LuxA et LuxB natifs de *Photobacterium luminescens* qui codent pour une seule protéine dans le même plasmide. L'une des protéines d'intérêt est fusionnée à l'extrémité C-terminale de LuxB et la seconde à l'extrémité N-terminale de la YFP, comme le substrat. Ce système BRET LuxAB-eYFP-décanal a été validé chez *E. coli* avec plusieurs modèles d'interactions incluant l'interaction dynamique induite par la

rapamycine entre FKBP12 et FRB. Le modèle FKBP12/FRB reste un modèle simple et robuste, classiquement utilisé dans les applications d'interactions protéine-protéine. Ce modèle a donc permis la validation de ce système de BRET avec une bonne sensibilité et une large gamme dynamique. Bien qu'il n'ait été testé que sur la bactérie *E. coli* et qu'aucune autre adaptation n'ait été validée chez les eucaryotes, de nombreux développements impliquent la LuxAB luciférase et l'expression de la Lux dans les systèmes de mammifères⁴⁴.

1.2.c.4.v Autres luciférases et accepteurs fluorescents

Le BRET reste une méthode en constante évolution, en particulier en raison de la diversité des couples de partenaires proposés ainsi que des différentes luciférases et mutations décrites précédemment. En fonction de l'étude à réaliser, il est primordial de choisir la bonne luciférase et le bon accepteur fluorescent. La palette de protéines fluorescentes disponible à ce jour permet le développement de nombreuses applications comme le suivi des interactions *in vivo* avec le développement des protéines de la famille des RFP (**Figure 15**). Le meilleur couple donneur/accepteur n'a pas encore été identifié mais les recherches dans ce domaine continuent de progresser^{58,68}.

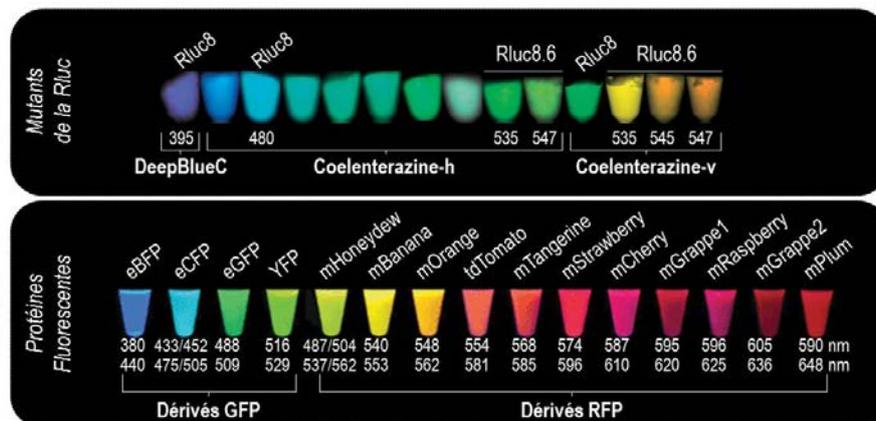


Figure 14 : Mutants de la *Rluc8* et différents substrats utilisés dans les études de BRET
Palette des protéines fluorescentes disponibles. Adapté de Shaner et al., 2005⁶⁸ et de Loening et al., 2010⁵⁸.

1.2.c.5 **Nano-lanternes**

Basées sur la technique de BRET, des protéines chimériques de fusion ou Nano-lanternes ont récemment été développées. La première Nano-lanterne à avoir été conçue est la YNL pour Yellow Fluorescent Nano-lantern. La YNL associe la *Rluc8* à la protéine fluorescente mVenus (**Figure 16A**). Plusieurs propriétés ont été combinées pour rendre cette protéine 10 fois plus lumineuse qu'une fusion directe entre un accepteur et un donneur d'énergie, avec l'utilisation de la mVenus, un mutant de la protéine fluorescente YFP possédant des propriétés de maturation supérieures à celle de la YFP^{69,70}. Egalement,

l'utilisation d'un variant de la *Rluc8*, muté S257G, génère une activité enzymatique 1.3 fois plus élevée qu'avec la *Rluc8* native. Enfin, le choix d'un linker approprié entre les deux partenaires pour faciliter le transfert d'énergie⁷¹.

Par la suite, deux nouvelles Nano-lanternes ont été développées. Dans la CNL, ou Cyan Nano-lantern, la mVenus est remplacée par la protéine mTurquoise, une protéine fluorescente au fort rendement quantique (**Figure 16B**). Cette nouvelle CNL est 20 fois plus brillante que la *Rluc*. Une autre version nommée ONL, pour Orange Nano-lantern, a aussi été mise au point pour l'imagerie des tissus profonds. Plusieurs combinaisons de donneurs ont été testées, incluant différentes versions de la *Rluc8* et différents accepteurs fluorescents émettant dans l'orange et le rouge. La combinaison entre la *Rluc8.6* et la mKusabiraOrange2 a montré la meilleure efficacité de BRET ; ce variant orange brille plus faiblement que la YNL mais toujours 15 fois plus que la *Rluc* native (**Figure 16C**)⁷².

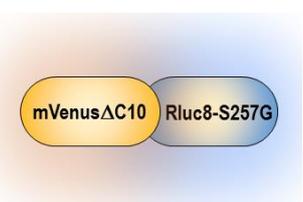
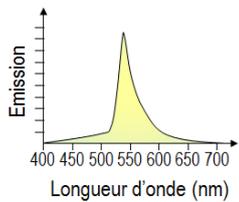
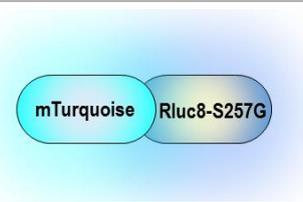
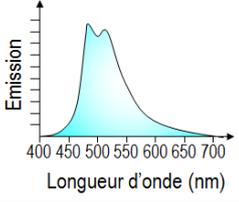
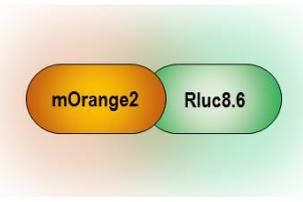
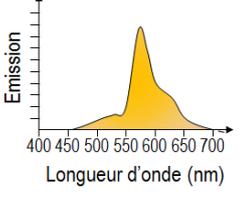
	Nanolanterne	Propriétés spectrales	Applications	Référence
A.	 <p>YNL</p> <p>mVenusΔC10 Rluc8-S257G</p>	 <p>Emission</p> <p>Longueur d'onde (nm)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Localisation de structures cellulaires -Visualisation des organelles -Imagerie <i>in vivo</i> 	71,72
B.	 <p>CNL</p> <p>mTurquoise Rluc8-S257G</p>	 <p>Emission</p> <p>Longueur d'onde (nm)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Localisation de structures cellulaires -Visualisation des organelles -Imagerie <i>in vivo</i> 	72
C.	 <p>ONL</p> <p>mOrange2 Rluc8.6</p>	 <p>Emission</p> <p>Longueur d'onde (nm)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Localisation de structures cellulaires -Visualisation des organelles -Imagerie <i>in vivo</i> 	72

Figure 15 : Développement des Nano-lanternes

Chaque version est caractérisée par un couple donné de partenaires compatibles pour le BRET. Propriétés spectrales et applications. Adapté de Saito *et al.*, 2012⁷¹ et de Takai *et al.*, 2015⁷².

Ces Nano-lanternes peuvent être utilisées dans diverses applications en tant que protéines de fusion pour la localisation de certaines structures cellulaires. Lorsqu'elles sont exprimées en cellules HeLa, une image de qualité comparable à celle des images de fluorescence est obtenue. De plus, ces Nano-lanternes, fusionnées à des signaux de localisation subcellulaires, ont donné une visualisation claire des organelles comme le cytoplasme, la mitochondrie ou encore le noyau des cellules vivantes. Elles sont également adaptées à la visualisation de structures plus fines comme les microfilaments ou les

microtubules. Des essais d'imagerie en cellules vivantes ont aussi été menés pour l'étude de structures cellulaires avec la ONL (lysosomes, peroxysomes). La dynamique rapide des peroxysomes et des lysosomes a pu être étudiée et les trajectoires suivies pendant plusieurs minutes et ce, jusqu'à 4 heures après l'addition du substrat.

Les Nano-lanternes ont toute leur importance dans les études d'imagerie *in vivo*. Elles ont notamment été utilisées dans la détection de tumeurs invasives chez les souris vivantes, pour la recherche de métastases et le criblage de molécules anti-cancéreuses. L'implantation de cellules de l'adénocarcinome du colon 26 exprimant stablement la Nano-lanterne YNL ou la *Rluc* native chez des souris nues BALB/c a été réalisée. L'augmentation de la brillance due à l'utilisation des Nano-lanternes a permis le suivi des tumeurs un jour après transplantation et cela jusqu'à 17 jours après l'implantation. En comparaison à de précédentes études, l'imagerie cellulaire de souris non anesthésiées n'était possible que pour des souris nues à larges tumeurs, exposées à des temps prolongés (160 à 200 unités contre 33 unités dans le cas des Nano-lanternes) (**Figure 17**).

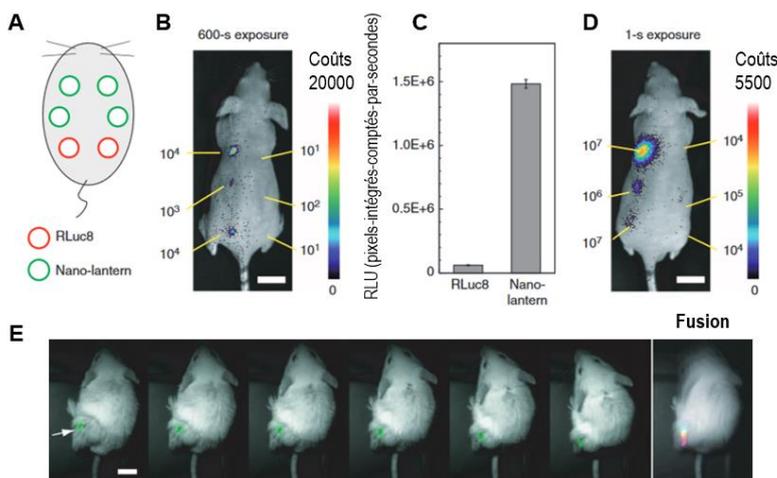


Figure 16 : Imagerie de luminescence de souris BALB/c exprimant des tumeurs

A] Position des cellules 26 du colon exprimant les Nano-lanternes (en vert) ou la *Rluc8* (en rouge) dans des souris transplantées, vue dorsale. **B]** et **D]** Images représentatives de la luminescence du nombre de cellules injectées à 600 et 1 seconde d'exposition. **C]** Comparaison en énergie relative des Nano-lanternes et de la *Rluc8*. **E]** Images extraites de vidéos de souris vivantes exprimant des tumeurs. En gris est donné le signal luminescent tous les 60 millisecondes et une série de pseudos couleurs a été réalisée pour l'obtention d'une image de fusion (bleu, cyan, vert, jaune, rouge et magenta). Barre d'échelle 1cm ^{71,72}.

Ces sondes bioluminescentes possèdent donc un avantage majeur dans les techniques d'imagerie en temps réel des structures en cellules vivantes, avec une résolution spatiale équivalente à la fluorescence, mais aussi dans la détection et plus particulièrement l'analyse de tumeurs et de métastases chez des souris vivantes, non anesthésiées.

1.2.c.6 Avantages du BRET

De toutes les méthodes de RET, la méthode de BRET possède le plus d'avantages, faisant de cette technique la meilleure candidate pour le développement de tests de criblages. Dans le cas du FRET, le donneur d'énergie doit être excité par une source lumineuse, ce qui n'est pas le cas du BRET. En raison du chevauchement des pics d'émission et d'absorption des mutants de la GFP, l'excitation par la source lumineuse entraîne souvent l'excitation simultanée du donneur et de l'accepteur. La quantification du

transfert d'énergie reste plus évidente avec le BRET : une expression relative des niveaux d'expression du donneur et de l'accepteur pouvant être quantifiée indépendamment. La supériorité du BRET a également été démontrée lors du développement d'immunoessais. La concentration en antigène est déterminée en quantifiant la réassociation induite des chaînes légères d'une immunoglobuline marquée avec des protéines bioluminescentes et fluorescentes. Quand le BRET a été utilisé à la place du FRET, un signal a été détecté en présence d'une concentration en donneur 40 fois moins importante. Cette concentration moindre de partenaire en l'absence d'antigène permet la détection d'une plus faible concentration d'antigène. A essai identique, ces expériences ont pu démontrer que le BRET s'avère être 10 fois plus sensible que le FRET (notamment avec le BRET1 et la *Rluc8*), permettant ainsi l'utilisation de récepteurs endogènes (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Comparaison des méthodes de FRET et de BRET

	Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)
Avantages	-Très bonne résolution subcellulaire	-Pas d'excitation du donneur d'énergie -Aucune autofluorescence des cellules (luminosité faible) -Facilité d'interprétation -10 fois plus sensible pour des signaux d'expression physiologique identique
Inconvénients	-Excitation simultanée du donneur et de l'accepteur -Autofluorescence des cellules lors de l'excitation -Interprétation des résultats plus difficile -Moins sensible, expression plus forte des protéines de fusion	-Résolution subcellulaire plus faible

Criblage à haut/moyen débit très difficile

Criblage à haut/moyen débit possible

Le BRET est donc un outil particulièrement adapté à réalisation de diverses applications telles que le dosage de composés, l'étude de l'oligomérisation des récepteurs, l'étude de l'activation de voies de signalisation ou encore la recherche d'inhibiteurs ou d'activateurs de protéases, des applications compatibles avec les techniques de criblage à haut débit⁷³, et en fait une méthode de choix pour les études de criblages.

I.3 Systèmes rapporteurs

De nombreux phénomènes physiologiques comme la communication, le développement cellulaire, la régulation de la croissance, la prolifération, ou l'oncogénèse sont des phénomènes contrôlés par des jeux d'expression génique différents. Pour obtenir des informations sur la relation entre l'activation, l'inhibition des différentes voies et leurs effets sur l'expression des gènes, des éléments de réponse spécifique sont fusionnées à des gènes codants pour des protéines rapporteurs⁷⁴. Classiquement, un gène rapporteur est connecté à un promoteur ou à une séquence codante d'un gène d'intérêt que ce soit chez la bactérie^{75,76}, ou dans les cellules animales ou végétales⁷⁴.

Ces gènes peuvent être utilisés comme indicateurs dans le suivi de l'activité transcriptionnelle, par quantification de l'activité enzymatique du rapporteur plutôt que la quantité d'ARNmessenger (ARNm) rapporteur ou de la protéine correspondante⁷⁷ (**Figure 18**). Ces gènes rapporteurs sont choisis en fonction des caractéristiques qu'ils confèrent aux organismes qui les expriment et sont souvent facilement identifiables ou mesurables et répondent à trois critères majeurs : i) être étranger au génome de l'hôte, ii) leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise afin de déterminer dans quel endroit de la cellule agit le gène modifié et iii) leur activité doit être quantifiable pour mesurer facilement l'activité du promoteur induisant sa modification.

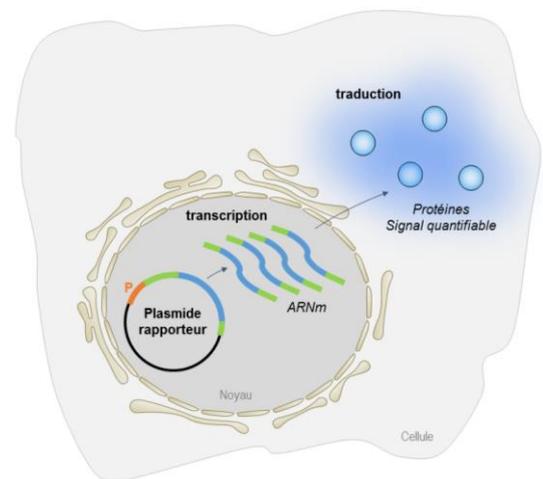


Figure 17 : Principe de l'activation d'un gène rapporteur

Le plasmide rapporteur transfecté dans les cellules exprime un taux d'ARNm sous contrôle du promoteur (orange), ces transcrits seront ensuite traduits, et un signal pourra être quantifié.

Ces systèmes sont généralement classés en deux groupes, d'une part les gènes rapporteurs dont l'expression provoque l'apparition d'une protéine quantifiable directement (par exemple protéine fluorescente) ou bien une protéine présentant une activité enzymatique (bioluminescente ou autre). Les gènes rapporteurs peuvent de plus être utilisés dans de nombreuses applications *in vitro* ou *in vivo*, le choix du rapporteur dépendra de la lignée cellulaire, la nature de l'expérience, ainsi que l'adaptabilité du test pour une détection appropriée, comme l'imagerie cellulaire⁷⁴.

I.3.a Systèmes rapporteur basés sur l'activité enzymatique

I.3.a.1 *Chloramphénicol acétyltransférase (CAT)*

Ce gène rapporteur est le premier à avoir été décrit pour l'analyse de la régulation transcriptionnelle dans les cellules de mammifères. Cette enzyme de structure trimérique possède trois sous-unités identiques de 25kDa chacune, et est relativement stable lorsqu'elle est exprimée en cellules de mammifères. Elle catalyse le transfert du groupe acétyle de l'acétyl-CoenzymeA (acétylCoA) en chloramphénicol. Après lyse des cellules par cycles de congélation/décongélation, les lysats sont mis en contact en présence de chloramphenicol radioactif et d'acétylCoA. L'enzyme CAT transfère ainsi le groupe acétylé de l'acétylCoA sur les positions 2 ou 3 du chloramphenicol. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince qui permet la séparation du chloramphénicol acétylé de la forme non acétylée. Un signal unique correspondant au chloramphenicol non acétylé est ainsi relevé. Plus le signal autoradiographique est fort, plus le niveau de transcription est élevé, révélant ainsi l'activité réelle du promoteur. Cette enzyme a été largement utilisée dans certains modèles de maladies comme l'hépatite B, les maladies cardiaques, ainsi que la pharmaco-résistance dans les bactéries. Cependant, ce test repose principalement sur des radio-isotopes, limitant son application en cellules vivantes⁷⁸⁻⁸⁰.

I.3.a.2 *β -galactosidase et opéron lactose*

L'opéron lactose, opéron indispensable au métabolisme et au transport du lactose chez certaines bactéries de la famille *d'Escherichia coli*, fait partie des systèmes rapporteurs bien décrits et code pour une enzyme la β -galactosidase. Cet opéron est organisé en plusieurs gènes codant pour différentes enzymes : LacZ (β -galactosidase), LacY (lactose perméase), LacA (thiogalactoside transacétylase) (**Figure 19A**). Ces gènes de structure sont précédés par une région responsable de la régulation responsable de leur expression qui comprend le promoteur et l'opérateur. Le gène régulateur LacI se trouve de plus en amont de cette séquence promotrice et exprime en continu, un répresseur qui bloque l'expression de l'opéron. En absence de lactose cet opéron est sous forme active, et se fixe au niveau de la séquence opérateur, ce qui empêche la fixation de l'ARNpolymérase et donc l'expression de l'opéron. En revanche, en présence de lactose, le répresseur est capable de se complexer avec un isomère du lactose ou un analogue l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), empêchant sa liaison à l'opérateur et permettant donc l'activation de la transcription du gène de la β -galactosidase. Contrairement à l'allolactose, l'IPTG n'est pas un substrat et celui-ci peut être qualifié « d'inducteur gratuit », et est non métabolisable, ce qui lui permet de rester à concentration stable dans le milieu pour une induction constante et stable. L'IPTG est donc couramment utilisé pour induire l'expression des protéines

recombinantes de divers gènes rapporteurs placées sous le contrôle du promoteur Lac. Les bactéries sont cultivées dans un premier temps en absence d'IPTG, puis l'addition d'IPTG au milieu permet d'induire la production de la protéine d'intérêt au moment souhaité⁸¹.

Basé sur le principe de l'opéron lactose, le test blanc/bleu été mis au point (**Figure 19B**). Dans ce test les souches de bactéries hôtes sont délétées du fragment alpha du gène LacZ au niveau de l'extrémité N-terminale. La souche synthétise donc un fragment inactif, et donc une β -galactosidase non fonctionnelle. Cette souche pourra être transformée avec un plasmide rapporteur d'intérêt codant pour le fragment alpha manquant du gène LacZ, et par alphacomplémentation, une β -galactosidase active pourra être synthétisée. De plus, en présence d'IPTG, et de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside), les colonies possédant le plasmide rapporteur d'intérêt apparaîtront bleues, β -galactosidase active, hydrolyse le X-gal en galactose+X, ce composé étant de couleur bleue. Les colonies transformées mais non recombinées apparaîtront quant à elles de couleur blanches.

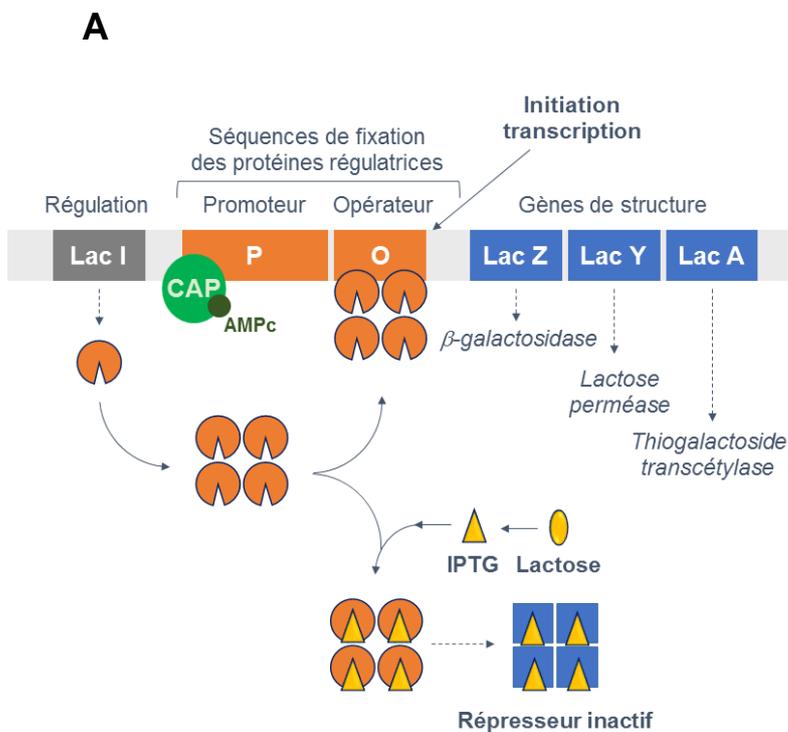


Figure 18 : Opéron Lactose et test blanc/bleu

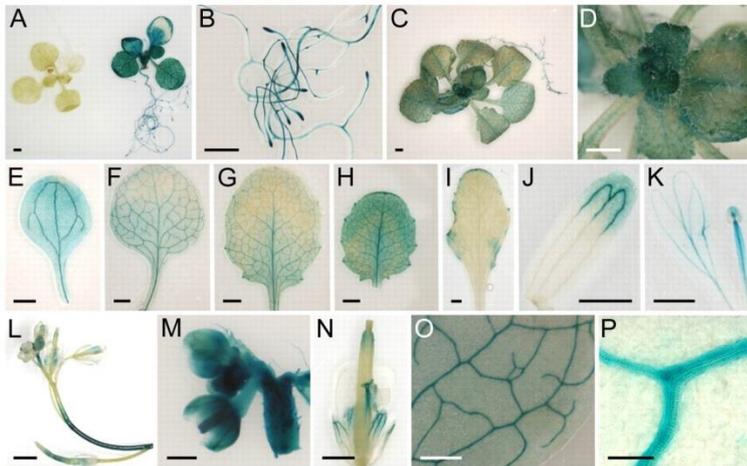
A] Principe de l'opéron lactose. En l'absence de lactose, l'opéron est sous sa forme inactive et aucune des enzymes n'est produite, l'opéron est bloqué par le répresseur. En présence de lactose, celui-ci va se lier au répresseur, supprimant toute affinité avec l'opérateur. Pour augmenter la production de lactose (environ 50 fois), la CAP (Catabolite Activator Protein) forme un complexe avec l'AMPc permettant sa fixation au brin d'ADN au niveau de l'opérateur. L'AMPc n'est présente que lorsque le glucose n'est plus disponible, accélérant ainsi positivement la production de lactose. **B]** Exemple de bactéries bleues dans le cas d'un test blanc/bleu

1.3.a.3 β -glucuronidase et gène GUS

Un autre gène provenant d'*E.coli*, le gène GUS (pour β -glucuronidase) est utilisé comme gène rapporteur. Sur le même principe que le test blanc/bleu, une coloration bleue sera mise en évidence si le gène d'intérêt est exprimé. Le substrat de ce gène est le X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Glucuronic acid) qui après clivage produit un précipité bleu insoluble à 37°C. A l'origine, ce gène a été découvert par Richard Anthony Jefferson⁸² à l'Université de Boulder, et son application a été utilisée dans la recherche de pathogènes

végétaux viraux, les plantes, les levures ou encore les champignons. De nombreux exemples ont été décrits dans la littérature, la **Figure 20** donne un aperçu de la coloration bleue dans le cas d'une étude du gène *hemivenata-1*⁸³.

Figure 19 : Exemple du motif d'expression du gène *hemivenata-1* découvert par le transgène PETA2-GUS



A] Coloration GUS des plantules portant à droite le transgène PETA2-GUS. **B]** Racines, **C]** Rosette, **D]** Rosette agrandie, **E]** Cotylédon, **F, G et H]** Septièmes feuilles végétatives **I]** Feuille caulinaire, **J]** Sépale, **K]** Pétale et étamine **L]** Inflorescence, **M]** Feuilles immatures, **N]** Fleur mature **O et P]** Détails de la nervation d'une première feuille. Images de plantes transgéniques⁸⁴

***1.3.a.4* Systèmes rapporteurs bioluminescents**

Les systèmes rapporteurs bioluminescents ou luciférases possèdent de nombreux avantages dans la quantification du niveau d'expression des gènes et des protéines. Comme développé précédemment (**cf. 1.2.c**), ceux-ci ont l'avantage, en comparaison aux systèmes fluorescents, de posséder un faible niveau de bruit de fond. La détection du signal de bioluminescence s'effectue dans l'obscurité complète par un détecteur de lumière, la réaction luciférine-luciférase (*Rluc*, *Nluc*, *Gluc*...) émettant de la lumière dans les cellules ou tissus. De ce fait, un niveau d'expression génique plus faible pourra être détecté par ces systèmes en comparaison aux protéines fluorescentes⁸⁵. Plusieurs systèmes rapporteurs bioluminescents ont donc vu le jour ces dernières années en fonction de l'application souhaitée.

***1.3.a.4.i* Luciférases de type « Flash and Glo »**

Comme pour les études de BRET de nombreuses luciférases ont été clonées et utilisées à partir de différents organismes marins ou coléoptères. Les luciférases les plus couramment utilisées restent la *Rluc*, la *Fluc* et la *Nluc* ainsi que les luciférases dites *click beetles* qui offrent une large gamme d'option de couleurs lumineuses. L'aequorine est également utilisée dans le suivi des concentrations de calcium intracellulaire. Les systèmes rapporteurs luciférases ont pu être développés en fonction de leur cinétique et regroupé en luciférase de type « Flash » ou « Glo ». Par exemple, une luciférase de type « Flash » comme la *Rluc* ou la *Gluc* va générer une bioluminescence de haute intensité en très peu de temps (environ 10 secondes)^{86,87} alors que des luciférases de type « Glo » telles que la *Fluc*

ou la luciférase bactérienne Lux génèrent une bioluminescence stable et de plus longue durée (plus de 30 minutes)⁸⁸. Les luciférases de type flash ont un intérêt dans la quantification en un point précis de temps, mais leur brillance est plus appropriée dans l'enregistrement à long terme dans certaines applications comme l'étude des rythmes circadiens⁸⁹.

De plus, les luciférases natives telles que la Fluc et la Rluc ne sont pas optimisées en tant que rapporteurs et ses protéines ont pu être améliorées pour favoriser leur expression dans les systèmes rapporteurs. L'optimisation de certains codons a permis d'améliorer ces protéines et des séquences de transcription non nécessaires ont été éliminées permettant l'obtention d'un système d'expression plus spécifique en cellules de mammifères.

1.3.a.4.ii Tests à double rapporteurs luciférases

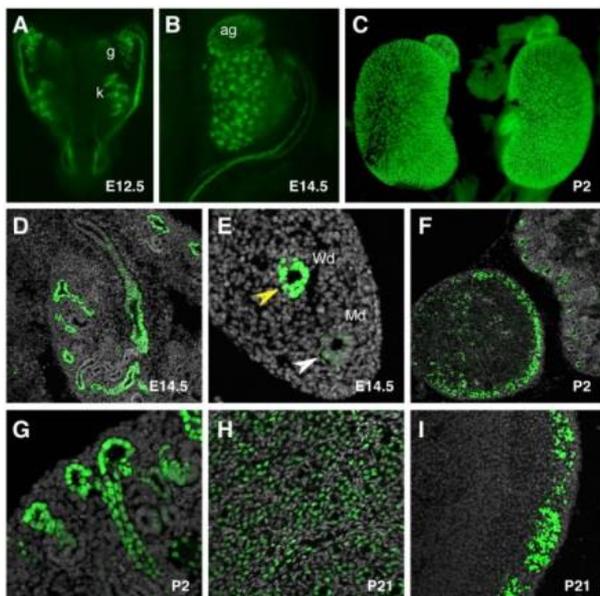
Les tests à double rapporteurs luciférase peuvent permettre d'obtenir des informations à partir de systèmes complexes par la mesure séquentielle de deux luciférases. En effet, un premier rapporteur est d'abord mesuré par ajout du premier réactif qui génère un signal luminescent pendant environ 1 minute. Après avoir quantifié cette luminescence la réaction est stoppée par un second réactif permettant la mesure de la seconde luciférase (tests développés par la compagnie Promega, France). Ces systèmes rapporteurs à double luciférase peuvent avoir leur utilité dans les essais ou les données collectées avec un seul gène rapporteur sont insuffisantes pour avoir des résultats concluants, l'une des deux *luciférases* exprimées de façon constante servant de moyen de comparaison interne.

1.3.a.5 Systèmes rapporteurs avec protéines quantifiables directement

La protéine fluorescente verte GFP est l'un des gènes rapporteurs les plus couramment utilisés dans de nombreux systèmes biologiques, car celle-ci possède de nombreux avantages dans la visualisation ou la localisation subcellulaire d'une protéine dans une cellule. La fluorescence étant brillante, il est possible d'observer finement des structures à l'intérieur des cellules telles que les noyaux ou d'autres organites. De plus, comme pour le développement des études de BRET, il existe une large palette de protéines fluorescentes⁶⁸, il est donc possible d'exprimer plusieurs gènes codants pour des protéines fluorescentes de différentes couleurs au sein d'une même cellule et de les fusionner à diverses protéines d'intérêt. Un autre avantage est l'excitation spécifique, il est en effet possible d'exciter les protéines fluorescentes dans une petite zone de tissu ou cellule spécifique par l'utilisation d'un faisceau laser. Les techniques de microscopie confocale à balayage laser à deux photons sont des techniques de fluorescence haut débit qui « effacent » la fluorescence hors foyer en excitant spécifiquement un point de l'échantillon avec un faisceau laser focalisé et générant des images 2D ou 3D par balayage.

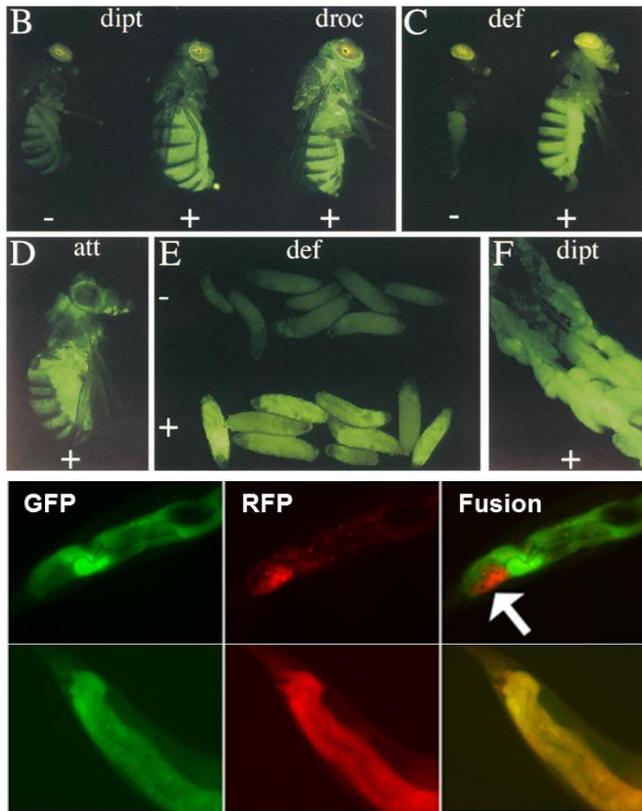
Comme pour les techniques de FRET, ce système possède quelques désavantages comme le photoblanchiment. Les fluorophores sont endommagés par les photons et perdent leur capacité de fluorescence. La phototoxicité, peut aussi être un désavantage lorsque les fluorophores sont exposés à la lumière en particulier à une énergie plus élevée, le processus tend à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent endommager l'ADN, l'ARN ainsi que les protéines par oxydation⁹⁰. Les cellules contiennent de plus, des composés naturellement fluorescent (autofluorescence), de ce fait les signaux des protéines fluorescentes doivent être suffisamment élevée par rapport à l'autofluorescence naturelle pour s'élever au-dessus du bruit de fond⁶⁸ ou suffisamment différente en terme de longueur d'onde pour être séparé par filtres optiques. Enfin, la GFP est une protéine très stable⁹¹ ce qui lui confère un avantage dans la localisation des protéines mais est cependant problématique dans la mesure de la dynamique du niveau d'expression, car les protéines préexistantes continuent de s'accumuler. Il est donc difficile de déterminer combien de nouvelles protéines ont été créés à un moment donné. La quantification de l'expression génique plus fine dans le temps est possible avec des protéines fluorescentes si une séquence de dégradation est intégrée à la protéine rapporteur, induisant une diminution de son temps de demie-vie par recrutement de la machinerie de protéolyse cellulaire. Ci-dessous **Figure 21** sont listés comme précédemment quelques exemples de gènes rapporteurs utilisés en fluorescence⁹².

Figure 20 : Quelques exemples exhaustifs de systèmes rapporteurs



Expression du gène rapporteur H2B-GFP pendant le développement du rein

Vue dorsale fluorescente à champs large du tractus urogénital E12.5 (A). Vue fluorescente à grand champ du rein et de la glande surrénale E14.5 (B) et P2 (C). Expression dans le rein : limitée aux canaux collecteurs (D). Canaux mésonéphriques et paramésonéphriques positifs pour le transgène E14.5 (E). Coupe transversale à travers la glande surrénale montrant des niveaux élevés du transgène dans la région corticale P2 (F). Cortex rénal en P2 montrant un événement de ramification. Fort grossissement du rein (H) et du cortex surrénalien P21 (I)⁹²



Construction de souches rapporteurs de drosophiles

(B-D) Induction de la réponse systémique chez les mouches transgéniques diptericine-GFP, drosocine-GFP (B), défensine-GFP (C) et attacine-GFP (D). Les mouches ont été piquées avec une aiguille inoculée avec des bactéries et examinées 48 heures plus tard. (E) Induction de la réponse systémique chez les larves défensine-GFP. Les larves du troisième stade sont naturellement infectées par *Bacillus megaterium* (1) et examinées 24 heures plus tard. (F) Expression de la GFP dans le corps gras d'une larve diptericine-GFP 24 heures après une blessure septique⁹³.

Des micrographies DIC et des images fluorescentes montrent les trois anneaux de cellules intestinales les plus postérieures (anneaux VII-IX). Sur la figure, la partie postérieure est à gauche et la partie dorsale au sommet. La rangée supérieure montre un animal exprimant deux rapporteurs multicopies. La rangée du bas montre un animal exprimant deux rapporteurs en copie unique.

En conclusion, un système rapporteur doit posséder les caractéristiques suivantes : i) s'exprimer uniformément dans les cellules hôtes, ii) générer uniquement une réponse aux effecteurs, c'est-à-dire éviter l'expression anormale d'autres gènes et iii) posséder une faible stabilité intrinsèque pour refléter rapidement la dynamique transcriptionnelle⁹⁴.

I.4 Tests d'activités protéase

I.4.a Protéases : Définition et classification

Les protéines font partie des polymères biologiques les plus stables. Les liaisons peptidiques qui les constituent sont capables de résister des heures à certains phénomènes comme l'ébullition, mais ces liaisons ne durent que quelques microsecondes en présence d'une protéase spécifique. L'étude des liaisons peptidiques et des protéases remonte au XIX^{ème} siècle avec la découverte de la pepsine par Schwann en 1836 et de la trypsine, par Corvisart en 1856. Depuis, de nombreuses protéases ont pu être identifiées dans presque tous les organismes (plantes, homme, virus). Elles jouent un rôle dans la plupart des processus biologiques et sont souvent impliquées dans un grand nombre de maladies (coagulopathies, inflammation, maladies infectieuses, cancers, maladies dégénératives, troubles cardiovasculaires...). Les protéases, peptidases, protéinases ou encore enzymes protéolytiques sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique établie entre deux acides aminés au sein d'une chaîne polypeptidique. Elles peuvent être regroupées en 6 classes et constituent l'une des plus vastes familles d'enzymes. Environ 2% des gènes du génome humain codent pour des protéases, soit un total d'environ 550 gènes. De plus, ces enzymes sont caractérisées par une grande diversité structurale et fonctionnelle⁹⁵. Le **Tableau 3**, présente les différentes classes d'enzymes ainsi que quelques exemples de protéases retrouvées dans différents types d'organismes.

Tableau 3 : Différentes familles de protéases

95-97

Famille	Organismes et fonctions	Exemples	Nombre de gènes
Aspartate protéase	-Humains -Plantes -Retrovirus	-Pepsine -Cathepsines	21
Cystéine protéase	-Plantes (croissance et développement, voies métaboliques) -Humain (sénescence et apoptose, réponse immunitaire, remodelage matrice extracellulaire)	-Papaïne -Cathepsines -Caspases -Calpaïnes -TEV protéase	161
Métallo protéase	-Humain (modification et remodelage de la matrice extracellulaire dans le développement des os)	-Métalloexopeptidases -Métalloendopeptidases matricielles	191
Sérine protéase	-Humain (digestion, réponse immunitaire, coagulation sanguine) -Maturation des virus	-Trypsine, chymotrypsine -Elastase -Thrombine -Protéase du VHC (NS3-4)	178
Glutamate protéase	-Champignons -Plantes -Humains	-Eqolisine	/
Thréonine protéase	-Humain (sous-unités catalytiques du protéasome)	-Ornithine acetyltransferase -Archaean proteasome	27

Certaines protéases peuvent être produites sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Certains zymogènes peuvent être activés par des changements environnementaux entraînant ainsi un changement conformationnel ou par la liaison d'une petite molécule ou peptide conduisant à une conformation active. Une des stratégies les plus connues d'activation du zymogène implique l'expression de la protéase fusionnée à un segment d'activation allant de 2 à 100 résidus, et empêche l'activité protéolytique avant le clivage de ce dernier⁹⁵.

I.4.b Reconnaissance et spécificité du substrat

Des efforts considérables ont été consacrés au développement de tests protéases sélectifs et robustes pour la détection quantitative des protéases et de leurs inhibiteurs. La fonction principale des protéases est d'hydrolyser une liaison peptidique entre deux acides aminés (endopeptidases) ou au niveau d'acides aminés terminaux, à l'extrémité N-terminale ou C-terminale (exopeptidase). Il en résulte la fragmentation d'une chaîne peptidique en deux plus courtes. La **Figure 22** décrit l'hydrolyse entre les positions P1 et P1' d'une chaîne peptidique. En fonction du type de protéase, le degré de spécificité du substrat peut être variable.

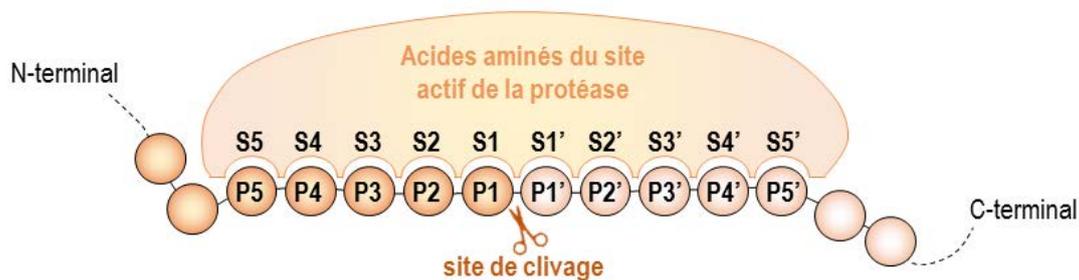


Figure 21 : Reconnaissance et spécificité du substrat pour la protéase

Dans la notation standard, le substrat est clivé entre les résidus de la position P1 (amino-terminale) et P1' (carboxy-terminale) avec P1, 2, 3... n et P1', 2', 3'... n résidus dans l'ordre croissant vers l'extrémité N et respectivement vers la terminaison C de la protéine. Les poches correspondantes de la protéase qui vont accepter le substrat sont désignées par les lettres S et S' Adapté de Drag et Salvesen, 2010⁹⁸, et Hao Ong et Yang, 2017⁹⁹.

Les protéases vont présenter différentes spécificités de substrat. Par exemple, la trypsine exige essentiellement une lysine ou une arginine en position P1. D'autres exemples comme l'antigène prostatique spécifique (PSA) reconnaissent spécifiquement la séquence d'acides aminés HSKLQ (P6-P1), tandis qu'un acide aspartique en position P10 pourra améliorer la spécificité du peptide dans le cas de la thrombine. Mécaniquement, l'hydrolyse des chaînes peptidiques par les protéases implique des interactions spécifiques entre les sites catalytiques des protéases et les acides aminés complémentaires : formation de liaisons covalentes, attractions électrostatiques, liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals. La spécificité et l'activité des protéases reposent donc sur l'hydrolyse de chaînes

peptidiques qui contiennent des séquences d'acides aminés spécifiques. En partant de cela, des substrats peptidiques spécifiques sont souvent utilisés pour détecter la présence d'une protéase cible.

I.4.c Cibler et inhiber les protéases

Les protéases, qu'elles soient d'origine cellulaire ou virale, représentent une cible pharmacologique importante en raison de leur implication dans de nombreux processus biologiques et de nombreuses maladies : la thrombine et la plasmine dans les coagulopathies et les troubles de la coagulation ; les métalloprotéinases matricielles (MMP) dans l'inflammation et le cancer ; la rénine et l'acétylcholine estérase (ACE) dans l'hypertension ; staphylococcus et streptococcus protéases dans les infections nécrotiques de la peau et la destruction de l'homéostasie ; les cystéines et cathépsines protéases et les caspases dans les cancers et maladies neurodégénérative. Et enfin les protéases virales liées aux virus de l'immunodéficience humaine et de l'hépatite C, utilisées dans les traitements de trithérapie (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Exemples de succès thérapeutiques dans la découverte d'inhibiteurs de protéases ⁹⁸

Maladie	Classe de protéase	Nom du médicament	Type de médicament	Mise sur le marché	Référence
Hypertension	ACE (Métallo)	Captopril (Capoten ; <i>Bristol-Myers Squibb</i>)	Peptidique	1981	100
	Rénine (Aspartique)	Aliskiren (Tekturna/Rasilez ; <i>Novartis/Speedel</i>)	Non peptidique	2007	101
Coagulation	Thrombine (Sérine)	Desirudine (Revasel/privask ; <i>Novartis</i>)	Peptidique	1998	102
	Facteur Xa (Sérine)	Rivaroxaban (Xarelto ; <i>Bayer</i>)	Non-peptidique	2008	103
	Thrombine (Sérine)	Dabigatran (Rendix/Pradaxa ; <i>Boehringer Ingelheim</i>)	Non-peptidique	2008	104
Cancer	Protéasome (Thréonine)	Bortezomib (Velcade ; <i>Millennium</i>)	Peptidique	2003	105
Virus de l'immunodéficience humaine (SIDA)	HIV protéase (Aspartique)	Tipranavir (Aptivus ; <i>Pfizer / Boehringer Ingelheim</i>)	Non peptidique	2005	106
Diabète	DPP4 (Sérine)	Sitagliptin (Januvia ; <i>Merck</i>)	Non peptidique	2006	107

L'objectif est alors d'identifier un inhibiteur spécifique, généralement une petite molécule, pour bloquer l'action de la protéase, la stratégie principale étant de cibler le site actif de la protéase en imitant la structure d'un substrat peptidique. Quelques exemples d'inhibiteurs détaillés dans le **Tableau 4** font partis de médicaments développés avec succès ces 30 dernières années^{95,98,108}.

Les premiers inhibiteurs de protéases ayant obtenus une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) sont des antihypertenseurs et des antiviraux. Depuis le Captopril en 1981, un inhibiteur de l'enzyme convertissant l'angiotensine (ACE) dans le traitement de l'hypertension, d'autres inhibiteurs ont pu être développés. Sur le même modèle, il existe plus de 10 médicaments autorisés ciblant les protéases des virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ou de l'hépatite C (HCV). Les inhibiteurs de protéases du HIV-1 ont joué un rôle considérable dans l'étiologie virale du SIDA en transformant cette infection mortelle, à court terme, en une maladie soignable par un traitement plus fiable et plus rapide. Depuis leur découverte, les inhibiteurs se sont avérés utiles dans d'autres zones thérapeutiques comme dans le traitement des troubles de la coagulation avec la Desirudine, inhibiteur de la thrombine, approuvé en 2000, ou encore dans le traitement du myélome multiple avec le Velcade ou Bortézomib en 2003, un inhibiteur du protéasome. Ces quelques exemples restent une petite fraction des découvertes dans ce domaine, mais la recherche des cibles de protéases et la diversité des pathologies dans lesquelles les protéases sont impliquées sont importantes.

I.4.d Développement de tests protéases

En terme de classification, les tests protéases peuvent être différenciés en tests d'affinité et d'activité. Pour les tests d'affinité, la détection et la quantification sont basées sur la présence de la protéase, quelque soit son niveau d'activité. En revanche, les tests d'activité protéase sont plus adaptés dans la détection de l'activité de la protéase elle-même. Ils présentent un grand intérêt dans la relation directe entre les activités de la protéase et les maladies. C'est pourquoi, il est plus intéressant dans notre étude de les développer. Les tests d'activité protéase peuvent être divisés en deux groupes : les essais homogènes et les essais hétérogènes. Pour les dosages homogènes, substrats et échantillons sont présents en phase aqueuse alors que dans les dosages hétérogènes, les substrats des protéases sont souvent immobilisés sur une plateforme solide quand les échantillons à étudier sont présents en phase aqueuse. Ces tests vont donc regrouper tous les tests de capteurs de protéase à base électrochimique, de résonance plasmonique de surface SPR, de capteurs de spectroscopie Raman à surface renforcée (SERS), les essais de protéase enzymatique et les analyses LC à base de cristaux liquides. Le but de la thèse étant d'adapter une sonde BRET à un test de suivi protéase, notre intérêt sera porté uniquement sur les tests d'activité

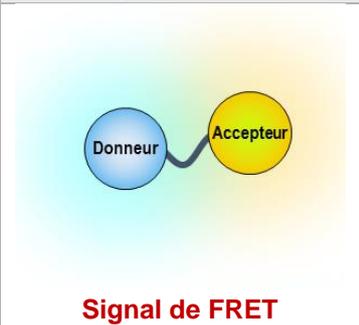
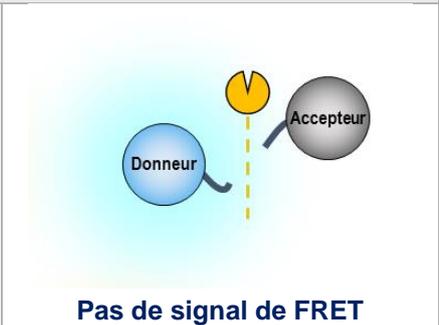
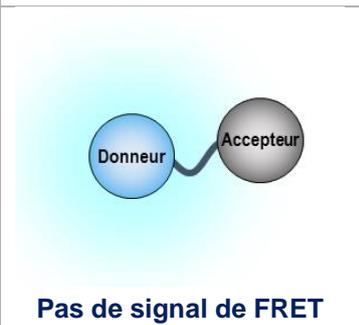
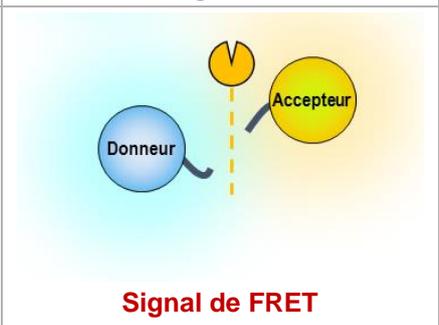
protéase homologues regroupant les dosages colorimétriques et par spectroscopie de masse, la polarisation de fluorescence et surtout les méthodes de transfert d'énergie de résonance développées au **paragraphe I.2**⁹⁹.

I.4.d.1 Essais développés en RET

Comme détaillé dans le chapitre précédent, un nombre croissant de publications décrit l'utilisation de sondes RET dans les tests de proximité, pour l'étude des interactions protéine-protéine. Ces tests de proximité sont également mis en oeuvre pour les essais de complémentation¹⁰⁹ ainsi que dans les tests protéase¹¹⁰. Les tests protéases permettent alors de suivre l'augmentation ou la diminution d'un signal de RET suite à la dissociation du complexe donneur-accepteur par clivage protéolytique.

I.4.d.1.i FRET et tests d'activité protéase

En raison de la proximité du donneur et de l'accepteur, les tests de FRET sont couramment utilisés dans la recherche d'inhibiteurs et dans les tests protéases. Dans ces tests, donneur et accepteur sont séparés par un petit peptide portant le site de reconnaissance de la protéase. En absence de protéase, une interaction a lieu et un signal de FRET est mesurable ; la présence de la protéase entrainera le clivage et la dissociation des deux partenaires d'où une diminution du signal de FRET. Différents donneurs et accepteurs peuvent être utilisés : des molécules organiques (**Figure 23A et 23B**), des nanomatériaux (**Figure 23C**). Plusieurs exemples de tests protéases développés en FRET sont représentés avec pour chaque type de molécule utilisée des exemples de protéases cellulaires ou virales⁹⁹.

	Molécule	Test protéase FRET		Exemples et références
A.	Protéine fluorescente et/ou organique dye			Protéases cellulaires -Caspase 3 ^{111,112} -TEV protéase ¹¹³ -SEN1 (SUMO) ¹¹⁴ Protéases virales -Human Enterovirus (HEV) ¹¹⁵ -Hepatitis C virus (HCV) ¹¹⁶
				Protéases cellulaires -Métalloprotéinase matricielle ^{117,118} Protéases virales -Chikungunya virus (ChikV) ^{119,120} -Human Immunodeficiency virus (HIV) ^{121,122}

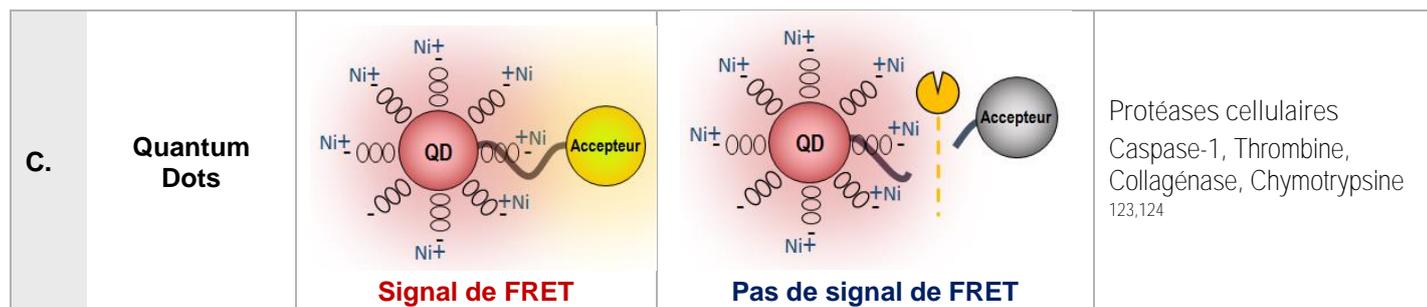


Figure 22 : Exemple de différents tests protéases appliqués à la technique de FRET

A et B] Utilisation de donneurs et d'accepteurs organiques (protéines fluorescentes, organique dye, quencher) ou C] Utilisation de nanomatériaux (Quantum Dots). Adapté de Hao Ong and Yang, 2017⁹⁹.

1.4.d.1.ii BRET et tests d'activité protéase

Comme pour le FRET, cette méthode de RET permet la mise en place et le suivi de tests à activité protéase. Basé sur le même principe, l'introduction d'un petit peptide spécifique d'une protéase entre les deux partenaires permet le suivi par diminution du signal après clivage par la protéase. De nombreuses combinaisons ont également pu être développées dans la recherche d'inhibiteurs de protéases virales ou cellulaires (**Figure 24**).

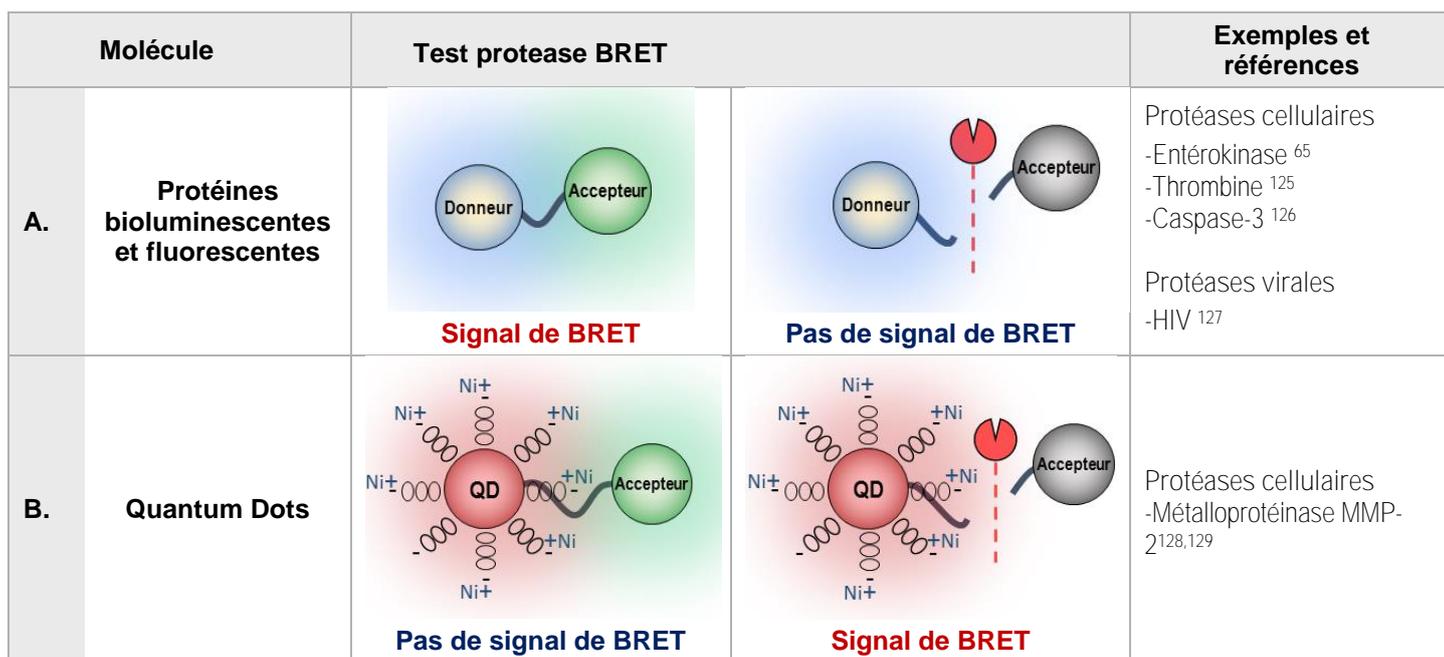


Figure 23 : Exemple de différents tests protéase appliqués à la technique de BRET

A] Utilisation de donneurs et d'accepteurs organiques (protéines bioluminescentes et fluorescentes) ou B] Utilisation de nanomatériaux (Quantum Dots). Adapté de Hao Ong and Yang, 2017⁹⁹.

Les stratégies de développement de tests ciblant les protéases sont nombreuses et se sont avérées utiles dans la découverte d'inhibiteurs de protéases. Des protéases d'une grande spécificité ont été utilisées comme outils pour la suppression de certains tags d'affinité (étiquettes) ou dans la suppression de séquences. De nombreuses protéases telles que le facteur Xa, les entérokinases, les métalloprotéinases, les entérokinases ou encore la

thrombine peuvent ainsi être utilisées dans différents tests, comme décrit précédemment (**cf. I.4.d.1.ii**). En revanche, il arrive que des protéases manquent de spécificité et peuvent conduire à des effets non spécifiques. Les protéases virales ont également été beaucoup utilisées comme la protéase 3C des rhinovirus ou encore la protéase TEV du Tobacco Etch Virus¹²⁸. Il a alors été mis en évidence des protéases appropriées (i) hautement actives à pH neutre, (ii) présentant une forte spécificité de substrat, sans substrat endogène dans les cellules de mammifères et (iii) bien tolérées par les cellules de mammifères après surexpression. La protéase TEVp du virus de la gravure du tabac (Tobacco Etch Virus) s'est avérée être un bon candidat en raison d'une forte activité et d'un clivage très spécifique, la rendant plus stringente comparativement aux autres protéases. Cette protéase est en outre l'une des rares à combiner diverses caractéristiques applicables à des tests *in vitro* et *in vivo*¹²⁹.

I.4.e TEV protéase

I.4.e.i Origine

La protéase TEV du Tobacco Etch virus fait partie de la famille des *Potyviridae*, virus responsables de nombreuses infections des espèces végétales. Le génome du virus TEV est un ARN monocaténaire de polarité positive (+) de 9500 nucléotides qui code pour une polyprotéine de 3054 acides aminés. Cette polyprotéine donne, après infection des cellules, 10 produits matures ainsi que 3 protéases virales dont la TEVp¹³⁰ (**Figure 25A**).

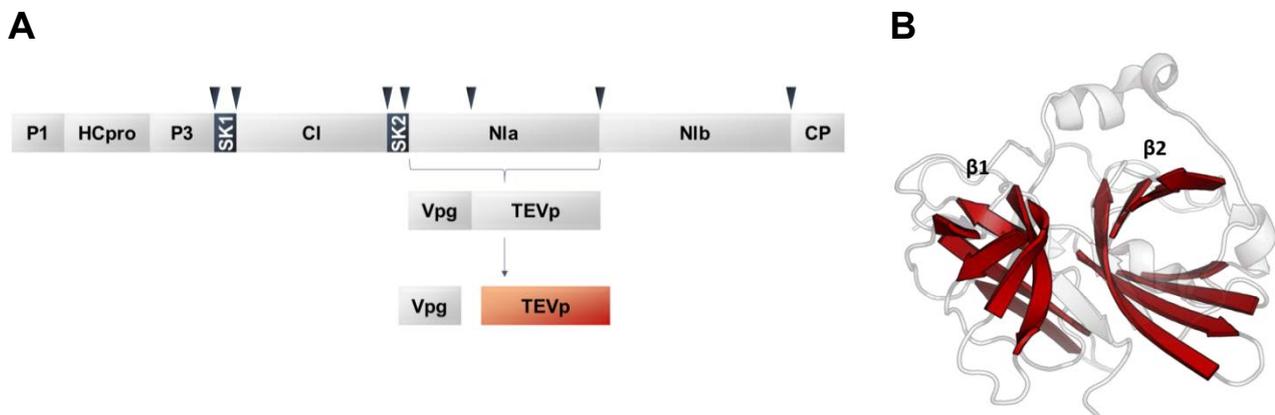


Figure 24 : Protéase du Tobacco Etch Virus

A] Polyprotéine clivée par la TEVp aux sites indiqués par un triangle bleu. Le précurseur Nla de 49kDa est clivé en protéine Vpg et TEVp. P1 : Sérine protéase ; HCpro : composant auxiliaire pour la transmission des pucerons ; P3 : protéine P3, 6K1 et 2 ; CI : inclusion cylindrique ; CP : protéine de couche ; Vpg : protéine virale liée au génome d'inclusion nucléaire Nla et Nlb. Adapté de Cesaratto *et al.*, 2016¹²⁹. **B]** Structure cristallographique de la TEVp présentant les deux tonneaux β caractéristiques de la superfamille de la chymotrypsine. Adapté de Shafee 2014¹³¹.

Cette protéase d'inclusion nucléaire Nla traite la plus grande partie de la polyprotéine¹³². Le précurseur Nla est clivé dans le domaine N-terminal en deux protéines : la Vpg, de 21kDa, et la protéase virale TEVp d'une longueur de 27kDa¹³³. La TEVp

appartient à la famille des peptidases C4 et est structurée en tonneaux β à deux domaines antiparallèles (**Figure 25B**)¹³⁴. Elle possède de fortes homologues avec la famille des protéases à sérine malgré la présence d'un acide aminé cystéine à la place d'une sérine. Son noyau catalytique est composé d'un résidu histidine en position 46 (H46), d'un acide aspartique en position 81 (Asp81) et d'une cystéine en position 151 (C151). Le remplacement du résidu cystéine par un résidu alanine (mutation C151A) abolit l'activité de la protéase TEV^{129,135}.

Le site de reconnaissance de la protéase TEV est constitué de 7 acides aminés dont le motif de reconnaissance correspond à la séquence EXXYXQ/G ou S. Le clivage peut avoir lieu entre les acides aminés Q et G ou Q et S, et X peut correspondre à n'importe quel autre acide aminé¹³⁶. Il a été démontré, à partir des structures cristallographiques, que les résidus P6, P4, P3, P2, P1 et P1' du substrat interagissent directement avec la poche de liaison au substrat de l'enzyme¹³⁴. Seul le résidu P5 est exposé au substrat et tolère presque tous les autres acides aminés possibles sans conséquence sur l'efficacité enzymatique¹³⁶. La TEVp a une forte préférence pour les substrats ayant un acide aminé Glutamine (Q) en position P1, une phénylalanine (F) en P2, une tyrosine (Y) en P3 ainsi qu'une leucine (L) en P4. Les acides aminés cystéine (C) et isoleucine (I) sont aussi tolérés en position P2^{134,136,137}. Ainsi, de nombreuses combinaisons ont pu être testées et le site de clivage optimal de cette protéase correspond à l'enchaînement ENLYFQ-G / S, enchaînement qui coïncide avec le site de clivage entre les fragments protéiques N1b et CP sur la polyprotéine TEV sauvage^{138,139}. D'autres acides aminés comme l'alanine (A), la cystéine (C) ou la méthionine (M) sont également bien tolérés en positions P1' alors que la présence d'une proline (P) empêche complètement le clivage^{136,137}. Cette tolérance est due à la poche S1 de la protéase, peu profonde, qui permet une exposition partielle de la chaîne latérale des résidus P1'¹³⁴. Un mutant de la protéase nommé TEVp2 R203G et tronqué au niveau de l'acide aminé 234 a été décrit comme ayant une meilleure reconnaissance en position P1' mais la présence d'une Proline en cette position empêche le clivage par la protéase¹⁴⁰. De plus, la présence d'une proline en position P2 inhibe l'activité de la TEVp ; ceci implique que, malgré des vitesses de cinétique différentes, presque toutes les protéines fusionnées en aval d'un site de clivage peuvent être libérées par la TEVp appropriée¹²⁹. De nombreux mutants ont ainsi pu être imaginés ces dernières années en fonction des différentes applications souhaitées¹⁴¹⁻¹⁴³.

1.4.e.ii Auto-clivage

La TEVp possède une séquence d'auto-clivage au motif GHKVM/S dans sa partie C-terminale, entre les résidus 213-219, le clivage se produisant entre la méthionine (M) et la sérine (S)^{135,137}. La perte de l'activité de l'enzyme suite à son auto-clivage est due à

l'inhibition de l'activité catalytique par le peptide C-terminal clivé et non à la déficience du polypeptide TEVp plus court¹⁴⁴. La TEVp tronquée en position 218 est active à la fois *in vitro* et dans les cellules mais avec une affinité réduite pour le substrat ainsi qu'une efficacité moindre^{144,145}. Des mutations ponctuelles ont été introduites pour réduire ce phénomène d'autoclivage sans affecter l'activité protéolytique globale¹³⁷. Plusieurs mutants sur la position P1 du site d'autoclivage, en remplacement de la sérine (S) en position 219, ont été rapportés, avec les acides aminés asparagine (N), acide aspartique (G), acide glutamique (E), lysine (K), valine (V) et proline (P)¹³⁷. Cependant, seuls les mutants V, N ou P se sont montrés plus résistants que la forme sauvage, et seuls les variant S219V et S219N conservent une activité enzymatique satisfaisante en comparaison du mutant S219P beaucoup moins actif¹³⁷. D'autres mutations dans ce motif d'auto-clivage peuvent provoquer une réduction drastique de l'activité enzymatique comme les mutations V216D ou F216K^{137,144}. Une autre alternative à cette stratégie est la version tronquée notée TEV⁺¹⁴⁶ dont la séquence C-terminale a été retirée (acides aminés 235-242). Celle-ci s'est avérée plus performante que la TEVp de type sauvage chez la levure et a été décrite comme ayant la même efficacité^{129,140}.

I.4.e.iii Approche Split-TEV

Comme d'autres protéines, la TEVp peut être séparée en deux protéines non fonctionnelles qui après réassociation et complémentation des deux moitiés donneront une protéine fonctionnelle ayant une activité enzymatique dans ce cas précis. Ce système de complémentation ou PCA (Protein Complementation Assay) est utilisé dans le suivi des interactions protéine-protéine¹⁴⁷ (**Figure 26A**).

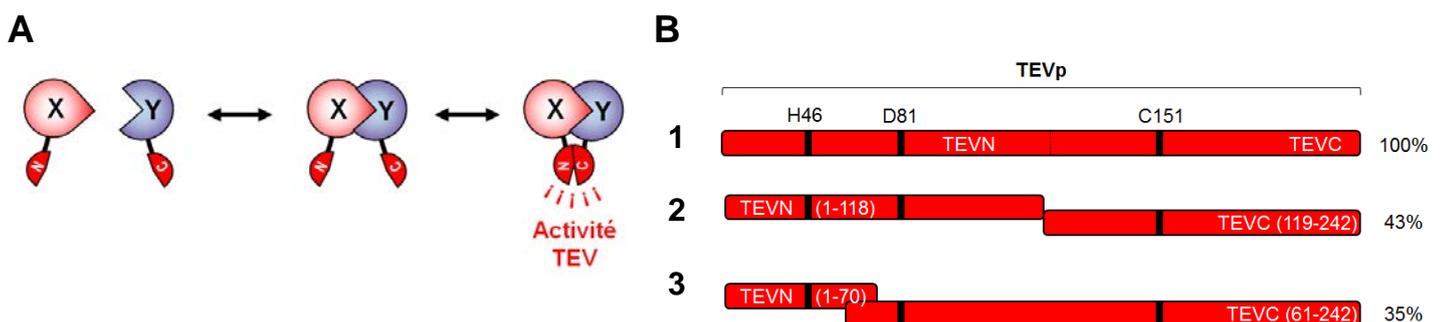


Figure 25 : Approche Split-TEV

A] Principe de l'approche Split-TEV pour étudier les interactions protéine-protéines. Lors de l'interaction les protéines (ou fragments X et Y) sont rapprochées ainsi que les moitiés TEVN et TEVC reconstituant ainsi l'activité protéolytique. **B]** Représentation schématique des différentes formes de protéases TEV clivées en deux. Adapté de Wehr et al., 2006¹⁴⁸

Deux TEVp ont été développées dans les essais de PCA¹⁴⁸. La protéase a d'abord été coupée en deux moitiés identiques entre les acides aminés 118 et 119 : N-TEVp(1-118)/C-TEVp(119-242) (**Figure 26B-2**) mais également après les 70 premiers acides

aminés, avec une version N-TEVp beaucoup plus courte que la précédente ainsi qu'un chevauchement d'une dizaine d'acides aminés entre les deux moitiés : N-TEVp (1-70)/C-TEVp (61-242)¹⁴⁸ (**Figure 26B-3**). L'activité catalytique retrouvée après réassociation est cependant plus faible que celle de la protéase entière (35 à 43%). La restauration de cette activité enzymatique peut être suivie dans un second temps par des systèmes rapporteurs directs ou indirects tels que les systèmes luciférases¹⁴⁹, les techniques de FRET¹⁵⁰ ou encore l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur^{129,148,149,151}. Cette technique a facilité l'analyse des interactions protéine-protéine avec l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G et leurs interactions en cellules^{147,149}.

I.5 Interactions protéine-protéine

La signalisation cellulaire est régulée par de nombreuses protéines en interactions dynamiques qui véhiculent différentes informations au sein des cellules. Ces interactions protéiques ou PPI (Protein-Protein Interaction) jouent un rôle essentiel dans la plupart des fonctions et mécanismes cellulaires. Généralement un stimulus externe est transmis à la cellule qui prend en charge l'information par l'intermédiaire de nombreuses interactions protéine-protéine. Les fondements de la signalisation cellulaire reposent sur ces différentes interactions, de la différenciation, à l'apoptose ou encore à l'inflammation. Une protéine peut par exemple être transportée d'un compartiment cellulaire à un autre au travers des pores nucléaires ou des importines, elle peut également être phosphorylée dans le cas de l'activation d'une voie de signalisation (exemple des récepteurs aux tyrosines kinases ou TK). Ce type de modification peut entraîner une cascade de réactions ainsi que d'autres interactions entre protéines comme dans le cas de mécanismes comme l'apoptose. Ces interactions sont donc d'une importance cruciale au sein de la cellule et un dérèglement de celles-ci entraîne de nombreux dysfonctionnements. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir connaissance de ces mécanismes pour améliorer la compréhension des maladies et apporter des solutions dans la découverte de médicaments¹⁵². Afin de comprendre les fondements de ces interactions, de nombreuses méthodes ont été développées, avec leurs avantages et inconvénients respectifs. Cette partie regroupe les méthodes d'interaction les plus couramment utilisées en biologie.

I.5.a Co-immunoprécipitation

Le principe de l'immunoprécipitation repose sur la sélection d'anticorps spécifiques de la protéine à étudier, afin de permettre sa sélection parmi une population protéique. L'agglutination de la protéine permet l'extraction du complexe dont elle fait partie ainsi que l'identification d'autres protéines du complexe. Dans cette méthode, l'interaction entre les protéines doit être suffisamment solide pour éviter toute dissociation lors des différentes étapes de lavages et ainsi permettre l'extraction complète du complexe protéique. Le principe de cette méthode, basé sur des billes couplées à un anticorps spécifique, est représenté **Figure 27**.

Afin d'identifier les différentes protéines d'un même complexe, plusieurs précipitations avec différents anticorps peuvent être réalisées. Un anticorps donné ne sélectionne qu'une sous-population de protéines impliquées dans une interaction. Bien que l'anticorps soit présent en excès dans le milieu, celui-ci peut ne pas précipiter toutes les protéines d'intérêt si leur épitope n'est pas accessible ou masqué. Il est donc important de réaliser plusieurs immunoprécipitations afin d'identifier l'anticorps à sélectionner pour arriver à une recherche

plus fine des protéines impliquées dans le complexe. A noter que les différentes protéines peuvent ne pas faire partie d'un même complexe et interagir à différents moments.

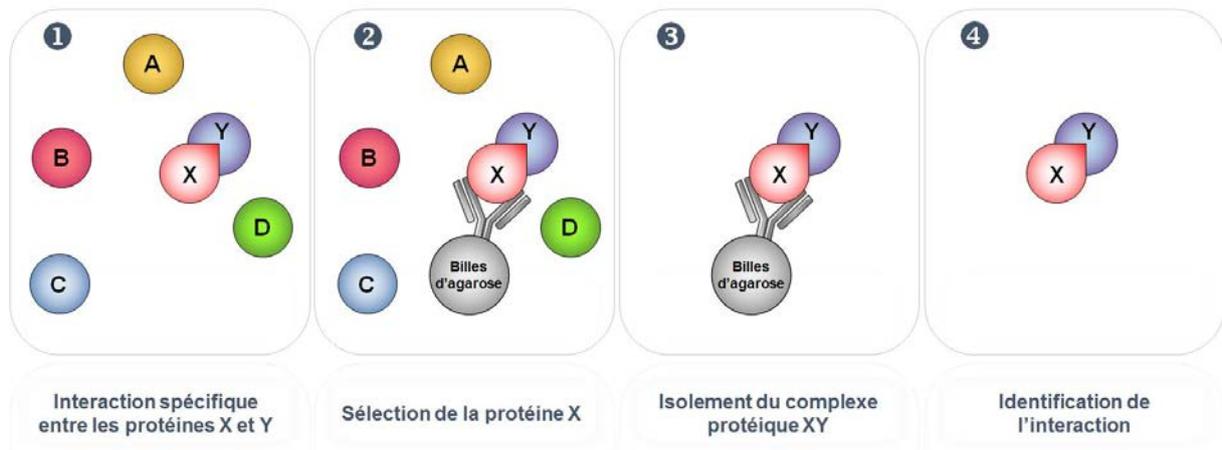


Figure 26 : Principe de la technique de Co-immunoprécipitation

❶ Interaction spécifique entre les protéines X et Y ❷ Reconnaissance de la protéine X *via* un anticorps anti-protéine X couplé à une bille d'agarose ❸ Différents lavages et étapes d'isolement du complexe protéique XY en interaction ❹ Isolement puis identification des protéines impliquées dans l'interaction¹⁵³.

I.5.b Technique GST pull-down

La technique de « GST pull-down » (Glutathione-S-Transferase pull-down) permet l'étude *in vitro* des interactions protéine-protéine présentes dans un lysat cellulaire ou sérum. Il s'agit d'une méthode complémentaire à la co-immunoprécipitation qui peut permettre de confirmer une interaction identifiée au préalable^{154–156}. Basée sur le principe de la chromatographie d'affinité, la protéine GST est utilisée comme « appât » à la place d'un anticorps (**Figure 28**). Elle est immobilisée sur une résine dite d'affinité glutathione créant ainsi un support d'affinité secondaire. Après ajout du lysat cellulaire, les protéines interagissent avec le support, et les protéines ou complexes protéiques « proies » viennent s'y fixer. La méthode d'éluion dépendra de l'affinité du ligand, des analytes compétitifs utilisés et du pH des tampons d'éluion à faible pH ou réducteurs. Les tests de pull-down peuvent également être utilisés pour déterminer le statut d'activation d'une protéine spécifique. En effet, certaines protéines sont actives en réponse à la phosphorylation de la tyrosine et peuvent être réduites en utilisant un domaine SH2 (Src Homology 2) immobilisé qui cible la tyrosine phosphorylée sur une protéine donnée¹⁵⁷.

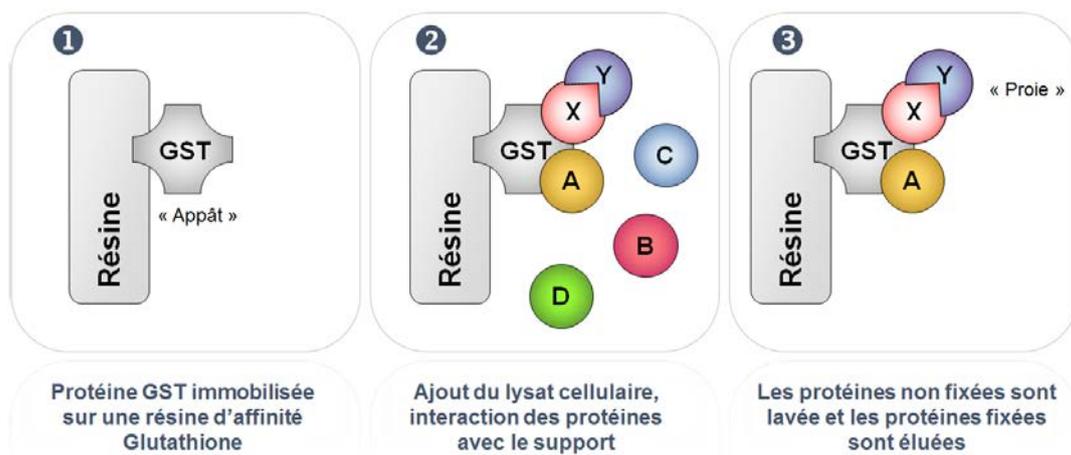


Figure 27 : Technique « GST pull-down »

La technique de GST pull-down repose sur le principe de purification par affinité à petite échelle. Ici, le système d'affinité est constitué d'une protéine GST (Glutathion S-transférase), protéine ou domaine de liaison marqué, capturée par le glutathion ou des billes d'agarose entourées de biotine. ① La protéine GST est immobilisée et utilisée comme appât sur un support résine ② La protéine est immobilisée et incubée avec un lysat cellulaire ③ Après des étapes de lavages successives à l'aide d'analytes compétitifs ou de tampons à faible pH, les complexes sont élués sélectivement pour une analyse en gel ou Western-Blot.

Tableau 5 : Exemples de supports pouvant être utilisés dans les techniques de « GST pull down »

Tag de fusion	Glutathione S-transférase (GST)	Poly-histidine (polyHis or 6xHis)	Biotine
Ligand d'affinité	Glutathione	Nickel ou cobalt	Streptavidine

I.5.c Interactions par complémentation (PCA)

Les interactions protéine-protéine peuvent être mesurées par complémentation ou PCA, pour Protein Complementation Assay (cf. **approche Split-TEV I.1.a.iii**). Dans cette stratégie, les interactions sont mesurées en fusionnant chacune des protéines d'intérêt X ou Y à deux fragments d'une protéine dite rapportrice (**Figure 29**), fluorescente ou bioluminescente, une protéase qui a été rationnellement séparée en deux parties distinctes N- et C-terminales¹⁵⁸. Au travers de l'interaction des protéines X et Y, les deux fragments se rapprochent ce qui leur permet de reconstituer les deux domaines inactifs de la protéine rapporteur qui retrouve ainsi son activité par complémentation. Le pliage et l'assemblage des protéines étant un phénomène universel, ce test de complémentation a été développé avec de nombreuses protéines telles que la dihydrofolate réductase (DHFR), la β -lactamase, les protéines fluorescentes de la famille des GFP, les luciférases ainsi que la TEV protéase (**Figure 29**). De plus, les fragments de PCA sont conçus de façon à ne pas pouvoir se compléter seuls spontanément et ainsi éviter toute interaction non spécifique. Après réassociation, les deux protéines sont généralement piégées, le complexe ne pouvant plus se dissocier. Ainsi, il a été montré que les protéines de la famille des GFP ne pouvaient pas

se dissocier¹⁵⁹, un phénomène avantageux dans l'étude des interactions rares ou transitoires. Mais, la réversibilité des tests de PCA a été observée pour les luciférases^{160,161}. Ces essais ne conviennent donc pas aux études dynamiques ou cinétiques de certaines interactions. Néanmoins, certaines réassociations peuvent être trop rapides pour détecter des associations de protéines et se produisent dans un laps de temps très court (secondes)¹⁶⁰.

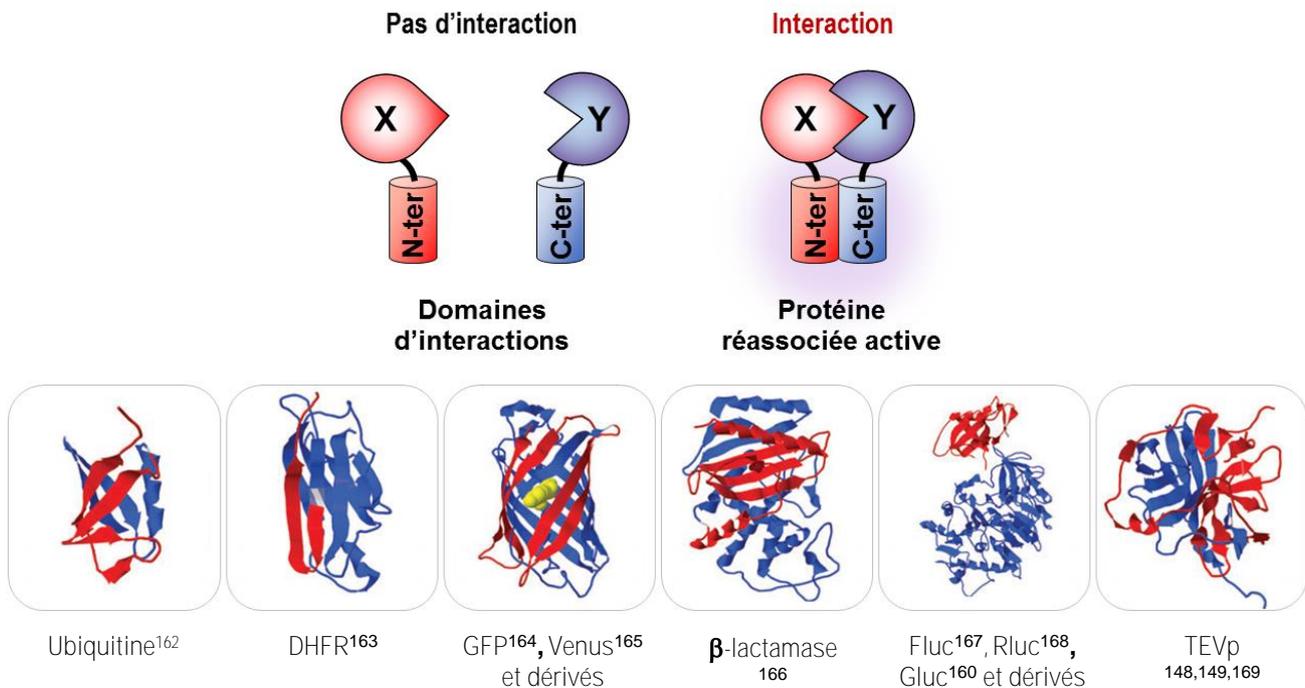


Figure 28 : Principe des tests de « Complémentation protéique »

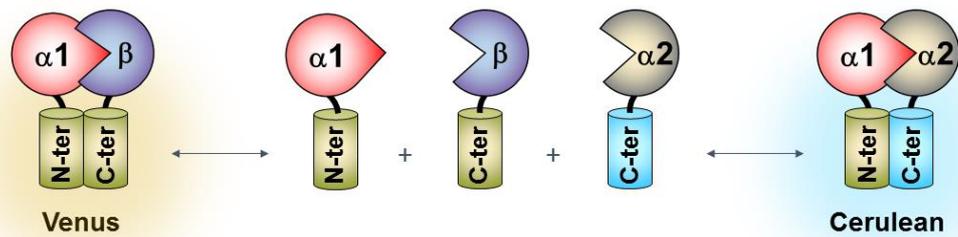
Principe des interactions de « Protéine Complémentation » et exemples associés. Les protéines X et Y interagissent entre elles ce qui permet de rapprocher les domaines N- et C- terminaux des protéines clivées en deux. La fonction de la protéine est retrouvée après complémentation. Adapté de Kerppola TK, 2009¹⁶² et Shekhawat et Ghosh, 2011¹⁷⁰

Ce système de complémentation possède de nombreux avantages de par la détection directe des interactions moléculaires. Les protéines sont exprimées dans un contexte cellulaire natif reflétant le processus post-traductionnel natif. Les perturbations des interactions induites par les hormones, les médicaments, les modifications géniques ou l'influence de facteurs environnementaux peuvent être détectés donnant des indications sur la validation de la cible en reliant des interactions biologiques à des processus spécifiques. Les localisations subcellulaires ainsi que les translocations de complexes protéiques peuvent aussi être mise en évidence. Enfin, ces tests sont peu coûteux et facilement adaptables au criblage à haut débit.

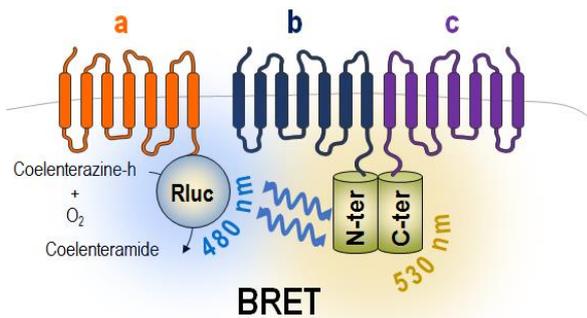
Un essai de complémentation très utilisé est retrouvé sous le terme Biomolecular Fluorescence Complementation (BiFC). Dans ce cas, la technique fait référence à l'interaction entre deux fragments non fluorescents d'une protéine fluorescente dont le

rapprochement va restaurer l'activité fluorescente de la protéine. La forte fluorescence intrinsèque alors émise permet la visualisation directe de l'interaction protéique. En effet, celle-ci est détectée sans addition d'agents fluorogènes ou chromogènes, évitant ainsi les problèmes de stress cellulaire ou de potentiels provoqués par des distributions inégales de substrats. Cette technique permet également d'observer les cellules vivantes en cinétique au fil du temps¹⁷¹.

A



B



C

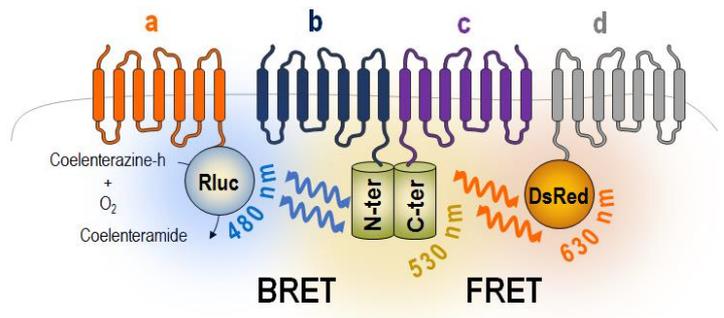


Figure 29 : Exemples d'essais de complémentation de fluorescence

A] Etude du récepteur CD8 à la surface des lymphocytes T. Différenciation des formes CD8 $\alpha\alpha$ et CD8 $\alpha\beta$ par reconstitution de deux protéines fluorescentes différentes : Venus et Cerulean en fonction de la forme du récepteur. Adapté de Rybakin *et al.*, 2011¹⁷². **B]** et **C]** Etude de l'oligomérisation des récepteurs aux protéines G par complémentation de fluorescence couplée aux techniques de BRET et FRET. Adapté de Vidi et Watts, 2009¹⁷³.

La complémentation par fluorescence a été utilisée avec le récepteur CD8 (Cluster Differentiation 8) s'exprimant à la surface des lymphocytes T du système immunitaire, pour différencier les formes CD8 $\alpha\alpha$ et CD8 $\alpha\beta$ lors de la reconnaissance de l'antigène à la surface des cellules (**Figure 30A**)¹⁷². Grâce à l'association des formes $\alpha\alpha$ ou $\alpha\beta$, une fluorescence différente est émise selon le type de complémentation reconstituée (protéine Venus ou Cerulean). De la même façon, l'étude de l'homodimérisation des récepteurs aux protéines G a fait appel à la complémentation par fluorescence couplée aux techniques de BRET (**Figure 30B**) et de FRET (**Figure 30C**)¹⁷³. En reconstituant la protéine fluorescente Venus, un signal de BRET peut être mesuré.

I.5.d Système double (Y2H) et triple (Y3H) hybride chez la levure

Découvert à la fin des années 1980 par Stanley Fields et Ok-Kyu Song¹⁷⁴, le système du deux-hybrides de levure (Yeast Two-Hybrid Y2H) est l'un des outils moléculaires majeurs de l'étude des interactions protéine-protéine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette technique est basée sur l'activateur transcriptionnel GAL4 qui peut être séparé en deux domaines distincts dont la fonction sera rétablie après réassociation des deux domaines. Cependant, des facteurs de transcription possèdent deux domaines fonctionnels distincts reliés à une séquence d'ADN spécifique, ici un domaine d'activation (Activation Domain AD) et un domaine de liaison (Binding Domain BD). Dans cette méthode, détaillée **Figure 31**, deux protéines de fusion sont transfectées, l'une est liée au domaine d'activation AD (protéine Y ou « proie »), l'autre au domaine de liaison BD (protéine X ou « appât »). L'interaction s'opérant entre la proie et l'appât rapproche suffisamment les domaines AD et BD pour reconstituer l'activateur transcriptionnel GAL4 et permettre la transcription d'un gène rapporteur. Dans l'exemple présenté **Figure 31** le gène LacZ est activé ce qui permet, après croissance sur un milieu sélectif, d'obtenir des colonies bleues qui montrent/prouvent l'interaction entre les protéines X et Y et la transcription effective des gènes¹⁷⁵. Cette approche permet également de cribler des banques de gènes afin d'identifier et de cloner des protéines inconnues qui interagissent avec une protéine cible.

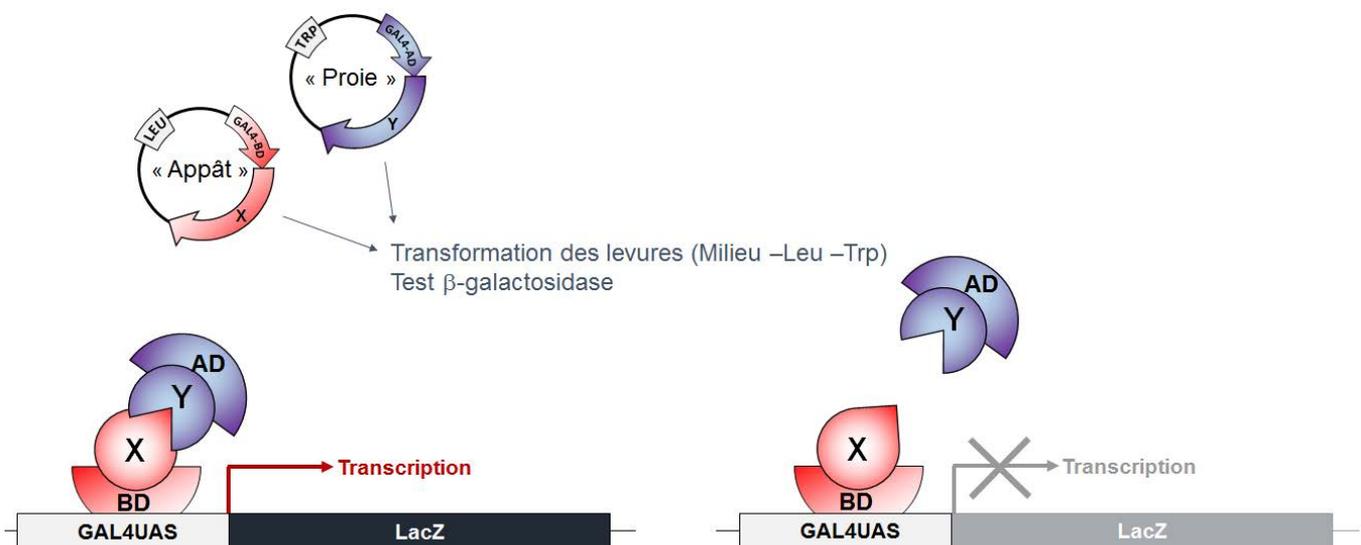


Figure 30 : Principe du double hybride chez la levure

Les protéines X et Y sont respectivement fusionnées aux domaines de liaison et d'activation de la protéine GAL4. Lorsqu'une interaction a lieu entre les deux protéines, les domaines GAL4 se rapprochent permettant ainsi l'activation de la transcription du gène rapporteur¹⁷⁵.

Dans la continuité du système Y2H, le système triple-hybride Y3H a été mis au point et permet de suivre les interactions molécule-protéine. Dans cette nouvelle version, la formation du complexe protéique est médiée par une petite molécule hybride, le

méthotrexate (MTX), molécule ayant montré une forte affinité pour la protéine dihydrofolate reductase (DHFR), ce qui a permis l'identification de nouvelles cibles cellulaires¹⁷⁶.

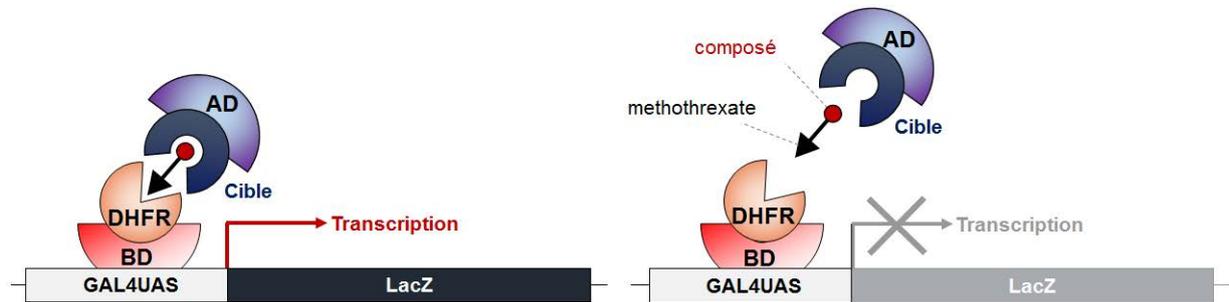


Figure 31 : Principe du système triple hybride chez la levure

La protéine cible et la protéine DHFR sont respectivement fusionnées aux domaines d'activation et de liaison de la protéine GAL4. Dans cette technique, la reconstitution des domaines d'interaction aura lieu s'il y a une interaction entre le méthotrexate et la DHFR permettant l'activation du gène rapporteur.

Comme le système Y2H, cette technique permet de reconstituer l'activité du facteur de transcription, ici GAL4, par complémentation. La protéine DHFR est fusionnée au domaine de liaison de GAL4 et la protéine cible au domaine d'activation de GAL4. Les deux domaines se rapprocheront s'il y a interaction entre le méthotrexate et la DHFR permettant l'activation du gène rapporteur comme précédemment (**Figure 32**). Dans cette technique, la protéine cible se lie au méthotrexate. Cette technologie reste cependant soumise à quelques limitations, notamment avec les cellules de levures, imperméables aux petites molécules¹⁷⁷.

I.5.e Systèmes triple-hybride en cellules de mammifères MAPPIT et MASPIT

Le système MAPPIT pour Mammalian Protein-Protein Interaction Trap, ou piège d'interaction protéine-protéine en cellules de mammifère, est dérivé de la voie de signalisation JAK/STAT (**Figure 33A**). Après fixation du ligand sur son récepteur, celui-ci est capable de se réorganiser permettant l'activation des Janus Kinases (JAK2) liées au récepteur. Une fois phosphorylées, ces kinases sont capables d'activer les résidus tyrosines présents à la surface du récepteur, permettant le recrutement et la phosphorylation des protéines transductrices de signal et activatrices de transcription (STAT3). Après phosphorylation, les protéines STAT3 sont capables de former un complexe qui permettra, une fois dans le noyau, l'activation de gènes rapporteurs dépendants de l'activité de STAT3. Le système MAPPIT (**Figure 33B**) utilise ce complexe modifié ; il est constitué de deux parties : (i) un récepteur lié à la membrane des cellules et permettant l'activation des kinases JAK2 ; dans cette version, les résidus tyrosines sont mutés afin d'empêcher l'amarrage de la protéine STAT3 au récepteur ; (ii) un morceau de récepteur contenant les sites de liaison de STAT3. Ces deux parties de récepteur sont ensuite fusionnées aux protéines X et Y

respectivement nommées proie et appât. S'il y a interaction entre les protéines X et Y, JAK2, activera la protéine STAT3, ce qui conduira à l'activation d'un gène rapporteur dépendant de l'activité de STAT3¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

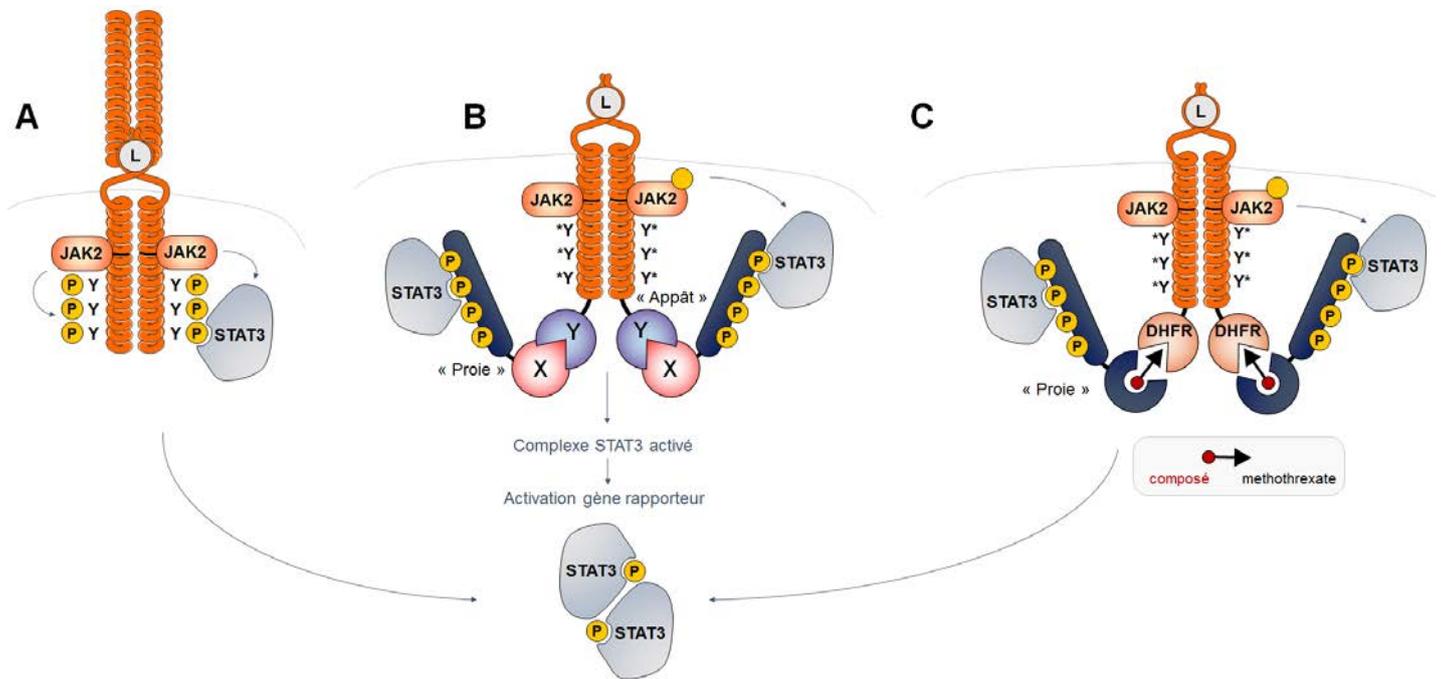


Figure 32 : Mammalian Protein-Protein Interaction Trap (Système MAPPIT)

A] Principe de la voie de signalisation JAK/STAT. La phosphorylation du récepteur par la kinase JAK permet le recrutement de la protéine STAT qui sera à son tour phosphorylée par cette même kinase JAK. **B]** Système MAPPIT. Ici le récepteur aux cytokines est une chimère comprenant le domaine de liaison du ligand du récepteur Epo ainsi que le domaine cytoplasmique d'un récepteur à la leptine muté pour les sites de recrutement de STAT3. La complémentation et la restauration de la signalisation JAK2/STAT3 est obtenue par l'interaction d'une protéine appât fusionnée au récepteur d'une protéine proie qui contient 4 sites de liaison de STAT3. **C]** Système MASPIT. La DHFR est fusionnée au récepteur chimère permettant l'adressage du ligand hybride dans lequel une petite molécule (rond rouge) est liée au MTX via un linker de polyéthylène glycol. L'interaction de cette petite molécule conduit au recrutement de la protéine STAT3 qui sera, comme précédemment phosphorylée, par la kinase JAK2. Adapté de Caligiuri *et al.*, 2006¹⁸⁰.

Une alternative au système MAPPIT et Y3H est le système mammifère à trois hybrides (M3H) qui complète le système Y3H en contournant certaines de ces limites. Ce nouveau système, le MASPIT (**Figure 33C**), utilise la dihydrofolate reductase (DHFR) d'*Escherichia coli*, une protéine de fusion permettant la liaison d'un méthotrexate (triangle noir) lié à une petite molécule (rond rouge) via un linker polyéthylène glycol (PEG). L'activation de ce récepteur est également dépendante de la voie de signalisation de JAK2/STAT3.

Ces techniques de suivi d'interaction protéine-protéine ont un intérêt particulier dans le criblage de banques d'ADNc et pourraient être facilement applicable à la conception d'un système M3H pour l'identification de cibles. Dans ce système, les interactions protéiques ont

lieu dans le cytoplasme des cellules et par conséquent, aucune translocation nucléaire des protéines de fusion ou des petites molécules n'est nécessaire. Ce système permet donc l'identification de cibles de petites molécules organiques dans des cellules intactes de mammifère.

I.5.f Techniques de FRET et de BRET

Comme développé en introduction, les techniques de BRET et de FRET peuvent être utilisées dans la détection des interactions protéine-protéine et de nombreux exemples ont été développés ces dernières années. Ces méthodes restent une excellente alternative aux méthodes de double-hybride. Etant applicables *in vitro* et *in vivo* possèdent un avantage supérieur aux techniques d'étude des interactions précédentes. Des méthodes de RET présentent une réponse rapide et réversible aux interactions dynamiques, et permettent un suivi en temps réel des interactions en recherche fondamentale. Cette technique peut de plus être utilisée en imagerie avec des outils appropriés pour cartographier et étudier la localisation des interactions⁴⁰.

Que ce soit en FRET^{2,181} ou en BRET, ces techniques ont souvent été utilisées pour l'étude de l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des récepteurs. Notre choix s'étant porté sur le BRET, les exemples qui suivent seront des exemples de BRET. De nombreuses études d'interactions protéines ont été mises en place pour les récepteurs couplés aux protéines G comme la mélatonine⁵¹, le récepteur à la sérotonine¹⁸², les récepteurs aux opioïdes et à la dopamine¹⁸³ ainsi que les récepteurs CXCR4 et CCR2 engagés dans le recrutement de la β -arrestine^{184,185} (Figure 34A et 34B).

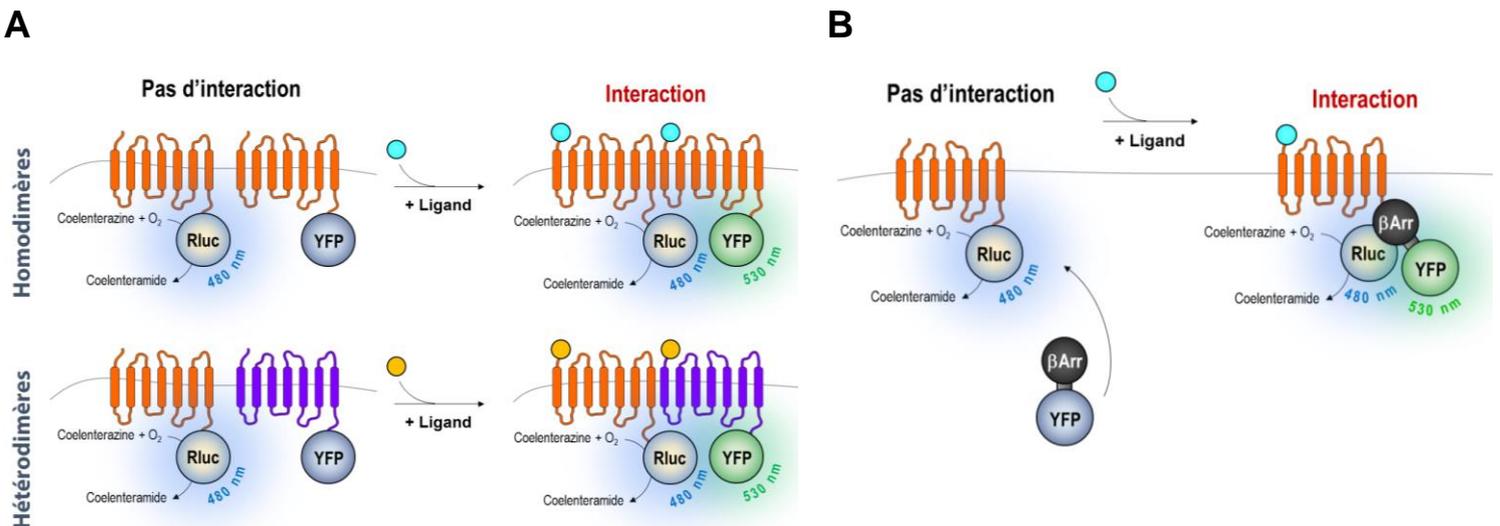


Figure 33 : Exemples d'interactions protéine-protéine développées en BRET dans le cas des récepteurs liés aux protéines G.

A] Etude de l'homodimérisation ou de l'hétérodimérisation des récepteurs^{49,181-183}. B] Etude des récepteurs couplés aux protéines G permettant le recrutement de la β -arrestine¹⁸⁴.

Le BRET est aussi utilisé dans les études d'activation de récepteurs comme la leptine¹⁸⁶ ou l'insuline¹⁸⁷ (**Figure 35A**). Que ce soit chez les plantes²¹ ou l'animal^{40,47,188}, l'étude des interactions protéines *in vivo* est facilement réalisable. Plusieurs exemples d'études *in vivo* entre les protéines FRB (FKBP Rapamycin Binding domain) et FKBP12 (FK506 Binding Protein 12) ont été démontré en BRET avec différents couples de partenaires Rluc et GFP2 ou plus récemment entre la Rluc8.6 et la TurboFP635^{37,41}. La **Figure 35B** présente des images de bioluminescence de souris nues (nues), mises en contact avec des cellules de mammifère accumulées dans les poumons et qui surexpriment stablement les partenaires d'interaction FRB et FKBP12 fusionnées à la Rluc8.6 et à la mOrange. Des cellules ont été injectées dans la veine de la queue, entraînant un piégeage important dans les poumons. Un groupe de 8 souris (n = 8) a reçu une dose de rapamycine 2 heures avant l'injection des cellules. Les souris contrôles ont reçu du DMSO et toutes ont reçu la coelenterazine par voie intraveineuse.

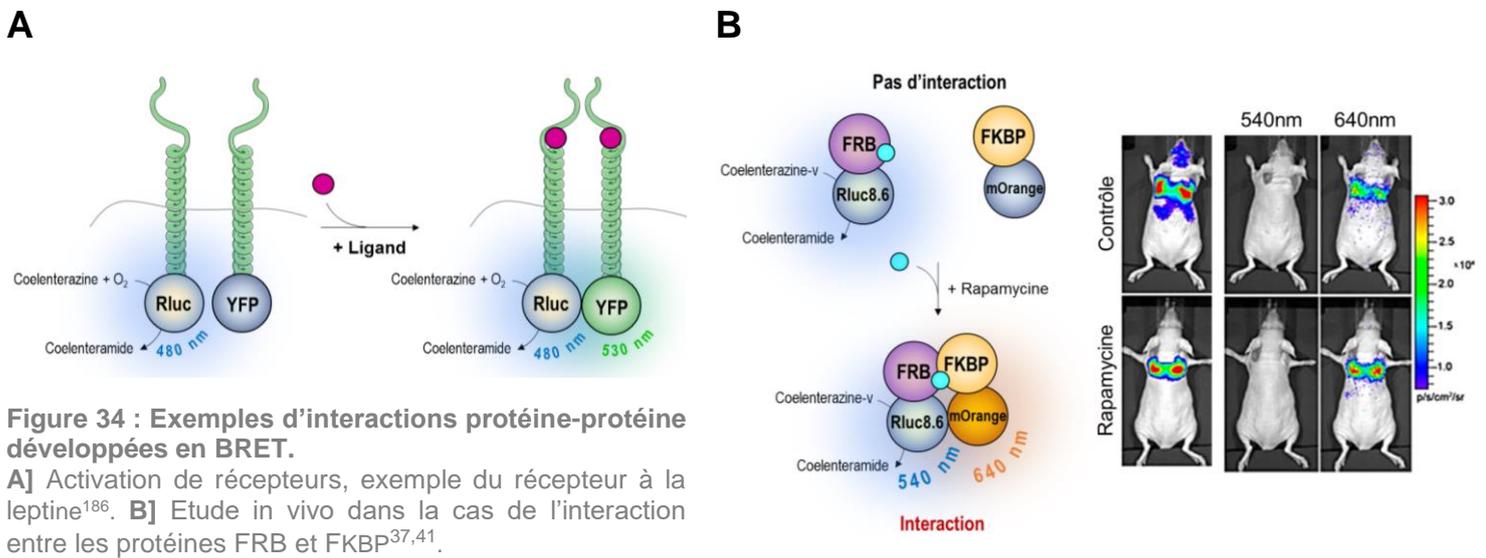


Figure 34 : Exemples d'interactions protéine-protéine développées en BRET.

A] Activation de récepteurs, exemple du récepteur à la leptine¹⁸⁶. **B]** Etude *in vivo* dans le cas de l'interaction entre les protéines FRB et FKBP^{37,41}.

I.5.g Comparatif des principales méthodes de détection des PPI

Il existe donc de nombreuses méthodes de détection des interactions protéine-protéine chacune possédant ses avantages et ses inconvénients. Cependant toutes ne sont pas utilisées en routine. Selon certaines bases de données⁴⁰, la technique de suivi des interactions double-hybride semble être la plus couramment utilisée en raison de sa facilité d'utilisation. De plus, cette technique a beaucoup évolué ces dernières années en se déclinant en de nombreuses variantes comme les techniques de triple-hybride ou de MAPPIT, lui donnant l'avantage d'être une méthode polyvalente de détection. Les techniques de co-immunoprécipitation et leurs variantes restent des techniques de faible coût, faciles à mettre en œuvre. Elles présentent l'avantage de détecter plusieurs interactions à la fois intrinsèquement et à haut débit, un avantage majeur dans le

développement de médicaments, pour la recherche de partenaires de liaison de protéines spécifiques.

Les méthodes de complémentation ont également été beaucoup utilisées en biologie cellulaire mais elles présentent l'inconvénient d'être irréversibles. Toutefois, elles peuvent être facilement couplées aux essais de RET¹⁷³. Les méthodes de RET sont assurées par un mécanisme physique. Celui-ci nécessite une activité cellulaire *in vivo*, pour une lecture instantanée du signal, sans passer par la transcription ou tout autre forme de retard lorsque les protéines interagissent, comme cela peut être le cas dans les méthodes basées sur l'activation de facteurs de transcription (Y2H, MAPPIT). La lecture *in vivo* est aussi un avantage en comparaison des techniques de co-immunoprécipitation qui ne permettent qu'une lecture *in vitro*. Comme développé précédemment, la méthode de BRET n'implique pas de relation intrinsèque entre la luciférase et la protéine fluorescente, le risque d'interaction non spécifique est donc très faible en BRET comparativement au FRET et aux méthodes de PCA. De ce fait, en minimisant le nombre de faux positifs, le mécanisme devient réversible. Cette réversibilité, combinée à une réponse instantanée du signal, rend donc le BRET et le FRET utiles pour l'étude de la dynamique des interactions protéine-protéine. Ces méthodes l'emportent par leur polyvalence et leurs performances par rapport aux autres techniques. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont résumés dans le **Tableau 6**⁴⁷.

Tableau 6 : Comparaison des différentes méthodes d'identification des PPI

Comparaison entre les méthodes de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) ou de bioluminescence (BRET), le double-hybride chez la levure (Y2H), la complémentation de Fluorescence (BiFC) et la co-immunoprécipitation de protéines (Co-IP)⁴⁷.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Applications
Co-IP	-Détection de plusieurs interactions protéine-protéine	-Faible sensibilité -Taux d'erreurs élevé - <i>In vitro</i> uniquement	-Détection de complexes protéiques -Criblage initial PPI
PCA (BiFC)	-Convient à une plus large gamme que les essais Y2H	-Source externe d'excitation -Détection non réversible	-Criblage secondaire PPI
Y2H	-Facile à utiliser -Faible coût	-Convient uniquement aux protéines co-localisables au noyau -Détection non réversible - <i>In vivo</i> uniquement	-Criblage secondaire PPI
FRET	-Suivi des interactions en temps réel - <i>In vivo</i>	-Source externe d'excitation -Bruit de fond élevé	-Criblage secondaire PPI -Etude de la régulation des PPI
BRET	-Suivi des interactions en temps réel - <i>In vivo</i> -Plus sensible que le FRET	-Coût du substrat	-Criblage secondaire PPI -Etude de la régulation des PPI

I.6 Mise en place du projet

En nous basant sur ces différentes recherches bibliographiques : étude des interactions en RET, des systèmes rapporteurs, des tests protéases ainsi que de la dynamique des interactions protéine-protéine, nous avons pu développer notre système rapporteur présenté dans les objectifs.

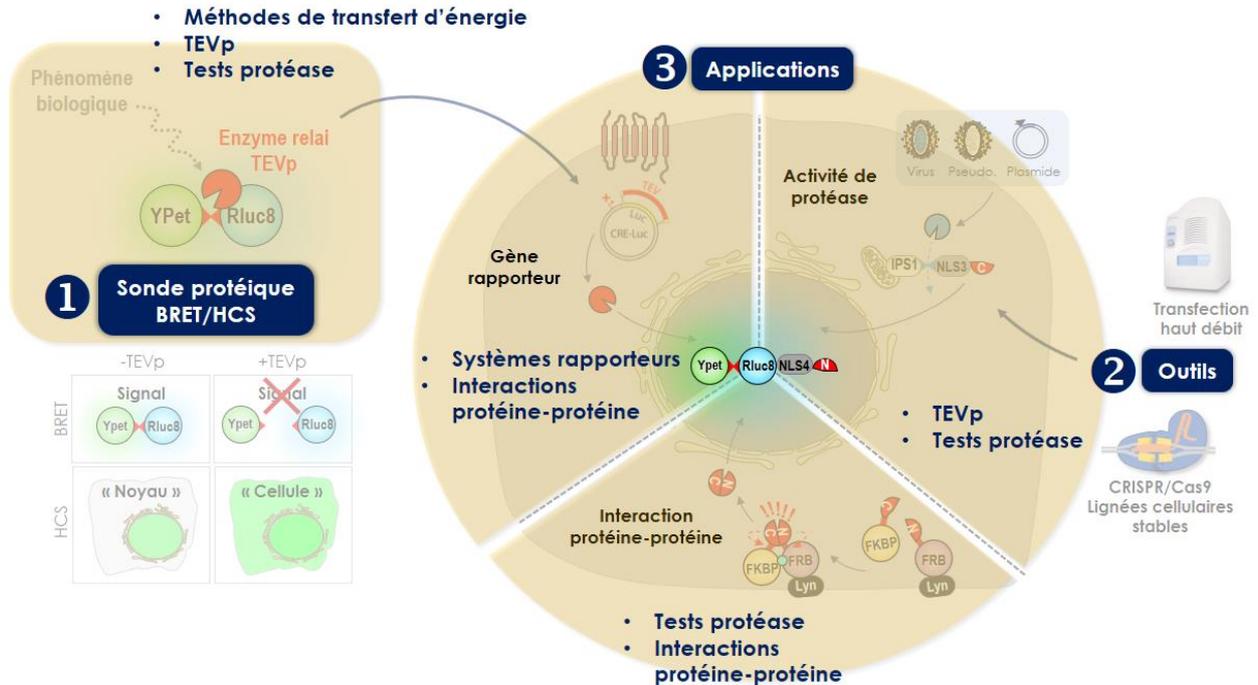


Figure 35 : Récapitulatif des outils utilisés pour la mise en place du projet

Notre choix s'orientera dans un premier temps vers la méthode de BRET, en raison de sa grande sensibilité et des nombreux avantages de ce système en comparaison aux autres techniques de transfert d'énergie présentées dans ce manuscrit. Nous avons également opté pour la protéase TEV, sélectionnée parmi d'autres protéases pour sa grande sensibilité et pour sa particularité d'être exprimée en deux moitiés N et C-terminales (Split-TEV).

Ces différents outils nous ont permis de proposer le modèle de test cellulaire présenté **Figure 36**. Plusieurs niveaux d'amplifications seront proposés et développés dans la partie **Résultats**.

RESULTATS

II Résultats

II.1 Développement et optimisation d'une sonde protéique en BRET et en HCS

Afin d'optimiser une sonde en BRET et valider les différentes applications proposées en introduction, le site de clivage de la protéase TEV a été inséré entre les deux partenaires *Rluc8* et YPet afin de suivre leur interaction en BRET et en HCS entre un état non clivé (transfert d'énergie) et clivé (absence de transfert d'énergie).

II.1.a En BRET

II.1.a.i Validation de l'activité de la protéase TEV

L'optimisation proposée met en jeu une amplification par l'intermédiaire de la protéase TEV, clonée à partir d'un gène synthétique (commandé chez GenScript). Cette protéase à cystéine, apparentée à la super-famille des chymotrypsines, possède des affinités similaires avec la famille des protéases à sérines telles que la trypsine, l'élastase ou encore la thrombine, et utilise une triade catalytique pour l'hydrolyse de son peptide cible. Cependant, celle-ci ne met pas en jeu un acide aminé sérine en position nucléophile (sérine-aspartate-histidine) mais une cystéine, pouvant expliquer, entre autres, son insensibilité face à de nombreux inhibiteurs de protéase (**Figure 37A**).

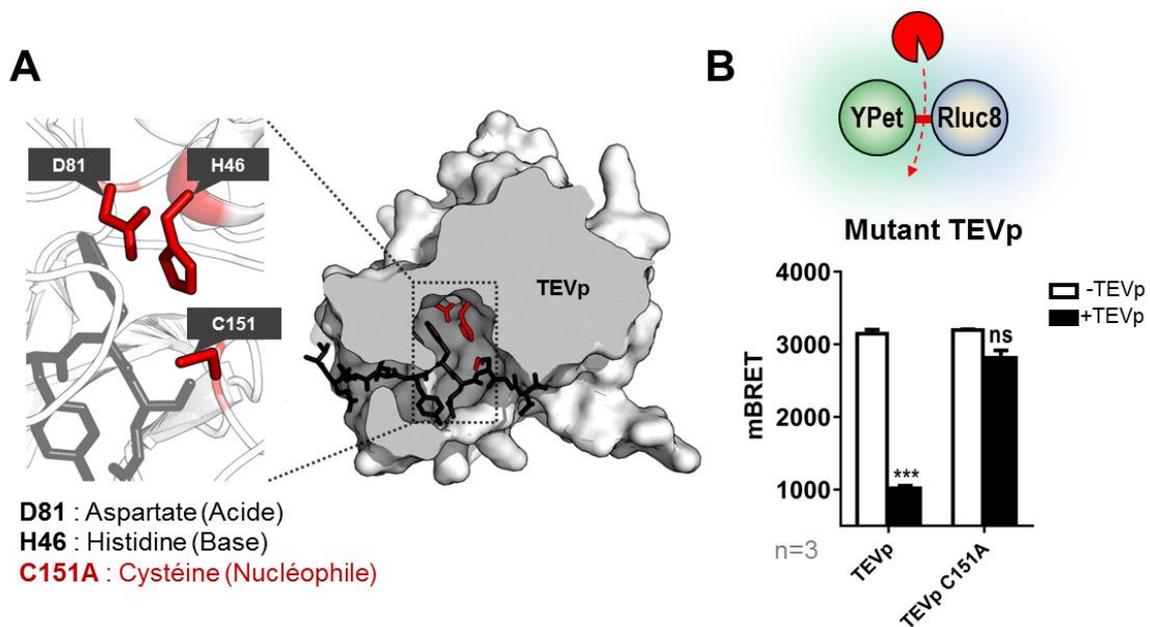


Figure 36 : Protéase TEV et caractéristiques

A] Site actif de la protéase TEV. Le substrat est représenté en noir, les résidus de la triade catalytique en rouge ainsi que la position des différents acides aminés. Adapté de Thomas, Shafee, 2014). **B]** Représentation schématique de la sonde cytosolique. La sonde a été co-transfectée en présence ou en l'absence de la protéase sauvage ou mutée C151A. Les valeurs de BRET sont données en mBRET, n = 3 ; ***p<0.001 Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism,7.0 ANOVA deux voies, Bonferonni post-test.

Afin de s'assurer que notre construction est clivable par l'enzyme TEV active, cette dernière a été co-transfectée en présence d'une sonde BRET cytosolique, déjà publiée¹⁸⁹. La sonde comporte le site de clivage de la TEV (ENLYFQ/G, clivage entre le Q et le G¹³⁷) entre les deux partenaires de BRET, YPet et *Rluc8*. En l'absence de la protéase TEV (**Figure 37B**), la sonde cytosolique présente un signal basal de BRET d'environ 3000 mBRET, qui est abolit lorsque la TEVp sauvage est co-transfectée. Une valeur d'environ 900 mBRET correspondant au bruit de fond de la *Rluc8* seule est alors obtenue. Cette sonde, lorsqu'elle est co-transfectée avec la version mutée TEVpC151A, n'est pas clivée, et donne un signal de BRET identique à celui obtenu sans protéase. Par conséquent, la sonde BRET contenant le site de reconnaissance de la TEVp est donc spécifiquement clivée par cette enzyme.

II.1.a.ii Choix des partenaires de BRET

Comme il a été expliqué dans l'introduction, nous avons choisi la méthode de BRET pour le développement et l'optimisation de notre sonde ; la version de BRET1 a été retenue, et met en jeu les partenaires *Rluc* et YFP en présence de cœlenterazine. Toutefois, nous avons opté pour une version améliorée faisant intervenir la *Rluc8* et la YPet, cette combinaison ayant montré de meilleurs résultats de BRET⁴⁵. La *Rluc8* est un mutant de la *Rluc* contenant huit substitutions d'acides aminés conduisant à une émission lumineuse 6 à 8 fois plus importante que celle de la *Rluc*. De plus, la YPet est un variant amélioré de la protéine fluorescente jaune YFP, présentant une réémission plus efficace que la YFP à quantité de lumière excitatrice identique¹⁸⁹. Comme décrit préalablement, l'intensité du signal de BRET pour ce couple dépendra de trois paramètres : (i) la proximité, (ii) l'orientation ainsi que (iii) le rapport de quantité entre les partenaires de BRET (donneur et accepteur). Cependant, ce dernier paramètre n'aura pas d'influence dans notre cas, puisque nous travaillons avec une sonde comportant une fusion directe entre le donneur et l'accepteur bloquant de ce fait le rapport à 1.

II.1.a.ii.1 Recherche du meilleur signal de BRET

Afin d'obtenir le meilleur signal de BRET, tout en conservant le meilleur delta de BRET avant et après clivage par la protéase TEV, le système existant a été optimisé en faisant varier à la fois la distance et l'orientation des partenaires^{189,190}. Une série de délétions de 7 à 14 acides aminés à l'extrémité C-terminale de l'accepteur, et de 1 à 11 acides aminés à l'extrémité N-terminale du donneur, a été réalisée dans le but de réduire au maximum la distance entre les deux partenaires de BRET, séparés par le site de clivage de la protéase TEV. Nous nous sommes inspirés de deux publications majeures pour le choix des délétions. Xiangiang Li et son équipe (1997)¹⁹¹ ont déterminé le domaine minimum requis pour la fluorescence de la GFP, et l'équipe de Takeharu Nagai^{71,72} a mis au point la nouvelle

génération de protéines de fusion nommées Nano-lanternes décrites en introduction (**cf. Nano-lanternes I.2.c.5**). Nous avons ainsi adapté leurs recherches à nos travaux pour la réalisation des différentes délétions en prenant en compte le site de clivage de la TEVp¹⁸⁹. Dans cette construction, le site de clivage de la protéase n'est pas ajustable et ne peut pas être modifié.

Dans l'optique d'obtenir le meilleur signal de BRET avant et après clivage par la protéase TEV, nous avons décidé de comparer deux accepteurs fluorescents, la YPet et la mVenus, décrits pour leur supériorité par rapport aux protéines YFP et GFP. La protéine mVenus est un variant de la famille des YFP et possède le meilleur delta de BRET publié à ce jour : 8700 mBRET^{71,72} avec le mutant *Rluc8S257G*. Cette nouvelle protéine diffère de la YPet par 7 mutations (**Figure 38**), et possède des capacités de maturation plus rapides que d'autres accepteurs fluorescents de la famille des YFP. Ces protéines étant sensibles à l'acidité, il est important de réaliser des mutations permettant de décroître la sensibilité au pH dans le but d'obtenir une protéine fluorescente plus stable⁶⁹. Une de ces mutations, la F46L, accélère grandement l'oxydation du chromophore à 37°C, étape limitante de la maturation. D'autres mutations telles que la F64L, la M153T, la V163A ou encore la S175G permettent un meilleur repliement de la mVenus ainsi qu'une meilleure tolérance à l'exposition aux ions chlorures^{69,70}. La YPet possède de plus ces mêmes mutations et partage donc ces propriétés.

```

GFP MLDLASLILAVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLGYGFQCFAR
YPet MLDLASLILAVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKLLCTTGKLPVPWPTLVTTTLGYGVQCFAR
Venus MLDLASLILAVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKLLICTTGKLPVPWPTLVTTTLGYGLQCFAR
-----**-----*-----

GFP YPDHMRQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADK
YPet YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADK
Venus YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADK
-----*-----*-----

GFP QKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
YPet QKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALFKDPNEKRDHMLLEFLTAAGITEGMNELYK
Venus QKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----
    
```

Figure 37 : Alignement des séquences de la mVenus, YPet et GFP

Alignement et comparaison de séquences réalisées avec le logiciel CLUSTAL. Les différentes mutations, en acides aminés, sont indiquées en noir pour chaque protéine. - : Pas de différence de séquence / *: Mutation

Le but de cette première partie est de comparer les couples de partenaires YPet-sTEV-*Rluc8* et mVenus-sTEV-*Rluc8*, la comparaison de ces deux accepteurs fluorescents n'ayant jamais été décrite dans la littérature. Ainsi, la version complète de la mVenus a été clonée dans un premier temps par PCR, puis par mutagenèse sur notre construction entière de départ notée « Full » (YPet-sTEV-*Rluc8*). Les différentes délétions du côté C-terminal de

la mVenus ont été réalisées sur le même principe que celles de la YPet. La **Figure 39A** illustre le principe et la **Figure 39B** les différentes délétions avec leur séquence en acides aminés, en comparaison à la mVenus de départ.

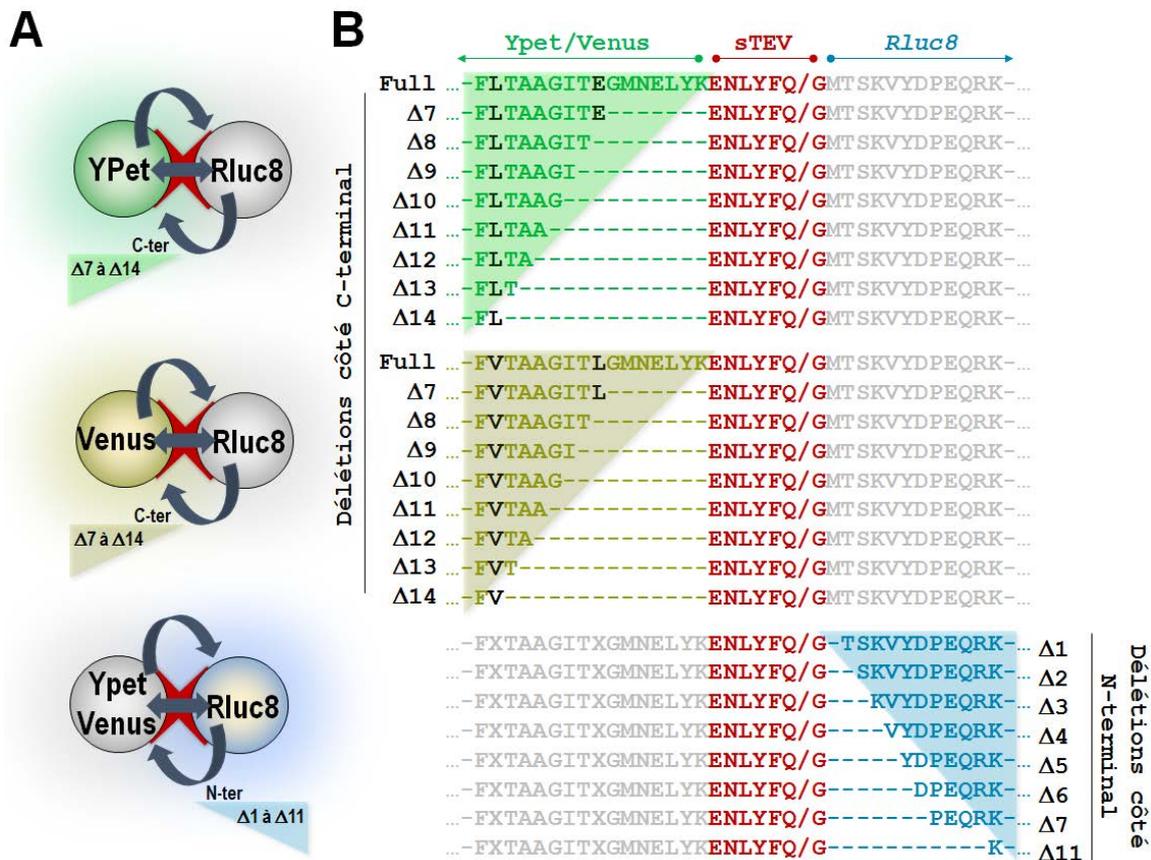


Figure 38 : Orientation, distance et délétions YPet et Rluc8

A] Modification de l'orientation et de la distance des partenaires de BRET par rapport au site de clivage de la protéase TEV. **B]** Délétions réalisées côté C-terminal de la YPet, de la mVenus et côté N-terminal de la Rluc8, séquence en acides aminés. Les délétions ont été réalisées à partir d'une version complète YPet/Venus-siteTEV-Rluc8 (notée Full), 7 à 14 acides aminés ont été délétés (Δ7 à Δ11) côté C-terminal de la YPet. De même, 1 à 11 acides aminés ont été délétés (Δ1 à Δ11) côté N-terminal de la Rluc8. La séquence en acides aminés ENLYFQ/G notée en rouge correspond au site de clivage de la protéase TEV située entre les deux partenaires.

II.1.a.ii.2 Délétions simples des accepteurs et du donneur d'énergie

La **Figure 40** présente les différents signaux de BRET obtenus avec ces séries de délétions. Que ce soit du côté C-terminal de la YPet ou de la mVenus, une distribution gaussienne est observée, en fonction du nombre d'acides aminés délétés, et le meilleur signal est atteint pour les délétions Δ9, Δ10, Δ11 et Δ12. Les constructions Ypet Δ11 et mVenus Δ11 génèrent un signal de BRET basal de l'ordre de 9300 et 6100 mBRET respectivement correspondant ainsi à une amélioration du signal de 2 à 3 fois par rapport aux constructions contrôles non délétées (3500 mBRET).

Dans le cas des délétions simples côté N-terminal de la Rluc8, aucune augmentation drastique du signal de BRET n'est observée. Le signal semble constant pour les délétions de

$\Delta 1$ à $\Delta 4$ acides aminés par rapport aux contrôles pour nos deux accepteurs. Pour les délétions allant de $\Delta 5$ à $\Delta 11$ acides aminés, le signal de BRET diminue même de façon significative par rapport aux témoins. Pour toutes les conditions, les différentes sondes sont clivées à 100% par la TEVp avec une valeur d'environ 980 mBRET, valeur correspondant à celle de la YPet et de la *Rluc8* transfectées séparément²⁶.

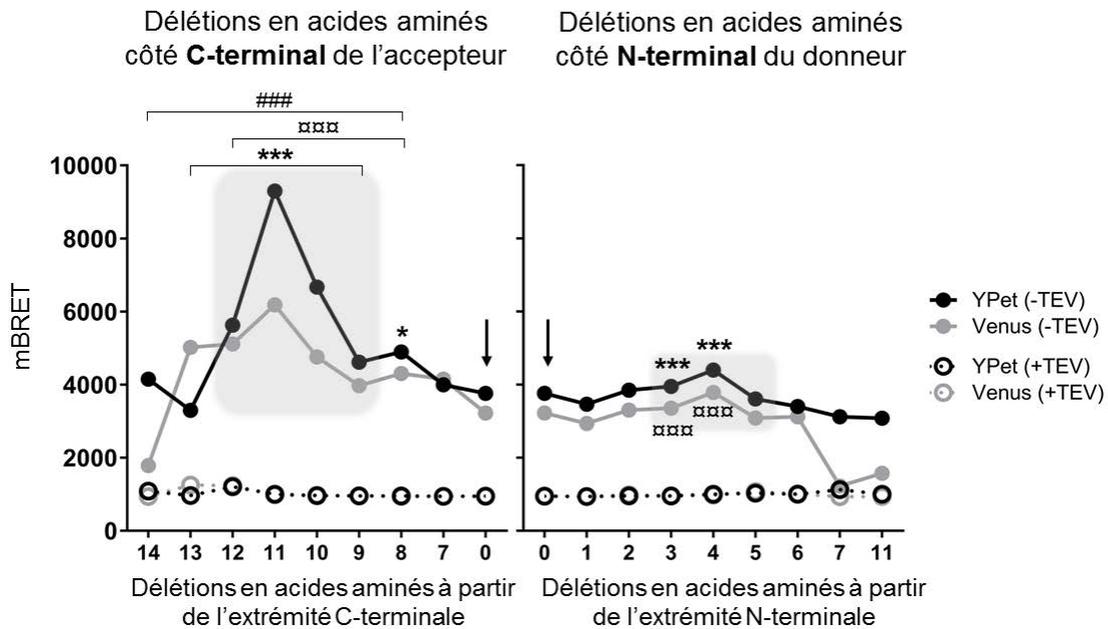


Figure 39 : Délétions simples YPet, mVenus, *Rluc8* et effet sur le signal de BRET

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les différentes constructions (20ng par puits dans une plaque 96 puits) en absence ou en présence de la protéase TEV (25ng). N = 4 ; p<0.001 Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism,7.0 ANOVA deux voies, Bonferonni post-test. *YPet-Full, #mVenus-Full par rapport au contrôle non délété / # Comparaison entre YPet et mVenus. La flèche noire indique l'emplacement du contrôle non délété.

II.1.a.ii.3 Délétions croisées des accepteurs et du donneur d'énergie

Afin d'approfondir ces expériences de délétions, les meilleures délétions côté YPet et mVenus ($\Delta 9$, $\Delta 10$, $\Delta 11$, $\Delta 12$) ont été croisées avec les meilleures délétions côté *Rluc8* ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$, $\Delta 5$ et $\Delta 6$). Les valeurs de BRET pour ces délétions croisées sont reportées **Figure 41**. Dans le cas de la YPet, les différentes délétions indiquent un plus fort signal de BRET pour les constructions délétées de 11 acides aminés en combinaison avec la *Rluc8*-Full, $\Delta 1$, $\Delta 2$ ou $\Delta 3$ par rapport au contrôle non délété. Le signal moyen de ces différentes constructions varie entre 7900 et 9000 mBRET. De plus, les constructions délétées de 12 acides aminés (courbes bleues) côté YPet, combinées à la *Rluc8* $\Delta 4$, $\Delta 5$ ou $\Delta 6$, génèrent un signal de BRET basal plus élevé que la condition non délétée, d'une moyenne de 7400 mBRET. Cependant, la valeur du delta est plus faible, d'environ 5000 mBRET contre 7000 mBRET pour les constructions précédentes. Pour les délétions croisées de l'accepteur fluorescent mVenus, les meilleurs signaux de BRET sont à nouveau atteints dans le cas de

la délétion 11 croisée à la *Rluc8*, Full et $\Delta 2$ à $\Delta 6$. Comme pour la YPet, les constructions mVenus $\Delta 12$ fusionnées *Rluc8* $\Delta 5$ ou $\Delta 6$, présentent un signal de BRET plus élevé, mais le delta de BRET entre l'état clivé et non clivé reste quasi nul. Cela pourrait s'expliquer par un encombrement stérique des partenaires qui gêne le clivage de la sonde par la protéase. Ainsi dans le cas de ces deux séries de doubles délétions, que ce soit pour la YPet ou pour la mVenus, le meilleur signal de BRET est atteint pour les constructions délétées de 11 acides aminés (courbes rouges) du côté accepteur, couplées à une version complète du donneur d'énergie *Rluc8*.

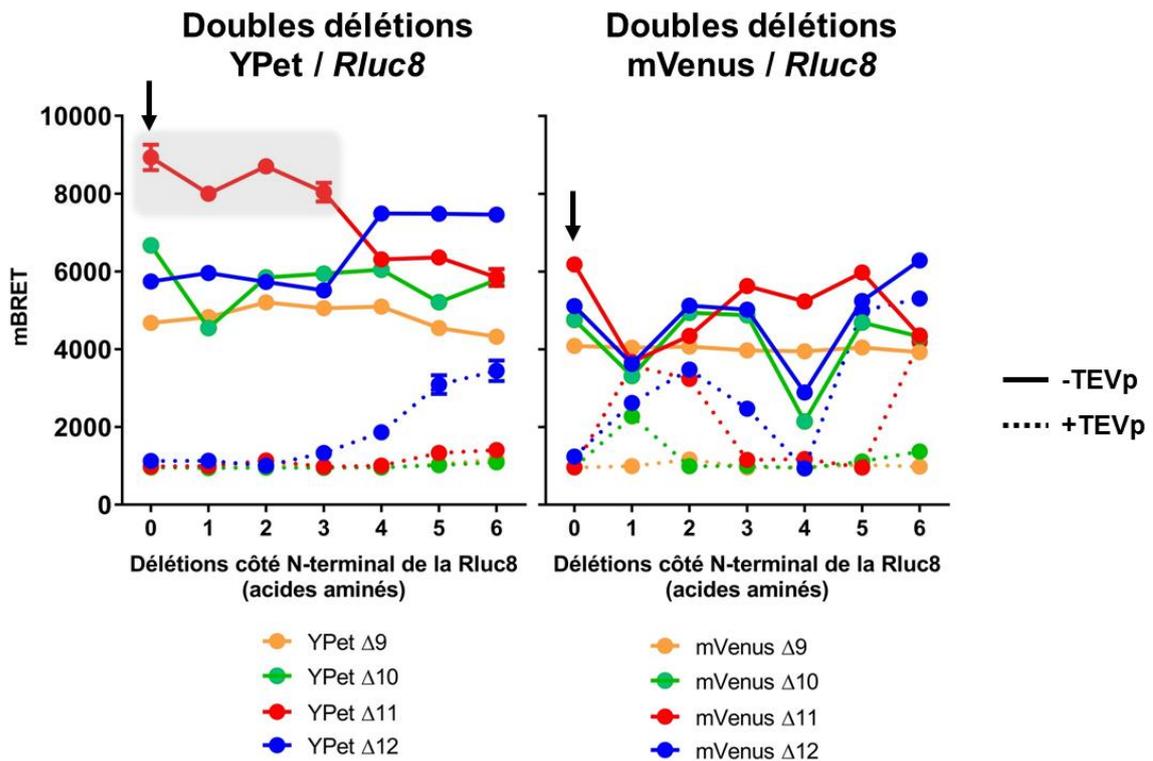


Figure 40 : Signaux de BRET des différentes délétions croisées YPet, mVenus et *Rluc8*

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec les différentes constructions (20ng de sonde par puits dans une plaque 96 puits) en absence ou en présence de la protéase TEV (25ng) $n \geq 3$. Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism,7.0 ANOVA deux voies, Bonferonni post-test. La flèche noire indique l'emplacement du contrôle non délété côté donneur d'énergie.

Cependant, de meilleurs résultats ont été obtenus avec l'accepteur YPet qui a donc été sélectionné pour la suite du travail. Grâce à ces expériences, 4 clones majeurs (YPet $\Delta 11$ -sTEV-Full*Rluc8* ; YPet $\Delta 11$ -sTEV- $\Delta 1$ *Rluc8* ; YPet $\Delta 11$ -sTEV- $\Delta 2$ *Rluc8* et YPet $\Delta 11$ -sTEV- $\Delta 3$ *Rluc8*) présentant le meilleur signal de BRET basal mais aussi le meilleur delta après clivage ont pu être isolés et comparés au clone de départ. Mais, comme il a été observé dans le cas de la délétion 12, une configuration donnant un meilleur signal de BRET peut également gêner la coupure par la TEVp. La sensibilité de ces différents clones a été testée dans un second temps (encadré gris **Figure 41**).

II.1.a.ii.4 Sélection de la sonde la plus sensible en réponse à la protéase TEV

Suite aux résultats obtenus, nous avons décidé de continuer avec la version de la sonde YPet Δ 11-sTEV-Full-*Rluc8*, présentant les meilleures valeurs de BRET basales ainsi que le meilleur delta entre l'état clivé et non clivé (encadré gris **Figure 41**). Les résultats sont présentés **Figure 42**, en BRET **A** ainsi qu'en pourcentage de coupure maximale **B**.

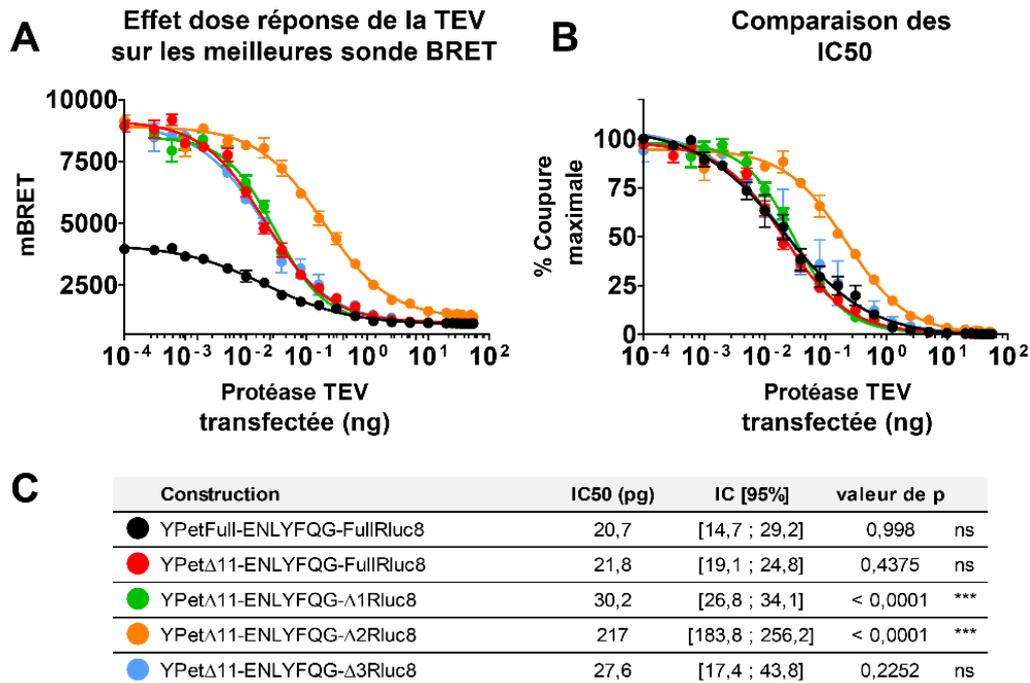


Figure 41 : Effet dose-réponse de la protéase TEV sur les meilleures sondes

A] Résultats présentés en BRET **B]** Comparaison des valeurs d'IC50, valeurs présentées en pourcentage de coupure maximale. **C]** Comparaison des valeurs d'IC50. Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec la sonde (20ng d'ADN par puits) en présence d'une dose croissante de protéase TEV allant de 0 à 40 ng. $n \geq 3$. Les valeurs d'IC50, intervalles de confiance et analyse statistique ont été déterminés avec le logiciel GraphPadPrism ANOVA deux voies, Bonferonni post-test. ns : non significatif ; *** $p < 0,0001$.

La **Figure 42A** présente le signal de BRET basal des meilleures sondes sélectionnées préalablement, comparé à la version de départ YPet-Full-sTEV-Full-*Rluc8* présentée en noir. Les différentes valeurs avant clivage correspondent aux valeurs préalablement présentées **Figure 41**. L'action de la protéase TEV observée sur la sonde est dépendante de la dose transfectée et que toutes les constructions ne sont pas clivées à 100% aux plus fortes quantités de TEVp. Afin de déterminer la sonde la plus sensible, les différentes valeurs de BRET ont été converties en pourcentage de coupure maximale (**Figure 42B**) pour comparer les différentes concentrations inhibitrices médianes, ou IC50. Les résultats sont reportés **Figure 42C**. Pour chaque construction sont indiqués : la valeur

de l'IC50, l'intervalle de confiance à 95% ainsi que la valeur de p (p-value) et la différence significative par rapport à la version non délétée. Une différence significative est observée pour les clones YPet Δ 11-sTEV- Δ 1*Rluc8* (vert) et YPet Δ 11-sTEV- Δ 2*Rluc8* (orange), alors qu'aucune différence significative (ns) n'est observée pour les sondes YPet Δ 11-sTEV-Full*Rluc8* (rouge) et YPet Δ 11-sTEV- Δ 3*Rluc8* (bleu clair) par rapport au contrôle (noir). Les valeurs d'IC50 et les intervalles de confiance étant quasiment identiques, la construction YPet Δ 11-sTEV-Full*Rluc8* a été sélectionnée, car elle présente le meilleur signal de BRET basal et répond le mieux à la protéase TEV (signal de BRET basal 8700 mBRET ; après clivage 994 mBRET ; Delta 7706 mBRET).

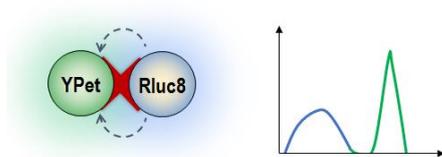
II.1.a.iii Amplification du système par le BRET

Une des premières amplifications de notre système repose sur l'utilisation de la TEVp qui coupe son substrat et empêche le transfert d'énergie. La seconde repose sur la méthode de BRET elle-même. Comme décrit en introduction (cf. **Mesure du signal de BRET I.2.c.3**), le signal de BRET correspond à la lumière émise par la YPet sur celle de la *Rluc8* : Valeur de BRET = $(YPet)_{em530} / (Rluc8)_{em485}$.

II.1.a.iii.1 Rapport de BRET

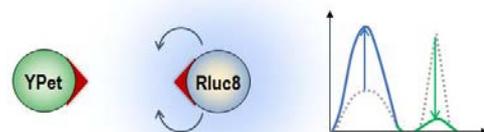
Le couple de partenaires YPet Δ 11 / Full-*Rluc8* choisi au préalable, nous donne un signal de BRET équivalent à 9000 mBRET, traduisant une émission à la longueur d'onde de l'accepteur neuf fois plus importante qu'à celle du donneur, indiquant ainsi un très fort transfert d'énergie entre les deux. Ce phénomène indique qu'avant la coupure de la sonde, une grande partie de l'activité luciférase est engagée dans le transfert d'énergie et n'est donc pas mesurable à la longueur d'onde d'émission de la luciférase (**Figure 43A**). Après clivage, le signal mesuré à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur décroît, provoquant une diminution du signal de BRET ainsi qu'une amplification du système, due à la part d'activité lumineuse engagée dans le transfert d'énergie qui devient cette fois-ci quantifiable (**Figure 43B**). L'augmentation de la quantité de luminescence de la *Rluc8* après clivage traduit donc une amplification du signal par exagération du rapport de BRET lors du clivage de la sonde. Si une amplification existe, une augmentation du signal mesuré à la longueur d'onde du donneur est donc attendue après dissociation des partenaires (**Figure 43C**).

A. Avant clivage



$$BRET = \frac{(YPet)}{(Rluc)}$$

B. Après clivage



$$BRET = \frac{(YPet)}{(Rluc)} = \frac{\rightarrow 0}{\uparrow} = \downarrow\downarrow\downarrow$$

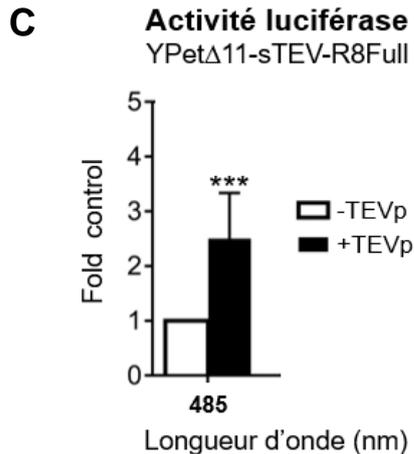


Figure 42 : Transfert d'énergie émis par les partenaires de BRET

A] Avant clivage par la protéase TEV. Le signal émis à la longueur d'onde du donneur est moins important que celui émis à la longueur d'onde de l'accepteur. **B]** Après coupure, augmentation de l'émission du donneur suite à la baisse d'émission lumineuse de l'accepteur. **C]** Signal de BRET et quantité de l'activité luciférase de la nouvelle sonde BRET en comparaison au témoin non délété. La valeur du signal de BRET est donnée en mBRET et l'activité luciférase exprimée en fois du contrôle. *** $p < 0,001$ et * $p < 0,05$ par rapport au témoin négatif (sans protéase). Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism 7.0, ANOVA deux voies, Bonferroni post-test.

II.1.a.iii.2 Différents filtres et rapports de BRET

Le signal de BRET correspond au ratio de la lumière émise par la YPet à 530 nm sur l'émission de la *Rluc8* à 485 nm. Dans notre système nous avons choisi de travailler avec le mutant *Rluc8*, sélectionné pour sa stabilité (200 fois plus stable que la version *Rluc* native à 37°C) mais aussi pour son activité lumineuse 6.8 fois plus intense¹⁹². Cette protéine étant plus brillante et donc plus facilement détectable, nous avons décidé de changer une série de filtres, principalement utilisés pour la détection de la *Nluc*, un variant de la *Rluc*, décrit également comme plus brillant. Les filtres 460, 485, 530, 535 et 568 nm ont pu être vérifiés en parallèle lors des différentes expériences de BRET. Les bandes passantes de chacun des filtres sont représentées **Figure 44A**. La **Figure 44B** illustre les valeurs de BRET obtenues avec ces nouveaux filtres, pour la sonde YPet Δ 11-sTEV-Full/*Rluc8* en réponse à la TEVp. Les résultats sont comparés au contrôle (530/485 nm), en l'absence (blanc) ou en présence (noir) de la protéase TEV. Les deltas ont également été calculés pour chaque rapport. Une augmentation drastique du signal de BRET est observée dans le cas du rapport 568/460 nm, en comparaison du contrôle. Ce nouveau couple de filtres permet ainsi de mesurer un rapport de BRET d'une valeur moyenne de 12500 mBRET contre 8900 mBRET pour le rapport 530/485 nm. De plus, la valeur moyenne du delta de BRET passe de 7933 mBRET (530/485 nm) à 11262 mBRET (568/460 nm). L'ensemble de ces expériences a permis d'améliorer le signal de BRET basal de notre sonde ainsi que la valeur du delta entre les états non clivé et clivé. Ainsi, nous pouvons espérer une sensibilité accrue et un facteur z' (indicateur de la quantité et de la fiabilité d'un criblage) favorable soit supérieur à 0.5 qui sont deux paramètres essentiels à prendre en considération lors de la réalisation des tests de criblage.

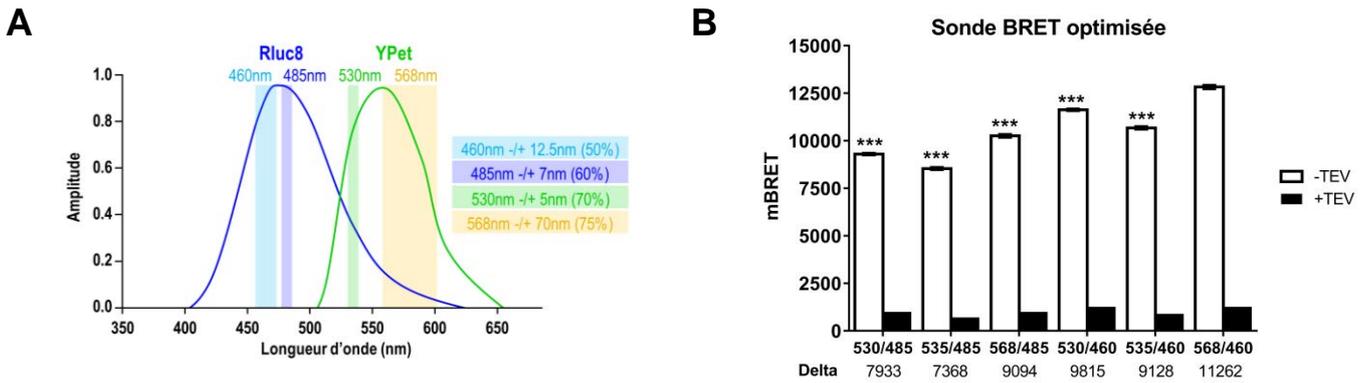


Figure 43 : Différents filtres et modification du ratio de BRET

A] Longueurs d'ondes et bandes passantes des différents filtres utilisés (Mithras – Berthold). **B]** Nouveaux ratios de BRET et valeurs de delta comparés au rapport initial de 530/485nm. Les cellules HeLa ont été co-transfectées en présence de la sonde (20 ng par puits d'une plaque 96 puits), en l'absence ou en présence de la protéase TEV (25 ng). Les différents rapports sont comparés au rapport 530/485nm en gris clair. n = 5 ; ***p<0.001 Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism 7.0, ANOVA deux voies, Bonferonni post-test.

II.1.a.iii.3 Remarques et perspectives

Grâce aux différentes délétions réalisées, le signal de BRET basal ainsi que le delta de BRET entre les deux états de la sonde de départ ont été optimisés d'un facteur 2.5 : de 3805 mBRET à 8911 mBRET pour le signal et un delta de 2764 mBRET initialement à 7933 mBRET après les délétions. Ces expériences présentent un système amplifié du fait de l'activité luciférase mesurée après clivage et de l'utilisation des différents couples de filtres qui permettent, là encore, une augmentation du delta de BRET entre les deux états. Le signal de BRET de départ, ainsi que le delta, se voient également augmentés pour la meilleure sonde sélectionnée YPet Δ 11-sTEV-FullRluc8 (comparaison des rapports 530/485 et 568/460nm). Le signal de la sonde sélectionnée est alors supérieur au meilleur signal de BRET publié à ce jour et décrit dans les études liées aux Nano-lanternes. Notre sonde pourrait ainsi être facilement adaptée à ces études : par la suppression du site de clivage de la TEVp constitué de 9 acides aminés, un signal de BRET plus élevé pourrait être atteint et la valeur de BRET basale de cette nouvelle Nano-lanterne serait comparable à celle de la Nano-lanterne mVenus déjà publiée^{71,72}.

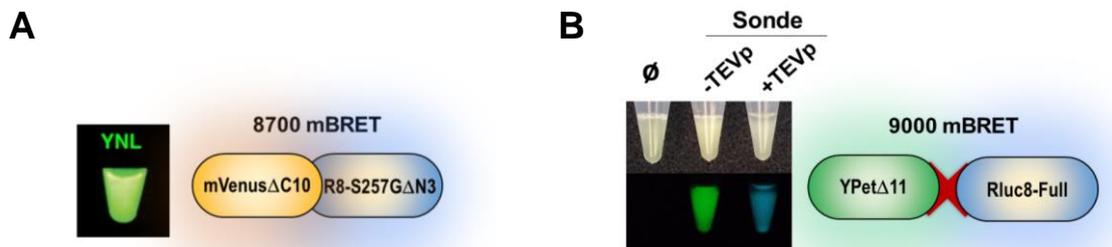


Figure 44 : Nano-lanternes

A] mVenus^{71,72}. **B]** Hypothèse Nano-lanterne YPet. Une augmentation du signal de BRET est attendue. Signal de bioluminescence naturelle pris en photo en chambre noire après récupération des cellules transfectées en présence de la sonde seule (-TEVp) et en présence de la sonde et de la protéase TEV (+TEVp).

II.1.b Adaptation de la sonde au modèle HCS

Un des autres objectifs de ma thèse a été de valider un deuxième mode de lecture de notre système en imagerie, afin de confirmer un double mode de lecture BRET / HCS. Moins utilisée car plus coûteuse que le BRET, l'HCS est néanmoins en plein essor en raison de la quantité importante d'informations générées par la visualisation du système dans les cellules vivantes ou non.

II.1.b.i Principe du HCS

La microscopie automatisée à haut débit est une approche multiparamétrique d'étude de la physiopathologie cellulaire. Basée sur des techniques d'imagerie cellulaire, ce système repose sur l'acquisition automatique d'images en microscopie, ou plein champ, de centaines de milliers de cellules, suivie de l'analyse quantitative en flux des images, de manière à tester en une seule et même manipulation des milliers de conditions. Le système HCS se compose d'un système d'imagerie cellulaire automatisé (ici l'INCell Analyzer 6000, GE Healthcare) permettant l'acquisition d'images, et d'un système de stockage et d'analyse des données (serveur Columbus, Perkin Elmer). Ces expériences d'optimisation HCS ont été menées en parallèle des différentes délétions réalisées sur la sonde. Dans un premier temps, nous avons cherché à localiser la fluorescence de la YPet dans le noyau des cellules avant clivage puis à exporter cette fluorescence hors du noyau des cellules après clivage. L'objectif est d'obtenir un fort contraste de fluorescence entre l'état basal non coupé et l'état clivé par la TEVp.

Suite aux expériences précédentes, le système a été pensé pour obtenir un signal de fluorescence de type ON/OFF permettant une réponse de type binaire : une cellule est dite positive ou négative, sans état intermédiaire de fluorescence. La délocalisation de la fluorescence de la sonde d'un compartiment cellulaire à un autre (du noyau vers le cytoplasme) permet d'obtenir un contraste optimal. Ces expériences ont été réalisées sur la sonde de départ non optimisée, la YPetFull-sTEV-Full*Rluc8*¹⁸⁹, et plusieurs séquences de localisation d'export (NES, *Nuclear Export Signal*) et/ou d'import (NLS, *Nuclear Localization Signal*) ont été testées.

II.3.b.1 Choix des séquences d'export et/ou d'import nucléaire

Une triple ou quadruple séquence de localisation d'import nucléaire (NLS3 ou NLS4) a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la *Rluc8* afin de localiser la sonde dans le noyau des cellules avant clivage par la protéase TEV. Sur le même modèle, différentes séquences d'export nucléaire (NES) simples ou doubles ont été testées et fusionnées en partie N-terminale de la YPet afin de localiser la fluorescence dans le cytoplasme après clivage par la TEVp. La **Figure 46A** représente schématiquement la délocalisation de fluorescence

attendue, la **Figure 46B** illustre les différentes constructions réalisées, et la **Figure 46C**, les résultats obtenus en microscopie.

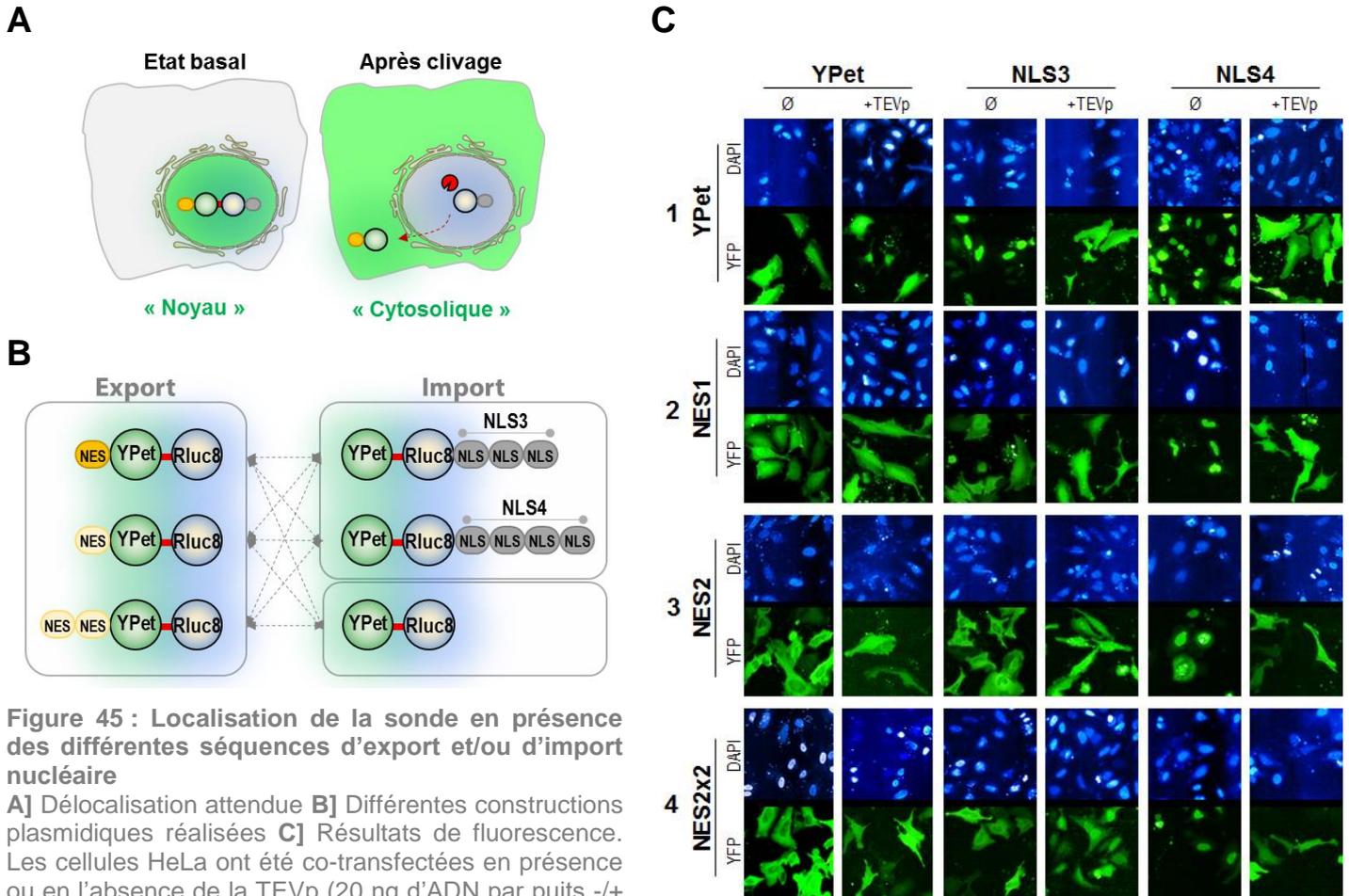


Figure 45 : Localisation de la sonde en présence des différentes séquences d'export et/ou d'import nucléaire
A] Délocalisation attendue **B]** Différentes constructions plasmidiques réalisées **C]** Résultats de fluorescence. Les cellules HeLa ont été co-transfectées en présence ou en l'absence de la TEVp (20 ng d'ADN par puits +/- 25 ng de TEVp dans une plaque 96 puits noire) n=3

La **Figure 46C** présente dans un premier temps, pour la YPet (1) une fluorescence dans le noyau des cellules avant clivage, quelle que soit la séquence d'import utilisée. Après clivage par la TEVp, on observe une délocalisation partielle de la fluorescence de la YPet, du noyau vers le cytoplasme. Afin d'obtenir une fluorescence de la YPet totalement exclue du noyau après clivage, différentes séquences d'export nucléaire ont été fusionnées à l'extrémité N-terminale de la YPet : NES-1 (2), NES-2 (3) ainsi que deux séquences NES-2 notées NES-2x2 (4), associées à la YPet seule ou sur les sondes nucléaires précédentes. Les séquences NES-1¹⁹³ et NES-2¹⁹⁴ ne diffèrent que de quelques acides aminés. La **Figure 46C-2,3,4**, présente les résultats obtenus avec les différentes séquences NES, en l'absence ou en présence des triples ou quadruples séquences d'import NLS3 ou NLS4. En l'absence de séquence d'import, la séquence NES-1 semble peu exclure la fluorescence du noyau comparé aux séquences NES-2 et NES-2x2, pour lesquelles la fluorescence semble bien exclue du noyau avant clivage. L'addition d'une triple séquence d'import NLS3, pour les constructions NES-1,- 2 ou- 2x2, n'entraîne pas la fluorescence de la YPet dans le noyau en

présence de la YPet seule avant clivage. Au vu de ces résultats, il semble y avoir une compétition entre les différents signaux d'import et d'export¹⁹³. En revanche, l'addition d'une quadruple séquence d'import NLS4, semble rétablir l'équilibre pour les différentes séquences NES : avant clivage par la TEVp, la fluorescence de la YPet est présente dans le noyau des cellules. Cependant, pour les trois séquences NES, après clivage par la TEVp, nous observons une fluorescence de la YPet dans toute la cellule, non exclue du noyau comme il aurait été attendu.

Cette non exclusion peut s'expliquer par une possible diffusion passive de la YPet du noyau au cytoplasme après clivage. En effet, la YPet est une petite protéine (environ 25 kDa) capable de diffuser librement entre le noyau et le cytoplasme, prenant ainsi le dessus sur le mécanisme du transport nucléaire. Les différentes recherches bibliographiques effectuées ont montré de nombreuses contradictions quant à la taille minimale requise pour permettre cette diffusion¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Lange *et al.*, ont démontré que la taille d'une protéine devait être inférieure à 40 kDa pour pouvoir diffuser entre le noyau et le cytoplasme¹⁹⁵ alors que l'équipe de Shimozono¹⁹⁶ a montré qu'une protéine entre 50 et 60 kDa était capable de diffuser entre ces deux compartiments cellulaires. Pour contrer ce problème de diffusion passive de la fluorescence entre les deux compartiments, la taille de la partie fluorescente libérée (NES-YPet), après coupure par la TEV, a été augmentée. Pour cela, nous avons choisi d'insérer une ou deux séquences codantes du gène de résistance à la puromycine (noté Puro^R) en amont de la séquence NES et de la YPet.

Pour réaliser les différentes constructions présentées **Figure 47-1,2,3,4,5**, la séquence d'export NES-2x2 a été sélectionnée, cette dernière montrant les meilleurs résultats d'exclusion de fluorescence de la YPet avant clivage. Toutes les constructions présentent une fluorescence de la YPet exclue du noyau avant clivage par la TEVp (**Figure 47-1,2,3**). L'ajout d'une seule séquence Puro^R (2) ne semble pas permettre une exclusion nucléaire de la fluorescence après clivage. En revanche, la construction réalisée avec deux gènes Puro^R (3) conduit à une fluorescence de la YPet exclue du noyau après clivage, mais aussi avant. Pour obtenir un contraste de type ON/OFF entre les deux états, la séquence NLS4, utilisée précédemment, a été clonée à l'extrémité C-terminale de la *Rluc8* (4). Dans le cas de cette dernière construction, bien que la fluorescence de la YPet soit exclue du noyau après clivage par la TEVp comme attendu, la fluorescence de la YPet n'est pas réellement présente dans le noyau des cellules avant clivage mais dans la cellule entière. Comme dans le cas de la séquence NES *versus* la séquence NLS3, la séquence NES-2x2 semble l'emporter sur notre séquence NLS4. Néanmoins, nous avons pris la décision de ne pas donner suite à ces expériences d'optimisation, la taille de notre sonde devenant trop conséquente. Nous avons alors choisi de travailler avec le contraste généré par la

construction (5), entre la fluorescence de la YPet dans le noyau des cellules à l'état basal, et celle de la cellule entière après clivage (5).

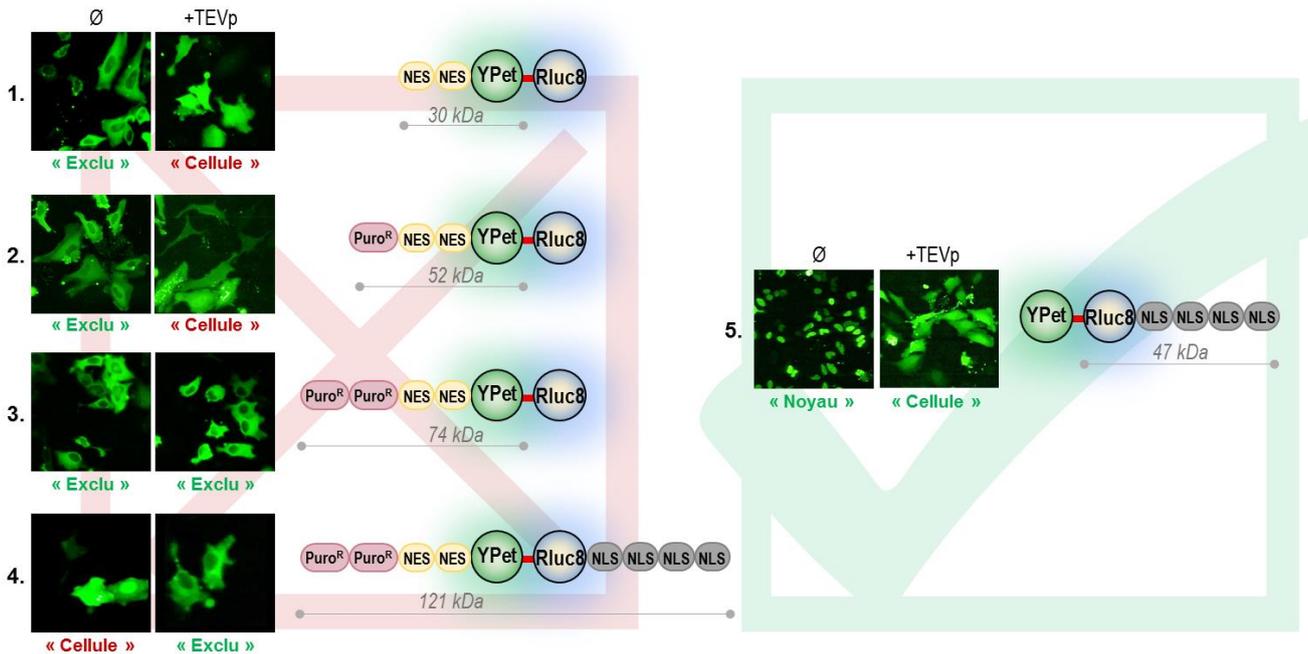


Figure 46 : Représentation schématique des différentes constructions après ajout du gène Puro^R et localisation cellulaire de la YPet avant et après clivage par la TEVp

La taille en kDa de chaque protéine après clivage par la protéase TEV est indiquée dans le cas de chaque construction par rapport à la construction de départ. Les cellules HeLa ont été co-transfectées en présence ou en l'absence de la protéase TEV (20 ng d'ADN par puits +/- 25 ng de protéase TEV pour une plaque 96 puits noire) n=3

II.3.b.2 Utilisation de la meilleure sonde BRET pour la double lecture BRET/HCS

Ces expériences menées en parallèle, à la fois sur l'optimisation de notre signal de BRET ainsi que sur le choix des signaux d'import et d'export, nous ont permis de sélectionner une sonde à la fois sensible en BRET mais aussi applicable à la lecture HCS. La sonde YPet Δ 11-sTEV-Full-Rluc8 a été retenue et la **Figure 48** présente les résultats après acquisition à l'INCell Analyser6000 pour des quantités de protéase préalablement testées lors des délétions YPet/Rluc8 (cf. II.1.a.ii.2).

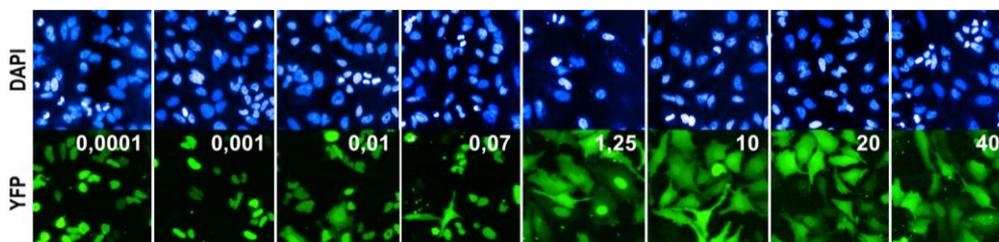


Figure 47 : Optimisation du paramètre HCS

Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec la sonde YPet Δ 11-sTEV-Full-Rluc8 (20 ng d'ADN par puits) en présence d'une quantité croissante de protéase TEV allant de 0 à 40 ng. n \geq 3. Les expériences ont été menées en parallèle à partir d'un mix réactionnel commun séparé en deux plaques (BRET et fluorescence). Résultats présentés en ng de TEVp transfectée.

La délocalisation de la fluorescence de la YPet est nettement observée après augmentation progressive de la dose de protéase en comparaison des noyaux marqués au DAPI.

II.3.b.3 Comparaison des paramètres BRET/HCS

En plus de l'analyse de BRET, pour chaque plaque HCS, un script d'analyse d'image a pu être développé pour quantifier les résultats obtenus avec les logiciels Columbus (Perkin Elmer) ou ImageJ / Fiji (cf. **Partie expérimentale – Techniques d'analyse d'images III.5**). Grâce au marquage des noyaux, le nombre de cellules par puits a pu être déterminé ainsi que le nombre de cellules transfectées (population noyaux verts). Dans un second temps, à partir de cette population de cellules transfectées, les cellules dites négatives (fluorescence de la YPet uniquement dans le noyau) et celles positives (fluorescence de la YPet présente en dehors du noyau) ont pu être comptabilisées. Pour différencier les cellules négatives des cellules positives, une zone précise a été délimitée autour du noyau. Si une intensité de fluorescence est observée dans cette zone, la cellule sera considérée comme positive. Les scripts d'analyse d'images donnent aussi de nombreuses informations quant au nombre total de cellules transfectées, de cellules positives et de cellules négatives, ainsi que les valeurs d'intensité de fluorescence de chaque puits.

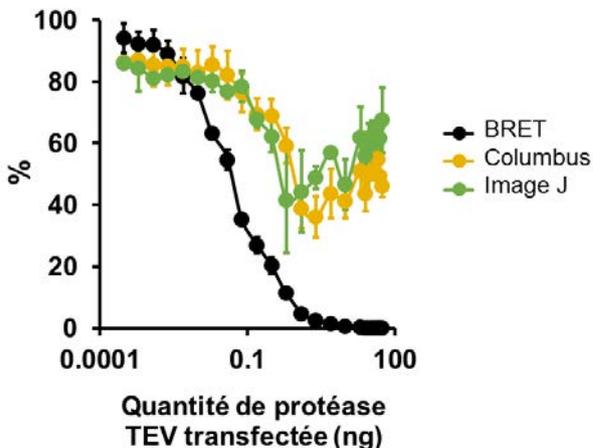


Figure 48 : Comparaison des paramètres BRET/HCS pour la sonde optimisée

En BRET (noir), les résultats sont présentés en fonction du pourcentage de coupure maximale de TEVp et pour le HCS (jaune : Columbus / vert : ImageJ), en fonction du pourcentage de cellules négatives parmi la population de cellules transfectées $n \geq 3$.

La **Figure 49** rapportée en % de coupure maximale pour le BRET (courbe noire) et en pourcentage de cellules négatives dans le cas du HCS (courbes jaunes et vertes), permet de comparer les deux méthodes BRET et HCS. L'analyse des résultats développés à partir des logiciels Columbus ou Image J suit la même tendance. L'approche HCS reste cependant moins sensible que l'approche BRET, avec une valeur d'IC50 d'environ 1900 pg de TEVp comparée aux 42 pg obtenus avec la méthode de BRET. Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées par une approche de transfection transitoire, tous les puits de cellules n'étant pas transfectés de façon homogène. Un second phénomène est observé

pour les fortes doses de TEVp pour lesquelles beaucoup de cellules mortes ont été considérées comme des cellules négatives en raison de leur forme arrondie, malgré un champ de cellules 100% positives. Le script d'analyse développé avec le logiciel ImageJ (gratuit), semble aussi efficace que le logiciel Columbus (payant), mais nécessite encore d'être optimisé sur quelques paramètres. Le travail des scripts reste à améliorer mais nous espérons obtenir de meilleurs résultats en couplant tous ces paramètres à nos lignées de cellules stables et à notre technique d'optimisation de la transfection.

II.2 Outils développés lors du projet

II.2.a Lignées cellulaires stables et système CRISPR/Cas9

Les lignées cellulaires stables sont utilisées dans de nombreuses applications, notamment la production de molécules comme les protéines recombinantes ou les anticorps. Elles ont également un intérêt majeur dans le criblage de médicaments en assurant une reproductibilité des résultats et un calibrage stable du système, nécessaire lors de la mise au point de tests de criblage. Nous avons choisi de réaliser des lignées de clones cellulaires stables, en utilisant le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9), largement développé et exploité ces dernières années^{199,200}. Un des avantages notables de ces lignées cellulaires stables est qu'elles surexpriment la protéine cible uniformément et indéfiniment, contrairement aux protéines cibles exprimées après transfection transitoire. La production de protéines est donc reproductible et peut être de ce fait facilement augmentée puisque que 100% des cellules vont exprimer la protéine d'intérêt²⁰¹. Cependant, la génération de lignées de cellules stables nécessite plus de temps et d'efforts que la transfection transitoire, notamment dans le processus de sélection des clones. En effet, un vecteur d'expression codant pour le gène d'intérêt doit être inséré dans le génome de la cellule hôte. Lors de la génération de ces lignées, seules quelques cellules intégreront le vecteur d'intérêt dans une région hautement transcrite, ce qui permettra la production d'une quantité suffisante de protéines. L'isolement et la caractérisation d'un grand nombre de clones est donc nécessaire et peut prendre plusieurs mois de travail²⁰¹, particulièrement pour la pousse cellulaire au moment de l'isolement de clones à partir d'une cellule unique.

II.2.a.i Choix des vecteurs

Pour réaliser les différentes lignées cellulaires stables pour les différentes applications, le système CRISPR/Cas9^{200,202,203} a été utilisé. Ce système, de par sa simplicité d'utilisation, permet de ne pas passer par les systèmes de transduction lentivirale²⁰⁴, plus contraignants dans la réalisation de lignées cellulaires stables.

Un petit ARN guide (ARNg), spécifique d'une séquence définie d'ADN, vient se fixer spécifiquement à l'endonucléase Cas9. Ce complexe va permettre de reconnaître une zone spécifique du génome : AAVS1 (Adeno-Associated Virus Integration Site 1). Cette zone spécifique de du génome humain, choisie par nos soins, sera alors clivée, provoquant une cassure double brin au niveau de l'ADN. Cette coupure sera réparée par recombinaison homologue par la machinerie cellulaire ce qui permettra d'intégrer un morceau d'ADN étranger au sein de la cellule^{200,202,203}.

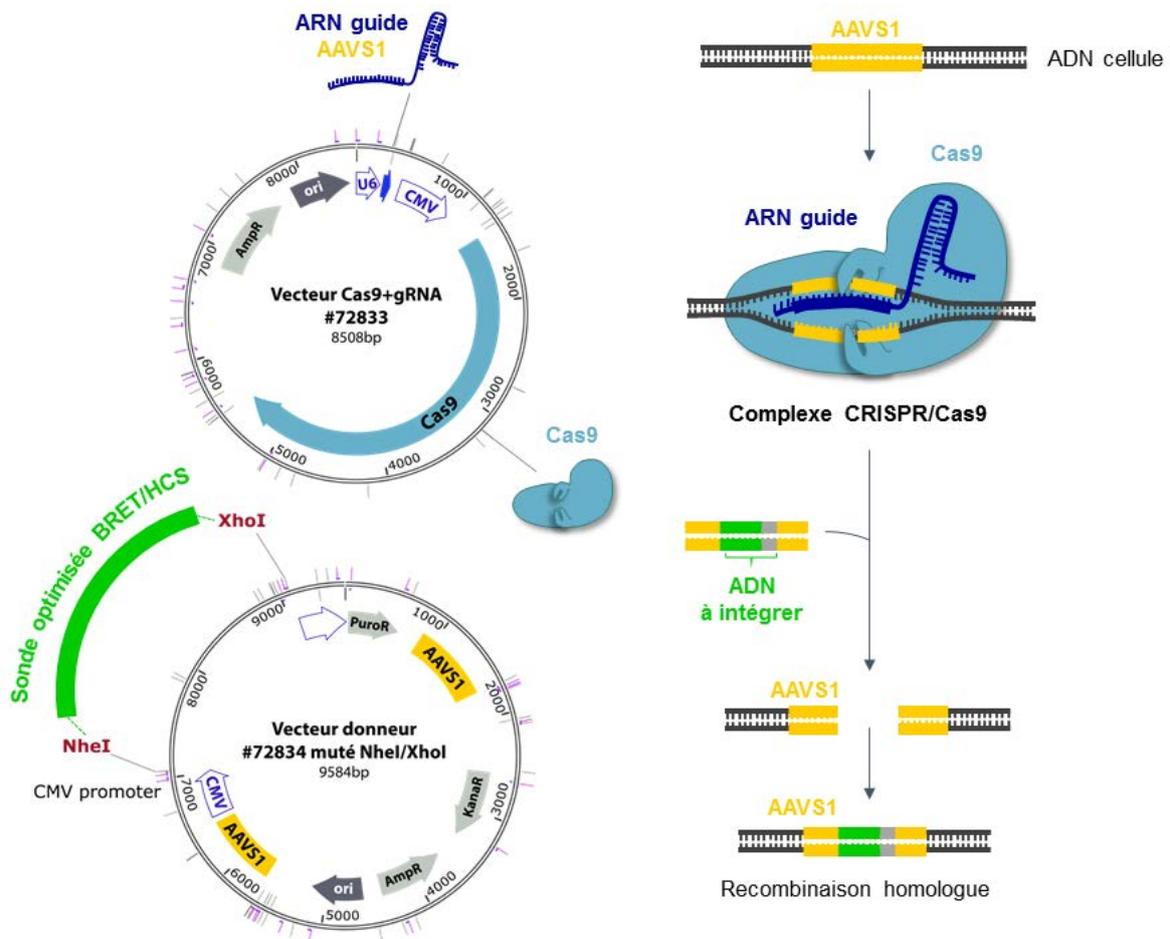


Figure 49 : Système CRISPR/Cas9 et vecteurs utilisés dans la réalisation de lignées cellulaires stables.

Le vecteur AAVS1-T2-CRIPR-in-pX330 (#72833 addgene) code pour la protéine Cas9, et pour l'ARNg AAVS1. Le vecteur donneur, pMK232-CMV-OsTIR1-PURO (#72834addgene) exprime la sonde BRET/HCS optimisée sous contrôle du promoteur CMV (Cytomegalovirus) entre deux séquences AAVS1 dans les cellules humaines

Le système choisi se compose de deux vecteurs. Le premier, AAVS1-T2-CRIPR-in-pX330 (#72833 addgene²⁰⁵), code pour la protéine Cas9, une endonucléase qui coupe spécifiquement les séquences du génome AAVS1 dans les cellules humaines, ainsi que pour un ARN guide, permettant ainsi la formation du complexe CRISPR/Cas9 et la réparation de la zone endommagée. Le second, vecteur donneur, pMK232-CMV-OsTIR1-PURO (#72834addgene), exprime une protéine X sous contrôle du promoteur CMV (Cytomegalovirus) entre deux séquences AAVS1 dans les cellules humaines. Cet ADN sera intégré spécifiquement dans le génome de nos cellules par recombinaison lors du processus de réparation du site AAVS1. Une mutagenèse dirigée a été réalisée pour supprimer le site de restriction *NheI* présent en aval du promoteur CMV sur le vecteur #72834, et une seconde a permis l'ajout d'un site *XhoI* en partie C-terminale de la protéine X. Toutes les constructions réalisées dans cette thèse ont été pensées et clonées entre les sites de restriction *NheI* et *XhoI* pour interchanger facilement les sondes d'un vecteur à l'autre et de

ce fait générer rapidement des lignées cellulaires stables pour cette approche CRISPR/Cas9 (**Figure 50**).

II.2.a.ii Réalisation des lignées et sélection

Une lignée stable de cellules HeLa exprimant la sonde BRET/HCS utilisée dans les expériences de gène rapporteur, a été générée *via* le système CRISPR/Cas9. Après apparition des premiers îlots de cellules, celles-ci ont été sélectionnées grâce à la puromycine : une forte dose de 8 µg/mL au début de la sélection permet d'éliminer rapidement les cellules n'ayant pas intégré la sonde, dose diminuée à 2 µg/mL après deux semaines de sélection.

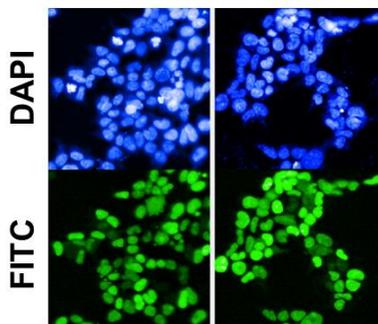


Figure 50 : Lignée de cellules stables générée par le système CRISPR/Cas9

Les cellules expriment la sonde BRET/HCS utilisée dans les expériences de gène rapporteur (YPet Δ 11-sTEV-Full-*Rluc8*). Marquage DAPI et FITC présenté pour deux champs. INCell Analyser 6000, 10X.

Lors de ces trois années, nous n'avons développé qu'un seul modèle de lignée cellulaire stable comme preuve de concept. Le vecteur YPet Δ 11-sTEV-*Rluc8*-Full correspondant à notre sonde BRET/HCS a été choisi (**Figure 51**). Tous les outils ont été pensés pour générer facilement et rapidement d'autres lignées cellulaires stables. Ainsi, les sondes réalisées ont été pensées pour être clonées entre les sites *NheI* et *XhoI* présents sur le vecteur donneur #72834 muté. Dans la partie applications, les différentes constructions plasmidiques réalisées ont été clonées dans ce même vecteur donneur #72834 modifié, même si ceux-ci ont été transfectés transitoirement. La preuve de concept du système a donc été validée avec cette première lignée de cellules stables. Une lignée cellulaire de type CRISPR/Cas9 peut être obtenue en 2 mois de la transfection à la sélection des clones.

II.2.b Optimisation de la technique de transfection transitoire pour le haut-débit

Suite à ces différentes expériences de délétions et au nombre important de constructions plasmidiques clonées et testées, nous avons développé lors de cette thèse, une technique de transfection reverse haut débit grâce aux moyens matériels disponibles au laboratoire. Chaque étape du processus de transfection a été optimisée et automatisée grâce à l'utilisation de l'Echo550 (Labcyte), un nano-dispenseur acoustique. L'optimisation de cette technique fait l'objet d'une publication actuellement en révision chez *SLAS Discovery* : malgré les nombreux avantages de la technologie de distribution acoustique ADE (Acoustic Droplet Ejection), aucun essai de transfection n'a été développé à ce jour. Manuellement, la transfection d'ADN plasmidique est un processus long et sujet à de nombreuses erreurs si de multiples conditions sont croisées et si plusieurs dilutions sont nécessaires. L'utilisation de la technologie ADE devient donc un outil précieux pour i) la miniaturisation, permettant ainsi l'utilisation d'une plus petite quantité d'ADN et d'agent transfectant, ii) le haut débit et la reproductibilité par rapport au protocole manuel, et ce même pour des débutants, iii) la distribution d'une quantité d'ADN à partir d'une même solution mère diluée ainsi qu'un multiplexage facile de différents ADN, dans une même plaque destination, une liste de programmation de l'appareil lui indiquant le puits source et les puits destinations requis dans le multiplexage en 384 puits sans erreurs.

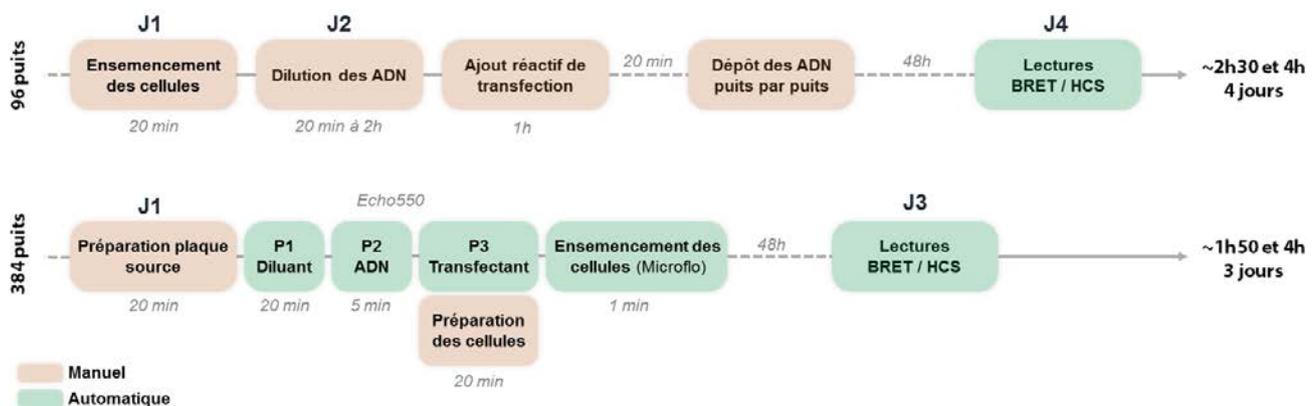


Figure 51 : Diagramme de comparaison des techniques de transfection manuelle et haut débit

Comparaison du temps de manipulation dans le cas des plaques 96 puits (manuel) et 384 puits (haut débit). Les étapes indiquées en marron représentent les opérations manuelles et en vert les différentes étapes automatisées.

L'adaptation du protocole de transfection reverse permet d'obtenir une technique haut débit, améliorant ainsi le débit des transfections, par rapport aux diverses manipulations réalisées en plaque 96 puits et permet de croiser de nombreuses conditions en parallèle au sein d'une même plaque 384 puits. La **Figure 52** compare les deux méthodes de transfection réalisées manuellement (96 puits), ou de façon automatisée (384 puits). Les étapes manuelles sont représentées en rouge et les étapes automatisées en vert. Les résultats sont détaillés dans la publication présentée à la page suivante.

High-Throughput DNA Plasmid Transfection Using Acoustic Droplet Ejection Technology

SLAS Discovery
1–9
© 2018 Society for Laboratory
Automation and Screening
DOI: 10.1177/2472555218803064
slasdisc.sagepub.com


Béatrice Colin¹ , Benoit Deprez¹, and Cyril Couturier¹

Abstract

The Labcyte Echo acoustic liquid handler allows accurate droplet ejection at high speed from a source well plate to a destination plate. It has already been used in various miniaturized biological assays, such as quantitative PCR (q-PCR), quantitative real-time PCR (q-RT-PCR), protein crystallization, drug screening, cell dispensing, and siRNA transfection. However, no plasmid DNA transfection assay has been published so far using this dispensing technology. In this study, we evaluated the ability of the Echo 550 device to perform plasmid DNA transfection in 384-well plates. Due to the high throughput of this device, we simultaneously optimized the three main parameters of a transfection process: dilution of the transfection reagent, DNA amount, and starting DNA concentration. We defined a four-step protocol whose optimal settings allowed us to transfect HeLa cells with up to 90% efficiency and reach a co-expression of nearly 100% within transfected cells in co-transfection experiments. This fast, reliable, and automated protocol opens new ways to easily and rapidly identify optimal transfection settings for a given cell type. Furthermore, it permits easy software-based transfection control and multiplexing of plasmids distributed on wells of a source plate. This new development could lead to new array applications, such as human ORFeome protein expression or CRISPR-Cas9-based gene function validation in nonpooled screening strategies.

Keywords

transfection, high throughput, acoustic droplet ejection, mammalian cells, liquid handling

Introduction

Nanovolume liquid handlers have opened new ways to perform biological experiments, ranging from micro- to picoliter scale, enhancing the high throughput of various biological assays. Several noncontact dispensing methods have been described and are mostly based on inkjet printing technologies.¹ Out of these, acoustic droplet ejection (ADE) uses focused acoustic energy to control ejection of a specific volume of liquid.² The Echo (Labcyte) is an accurate, precise, and efficient device that uses this technology and produces highly reproducible, fully automated, noncontact, and tipless dispensing of liquid at high throughput.³ Moreover, it is fitted with an integrated dynamic fluid Analysis technology (Labcyte) for the determination of the fluid composition, the liquid height in the source plate, and the power needed to eject 2.5 nL droplets into the destination microplate.⁴ Volumes up to 500 nL can be handled by transferring several hundreds of droplets per second. Initially, this device was only able to deliver solutions containing at least 70% DMSO, but new settings have circumvented this limitation to deliver more aqueous solutions.⁴ To date, ADE has been successfully used

to miniaturize biological applications such as quantitative PCR (q-PCR) and quantitative real-time PCR (q-RT-PCR), drug and RNA interference screening,⁵ and protein crystallization⁶ and is also expected to be applied soon to high-throughput sequencing⁷ and cell dispensing.⁸ Thanks to the Cherry Pick software (Labcyte), the user can elaborate a study plan to control the volume to be dispensed and the source well and destination well, within the source and destination plates, respectively. A customized picklist file can be generated in spreadsheet software to enable multiplexing of

¹Université de Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1177—Drugs and Molecules for Living Systems, Lille, France

Received June 11, 2018, and in revised form Sept 3, 2018. Accepted for publication Sept 5, 2018.

Corresponding Author:

Cyril Couturier, U1177 Inserm, Drugs and Molecules for Living Systems, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, F-59000 Lille, France.

Email: cyril.couturier@univ-lille.fr

several fluids dispensing from different source plates in the expected wells of different destination plates.

Given that transfection is the starting point of many cell-based experiments, having an easy and reproducible way to perform it in a high-throughput manner would be an extremely valuable tool, even for nonspecialists. High-throughput transfection allows for rapid optimizations of the parameters, which ensures efficient development of the miniaturized cellular experiments. However, high-throughput transfection is a challenging issue, and whereas several attempts have been successful for siRNA screening,⁹ very few examples of DNA plasmid transfection have been reported so far. A jetPEI-based method has been described using the Biomek liquid handling system in 96-well plate format.¹⁰ A microfluidic chip has been developed for the independent transfections of 280 chambers, but it requires specialized skills in this field.¹¹ Despite all the advantages of the ADE technology, to date no plasmid transfection assay has been developed using this technology. Plasmid DNA transfection is, however, time-consuming and error-prone if various multiplexed conditions and several DNA dilutions are required. An easy, efficient, and high-throughput cell transfection protocol using the ADE technology would therefore be a valuable tool for several reasons: (1) the ability to miniaturize, leading to the use of a smaller amount of the prepared DNA; (2) the high throughput and reproducibility over the manual protocol (even for nonexperts); and (3) the device-controlled dispensing from a pre-defined picklist, allowing the DNA amount to dispense from a single diluted DNA stock solution, and easy multiplexing of several plasmids' DNA in the same destination well. Beyond calcium phosphate precipitation-based DNA delivery systems, efforts have been made to enhance DNA cell delivery, such as encapsulating nucleic acids in liposome-like complexes using lipids or cationic polymers or, more recently, using nonliposomal polymeric chemistry systems.¹² However, transfection can be challenging as every cell type has a different set of requirements for optimal introduction of foreign DNA. The transfection methods relying on DNA encapsulation are relatively simple and straightforward and generally provide high transfection efficiency in many cell lines.¹³ Reverse transfection protocols have been developed to enhance the throughput and quickly test and combine several plasmid transfections.¹⁴ These reverse protocols seem suitable for use of the Echo liquid nanodispenser, as nucleic acid complexes with the transfection reagent are formed before seeding the cells.

In this study, we have evaluated the ability of an acoustic-based dispensing system to perform plasmid DNA transfection in 384 wells. We simultaneously co-optimized several parameters involved in the transfection process: the total amount of DNA, the nature of the transfection reagent, and

the starting DNA concentration. We then improved throughput, evaluated the stability of preloaded plates, and finally implemented optimized conditions to perform co-transfection experiments.

Materials and Methods

Plasmid DNA Vectors

The tdTomato-N1 plasmid expressing the tandem dimer Tomato was a gift from Michael Davidson and Roger Tsien (Addgene plasmid 54562). The humanized mVenus coding sequence was amplified by PCR and cloned in the same vector backbone instead of the tdTomato.

Plasmid DNA Extraction

Plasmid DNA was isolated using miniprep NucleoBond extraction columns (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol.

Transfection Reagents

jetPEI (Polyplus) or *TransIT*-X2 Dynamic Delivery System (Mirus) transfection reagents were used with their respective diluents: 150 mM NaCl and Opti-MEM medium (Life Technologies) according to the supplier's instructions.

Echo 550 Reverse Transfection

The Echo 550 device was set to 384LDV_AQ_B2 mode. Three picklists were generated from a Microsoft Excel macro file to design the position of each source well, the expected transferred volume, and the destination wells (step 1: diluent dispensing; step 2: DNA transfer; step 3: transfection reagent mix dispensing). Generated picklists were imported in the Echo Cherry Pick 1.5.3 software for transfers. A 384LDV Microplate (Labcyte) and a 384-well Microplate μ Clear Black (Greiner Bio-one) were used as the source plate and destination plate, respectively. In the optimized protocol, diluent was dispensed using the MicroFlo dispenser (BioTek, 1 μ L cassette).

Cell Culture

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum, 4.5 g/L glucose, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (Life Technologies). To reach a cell density suitable for proper image analysis after 48 h of growth, 1500 cells were seeded per well using the MicroFlo dispenser (BioTek, 10 μ L cassette) after the Echo 550 dispensing and incubated at 37 °C, 5% CO₂.

Cell Fixation

Transfected cells were fixed for 15 min with 10% formalin (Sigma-Aldrich). Nuclei were stained for 20 min with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst (Invitrogen) diluted in 1 \times phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies), and washed three times using 1 \times PBS.

Image Acquisition and Analysis

Images of two or three fluorescent channels (Hoechst, tdTomato, mVenus) were sequentially acquired (three fields) using the INCell Analyzer 6000 (GE Healthcare, Life Sciences) with 10 \times objectives and a proper emission filter set (DAPI, dsRed, and FITC, respectively). Transfection efficiencies were analyzed based on nuclei staining using Columbus software (PerkinElmer) and expressed as the percent of transfected cells.

Data Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.00 software using one-way ANOVA analysis and Dunnett posttests, or two-way ANOVA and Bonferroni posttests.

Results and Discussion

Plasmid DNA Transfection Feasibility Using Echo Acoustic Dispenser

To test the ADE technology for automated plasmid transfection upon a reverse transfection protocol, we used HeLa cells and two different transfection reagents: jetPEI, a lipopolyplex, and *TransIT-X2*, a nonliposomal system. To easily monitor transfection efficiency by automated confocal imaging, a tdTomato red fluorescent protein expressing plasmid was chosen due to its exceptional brightness.¹⁵ Four main parameters can affect DNA transfection efficiency: (1) DNA amount, (2) ratio of transfection reagent to DNA, (3) cell density at the time of the transfection mixture addition, and (4) incubation time of the reagent–DNA complex. We focused our effort on the first three parameters since DNA solution and transfection reagent incubating time before cell addition cannot easily be controlled in the 384-well format. Using three-step dispensing, we studied the impact of these parameters by changing the diluent volumes from 15 to 4000 nL, the amount of DNA from 5 to 100 ng, and the concentration of the final dispense of 500 nL containing the DNA transfection reagent (1 \times and 2 \times concentrations). In our preliminary experiments, we noticed that DNA solution dispensed could evaporate before addition of the transfection reagent mixture (data not shown), so a diluent was dispensed before DNA to circumvent this

problem. The 500 nL transfection mixture volume per well was the same for both reagents, as calculated according to the manufacturer's instructions, and was not optimized in this study. As this mixture requires vortexing of a fresh preparation before addition to diluted DNA solutions, we filled the source plate just after vortexing.

After this final use of acoustic dispensing, cells were seeded using BioTek MicroFlo at a density of 1500 cells/well, as this ensures proper final automated image analysis 48 h posttransfection.

The *TransIT-X2* reagent showed significantly higher transfection efficiency (Fig. 1) than jetPEI at both concentrations used (up to $89.3 \pm 1.15\%$ and $43.75 \pm 9.2\%$ positive cells, respectively; $p < 0.05$). The higher concentration of jetPEI showed generally higher transfection efficiency than 1 \times for 5–30 ng of transfected DNA (Fig. 1B) and 500–2000 nL diluent volumes (Fig. 1A). The poor efficiencies obtained using jetPEI could be explained by the suppression of the vortex step normally required to form optimal DNA–jetPEI complexes, which can hardly be set up with a 384-well plate during the dispensing time. Better efficiencies could then be expected for transfection reagents avoiding vortex steps, such as the nonliposomal system *TransIT-X2* in our case. However, more studies would be necessary to determine if non-liposomal-based transfection leads to higher efficiencies than liposome-based transfection in our high-throughput protocol. The best transfection efficiencies for *TransIT-X2* were obtained with 5–30 ng of transfected DNA and diluent volumes ranging from 250 to 2000 nL. In these conditions, both concentrations of reagent led to the same results (Fig. 1A,B): significantly higher transfection efficiencies were obtained for a quantity of transfected DNA ranging from 5 to 30 ng with 1000 nL of diluent (Fig. 1B). The Echo dispenser was developed to dispense 2.5 nL droplets from source wells filled with 3–12 μL of aqueous liquid using an LDV plate, with a 9 μL working volume. Using 100 ng/ μL DNA solution allows a total dispense of 900 ng, which represents 45 different destination wells that can be filled with 20 ng of DNA from the same source well. In order to increase this number, we examined the effect of the starting DNA solution concentration on the transfection efficiency. HeLa cells were transfected using 1 \times concentrated *TransIT-X2*, with 5–100 ng of DNA, but using a serial dilution of 400, 200, and 100 ng/ μL of the dispensed DNA solution in three separate wells of the source plate. For all the diluent volumes tested, a starting DNA concentration of 100 ng/ μL leads to significantly higher transfection efficiencies than 200 and 400 ng/ μL for 5–30 ng of DNA dispensed (Fig. 1C). This could be due to variations in liquid surface tension, a crucial parameter for droplet ejection.¹⁶ DNA greatly increases the viscosity of water and might then impair the dispensing process in acoustic liquid delivery. However, to confirm this point, we would have to test each cell line used.

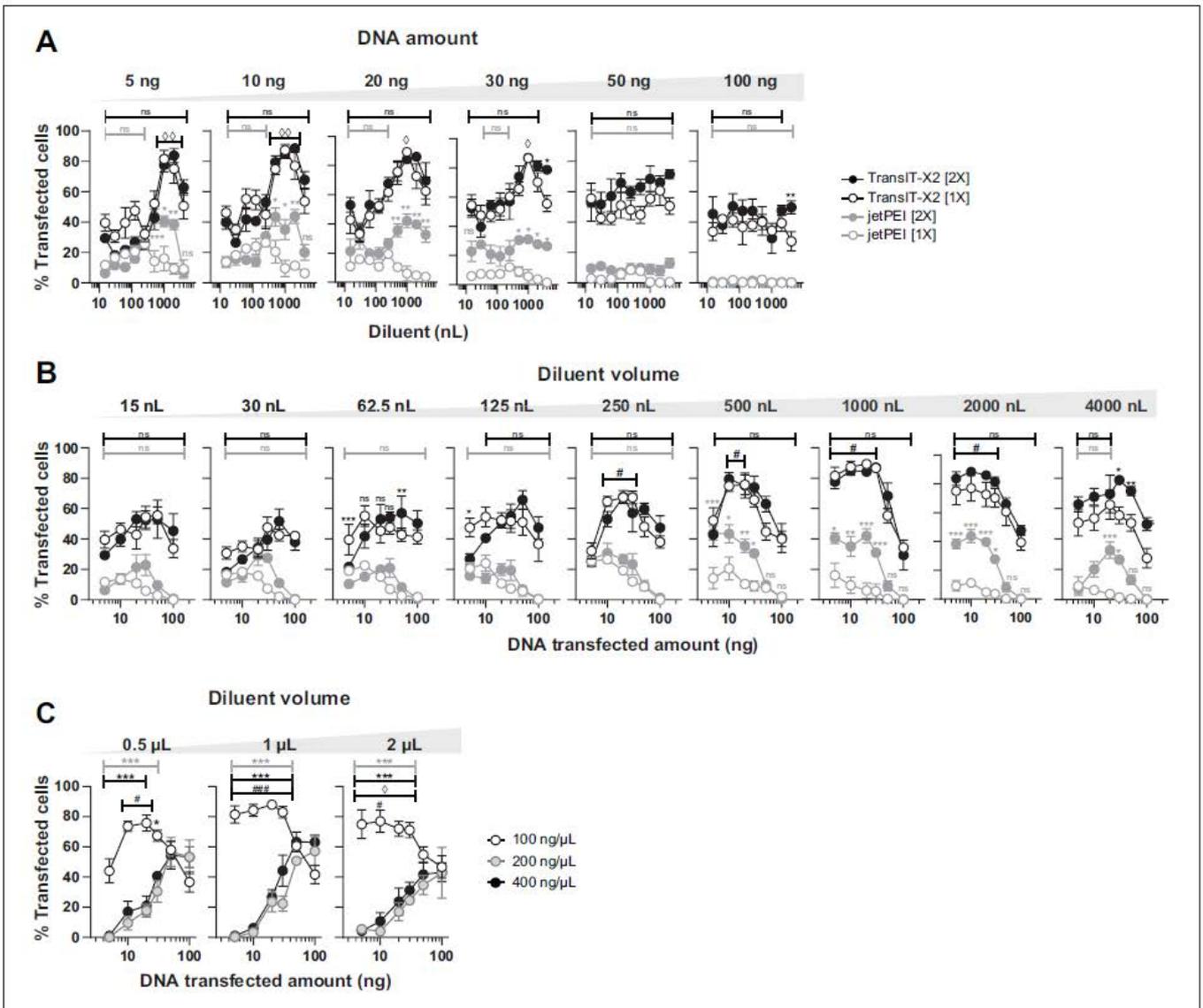


Figure 1. Transfection feasibility using an Echo 550 acoustic nanovolume dispenser. HeLa cells were reverse transfected using the Echo 550 device and *TransIT-X2* (black) or *jetPEI* (grey) transfection reagents. The 1× concentration recommended by the manufacturer or a 2× concentration was used (unfilled and filled circles, respectively). Volumes from 15 to 4000 nL of the recommended diluent (Opti-MEM medium for *TransIT-X2*; 150 mM NaCl for *jetPEI*) were used with increasing amounts of DNA (5–100 ng). Transfection efficiencies were determined 48 h later using image-based analysis software. **(A)** Results expressed as a percent of the transfected cells for each DNA amount dispensed upon diluent volume increase. **(B)** Same results expressed for each diluent volume upon increasing the amount of DNA dispensed. The error bars represent the SEM with $n \geq 4$. Two-way ANOVA and Bonferroni posttest were used for statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in grey when comparing 1× and 2× *jetPEI* conditions, and in black for 1× and 2× *TransIT-X2*. One-way ANOVA and Dunnett posttest were used for statistical analysis. $\diamond p < 0.05$, $\diamond\diamond p < 0.01$ when comparing the 1× *TransIT-X2* efficiencies to each other for the different diluent volumes used **(A)**. $\#p < 0.05$, $\#\#\#p < 0.01$ when comparing the 1× *TransIT-X2* efficiencies to each other for the different DNA amount used **(B)**. **(C)** DNA source plate optimal working concentration. HeLa cells were transfected using the *TransIT-X2* reagent (1× concentration), diluent volumes of 0.5–2 µL, and a DNA concentration in the source plate from 100 to 400 ng/µL, to dispense 5–100 ng/well. Transfection efficiencies were determined 48 h later using image-based analysis software. The error bar represents the SEM with $n \geq 4$. Two-way ANOVA and Bonferroni posttest were used for statistical analysis. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in grey and black when the 100 ng/µL condition is compared with the 200 and 400 ng/µL conditions, respectively. One-way ANOVA and Dunnett posttest statistical analysis were used to compare transfection efficiencies to each other for the different DNA amounts used. $\#p < 0.05$, $\#\#\#\#p < 0.001$ when comparing data with 50 and 100 ng DNA dispensed, and $\diamond p < 0.05$ when comparing data with 100 ng of DNA dispensed.

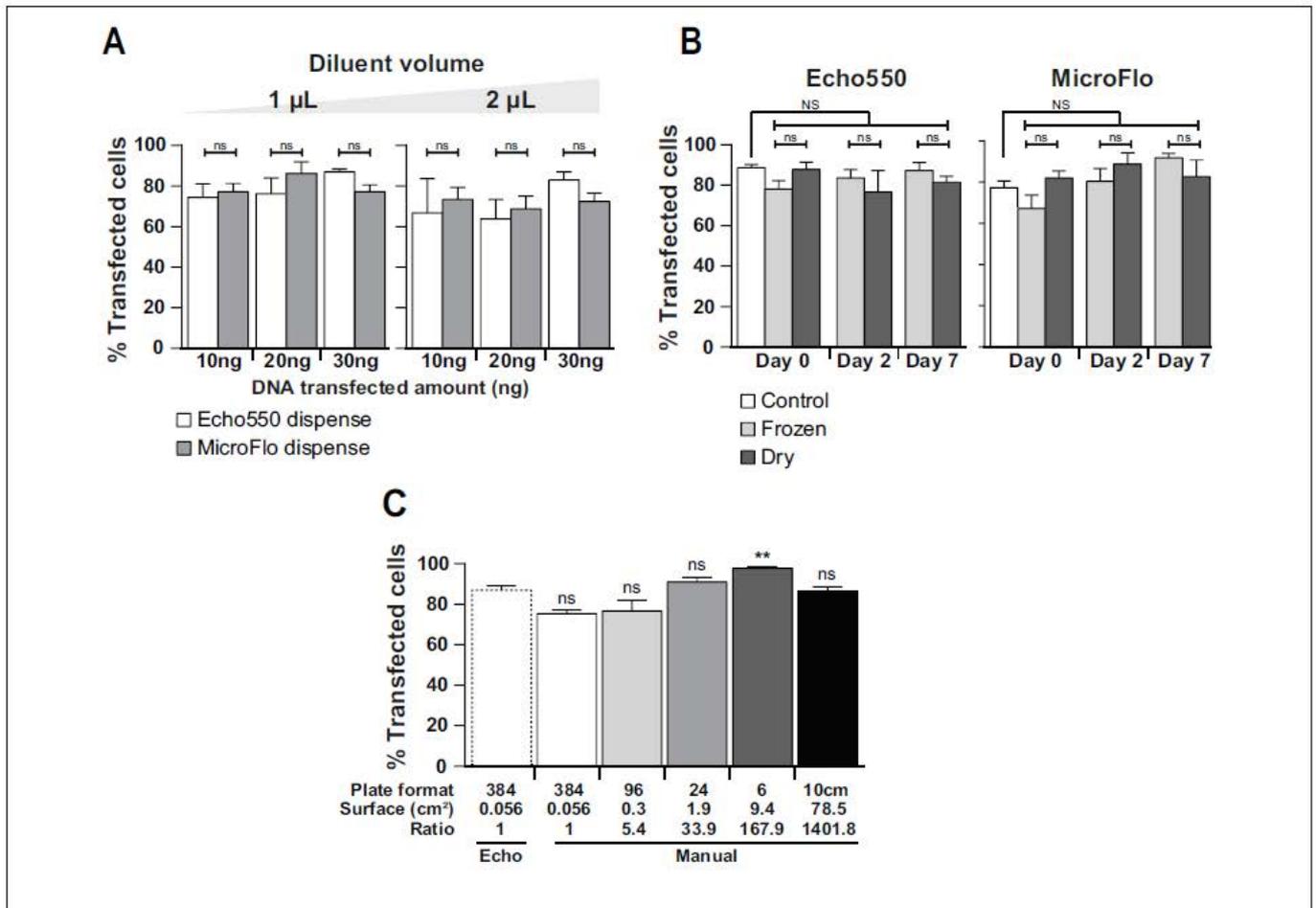


Figure 2. Improvement of the protocol. **(A)** Optimization of the transfer conditions. HeLa cells were reverse transfected using $1 \times$ *TransIT-X2* reagent with 10 to 30 ng of DNA, as in Figure 1, but 1 or 2 μ L of the DNA diluent was dispensed using either Echo 550 or MicroFlo. The results are expressed as a percent of transfected cells. **(B)** Stability of prepared DNA plates. One microliter of diluent was dispensed using MicroFlo and 20 ng of DNA was dispensed by Echo 550 and immediately transfected as previously (control) or either stored at room temperature once dry or frozen at -20°C . At day 0, 2, or 7, dry DNA was resuspended with 1 μ L of diluent using Echo 550 or MicroFlo, and frozen plates were unfrozen at room temperature. Cells were then seeded using MicroFlo, as in Figure 1. The results are expressed as a percent of transfected cells. **(C)** Translation of the protocol to a higher scale. The volumes and cell numbers used in the enhanced MicroFlo/Echo 550 protocol (control) were adapted to other well/plate formats using ratios calculated from the well/dish surface starting from the 384-well plate. Transfection efficiencies were determined 48 h posttransfection using image-based analysis software. The error bar represents the SEM with $n = 3$. Two-way ANOVA and Bonferroni posttest were used for statistical analysis. ns = statistically nonsignificant difference.

These first results showed that our three-step Echo 550-based reverse transfection DNA-dispensing protocol is efficient and accurate. For further optimization, we used the best parameters obtained for HeLa cells: *TransIT-X2*, 1 μ L of Opti-MEM diluent, a DNA source concentration of 100 ng/ μ L, and a total DNA dispensed amount of 10–30 ng.

Improvement of the Protocol

We thought that our protocol could be further improved in terms of throughput. We estimated the throughput of our protocol by measuring the time required for each step: 25 or 50 min to dispense 1 or 2 μ L of diluent, respectively; 5 min

to deliver 20 ng of DNA (starting from a 100 ng/ μ L concentration); 15–20 min for the 500 nL transfection mixture; and only 45 s for dispensing cells using MicroFlo. Our initial settings for the overall dispensing process then required nearly 1 h to transfect a 384-well plate, including the manual plate handlings between the different steps. The handling of both the diluent and transfection reaction mixture appears to be the throughput-limiting step. Acoustic dispensing is particularly well suited to prepare the low volumes of transfection mixture required for this kind of experiment, saving this usually expensive reagent. We therefore decided to keep this technology for this step. However, MicroFlo is able to dispense 1 and 2 μ L in 8.5 and

10.5 s, respectively. As the largest volume to be dispensed is the diluent, we compared HeLa cell transfection using Echo- or MicroFlo-based dispensing for the diluent step. Both dispensing methods led to similar results (Fig. 2A), and no significant differences in transfection efficiencies were noticed. MicroFlo lowered the overall process time to less than 30 min, enhancing the throughput of the protocol by twofold, up to 16 plates per day. At this rate, another expected limiting factor would be the cell preparation, as an entire workday would be necessary to fill 16 plates, assuming a rate of one plate every 30 min. We then tested whether plates could be preloaded with DNA in order to add the transfecting reagent and cells extemporaneously. Whereas more than 4 years of DNA conservation has previously been reported using different optimized media,¹⁷ such as Biomatrix or polyvinyl alcohol, we avoided their use in order to keep our initial working protocol (DNA congelation or drying in Opti-MEM medium). One microliter of diluent was then dispensed using acoustic dispensing or MicroFlo, and DNA was dispensed using acoustic dispensing. The prepared plates were either (1) used immediately to dispense the transfection reagent and cells (initial protocol, day 0 control), (2) frozen to -20°C , or (3) dried in an oven and used the same day once thawed or rehydrated, respectively (day 0), or 2 or 7 days later (days 2 and 7, respectively). Both conservation methods led to the same results as no significant differences were seen between the initial full Echo or MicroFlo/Echo-enhanced protocol and the preloaded plate used at day 0, 2, or 7 (Fig. 2B). This indicates that DNA preloaded plates can be stored and used to transfect cells at higher rates. Indeed, as the transfection reagent dispensing only requires 15–20 min, we are able to transfect nearly 24 plates during a workday at a rate of 3 plates per hour. Up to six plates can therefore be prepared using the same cell batch for 2 h. At this stage, we have proven that our full Echo or MicroFlo/Echo transfection protocol can be easily used to set up a transfection protocol for a given cell line.

Scaling up after screening, we then examined whether the identified optimal protocol could be implemented at a higher scale. The DNA amount (20 ng), volumes (1 μL of diluent, 0.2 μL of DNA, and 0.5 μL of reagent), and cell number (1500 cells/well) used in the 384-well MicroFlo/Echo-based transfection protocol were used as a reference to calculate the parameters for larger-scale transfections. Ratios were calculated from a 384-well culture surface to other culture well or dish surfaces (bottom of Fig. 2C). HeLa cell transfection in 384-, 96-, 24-, and 6-well plates and a 10 cm culture dish was then manually performed using the indicated ratios and starting with the above-mentioned 384-well condition references. Under these conditions, all plate formats were efficiently transfected and no significant differences were seen compared with the MicroFlo/Echo-enhanced

protocol, except for the six-well plate, which marginally showed higher transfection efficiency (Fig. 2C). This means that our high-throughput protocol could be used for the identification of optimal transfection settings for larger-scale manual transfections. Our MicroFlo/Echo protocol was thus not only as efficient as the manual protocol but also much faster. Furthermore, in this protocol, DNA dispensing is performed automatically using a customized picklist, avoiding errors associated with the cumbersome repetitive manual dispensing (i.e., more than 1 h for the manual protocol vs three plates per hour for the MicroFlo/Echo protocol). We still tried to improve the manual protocol to reduce the overall time process, focusing on the transfection reagent dispensing step. Using an automated pipette and a reservoir, 34 s were required (still more than the MicroFlo device), and on top of that, a larger quantity of reagent was needed, leading to waste at least 500 μL of dead volume of transfection mixture. Thus, although feasible, this way does not seem to be advantageous.

Our Echo acoustic dispense-based high-throughput transfection protocol appears to be a valuable tool to transfect cells with different plasmids and screen conditions applicable to larger-scale transfections. However, we thought that it would be a huge advantage if it could also be used for co-transfection experiments.

Plasmid DNA Co-Transfection

Two fluorescent plasmids were used to evaluate the multiplexing potential of acoustic dispensing. The tdTomato-expressing plasmid was modified to express mVenus, a bright yellow fluorescent protein, and 1.7 ratio of mVenus over tdTomato was used due to differences in their brightness and quantum yield.¹⁸ The DNA dispense picklist was modified in order to dispense 20 ng of total DNA, including both plasmids mixed in the same source well (control) or in distinct source wells, into a single destination well. Both plasmids were efficiently transfected when mixed in either the same source well or separate source wells and multiplexed by the Echo picklist-driven dispense (Fig. 3A). The transfection efficiencies were similar for both the mixed and sequential DNA plasmid dispenses (Fig. 3B), and no significant differences were observed. This implies that the hard and time-consuming step of multiplexing DNA for co-transfection even in a dose-ranging manner would be easily software driven by the Echo 550 customized picklist. The co-transfection efficiencies seemed lower than previously with the use of 20 ng of DNA. This can be explained by the ratio used, as mentioned above, which lowers the transfected amount of tdTomato and mVenus. However, whereas not all the cells were transfected, the results expressed as the percent of co-transfected cells within the mVenus- or tdTomato-positive populations showed no significant

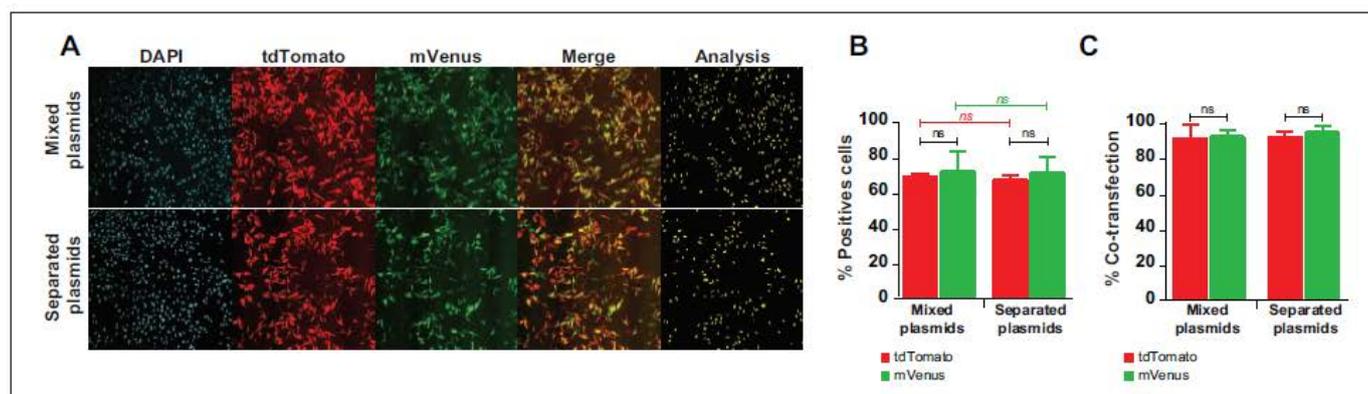


Figure 3. Plasmid DNA co-transfection ability. HeLa cells were transfected using the MicroFlo/Echo-enhanced protocol: the MicroFlo device was used for 1 μ L of diluent dispense and the Echo 550 device was used for the DNA and TransIT-X2 reagent (1 \times concentration) dispenses. Both plasmids (total of 20 ng), in a mixed solution (20 ng using a 1.5 ratio of mVenus over tdTomato) loaded in a unique well or in two separate source well transfection efficiencies, were compared 48 h posttransfection using image-based analysis software. Representative field of 10 \times objective fluorescence microscopy acquisition (A) and the corresponding software-based image analyses expressed as percent of transfected cells (B) and percent of co-transfected cells (C). Error bars represent the SEM with $n = 3$. Two-way ANOVA and Bonferroni posttest were used for statistical analysis. ns = nonsignificant compared with the control condition; ns (red or green) = nonsignificant when mixed and separate plasmids compared with each other.

differences, as both almost reached 100% (Fig. 3C). Taken together, these results indicate that ADE-driven DNA multiplexing can be efficiently used for co-transfection and that transfected cells can be co-transfected by both plasmids using our experimental settings.

In conclusion, we developed an easy, accurate, and high-throughput transfection method using automated acoustic dispensing (Fig. 4).

Using fluorescent proteins expressing plasmids, and high-throughput image-based software analysis, we demonstrated the feasibility of ADE-based liquid dispensing to transfect cells in 384-well plates using three dispensing steps (diluent, DNA, and transfection reagent), before cell seeding using MicroFlo device. This method enables simultaneous evaluation and comparison of different parameters in order to optimize transfection parameters.

On top of its high throughput, this method has several other advantages: (1) it reduces the reagent costs using lower volumes of transfection reagents; (2) it avoids waste and saves DNA preparation labor, using amounts of only a few nanograms, and is also efficient, using cheap mini-column-based plasmid DNA miniprep, which is compatible with plate-based high-throughput plasmid purification protocols; and (3) it ensures successful transfection, even nonexperimented biologists, as few manual steps are required: diluting the source DNA to 100 ng/ μ L, dispensing it on a source plate, and preparing the cell suspension before seeding. The nano-dispenser executes the time-consuming and error-prone steps according to a customized picklist: dose delivery and multiplexing of plasmids.

The throughput of the full Echo protocol was further enhanced by replacing the diluent dispense-limiting step using ADE by an ultrafast MicroFlo dispense. This MicroFlo/Echo optimized process requires a total time of less than 30 min to transfect a 384-well plate with different plasmids. We further demonstrated that DNA preloaded plates could be stored (dry or frozen) and used later for the transfection mixture dispense and cell seeding steps only. Using such an approach improves the transfection rate to 3 plates per hour (i.e., 24 plates per day). This last optimized protocol could open up new ways to perform array-based experiments, such as expressing human protein-coding genes from the human ORFeome collection¹⁹ or knocking down each of them using CRISPR-Cas9 library-based approaches.²⁰ Indeed, performing such array approaches would then require around 53 plates for the estimated 20,000 human genes and then take about 18 h on a dedicated automated platform, rather than 2–3 days of human work. Successful CRISPR-Cas9 high-throughput approaches have used pooled gRNA libraries and implied viral delivery and a strong discriminating phenotype to sort positive cells.²⁰ Due to its high efficiency and high-throughput performance, our protocol would achieve a nonpooled approach with the gRNA library/CRISPR-Cas9-expressing plasmids distributed in source plates. Such an approach would then allow screening applications using milder cellular phenotype changes, which are currently incompatible with the required cell-sorting step.

Finally, a further step would be to study the compatibility of long-lasting DNA storage mediums with our

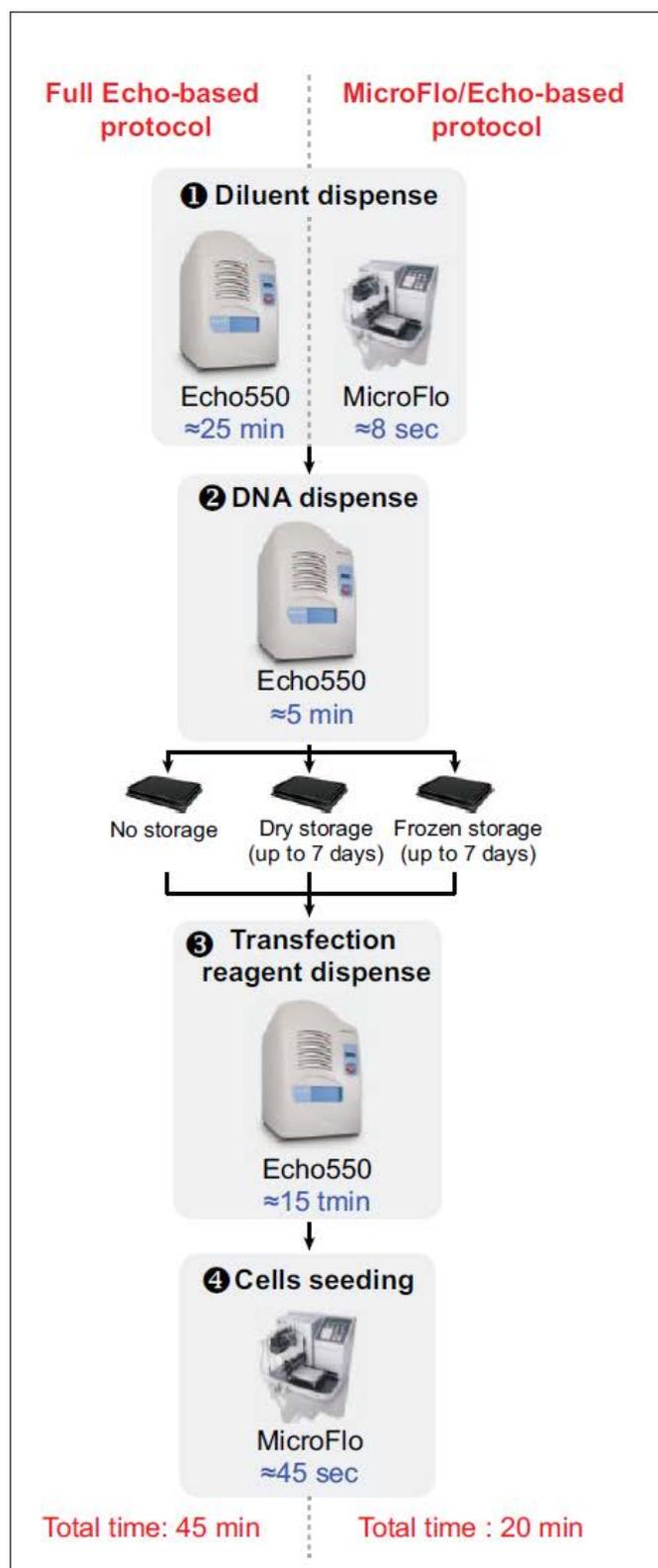


Figure 4. Experimental workflow. Schematic representation of our automated high-throughput reverse transfection protocol for the different conditions tested. The time needed for each step is indicated in blue, depending on the device used.

protocol when using DNA pre-filled transfection-ready plates, awaiting the transfection reagent and cell dispense.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. B. Villemagne, Dr. S. Moureu, Ms. M. Goasmat, and Ms. A. Guillome for critical review and corrections of the manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This project was supported by Inserm, Lille University, Lille Pasteur Institute, Conseil Régional Nord and PRIM (Pôle de Recherche Interdisciplinaire pour le Médicament).

ORCID iD

Béatrice Colin  <https://orcid.org/0000-0002-2499-3962>

References

- Kong, F.; Yuan, L.; Zheng, Y. F.; et al. Automatic Liquid Handling for Life Science: A Critical Review of the Current State of the Art. *J. Lab. Autom.* **2012**, *17*, 169–185.
- Hadimioglu, B.; Stearns, R.; Ellson, R. Moving Liquids with Sound: The Physics of Acoustic Droplet Ejection for Robust Laboratory Automation in Life Sciences. *J. Lab. Autom.* **2016**, *21*, 4–18.
- Grant, R. J.; Roberts, K.; Pointon, C.; et al. Achieving Accurate Compound Concentration in Cell-Based Screening: Validation of Acoustic Droplet Ejection Technology. *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 452–459.
- Sackmann, E. K.; Majlof, L.; Hahn-Windgassen, A.; et al. Technologies That Enable Accurate and Precise Nano- to Milliliter-Scale Liquid Dispensing of Aqueous Reagents Using Acoustic Droplet Ejection. *J. Lab. Autom.* **2016**, *21*, 166–177.
- Olechno, J.; Green, C.; Rasmussen, L. Advancing Scientific Innovation with Acoustic Droplet Ejection. *J. Lab. Autom.* **2016**, Special Issue, *21*, 64–166.
- Collins, P. M.; Ng, J. T.; Talon, R.; et al. Gentle, Fast and Effective Crystal Soaking by Acoustic Dispensing. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **2017**, *73*, 246–255.
- Lai, J.; Lehto, A.; Lesnick, J.; et al. Echo-Enhanced SMART-Seq[®] v4 for RNA Sequencing. Sunnyvale, CA: Labcyte, Oct 2017. <https://www.labcyte.com/media/pdf/APP-G122-Echo-Enhanced-SMART-Seq-v4.pdf>
- Lesnick, J.; Lejeune-Dodge, A.; Ruppert, N.; et al. High-Precision Cell Dispensing with the Labcyte Echo[®] Liquid Handler. Sunnyvale, CA: Labcyte, Aug 2016. <https://www.labcyte.com/media/pdf/TEC-High-Precision-Cell-Dispensing-D107.pdf>

9. Xiao, A. S.; Lightcap, E. S.; Bouck, D. C. Acoustic Liquid Handling for Rapid siRNA Transfection Optimization. *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20*, 957–964.
10. Bos, A. B.; Duque, J. N.; Bhakta, S.; et al. Development of a Semi-Automated High Throughput Transient Transfection System. *J. Biotechnol.* **2014**, *180*, 10–16.
11. Woodruff, K.; Maerkl, S. J. A High-Throughput Microfluidic Platform for Mammalian Cell Transfection and Culturing. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23937.
12. Junquera, E.; Aicart, E. Recent Progress in Gene Therapy to Deliver Nucleic Acids with Multivalent Cationic Vectors. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *233*, 161–175.
13. Colosimo, A.; Goncz, K. K.; Holmes, A. R.; et al. Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells. *Biotechniques* **2000**, *29*, 314–318, 320–322, 324 passim.
14. Sabatini, D. M. Reverse Transfection Method. Patent WO2001020015A1, March 22, 2001.
15. Day, R. N.; Davidson, M. W. The Fluorescent Protein Palette: Tools for Cellular Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2887–2921.
16. Wood, R. W.; Loomis, A. L. XXXVIII. The Physical and Biological Effects of High-Frequency Sound-Waves of Great Intensity. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1927**, *4*, 417–436.
17. Ivanova, N. V.; Kuzmina, M. L. Protocols for Dry DNA Storage and Shipment at Room Temperature. *Mol. Ecol. Resour.* **2013**, *13*, 890–898.
18. Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. A Guide to Choosing Fluorescent Proteins. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905–909.
19. Yang, X.; Boehm, J. S.; Yang, X.; et al. A Public Genome-Scale Lentiviral Expression Library of Human ORFs. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 659–661.
20. Peng, J.; Zhou, Y.; Zhu, S.; et al. High-Throughput Screens in Mammalian Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *FEBS J.* **2015**, *282*, 2089–2096.

II.3 Utilisation de la sonde pour différentes applications

II.3.a Déclenchement du système rapporteur par la protéase cible

La première partie de ce travail de thèse a permis d'optimiser une sonde pour le transfert d'énergie (valeur de BRET basal augmentée d'un facteur 3 par rapport à la sonde de départ non déletée et utilisation d'un nouveau couple de filtres) mais aussi en HCS, avec la délocalisation de la fluorescence de la YPet du noyau vers le cytoplasme après clivage par la protéase. Le but de cette seconde partie est de valider son utilisation générique pour différentes applications, en rendant la TEVp sensible à un stimulus.

II.3.a.i Séparations subcellulaires de la sonde et de la protéase relai (TEVp)

Le meilleur couple de partenaires de BRET ayant été déterminé, une des premières expériences réalisées a été d'étudier l'influence de la localisation de la protéase TEV sur le clivage de notre sonde, dans le but de déterminer la meilleure localisation de la sonde et de la TEVp. Pour cela, plusieurs séquences de localisation ont été clonées sur nos constructions ainsi que sur la TEVp : (1) cytosolique ; (2) nucléaire ; (3) mitochondriale et (4) membranaire. Les signaux de BRET ainsi que leur localisation ont ainsi été vérifiés.

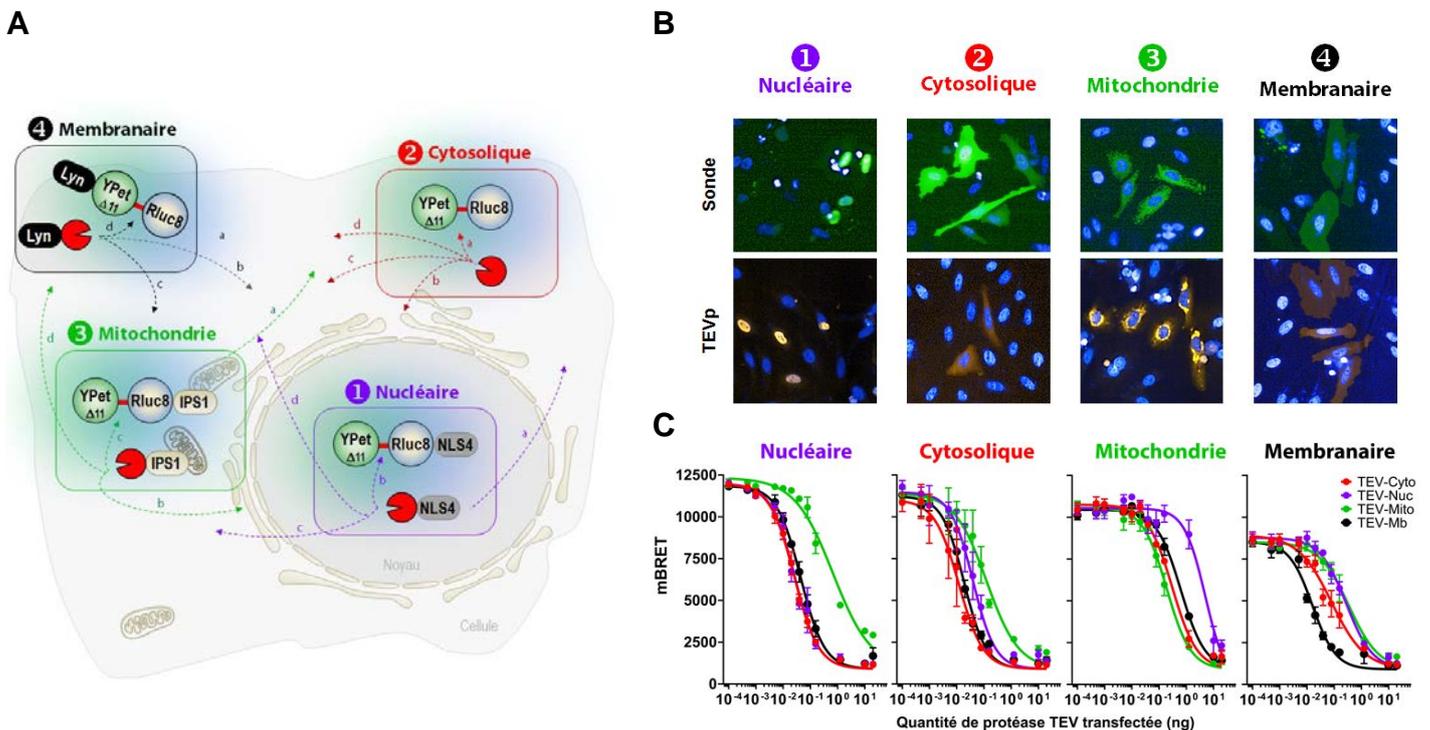


Figure 52 : Localisation subcellulaire des différentes sondes et protéases TEV

A] Les différentes sondes sont constituées des deux meilleurs partenaires de BRET, du site de clivage de la TEVp (en rouge). Les séquences de localisation compartimentent les sondes à différentes localisations subcellulaires : (1) cytosolique ; (2) nucléaire ; (3) mitochondriale ; (4) membranaire. La TEVp est représentée en rouge aux mêmes localisations subcellulaires : (a) clivage sonde cytosolique, (b) nucléaire, (c) mitochondriale, (d) membranaire. **B]** Immunomarquage et microscopie. Les différentes formes de sonde et de protéase ont été transfectées en cellules HeLa (40 ng de sonde / 20 ng de TEVp), fixées et immunomarquées avec l'anticorps anti-HA. INCell Analyzer 6000 ; 10X. **C]** Mesure de BRET et clivage par la TEVp. Les sondes ont été transfectées en cellules HeLa (20 ng) en l'absence ou en présence de protéase TEV (0.0001 à 20 ng). n=3 +/- SEM. Rapport 568/460 nm.

Pour cela, sur chacune des sondes ou TEVp, différentes séquences de localisation cellulaire ont été fusionnées par clonage. Une quadruple séquence d'import NLS4¹⁹³ a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la *Rluc8* pour permettre l'import de la sonde dans le noyau des cellules (2). Pour la sonde localisée au niveau de la mitochondrie, un petit peptide de localisation IPS1²⁰⁷ (Interféron Bêta Promotor Stimulator 1) a été fusionné sur la terminaison carboxyle de la *Rluc8* (3). Enfin, pour la sonde localisée cette fois-ci à la membrane, une séquence d'adressage Lyn (Lck/Yes tyrosine kinase)²⁰⁸ a été fusionnée côté N-terminal de la YPet (4). La **Figure 53A** reprend les différentes constructions et leur localisation au sein de la cellule. Des séquences d'adressages identiques ont été clonées sur la TEV protéase, pour localiser celle-ci dans les mêmes compartiments subcellulaires. Les résultats présentés en fluorescence (**Figure 53B**) permettent de vérifier la localisation subcellulaire des différentes sondes ainsi que les différentes formes de TEVp. La YPet étant une protéine fluorescente, un immunomarquage n'est pas nécessaire dans les cas de ces sondes. Celles-ci ont été transfectées de manière transitoire et 48 heures après transfection, une lecture au microscope INCell Analyzer 6000 a été réalisée. Les différentes protéases TEV ont aussi été transfectées transitoirement et un immunomarquage a été réalisé, via le tag HA, cloné à l'extrémité N-terminale de la TEVp, après lecture à l'INCell Analyzer.

Dans un second temps, l'activité des différentes TEV protéases a été étudiée pour chaque sonde (**Figure 53C**) et le signal mesuré en BRET. Comme attendu, le signal de BRET diminue drastiquement, de 8200 à 990 mBRET, de manière dose dépendante, en présence de la TEVp co-transfectée avec la sonde. Comme dans les expériences de délétion, la coupure de la sonde est totale au plus fortes doses de protéase. Ce profil de courbe est observé pour les 4 sondes, en présence des 4 formes de protéases sauf dans le cas de la sonde nucléaire (2) en présence de la TEVp-Mitochondriale (3b). Lorsque cette sonde est co-transfectée avec la TEVp-Mitochondriale, le signal de BRET ne diminue que jusqu'à 2100 mBRET (**Figure 53C-2**). De plus, un décalage d'IC50 (176.6 pg) est observé, indiquant que le clivage de la sonde nucléaire (2) par la TEVp-Mitochondriale est moins facile, la sonde étant protégée dans un compartiment cellulaire comme le noyau (**Tableau 7**). Un décalage d'IC50 est aussi observé pour la sonde mitochondriale (3) co-transfectée en présence de la TEVp nucléaire, indiquant là encore que la sonde est moins accessible à l'enzyme, car localisée dans un compartiment cellulaire différent de celui de l'enzyme. Enfin le signal de BRET basal de la sonde membranaire (4) est plus faible que pour les autres sondes (6200 mBRET), ce qui pourrait être dû à un encombrement spatial qui modifie la conformation de la sonde quand celle-ci est accrochée à la membrane plasmique et donc le signal de BRET. La distance et l'orientation étant essentielle dans le transfert d'énergie, le

moindre changement de conformation peut influencer ce transfert et donc diminuer le signal de BRET de départ.

Contrairement à ce qui était attendu, une coupure des sondes est observée dans toutes les localisations subcellulaires étudiées, en présence des différentes formes de TEVp. Quelle que soit sa localisation subcellulaire, la protéase TEV, est capable de cliver la sonde même à de très faibles doses de protéase (entre 1 et 10 ng). Il semblerait que les différentes sondes soient clivées par les différentes formes de TEV lors de la biosynthèse des protéines et donc avant leur arrivée dans leur compartiment cellulaire. L'amplification attendue par la TEVp semble bien effective, voire trop. Le système répondant trop fortement à la TEVp, l'approche Split-TEV décrite en introduction a donc été envisagée par la suite afin de diminuer l'activité de la protéase.

Tableau 7 : Valeurs des IC50 pour les différentes sondes en fonction des différentes formes de protéase

Résultats calculés à partir de GraphPad Prism 7, Nonlinfit test.

TEVp / Sondes (pg)	Sonde Nucléaire	Sonde Cytosolique	Sonde Mitochondrie	Sonde Membranaire
TEVp-Cytosolique	30.0	13.3	118.8	432.1
TEVp-Nucléaire	31.1	45.8	482.6	5014.0
TEVp-Mitochondrie	985.7	176.6	588.1	275.3
TEVp-Membranaire	53.0	21.8	16.9	879.0

II.3.a.ii Approche Split-TEV

Le système développé étant trop sensible, l'approche Split-TEV a été envisagée. Elle consiste à exprimer séparément les moitiés N-terminale (1 à 123 acides aminés) et C-terminale (124 à 248 acides aminés) de la protéase. La partie N-terminale a été clonée comme précédemment en partie C-terminale de la sonde, et la partie C-terminale a été clonée aux différents peptides de localisation. L'activité protéolytique de la TEVp sera rétablie après réassociation des deux moitiés (cf. **Split-TEV I.4.e.iii**). Afin de visualiser ces nouvelles sondes TEV_N dans les cellules HeLa, un tag V5 a été fusionné en amont de la TEV_N. La demi-TEV_C reste fusionnée au tag HA comme dans les expériences précédentes.

La **Figure 54** présente les résultats obtenus. Sur le modèle précédent, la **Figure 54A** reprend schématiquement les constructions réalisées ainsi que les couplages effectués au sein des cellules. La **Figure 54B** met en évidence la localisation cellulaire de la sonde, la présence de la demi-TEV_N greffée en partie C-terminale de la sonde, ainsi que les différentes TEV_C. L'activité des différentes formes de protéase TEV_C a également été suivie en BRET (**Figure 54C**). Dans ces expériences, le signal de BRET diminue significativement, de 7800 à 2500 mBRET, de façon dose dépendante, lorsque les TEV_C cytosolique, nucléaire et membranaire sont co-transfectées avec la sonde cytosolique TEV_N (1). Un décalage

d'IC50 est observé lorsque l'effecteur TEV_C est localisé à la mitochondrie, décalage indiquant que la reconstitution de la TEV protéase activée est moindre dans ces conditions (**Tableau 8**). Dans le cas de la sonde nucléaire- TEV_N (2), le signal de BRET diminue significativement (de 9000 à 2700 mBRET) pour toutes les formes de protéase TEV_C , sauf dans le cas de la TEV_C -Mitochondriale où une diminution du signal n'est observée qu'à partir de 10 ng de TEV_C (effecteur) transfectés. D'après ces résultats, l'hypothèse est que la sonde nucléaire TEV_N rencontre moins l'effecteur TEV_C -Mitochondrie et que celle-ci reconstitue moins de molécules de TEV_p actives. Le système est donc bien moins sensible que dans le cas de la TEV_p entière.

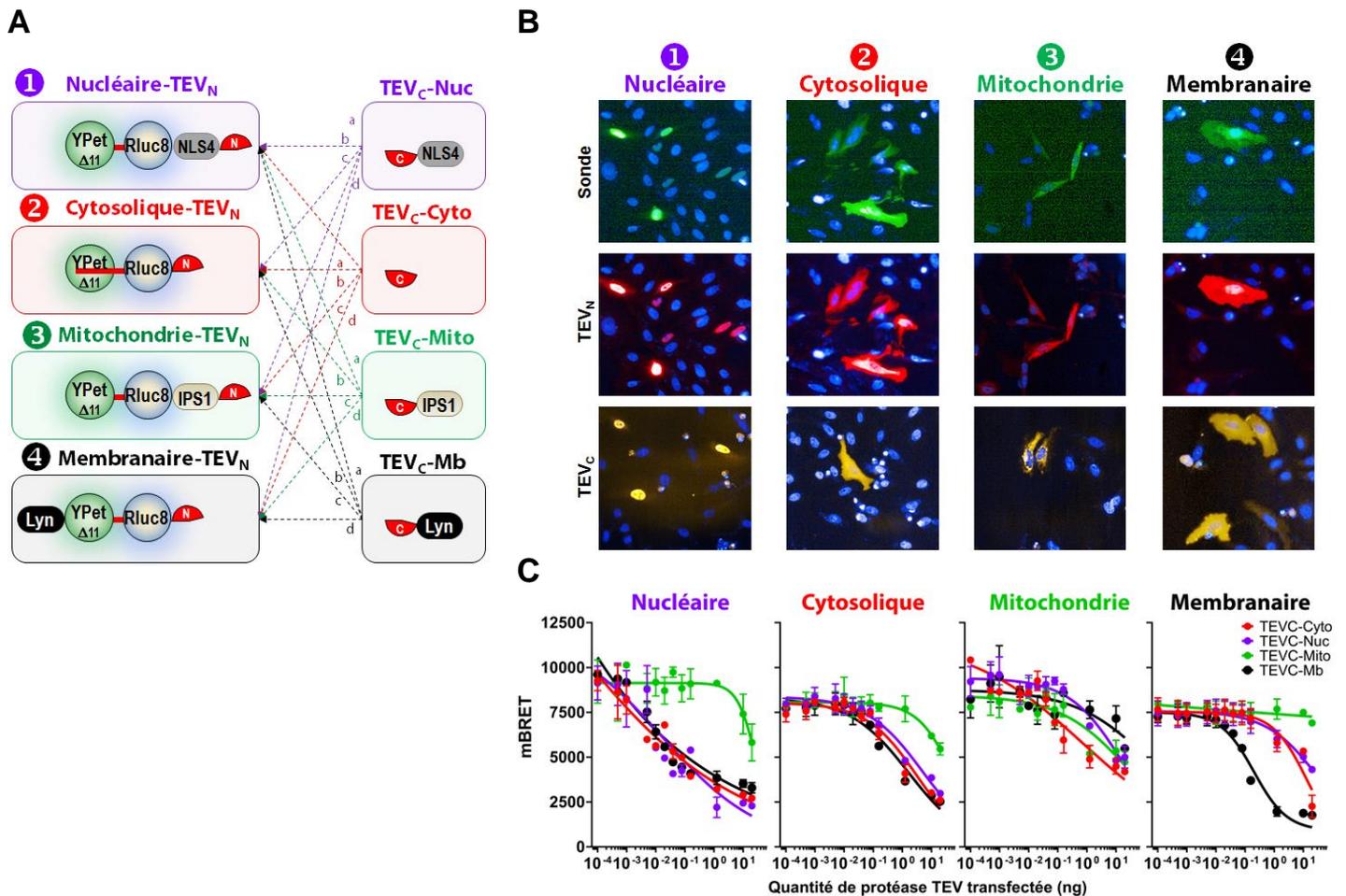


Figure 53 : Localisation subcellulaire des différentes sondes TEV_N et protéases TEV_C

A] Les différentes sondes sont constituées des deux meilleurs partenaires de BRET, du site de clivage de la TEV_p (en rouge). Les séquences de localisation compartimentent les sondes à différentes localisations subcellulaires : (1) cytosolique ; (2) nucléaire ; (3) mitochondriale ; (4) membranaire. Les demi- TEV_N et C sont représentées en rouge aux mêmes localisations subcellulaires : (a) clivage sonde cytosolique, (b) nucléaire, (c) mitochondriale, (d) membranaire. **B]** Immunomarquage et microscopie. Les différentes formes de sonde et de protéase ont été transfectées en cellules HeLa (40 ng de sonde / 20 ng de TEV_p), fixées et immunomarcuées respectivement avec l'anticorps anti-V5 (TEV_N) et anti-HA (TEV_C). INCell Analyzer 6000 ; 10X. **C]** Mesure de BRET et clivage par la TEV_p . Les sondes ont été transfectées en cellules HeLa (20 ng) en l'absence ou en présence de protéase TEV (0.0001 à 20 ng). n=3 +/- SEM. Rapport 568/460 nm.

Lorsque la sonde TEV_N, localisée à la mitochondrie (3), est co-transfectée avec les quatre types d'effecteurs TEV_C, le signal de BRET chute moins drastiquement par rapport aux diminutions observées avec les deux premières sondes. Avec cette nouvelle forme de sonde, non seulement les formes TEV_C-cytosolique, nucléaire, et membranaires n'influencent pas le signal de BRET. La TEV_C-mitochondriale n'influe pas non plus sur la diminution du signal de BRET, alors que la probabilité de rencontre des deux demies TEV est plus importante dans cette configuration.

Enfin, pour la sonde TEV_N membranaire (4), le signal de BRET diminue fortement lorsqu'elle est co-transfectée en présence de l'effecteur TEV_C-membranaire (de 7000 à 2000 mBRET) contrairement aux formes TEV_C-cytosolique, nucléaire et mitochondriale qui commencent à diminuer à partir d'1 ng d'effecteur transfecté. Ce nouveau système semble moins sensible lorsque la sonde TEV_N est localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules et que l'effecteur se situe dans d'autres compartiments cellulaires. En revanche, le signal de BRET minimum atteint par toutes les sondes est d'environ 2000 mBRET, le double de celui observé dans le cas de l'approche TEV entière ; toutefois, dans ces conditions, la valeur du delta de BRET entre l'état non clivé et clivé de la sonde reste deux fois plus élevé par rapport à l'approche TEV entière. Le delta maximum atteint une valeur de 6000 mBRET dans le cas de la sonde nucléaire TEV_N couplée à l'effecteur TEV_C-RE. La sensibilité de ce nouveau système semble atténuée par rapport à l'approche TEV entière ; ce système pourra donc être induit par différents stimulus ou effets biologiques.

Tableau 8 : Valeurs des IC50 pour les différentes sondes-TEV_N en fonction des différentes formes de protéase TEV_C

Résultats calculés à partir de GraphPad Prism 7, Nonlinfit test. NC non calculée.

TEVp / Sondes (pg)	Sonde TEV _N Nucléaire	Sonde TEV _N Cytosolique	Sonde TEV _N Mitochondrie	Sonde TEV _N Membranaire
TEV _C -Cytosolique	5576	479	329	1117
TEV _C -Nucléaire	1789	700	1053	1556
TEV _C -Mitochondrie	1484	1739	1231	NC
TEV _C -Membranaire	NC	213	9954	413

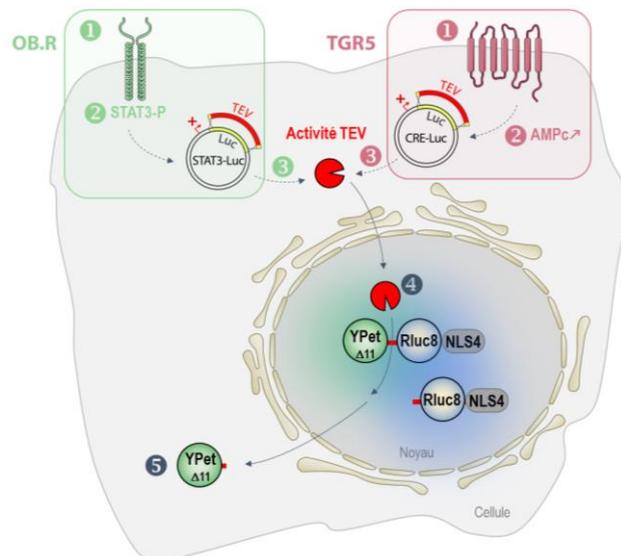
II.4 Application : suivi de l'expression de gènes rapporteurs

Avec ces différentes expériences de localisation cellulaire, nous avons pu observer que la transfection d'une très faible quantité de vecteur d'expression de la TEVp entière provoque une coupure totale de la sonde. Nous avons donc souhaité adapter ce système à des études de suivi de l'expression de gènes rapporteurs.

Le projet initial de cette thèse reposait sur deux modèles de récepteurs déjà utilisés au laboratoire d'accueil : TGR5 (The bile acid membrane receptor), un récepteur à 7 domaines transmembranaires (TM) couplé aux protéines G (ou RCPG), ainsi qu'OB-R, un récepteur à un domaine transmembranaire. TGR5 est un récepteur aux acides biliaires pour lequel un test de criblage basé sur un gène rapporteur luciférase répondant à l'AMP cyclique (cAMP-responsive element)²⁰⁹ est déjà en place au sein du laboratoire. OB-R, le récepteur à la leptine, permet l'activation d'un gène rapporteur pour STAT3 (STAT3-Luc) en réponse à la leptine²¹⁰. Afin d'adapter ce système à n'importe quel gène rapporteur décrit, la technique de mutagenèse dirigée a été utilisée pour interchanger la cassette de la luciférase sur ces deux vecteurs par celle de la TEVp. Un fragment de PCR, codant pour la TEV de part et d'autre des 15 nucléotides N- et C-terminaux de la luciférase, a été utilisé comme amorce (**Figure 55**).

Figure 54 : Activation des gènes rapporteurs STAT3-TEV et CRE-TEV

① Fixation des ligands spécifiques du récepteur OB-R ou TGR5. ② Déclenchement de la voie de signalisation correspondante (STAT3 ou CRE) et activation spécifique du gène rapporteur ③ Activation de la TEVp ④ La TEVp ainsi libérée diffuse dans la cellule et, arrivée au noyau, va être capable de reconnaître son site spécifique de clivage sur la sonde BRET/HCS ⑤ Libération de la protéine YPet dans la cellule après clivage.



II.4.a Preuve de concept : modèle TGR5

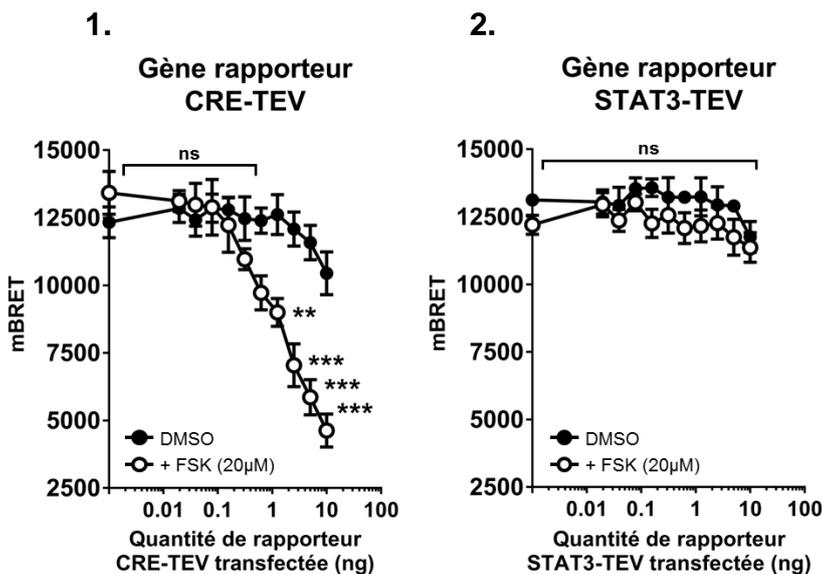
II.4.a.i Activation de la voie de signalisation de CRE par la forskoline

Afin de valider l'activation du plasmide rapporteur CRE-TEV, une première expérience a été menée dans les cellules HEK293T, en co-transfectant transitoirement la sonde BRET/HCS en présence de différentes doses de rapporteur CRE-TEV (0 à 10 ng). 24 heures après transfection, 20 μ M de forskoline (FSK) ont été ajoutés au milieu des cellules

pendant 48 heures. La forskoline permet l'activation directe de la voie de signalisation de CRE sans passer par le récepteur TGR5.

La **Figure 56** présente les résultats obtenus en BRET (**A.1 et A.2**) ainsi qu'en fluorescence (**B**). Une diminution importante du signal de BRET est observée après addition de forskoline (signal de BRET d'une valeur moyenne de 4626 mBRET comparé au signal basal de 10442 mBRET), à la plus forte dose de rapporteur transfectée de 10 ng, traduisant l'activation du gène rapporteur CRE-TEV (**A.1**). Une diminution importante du signal de BRET est de même observée pour les plus fortes doses traduisant l'autoactivation du récepteur (fuite du récepteur). Cette expérience a été menée en parallèle avec le gène rapporteur STAT3-TEV (**A.2**), et dans ces conditions, aucune diminution significative du signal de BRET (valeur moyenne 12000 mBRET) n'a été observée, avec ou sans addition de forskoline, ce qui prouve que la forskoline est bien spécifique de la voie de signalisation de CRE. Les images acquises au microscope à fluorescence confirment l'activation du récepteur avec le passage de la fluorescence de la YPet du noyau vers le cytoplasme aux plus fortes doses de rapporteur (**Figure 56B**).

A. BRET



B. Fluorescence

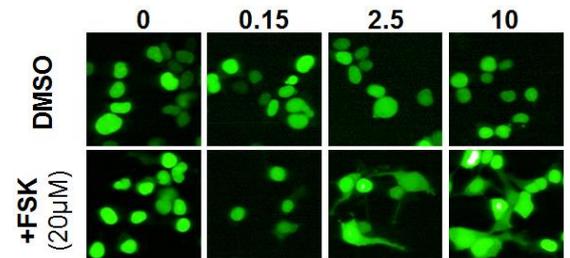


Figure 55 : Activation de la voie de signalisation CRE-TEV par la Forskoline
 Les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec la sonde BRET/HCS optimisée (20 ng) en présence d'une gamme de rapporteur (0 à 10 ng). Après 24h de transfection, 20 µM de FSK ont été ajoutés pour les différentes conditions. Résultats en BRET et HCS (n=4). Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism 7.0, ANOVA deux voies, Bonferonni post-test. Rapport 568/460nm.

II.4.a.ii Activation du récepteur par deux ligands spécifiques

Le système a ensuite été testé en co-transfectant la sonde BRET/HCS, le plasmide rapporteur CRE-TEV ainsi que les récepteurs TGR5^{209,211,212} humains ou murins en présence de deux ligands développés par le laboratoire d'accueil (Ligands BDM72881 et BDM71589). Les résultats sont présentés **Figure 57**. Suite aux résultats déjà obtenus, la dose de rapporteur CRE-TEV a été fixée à 5 ng (dose suffisante de rapporteur TEVp ne permettant

pas l'auto-activation du système) ; les résultats sont présentés en fonction d'une dose croissante de ligand (0.01 ; 0.1 ; 1 et 10 μM) et de récepteur TGR5 (0.01 ; 0.1 ; 1 et 10 ng).

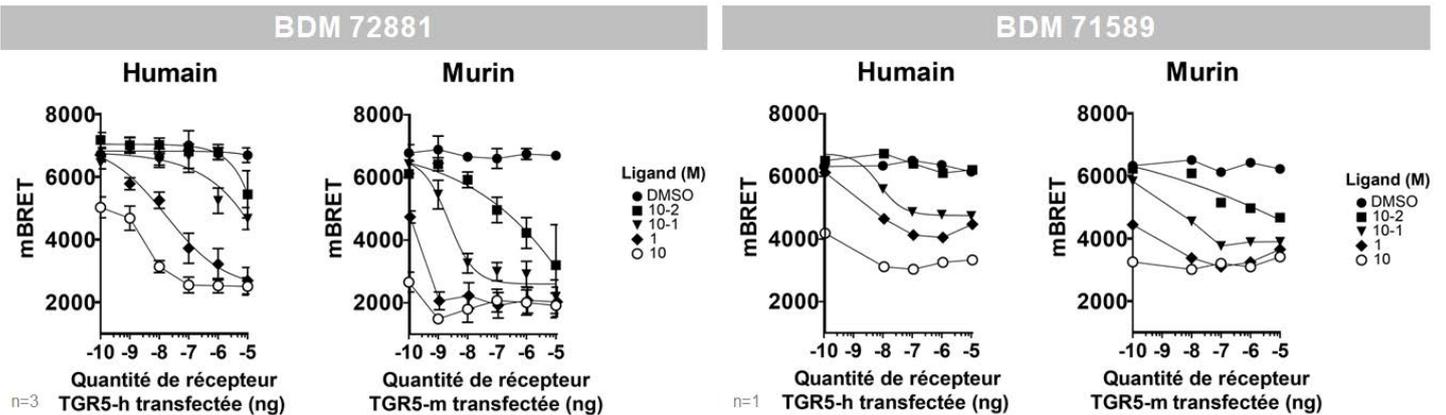


Figure 56 : Activation du récepteur TGR5 humain ou murin

Les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec la sonde BRET/HCS (20 ng), du rapporteur TEV (0 ; 0,01 ; 0,1 et 10 ng d'ADN) ainsi qu'avec une dose de ligand (72881 et 71589 développés par le laboratoire) allant de 10⁻⁹ à 10 μM . Résultats présentés en BRET (n=3 pour 72881 / n=1 pour 71589, n=2 pour la dose à 1 ng de récepteur). Test nonfit lin réalisé avec le logiciel GraphPadPrism 7.0. Rapport 568/460 nm.

D'après ces résultats, la quantité de ligand et de rapporteur traduit l'activation des récepteurs TGR5 humains ou murins, et donc de la voie de signalisation CRE dans le cas des deux ligands testés. Cependant, pour les deux molécules, un écart d'un log entre les récepteurs humains et murins est observé, à dose équivalente de ligand et de récepteur transfecté. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le récepteur murin soit plus exprimé à la surface des cellules HEK293T que la forme humaine à quantité de vecteur d'expression identique.

Les valeurs d'IC₅₀ de ce test (TEVp) ont été comparées aux valeurs d'IC₅₀ données pour un test de gène rapporteur exprimant un plasmide luciférase développé par le laboratoire en collaboration avec une autre équipe du campus et sont présentées **Tableau 9**, pour les deux récepteurs et les deux ligands.

Tableau 9 : Meilleures conditions d'activation du récepteur TGR5 humain ou murin en fonction des différents ligands testés

	Humain		Murin	
BDM 72881	Luciférase	TEVp	Luciférase	TEVp
	2.4 ng IC ₅₀ = 24 nM	1 ng IC ₅₀ = 17 nM	2.4 ng IC ₅₀ = 0.4 nM	0.1 ng IC ₅₀ = 2 nM
BDM 71589	Luciférase	TEVp	Luciférase	TEVp
	2.4 ng IC ₅₀ = 1 nM	0.1 ng IC ₅₀ = 8 nM	2.4 ng IC ₅₀ = 4 nM	0.1 ng IC ₅₀ = 9 nM

Pour démontrer la sensibilité de notre test en comparaison au test préalablement réalisé par le laboratoire d'accueil nous aurons besoin de calculer les valeurs d'IC₅₀ aux

mêmes doses de récepteur ici 2.4 ng, mais la TEVp étant trop sensible dans notre système, les valeurs d'IC50 ont été données pour des quantités de 0.1 ou 1 ng en fonction de la forme du récepteur.

Ces expériences préliminaires réalisées en présence des deux ligands 72881 et 71589, pour deux espèces différentes de récepteur TGR5, nous ont seulement permis de réaliser une première preuve de concept du système, en validant l'action de ces ligands sur notre système.

De nombreuses questions restent en suspens, mais nous avons choisi pour cette thèse, de ne pas continuer ces expériences de gène rapporteur par faute de temps et de s'arrêter à la preuve de concept. Cependant, il sera important de :

- *Comparer les valeurs obtenues avec ce nouveau test par rapport au test développé par le laboratoire*
- *Tester le système en présence d'un ligand naturel ou synthétique*
- *Dans des cellules exprimant constitutivement le récepteur TGR5*
- *Réaliser des expériences de Western Blot pour déterminer la quantité de récepteur et vérifier le taux d'expression du récepteur à la surface des cellules, pouvant expliquer le décalage d'IC50 entre les récepteurs humains et murins.*

Afin de déterminer le niveau d'expression des deux récepteurs, et permettre une comparaison plus fine de l'action de ces molécules sur un système plus calibré, à quantité égale de récepteur, cette preuve de concept pourra être complétée par des expériences de Western Blot. Ces expériences pourront être réalisées sur un modèle cellulaire exprimant constitutivement le récepteur TGR5 afin de limiter les effets liés à la co-transfection transitoire des trois plasmides (sonde, rapporteur et récepteur). Dans la même optique, une lignée de cellules stables exprimant à la fois la sonde et le rapporteur TEV pourra être produite à l'aide d'un vecteur bicistronique. De plus, grâce à l'introduction d'une séquence (**cf séquence IRES II.5.a.ii**) entre la sonde et le rapporteur. Le système CRISPR/Cas9 pourra également être utilisé pour réaliser facilement et rapidement des lignées de cellules stables.

II.4.b Conclusions et perspectives

La preuve de concept a été validée avec le récepteur TGR5 disponible au sein du laboratoire d'accueil. Cependant, il sera intéressant de valider le système sur un second récepteur comme le récepteur à la leptine proposé en introduction, également disponible au laboratoire. Il s'agira alors d'activer la voie de signalisation de STAT3 en réponse à la leptine ; le plasmide rapporteur STAT3-TEV étant déjà cloné, la validation sera facile à mettre en place.

Cette approche pourra être utilisée avec n'importe quel gène rapporteur décrit, en le transposant à d'autres modèles cellulaires. Avec notre sonde, nous espérons pouvoir rendre ce système générique à d'autres voies de signalisation et types cellulaires. De plus, cette nouvelle méthode pourra être comparée aux systèmes rapporteurs existants, moins sensibles, comme les systèmes luciférases qui quantifient l'apparition d'une enzyme ou d'une protéine fluorescente et non le clivage d'une sonde. Un avantage de ce système réside dans le fait qu'un signal de BRET basal est présent permettant, contrairement aux autres approches, de quantifier l'activation constitutive du récepteur étudié dans un contexte donné. De plus, le signal de BRET est « encadré » par la valeur limite en absence de récepteur et la valeur minimale en présence de TEVp donnant ainsi une échelle permettant la calibration de l'activation du récepteur et leurs ligands afin de les comparer. Enfin cette approche repose sur un système amplifié comme développé précédemment (ratio augmenté après coupure par la TEVp) et ce système peut aussi être développé facilement en HCS.

II.5 Application : suivi d'activité protéase

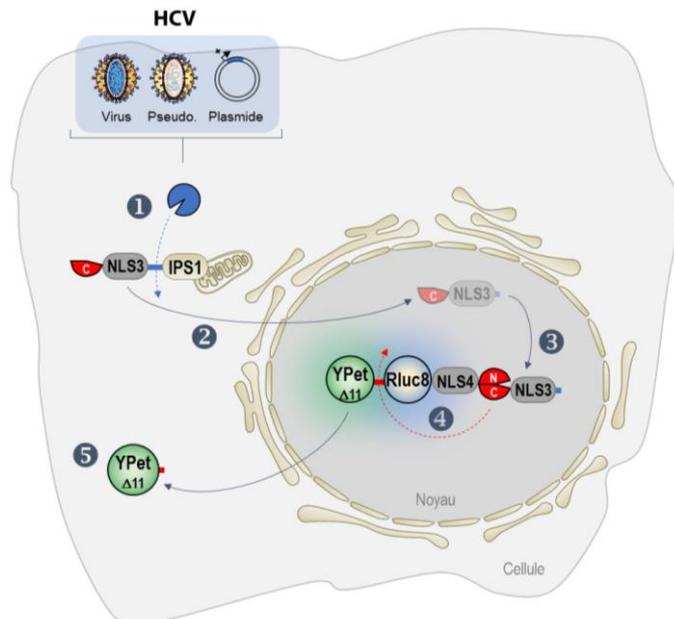
Après avoir déterminé la sonde et l'effecteur répondant le mieux à l'approche Split-TEV, nous avons pu adapter notre système pour que celui-ci soit déclenché par un processus biologique. Basé sur les résultats obtenus, nous proposons ici un système générique pour le suivi de l'activité d'une protéase virale par l'approche Split-TEV.

II.5.a Preuve de concept : modèle HCV

La preuve de concept proposée a été réalisée avec le virus de l'Hépatite C (HCV), virus bien décrit de la littérature et pour lequel existent déjà des inhibiteurs de protéase. Les vecteurs exprimant le déclencheur, la sonde fusionnée avec à la demie-TEV_N et l'effecteur TEV_C présent au niveau de la mitochondrie sont transfectés transitoirement dans les cellules. Après activation du système par le déclencheur (protéase virale ici NS3-4), l'effecteur (TEV_C) est libéré ; grâce à la séquence de localisation nucléaire, il entre dans le noyau des cellules où il va pouvoir se réassocier avec la demie-TEV_N présente sur la sonde. Une fois l'activité protéolytique de la TEVp rétablie, la sonde peut être clivée et la YPet libérée hors du noyau. La **Figure 58** reprend de façon schématique les différents éléments du système proposé.

Figure 57 : Déclenchement du système par un processus biologique

① Une protéase, ici virale, clive à la surface du RE le partenaire TEV_C qui entre dans le noyau des cellules grâce la séquence de localisation nucléaire NLS3 ② et va être capable de se réassocier avec son partenaire TEV_N présent sur la sonde nucléaire ③. Une fois la protéase TEV reconstituée et active, celle-ci va reconnaître et cliver son site ④ libérant ainsi la protéine YPet dans le cytoplasme des cellules ⑤.



II.5.a.i Génération d'un vecteur bicistronique d'expression de la sonde et de l'effecteur

Le système proposé ci-dessus (**Figure 59**) comporte plusieurs éléments : le déclencheur, l'effecteur et la sonde à co-transfecter pour la mise en place des tests cellulaires. Afin d'augmenter les chances de transfection mais surtout de co-transfection et d'expression de tous les éléments au sein d'une même cellule, nous avons besoin d'un système calibré. Pour obtenir une régulation fine de l'expression de la sonde par rapport à

celle de l'effecteur, les deux plasmides ont été clonés sur un même vecteur. L'utilisation d'une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) permet l'expression des protéines depuis un même vecteur dans les cellules. Cette séquence permet également l'accrochage des ribosomes et donc l'initiation de la traduction au milieu de l'ARNmessager (ARNm), et non uniquement à son extrémité 5'. L'ARNm présente une structure tridimensionnelle au niveau de l'IRES avec différentes boucles impliquées dans le recrutement des ribosomes.

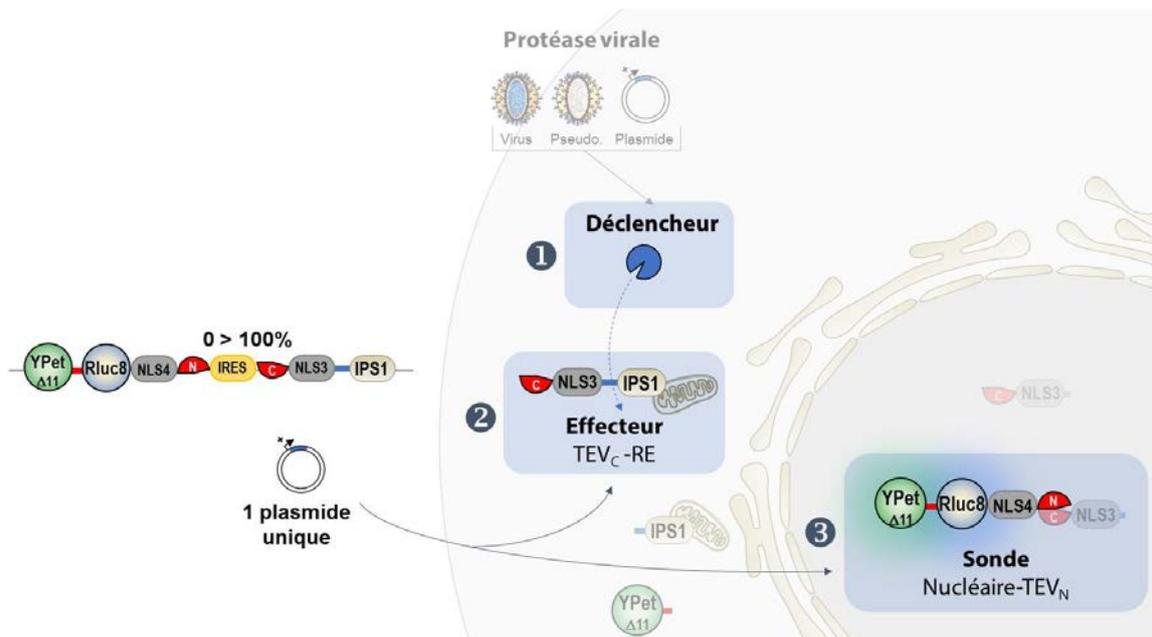


Figure 58 : Représentation schématique des différents éléments du test

Un plasmide unique comprenant la sonde+effecteur a été généré et une séquence IRES mutée de 0 à 100 % a été introduite afin de réguler le niveau d'expression de la sonde par rapport à celui de l'effecteur. ❶ Protéase virale / ❷ Effecteur TEV_c localisé à la mitochondrie / ❸ Sonde BRET/HCS optimisée, approche Split-TEV.

II.5.a.ii Génération des mutants et choix de la sonde

La séquence IRES utilisée dans ces expériences est celle de l'ECMV (**Figure 60A**), car étant disponible au laboratoire. Pour fonctionner correctement et éviter toute réassociation non spécifique des deux moitiés de la TEVp avant coupure par la protéase virale, le système nécessite très peu d'expression d'effecteur par rapport à la sonde. Plusieurs mutants de cette séquence IRES sauvage ont donc été utilisés et permettent, de ce fait, une expression graduelle, de 0% à 100% de l'activité de l'IRES sauvage^{213,214} (**Figure 60B**). Afin de réguler finement l'expression de l'effecteur, ces mutants ont été clonés sur notre construction par mutagenèse dirigée à l'aide d'oligonucléotides spécifiques contenant les différentes mutations notées en rouge.

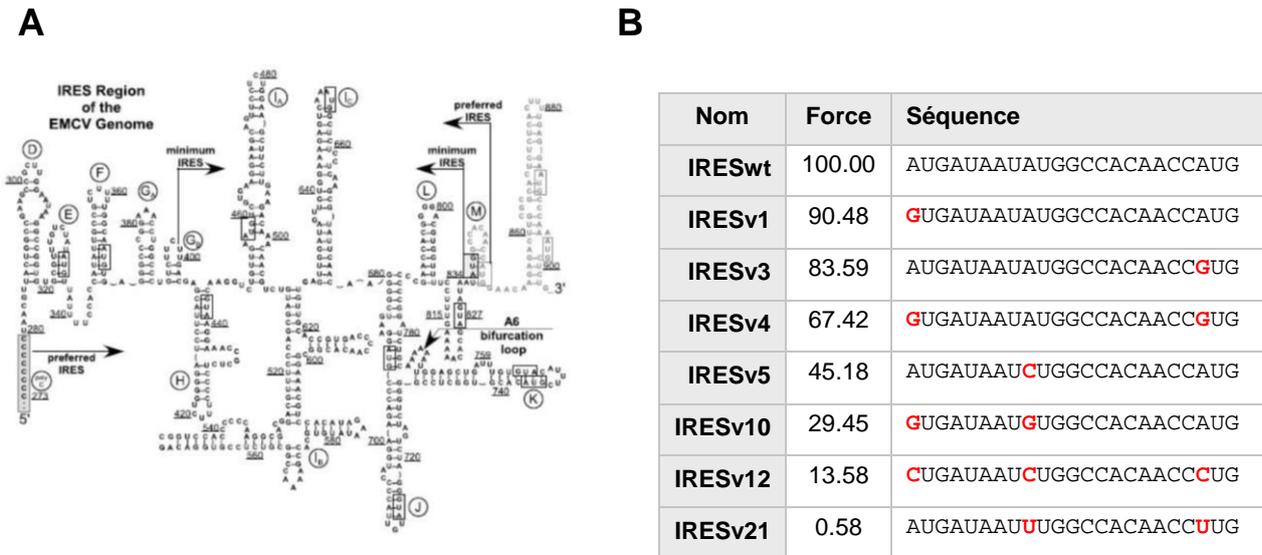


Figure 59 : Séquence IRES et différents mutants
A] Séquence de l'IRES sauvage²¹³. **B]** Séquences des différents mutants réalisés pour l'obtention d'une expression graduelle de l'activité de l'IRES.

Pour étudier la réponse observée avec ou sans de déclencheur (protéase NS3-4), les cellules HeLa ont été transfectées en présence des vecteurs bicistroniques (**Figure 61**). En l'absence de la protéase virale NS3-4, le signal de BRET basal diminue légèrement en fonction de l'augmentation du pourcentage de l'activité de l'IRES ; cette diminution n'est pas significative, excepté pour l'IRES100% (de 11333 à 10268 mBRET). Plus l'effecteur est exprimé par l'IRES, plus une quantité croissante de sonde est donc clivée, certainement dû à une réassociation TEV_N/TEV_C. En présence de la protéase NS3-4, une diminution du signal de BRET est visible pour tous les IRES et cela dès l'IRES0% (sonde hypersensible). Le signal de BRET atteint une valeur plateau de 3100 mBRET à partir de l'IRES45% et, le delta de BRET maximal est obtenu pour les séquences IRES de 30 et 45% (environ 4300 mBRET). Pour la suite des expériences, il sera intéressant de travailler avec l'IRES45% qui semble réguler le plus finement l'expression du déclencheur par rapport à la sonde, car le signal de BRET basal reste le moins diminué par rapport à la valeur 0% de référence et donne, après coupure, un clivage maximal de la sonde. Ce système est déclenché par la protéase virale.

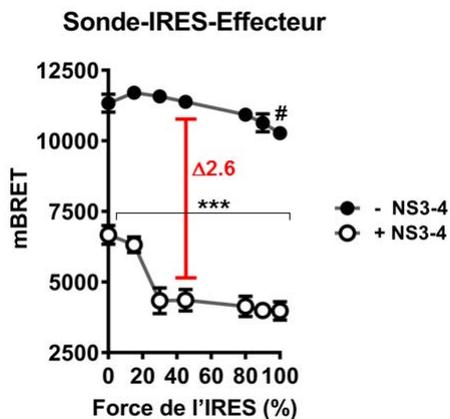


Figure 60 : Effet de la force de l'IRES sur la coupure de la sonde en l'absence ou en présence de déclencheur

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 40 ng de vecteur sonde comprenant les différents IRES, en présence de 20 ng de protéase virale (n=3). ***: p<0,001 par rapport au témoin négatif (sans NS3-4) #p<0.05 par rapport à l'IRES0%. Analyse statistique réalisée avec GraphPadPrism7.0, ANOVA deux voies, Boneferonni post-test. Les valeurs pour les différents IRES en l'absence de NS3-4 sont non significatives par rapport à la valeur de référence 0%. Rapport 568/460nm.

II.5.a.iii Conclusions et perspectives

La preuve de concept est validée en ce qui concerne la protéase du virus de l'Hépatite C. Le système IRES45% semble être celui qui répond le mieux avec une diminution maximale du signal de BRET en présence de la protéase virale exprimée par le plasmide. La seconde étape sera donc de réaliser des lignées de clones cellulaires stables exprimant cette construction Sonde-IRES45%-Effecteur, et de tester à la fois le plasmide codant pour la protéase NS3-4, ainsi que le virus natif et des pseudos particules exprimant cette même protéase. Le précédent test développé par le laboratoire, bien que très sensible pour suivre l'infection par ce même virus, avait montré ses limites lors de la transfection de la protéase par le plasmide ou les pseudos particules virales. Les pseudos particules sont des particules virales modifiées qui, ne permettent pas une forte production de protéase NS3-4, contrairement aux virus répliatifs, pour induire un changement drastique du signal.

Le système proposé ici ayant été validé en présence du plasmide exprimant la protéase NS3-4, la preuve de concept devra également être validée en présence du virus natif et des pseudos particules. Un criblage de quelques molécules pourra aussi être réalisé en présence d'inhibiteurs connus de la protéase, tels que le Bocéprévir²¹⁵ et le Télaprévir²¹⁶, afin de valider le test avec ce modèle de virus bien décrit dans la littérature.

Le but est d'obtenir un test homogène utilisable à la fois avec du virus natif et des pseudos particules virales. Son utilisation pourra se généraliser à n'importe quel virus à protéase, en changeant simplement, par mutagénèse dirigée, le site de coupure libérant l'effecteur TEV_C. Etant basé sur l'activité protéase, ce système rapporteur apportera non seulement un système homogène pour le virus natif et les pseudos particules, mais aussi une meilleure sensibilité par les niveaux d'amplification qu'il apporte. Il présente aussi l'avantage d'être développé sans virus et pourra de ce fait être adapté à n'importe quel virus à protéase, notamment les virus émergents tels que le Chikungunya ou Zika ou encore d'autres virus à protéases. Ce système pourra être mis au point même en l'absence de la production du virus natif en laboratoire, car seule la protéase virale suffit pour le développement du test qui pourra ensuite être appliqué au suivi de l'infection par le virus natif.

II.5.b Protéases cellulaires et preuve de concept

Dans l'optique d'adapter ce modèle aux protéases cellulaires, une expérience préliminaire a été menée avec le modèle cellulaire *Caspase3*, une des protéases à cystéine régulatrices de l'apoptose. Comme développé précédemment, les protéases cellulaires ont un rôle majeur dans la régulation de la signalisation, et sont, de ce fait, des cibles attrayantes pour le traitement par des inhibiteurs de protéase. L'équipe de Den Hamer¹²⁶ a développé un test de BRET basé sur la protéine fluorescente NeonGreen et sur la *Nluc*. Afin de valider la

preuve de concept de cette approche, le site de la protéase *Caspase3*, d'une longueur de 17 acides aminés, a été inséré entre les partenaires de BRET YPet Δ 11 et *Rluc8*-Full de notre sonde optimisée. 48 heures après transfection, une dose de staurosporine de 10 μ M a été ajoutée sur les cellules et une lecture de BRET a été réalisée 6 heures après.

Le signal de BRET a été mesuré en présence ou en l'absence de staurosporine, une molécule inductrice de l'apoptose, dans le cas des deux constructions : la construction dans laquelle les partenaires de BRET sont séparés par le site de clivage de la protéase TEV et la construction avec les mêmes partenaires mais séparés par le site *Caspase3* (**Figure 62A et 62B**). Dans le cas de la sonde BRET-sTEV, avec ou sans staurosporine, aucune diminution du signal de BRET n'est observée : cette sonde est bien spécifique de la protéase TEV. En revanche, lorsque le site de clivage de la protéase TEV est remplacé par celui de la *Caspase3*, une diminution significative du signal de BRET est observée. Sans staurosporine, le signal de BRET basal est déjà plus bas que celui du contrôle TEVp : l'ajout de 8 acides aminés supplémentaires en plus des 9 acides aminés du site de clivage de la TEV (**Figure 55C**) rallonge la construction de BRET et induit un signal de BRET équivalent à celui d'une construction YPet Δ 1-sTEV-Full-*Rluc8*, d'où une chute du signal de 9000 à environ 3000 mBRET. En présence de staurosporine, une diminution significative du signal de BRET est observée, montrant que la protéase cible est capable de reconnaître et cliver son site comme dans le cas de la TEV protéase.

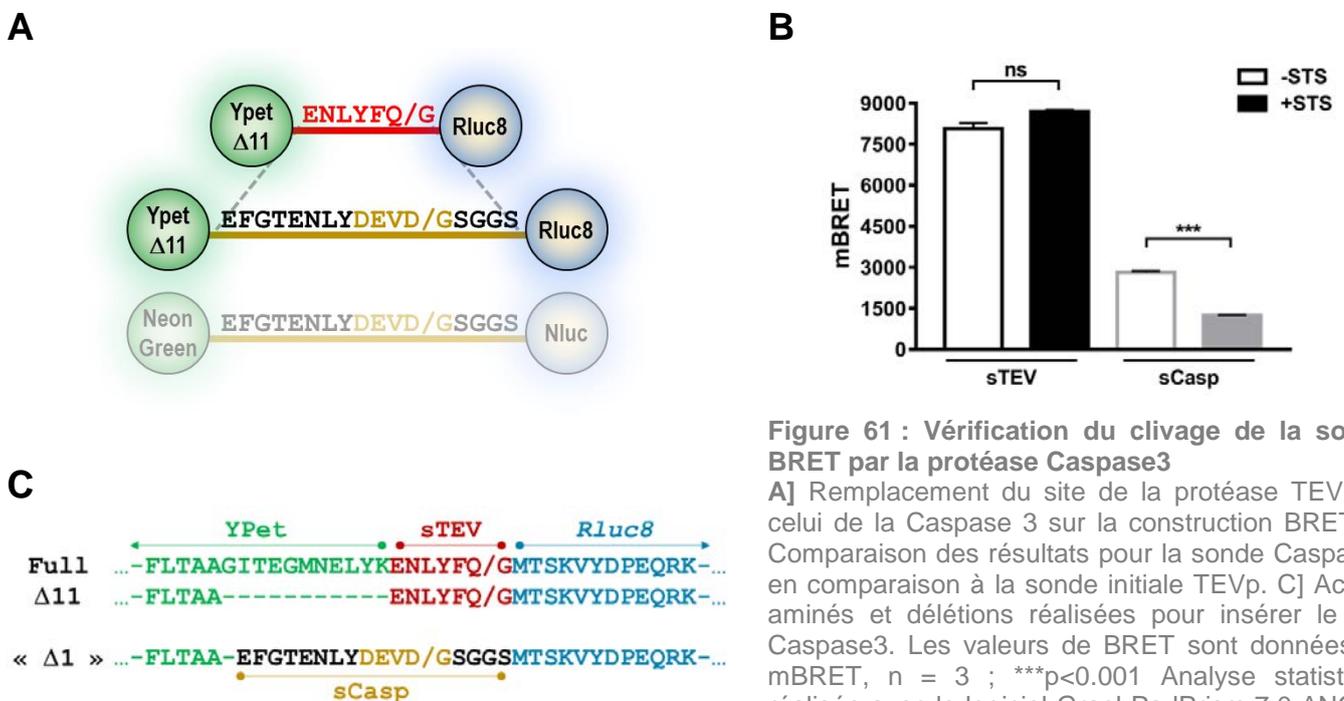


Figure 61 : Vérification du clivage de la sonde BRET par la protéase Caspase3

A] Remplacement du site de la protéase TEV par celui de la Caspase 3 sur la construction BRET B] Comparaison des résultats pour la sonde Caspase3 en comparaison à la sonde initiale TEVp. C] Acides aminés et délétions réalisées pour insérer le site Caspase3. Les valeurs de BRET sont données en mBRET, n = 3 ; ***p<0.001 Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism,7.0 ANOVA deux voies, Bonferonni post-test.

Afin de valider notre système en présence de cette protéase cellulaire, nous avons, par mutagenèse dirigée, interchangé le site de clivage de la protéase NS3-4 par celui de la

Caspase3 et vérifié les séquences. Cependant, lorsque ces nouveaux vecteurs ont été transfectés, aucune diminution du signal de BRET n'a été observée en présence de staurosporine ou de carfilzomib, un autre inducteur de l'apoptose, à 6 heures ou 24 heures. Le problème réside probablement dans la localisation de l'effecteur. Le site de clivage de la protéase *Caspase3* ne semble pas accessible à la protéase. Une autre séquence de localisation, au réticulum endoplasmique cette fois-ci, sera testée, la séquence IPS1 (mitochondriale) étant principalement utilisée dans les études liées aux virus. Notre système, bien que très sensible, nécessite là encore quelques ajustements en fonction de l'évènement biologique ciblé.

II.6 Application : interaction protéine-protéine

Comme présenté dans l'introduction (**cf interactions protéine-protéine I.5**), de nombreuses méthodes ont été développées pour mettre en évidence les interactions protéine-protéine. Cependant, chaque méthode possède ses limites et des interactions brèves, comme celles avec les phosphatases, peuvent ne pas être détectées, même avec des approches sensibles, à moins d'utiliser des mutants empêchant la dissociation du complexe²¹⁷. De plus, très peu d'exemples de détection d'interactions protéine-protéine en HCS ont été décrits dans la littérature si ce n'est entre deux cibles connues telles que p53 et hDM2²¹⁸. Avec ce système basé sur l'approche Split-TEV, même si l'interaction étudiée est rare, nous espérons observer un changement d'état après activation du système dans la cellule.

Afin de valider cette application potentielle, les partenaires Split-TEV ont été clonés aux protéines FRB (FKBP12 Rapamycin Binding domain) et FKBP (FK506 Binding Protein) bien décrites dans la littérature pour le suivi des interactions protéine-protéine et inducible par la rapamycine comme décrit en introduction¹⁴⁸.

II.6.a Preuve de concept : interactions FRB/FKBP

II.6.a.i Choix des partenaires

Le couple de protéines a été cloné en créant deux versions : i) une version dans laquelle FRB et FKBP sont liées à la membrane plasmique grâce au peptide de localisation cellulaire Lyn²⁰⁸ et ii) une version dite soluble dans laquelle les deux protéines circulent librement dans le cytosol. Une demi-TEV_N ou TEV_C a été clonée à chaque protéine FRB et/ou FKBP et le meilleur couple de partenaires a été déterminé en croisant les différentes constructions. Pour essayer de démontrer la sensibilité de ce système nous avons également comparé ces différentes constructions à une version de « BRET direct », en remplaçant les demies TEV_N ou TEV_C respectivement par les protéines *Rluc8* et YPet. La **Figure 63** présente l'ensemble des combinaisons réalisées ainsi que les différents signaux obtenus en BRET.

Pour chaque graphique sont représentées en noir, la courbe contrôle sans rapamycine (DMSO), et en blanc, la courbe après addition de rapamycine à une dose de 1 μ M, 24h après la transfection. Dans le cas de la méthode « BRET direct » (**Figure 63A**), les différentes combinaisons montrent l'apparition d'un signal de BRET après ajout de rapamycine, reflétant l'interaction entre les deux partenaires. La valeur la plus élevée est obtenue pour le couple Lyn-FRB-*Rluc8* et FKBP-YPet (2290 mBRET à la plus forte dose de partenaires transfectés). Avec ou sans rapamycine, certaines combinaisons ne semblent pas être dans une conformation d'interaction optimale pour le transfert d'énergie, comme c'est le

cas pour la combinaison FRB-*Rluc8* + FKBP-YPet dont le signal de BRET est d'environ 1300 mBRET en l'absence de rapamycine et ne dépasse pas les 1500 mBRET en présence de rapamycine. Dans le cas des deux premiers couples de partenaires, Lyn-FRB-*Rluc8*+Lyn-FKBP-YPet et Lyn-FRB-YPet+Lyn-FKBP-*Rluc8*, le signal de BRET obtenu entre les protéines *Rluc8* et YPet en l'absence de rapamycine reflète une interaction non spécifique des protéines FRB et FKBP. En fonction de l'encombrement des partenaires de BRET et du complexe protéique il se peut qu'un complexe non optimal pour le transfert d'énergie se mette en place faisant varier le signal de BRET.

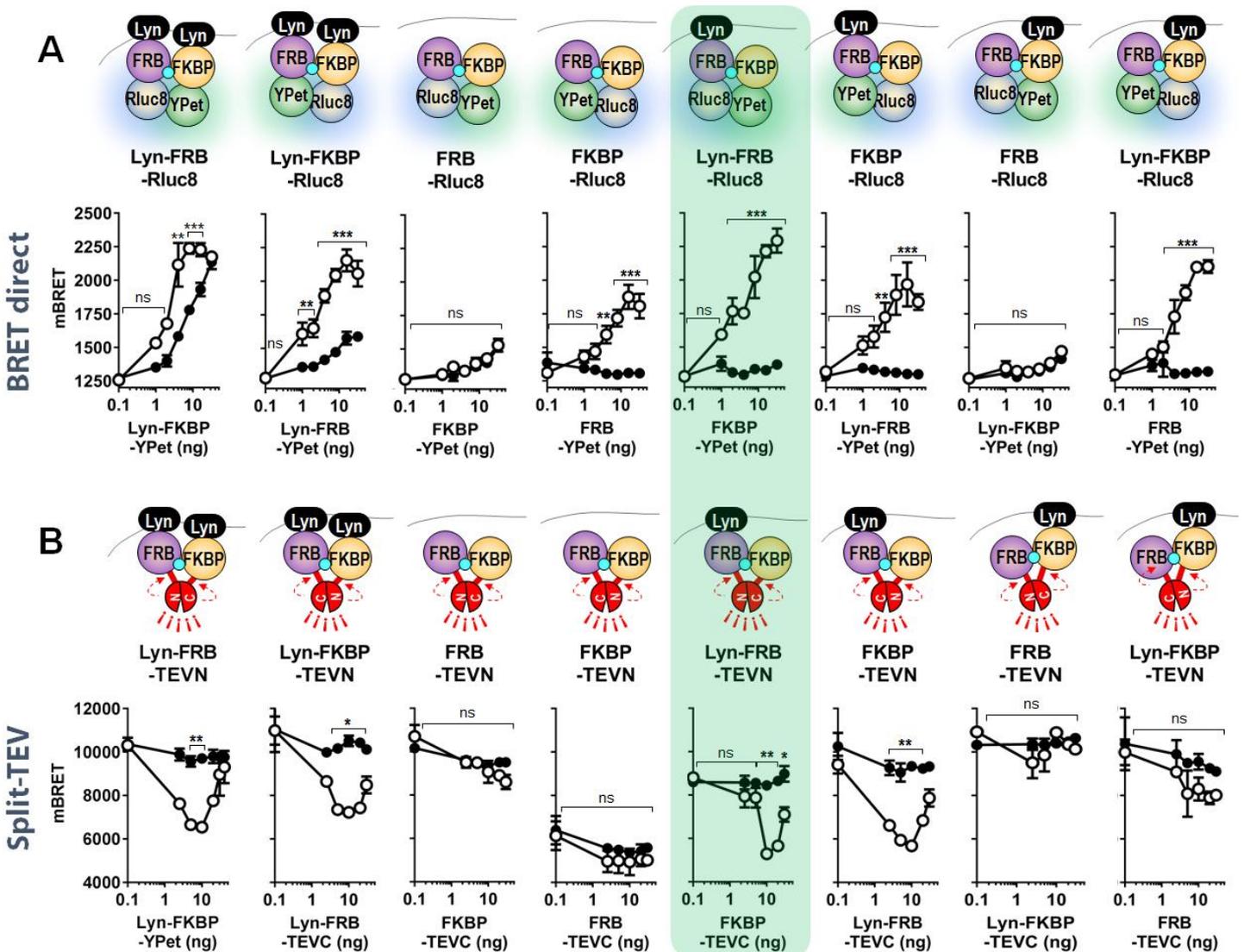


Figure 62 : Résultats en BRET obtenus suite au croisement des différentes constructions FRB/FKBP pour les approches « BRET direct » et « Split-TEV »

Les valeurs sont données en mBRET pour chaque construction et une comparaison sans rapamycine (condition DMSO, en noir) et avec rapamycine (dose 1 μ M, en blanc) est représentée en fonction d'une dose croissante de partenaire YPet (0 à 32 ng) et TEV_c (0 à 20 ng) pour une quantité constante de partenaire *Rluc8* (5 ng) ou TEV_N (5 ng) respectivement, en présence de la sonde BRET/HCS nucléaire. Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 7.0. Test ANOVA deux-voies, Bonferonni post-test. n=3; ns : non significatif ; *p>0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001. Rapport 568/460 nm.

Pour le système Split-TEV (**Figure 63B**), une diminution du signal de BRET est observée, traduisant le clivage de la sonde, et par conséquent la reconstruction de la TEVp dans ce système. Pour ces nouvelles combinaisons, nous retrouvons, par effet miroir, les mêmes couples que précédemment. Le signal de BRET basal est d'environ 10000 mBRET en l'absence de rapamycine pour les différentes constructions, excepté dans le cas de la combinaison FKBP-TEV_N+FRB-TEV_C pour laquelle le signal de BRET basal est d'environ 6000 mBRET avec ou sans rapamycine. Comme pour le système BRET direct, le clivage de la sonde le plus important en présence de rapamycine est observé pour le couple Lyn-FRB-TEV_N couplé à la construction FKBP-TEV_C avec une valeur de 5200 mBRET après clivage. Pour certaines constructions, le signal de BRET semble plus élevé, ce phénomène est probablement dû à l'encombrement des partenaires TEV_N et TEV_C : une trop forte quantité du partenaire TEV_C vient gêner la reconstitution active de la TEV entière. Le couple Lyn-FRB-TEV_N+FKBP-TEV_C, semble donner les meilleurs résultats (encadré vert), comme dans le cas des expériences de BRET direct, et rejoint les expériences décrites par Wehr *et al*,¹⁴⁸ qui avaient montré un système Split-TEV basé sur le même couple de partenaires. Nous avons donc choisi par la suite de travailler avec ce couple de partenaires.

Ces expériences apportent une première information quant au couple de partenaires à utiliser. Néanmoins, une plus forte diminution du signal de BRET était attendue après clivage par la TEVp (signal d'environ 2000 mBRET pour notre sonde clivée à 100%). Deux questions se sont alors posées :

- *Le site de clivage de la protéase est-il suffisamment accessible à la coupure par la TEVp ?*
- *Si ce site est accessible, l'association des deux demies TEV permet-elle le clivage de ce dernier en cis ou en trans, libérant ainsi la protéase reconstituée ?*

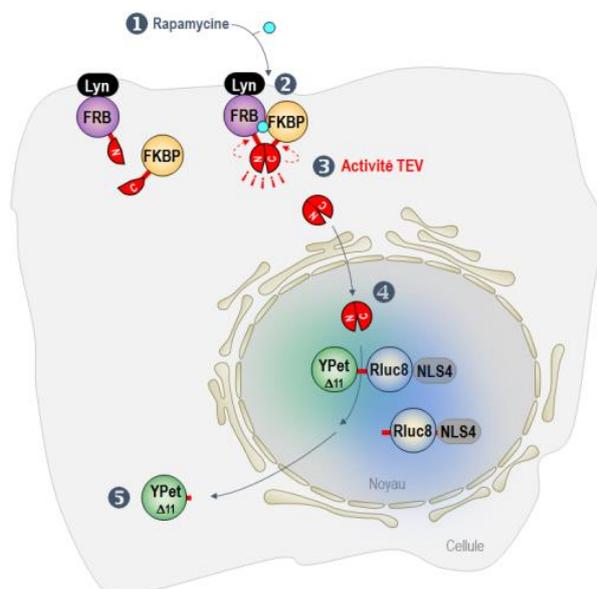


Figure 63 : Principe de l'interaction induite FRB/FKBP par la rapamycine pour le meilleur couple de protéines

En absence de rapamycine, la sonde est localisée dans le noyau des cellules.

① L'ajout de rapamycine va permettre ② l'activation du système par reconstitution de la protéase Split-TEV ③ qui va être capable de s'autolibérer grâce à son activité TEV, celle-ci pourra alors diffuser vers le noyau ④ et ainsi cliver la sonde nucléaire, libérant ⑤ la YPet dans le cytoplasme des cellules.

Pour répondre à ces deux questions, les constructions Lyn-FRB-YPet et Lyn-FKBP-YPet ont été mises en présence ou non de la protéase TEV entière pour suivre par fluorescence la délocalisation de la YPet (**Figure 64**). Avant clivage par la TEVp, la construction Lyn-FRB-YPet est bien localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules. Comme attendu, après clivage, une délocalisation de la fluorescence de la YPet, de la membrane plasmique vers le cytoplasme, est observée. Le site de clivage de la TEVp semble donc bien accessible à la protéase. Cependant, une vérification par des expériences d'immunofluorescence devra être réalisée, pour démontrer que ce site de clivage est bien accessible sur les constructions FRB/FKBP grâce aux tags V5- localisés respectivement en amont de la demi-TEV_N et demie TEV_C.

Pour répondre à la deuxième question de non libération de la TEVp, deux nouvelles approches ont été développées. Un linker flexible (succession de [GGGS]_{1,2} ou ₃²⁷ séquence(s) en acides aminés) a été inséré avant et/ou après le site de clivage de la protéase afin de gagner en flexibilité lors du clivage. La deuxième approche imaginée consiste à ajouter une seconde demie-TEV à la suite de la première pour permettre une auto-libération si la première TEVp n'est pas capable de se libérer des partenaires FRB et FKBP, son site de clivage étant localisé en amont et non en aval comme dans le système décrit par Wehr *et al*⁴⁸. La **Figure 65** expose le principe de ces deux nouvelles approches dites « Linkers flexibles » et « Double TEVp ».

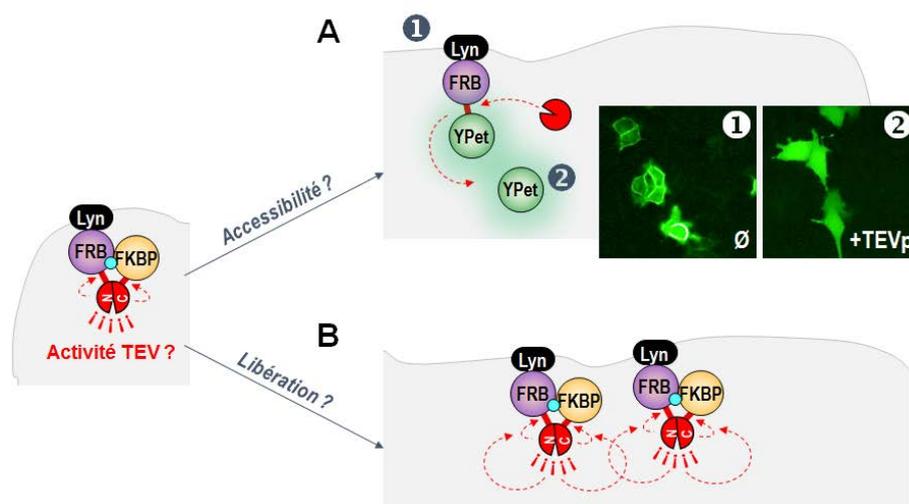


Figure 64 : Hypothèses émises lors du développement de la preuve de concept
Accessibilité du site de clivage ? Libération de la protéase TEV ?

II.6.a.ii Approche « Linkers » et « Double TEV »

Les résultats **Figure 66** représentent les signaux de BRET obtenus en présence ou en l'absence i) du partenaire FKBP-TEV_C pour les différentes constructions et ii) de rapamycine à 0.5 µM, ajoutée 24 heures après transfection pour les différentes approches.

Comme déjà observé, le delta de BRET n'est que de 3600 mBRET dans le cas de la condition contrôle et ce signal ne semble pas diminuer plus dans l'approche linkers, avec des deltas d'un facteur 1.5 pour les motifs [GGGGS]_{1,2} ou₃ (**Figure 66B**). L'ajout de ces différents linkers ne semble pas avoir permis une configuration dans laquelle une protéase TEV active pourrait se détacher de la membrane et diffuser dans le noyau pour aller cliver la sonde. La sonde nucléaire est probablement clivée pendant la biosynthèse avant d'être transférée dans le noyau des cellules.

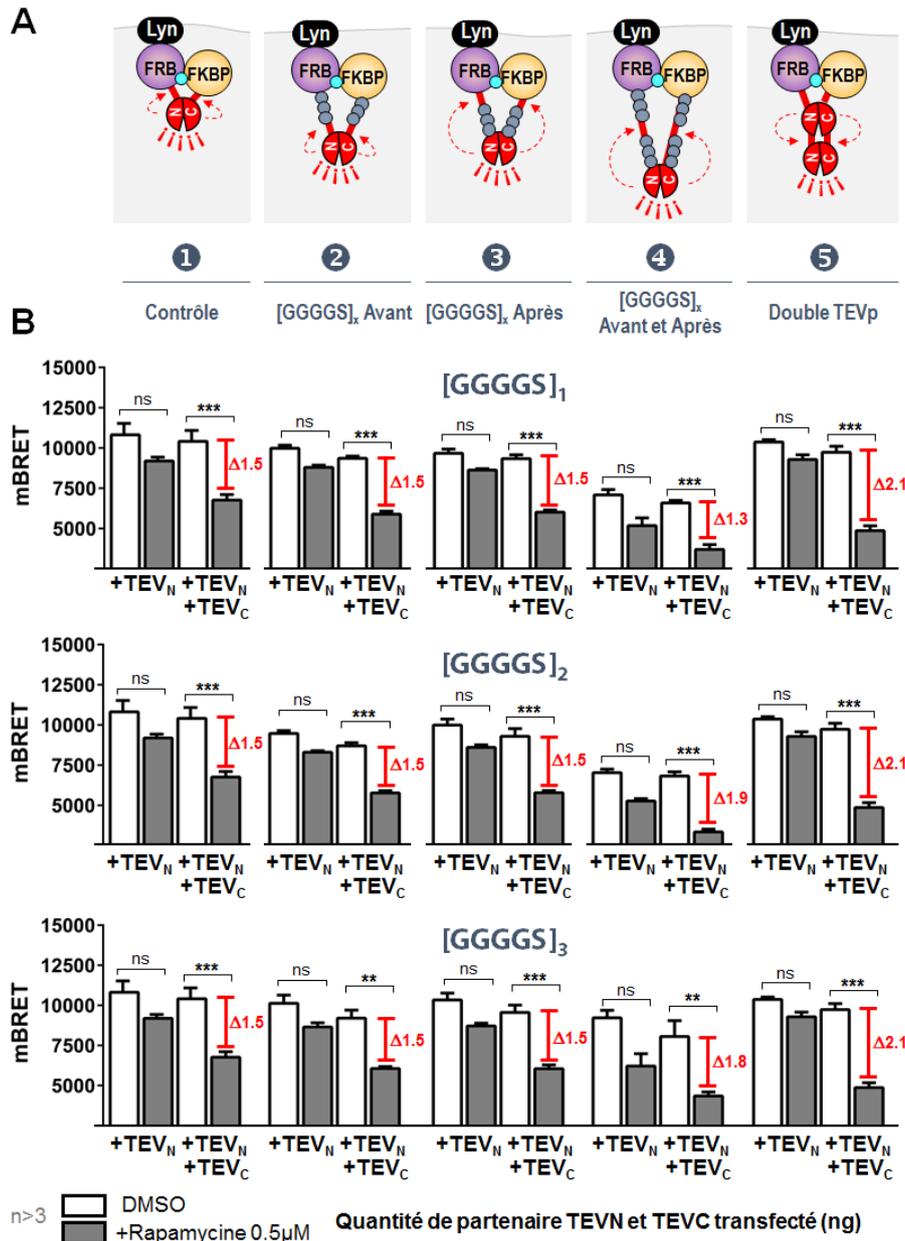


Figure 65 : Approche « Linkers » et « Double TEV »

A] Représentation schématique des différentes constructions plasmidiques réalisées. **B]** Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 3 ng de sonde BRET/HCS, 10 ng de partenaire TEV_C, sans ou avec 10 ng de partenaire TEV_N. Les différentes conditions sont testées en l'absence (DMSO - blanc) ou en présence de rapamycine à une dose de 0,5 μM (gris). n=3, ns p>0,05 / * p<0,05. Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism 7.0, ANOVA deux voies, Bonferroni post-test. Les

valeurs de BRET pour les différentes approches sont également notées sur les graphiques. Rapport 568/460 nm.

En revanche, avec l'approche double TEVp (dernier graphique du bloc de 5, valeur de Δ 2.1), une diminution significative du signal de BRET a été observée par rapport à notre point contrôle ($*p < 0,05$ – ANOVA deux voies, corrigé par Bonferroni). La preuve de concept de cette approche d'interaction protéine-protéine semble validée. Cependant, de nombreuses questions restent encore en suspens quant à la réelle libération de la TEVp. Des expériences d'immunofluorescence devront être menées pour vérifier ce point, mais faute de temps et au vu des résultats et des constructions à réaliser, nous avons préféré laisser de côté ce modèle d'étude pour nous focaliser sur l'approche initiale de développement d'un test protéase. Le système pourra être adapté ou validé sur un autre type d'interaction protéine-protéine en prenant pour exemple une interaction dite constitutive, comme c'est le cas pour le récepteur à la vasopressine couplé aux protéines G, disponible au sein du laboratoire d'accueil.

II.6.b Conclusions et perspectives

Cette interaction entre les partenaires a été utilisée dans de nombreuses applications telles que le FRET¹⁵⁰, le BRET²¹⁸, la régulation des protéines²¹⁹, les études de gènes rapporteurs¹⁴⁷, l'étude des récepteurs liés aux protéines G^{148,149,220,221} et plus récemment les études de Split-Cas9²²². Cette dernière application n'a pas donné les résultats escomptés. Nous avons essayé d'adapter notre système en nous basant sur les travaux de l'équipe de Wehr, qui avait choisi ce modèle d'interaction pour le développement de son approche Split-TEV^{148,151}. Un des problèmes majeurs rencontrés lors du développement de notre application a été la question de la libération de la TEVp. Celle-ci est-elle active ? Est-elle capable de se libérer des partenaires à la membrane pour cliver la sonde localisée dans le noyau des cellules ? Dans notre test, la TEVp semble avoir une activité après induction par la rapamycine et se réassocier car nous observons une diminution du signal de BRET, même si la sonde n'est pas clivée à 100%. En introduisant la TEVp entière, et en fusionnant la YPet à l'un des partenaires FRB ou FKBP, nous avons aussi pu vérifier l'accessibilité du site de clivage de la TEV qui semble être clivée par la TEVp entière. Il sera important de vérifier, par des expériences d'immunofluorescence, la reconstitution de la forme Split-TEV ainsi que sa libération *via* les différents tags insérés dans notre système. Enfin, nous avons décidé de placer le site de clivage de la protéase en amont et non en aval des deux moitiés de TEVp, comme il est décrit dans différents exemples de la littérature ; la position de ce site doit probablement avoir un impact sur la libération de la TEVp et l'orientation du site catalytique de cette protéase (**Figure 64**).

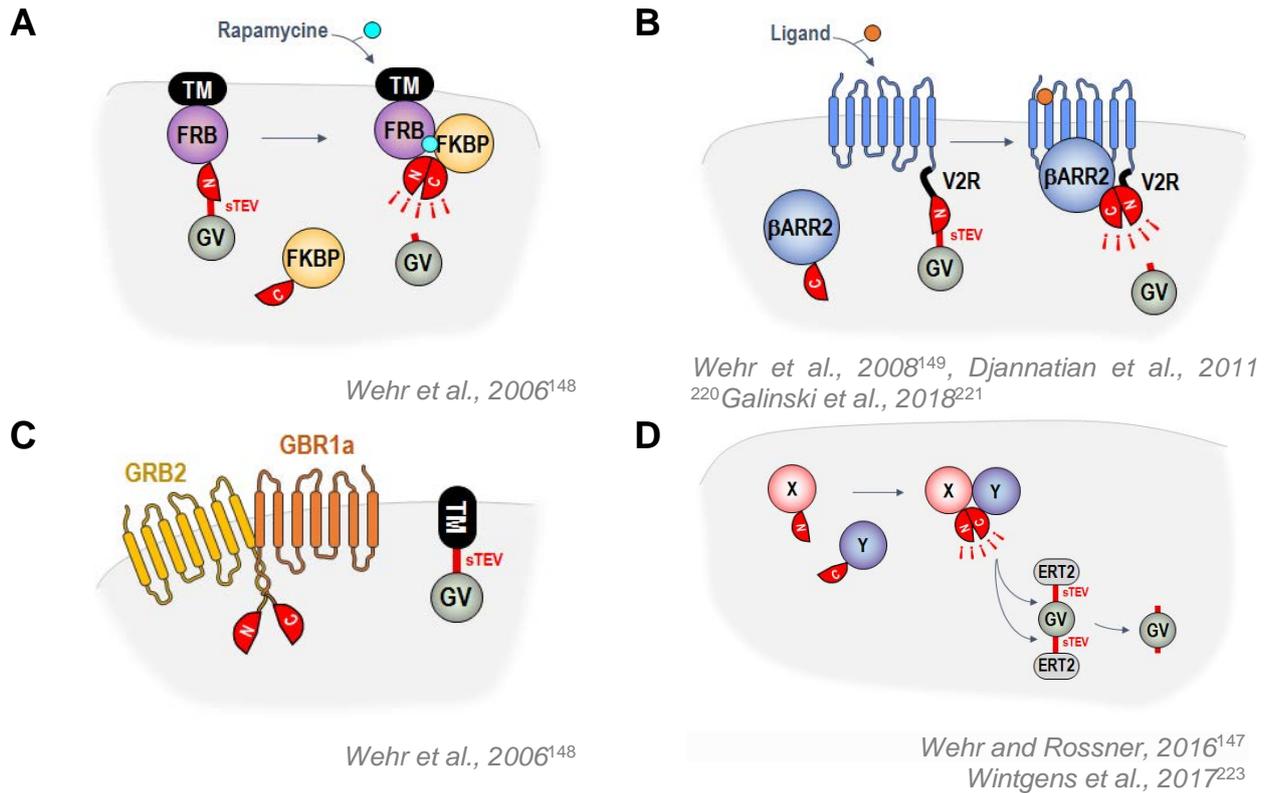


Figure 66 : Différents modèles d'études développés avec l'approche Split-TEV

A] Interaction FRB/FKBP. La protéine FRB transmembranaire est fusionnée à la TEV_N et au facteur de transcription GV. La TEV_N et le facteur de transcription GV sont séparés par le site de clivage de la TEVp noté sTEV. La protéine FKBP soluble est fusionnée au fragment TEV_C. La rapamycine induit l'interaction FRB/ FKBP et permet la reconstitution de la TEVp. **B]** Etude des GPCR. L'activation du récepteur dépendant du ligand entraîne le recrutement de la protéine β-arrestine au RCPCG et la reconstruction de l'activité protéase. Le facteur de transcription GV est relâché et se déplace vers le noyau pour activer la transcription des gènes. **C]** Homodimérisation des récepteurs GABA (1a) et GABA (2) : GBR2-TEV_N et GBR1a-TEV_C chez le rat et facteur de transcription GV lié à la membrane, celui-ci sera libéré après réassociation des deux moitiés de la TEVp. **D]** Une protéine soluble X est fusionnée à la TEV_N et une seconde Y à la TEV_C. Un rapporteur TEV cytosolique composé d'une unité centrale (facteur de transcription GV) est piégé et flanqué de domaines ERT2 fusionnés à un site de clivage de la protéase. La réassociation des deux partenaires induit la reconstitution de l'activité protéolytique de la TEV, qui peut libérer le facteur de transcription GV qui se déplace dans le noyau pour activer un système rapporteur de type luciférase.

Ces différents exemples présentent des protéines membranaires ou solubles. Le but de ces différentes expériences est de libérer une protéine, ici le facteur de transcription GV, après reconstitution des deux moitiés de la protéase TEV. La **Figure 67** présente des exemples de protéines liées à la membrane par un domaine transmembranaire (**67A**) ou simplement *via* un récepteur (**67B**). Après reconstitution de la protéase TEV, le facteur GV est libéré, le site de clivage étant, dans ces deux exemples, présent en aval de la protéase. Dans les **Figures 67C** et **67D**, le facteur de transcription GV n'est pas lié à l'une des deux moitiés de la protéase comme décrit en A et B. Dans l'étude de l'homodimérisation des récepteurs GABA chez le rat (**67C**), le facteur de transcription est attaché à la membrane et sera libéré de celle-ci après reconstitution de l'activité TEV. Enfin dans l'exemple **67D**, la

réassociation des deux moitiés de TEV permet la libération du facteur de transcription GV présent dans le cytoplasme. Dans ces différents exemples, la TEVp n'a pas spécialement besoin d'être libérée après réassociation, ce qui n'est pas le cas de notre système. Pour pallier à ce problème, l'approche « Double TEV » a été développée pour essayer de libérer la protéase TEV afin qu'elle puisse entrer dans le noyau des cellules par diffusion passive. Cette approche a conduit à un delta de BRET d'un facteur 2.3 entre les deux états, en l'absence et en présence de rapamycine, mais les résultats nécessitent aussi d'être confirmés par des expériences d'immunofluorescence. Lors du développement de notre système, nous avons également testé différentes sondes, localisées à plusieurs endroits de la cellule : (1) cytosol ; (2) noyau ; (3) mitochondrie et (4) membrane. Pour ce type d'application, nous pourrions songer à l'utilisation d'une sonde plus adaptée à l'interaction étudiée.

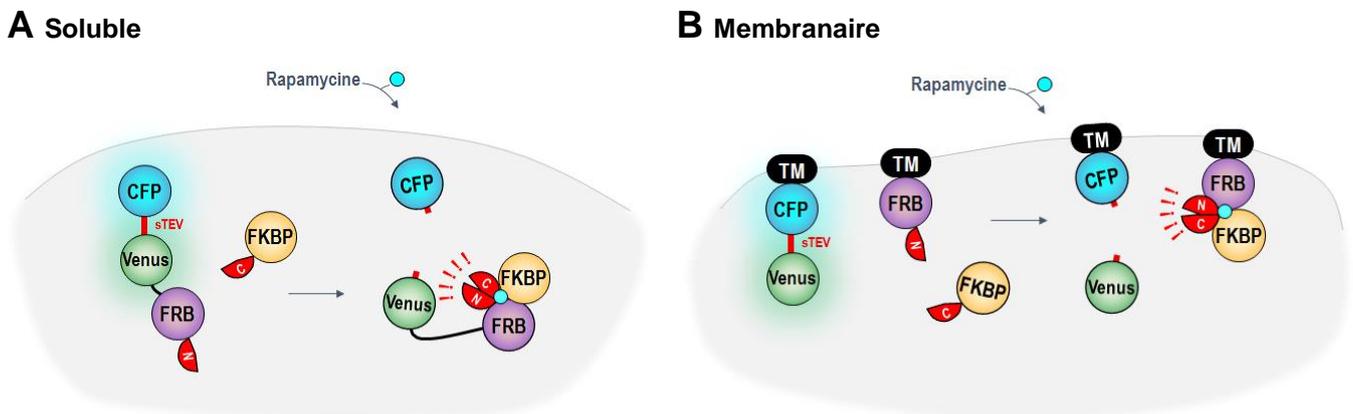


Figure 67 : Clivage d'une sonde FRET par l'approche Split-TEV

A] Version « Soluble ». Le partenaire TEV_N est fusionné à la protéine FRB et à la sonde FRET. Après induction par la rapamycine, la protéase TEV reconstituée est capable de cliver la sonde FRET. **B]** Version « membranaire ». Sur le même modèle, la sonde FRET est rattachée à la membrane des cellules, ainsi que la protéine FRB, liée à la moitié TEV_N. Après induction et réassociation de la TEV, la sonde FRET est clivée au niveau de la membrane plasmique des cellules.

L'équipe de Williams¹⁵⁰ a réalisé un test de FRET basé sur le clivage d'une sonde fluorescente par la protéase Split-TEV. L'exemple décrit ici pourrait servir de modèle pour l'amélioration de notre preuve de concept (**Figure 68**). Pour ce type interaction protéine-protéine, il conviendrait donc, en fonction de l'étude de l'interaction souhaitée, d'utiliser la sonde la plus adaptée si la reconstitution des partenaires TEV ne permet pas la libération efficace de la protéase TEV.

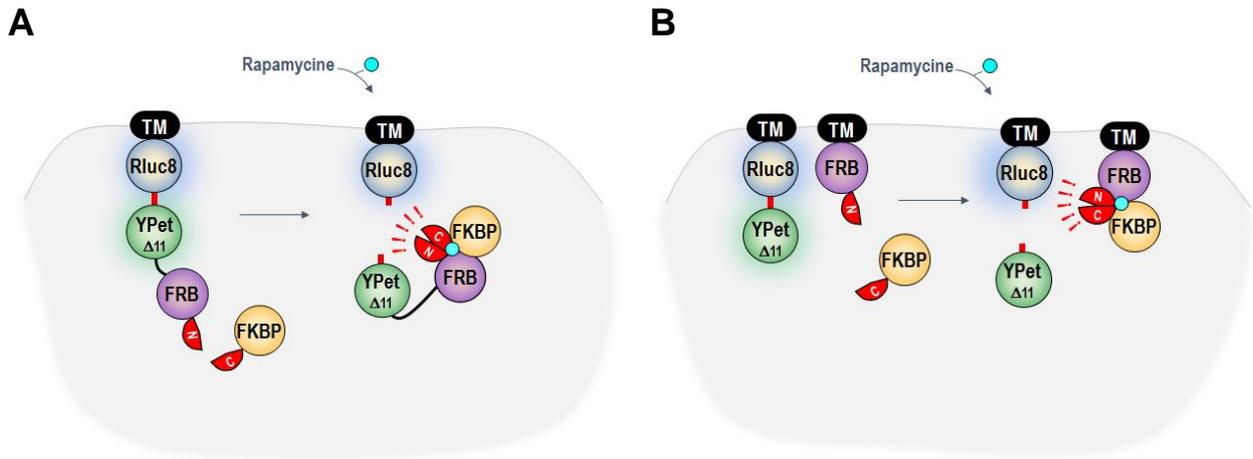


Figure 68 : Potentielles hypothèses à tester dans le cas de l'interaction protéine-protéine
Adapté des travaux de Williams *et al.*, 2009¹⁵⁰

Cependant, un des avantages de notre système est le double mode de lecture BRET/HCS, avec un contraste important pour la localisation nucléaire qui devient cytosolique. Si nous changeons la localisation de la sonde dans un compartiment cellulaire différent du noyau, il est important de conserver une localisation cellulaire différente avant et après clivage de la sonde. Dans ce type de configuration, une localisation de la fluorescence de la YPet au niveau de la membrane pourrait être envisagée et la fluorescence pourrait être retrouvée dans le cytoplasme après coupure. Ce contraste de fluorescence serait moins prononcé qu'entre noyau et cytoplasme mais reste envisageable. De plus, la sonde membranaire utilisée dans les approches précédentes devrait être repensée et la position des deux partenaires de BRET inversée. Deux hypothèses pourraient ainsi être considérées : une version (**Figure 69A**), avec une sonde à la membrane des cellules fusionnée à la protéine FRB et à la demie TEV_N et une seconde version où le couple FRB-TEV_N est lié à la membrane comme la sonde (**Figure 69B**).

Lors du développement de ce projet, cette application avait été pensée pour le suivi de certaines interactions difficiles à détecter au sein de la cellule. Comme développé précédemment, l'approche Split-TEV a montré son grand intérêt dans le suivi des interactions protéine-protéine, et nous pensons pouvoir détecter un changement d'état d'activation dans les cellules, même si l'interaction étudiée dans la cellule est rare comme celle entre le récepteur à l'insuline et la phosphatase PTP1B. Il sera donc intéressant de valider la preuve de concept pour un autre type d'interaction bien décrit et essayer de démontrer que notre système est capable de fonctionner pour des interactions rares. Le but sera par la suite d'adapter les constructions au système Gateway afin de cloner une banque de cDNA pouvant coder pour les protéines humaines et Split-TEV, pour développer un exemple de double hybride BRET/HCS à haut débit.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de cette thèse a été de développer un système générique au double mode de lecture BRET/HCS, d'une grande sensibilité dans différentes applications telles que le suivi de l'expression de gènes rapporteurs, le suivi de l'infection virale ou encore la détection d'interactions protéine-protéine. La **Figure 70** propose un bilan général de l'ensemble des preuves de concepts réalisées et résultats obtenus lors de la thèse pour les différentes applications proposées.

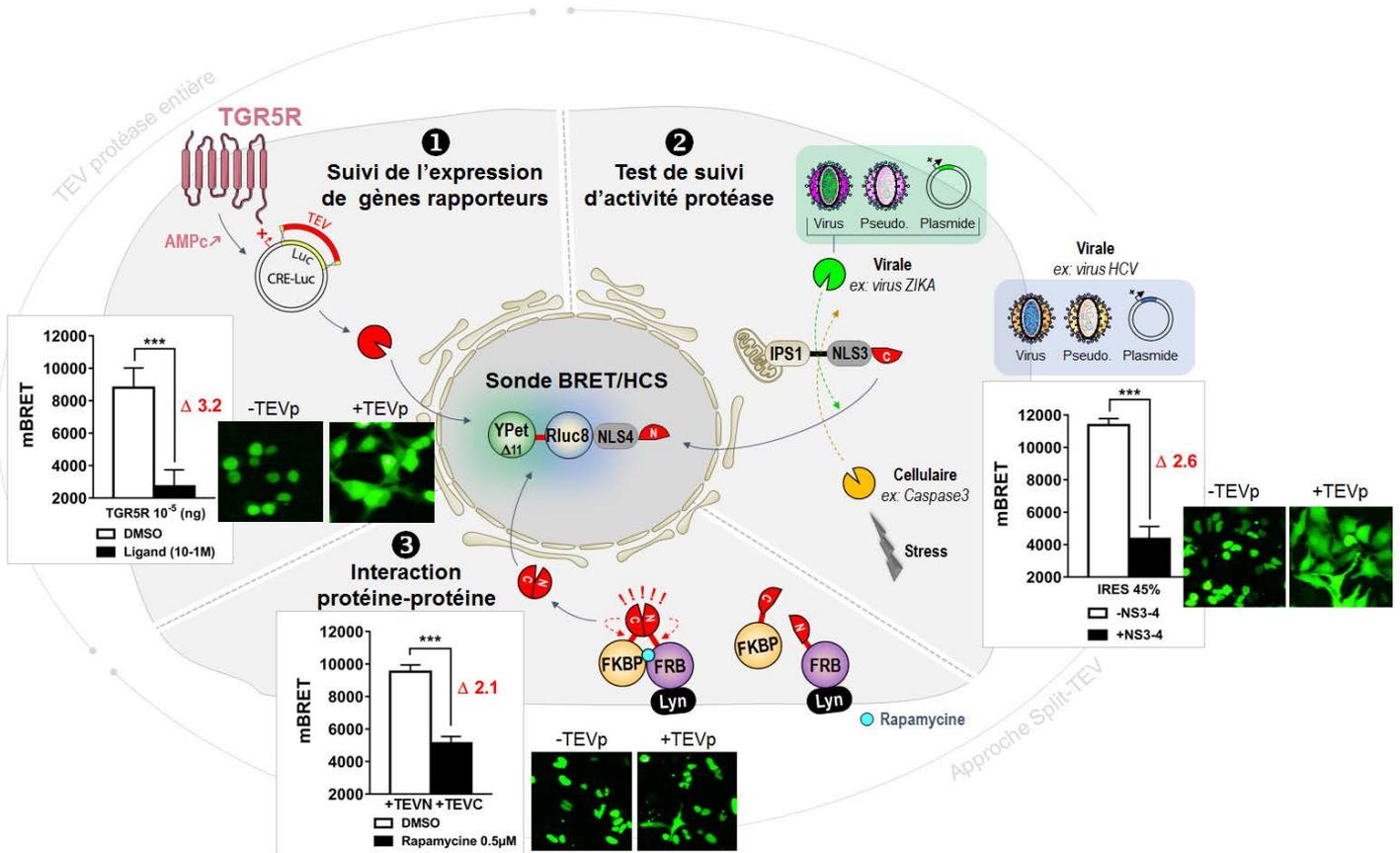


Figure 69 : Bilan général du système générique proposé et ses différentes applications

Approche TEV entière : ① Suivi de l'expression de gènes rapporteurs, preuve de concept modèle TGR5. Approche Split-TEV ② Test de suivi d'activité protéase, preuve de concept modèle HCV. Perspectives : virus ZIKA (protéase virale), Caspase3 (protéase cellulaire) ③ Interaction protéine-protéine, preuve de concept : Interaction FRB-FKBP12. Analyse statistique réalisée avec le logiciel GraphPadPrism 7.0, ANOVA deux voies, Bonferonni post-test. Rapport 568/460nm.

Le système générique proposé offre de nombreux avantages. La délétion de 11 acides aminés à l'extrémité C-terminale de l'accepteur fluorescent permet à notre nouvelle sonde d'atteindre un signal de BRET basal de 9000 mBRET, soit un signal augmenté d'un facteur 3 par rapport à la sonde non délétée de départ.

De plus, l'utilisation de la TEVp permet une coupure totale de la sonde, ce qui nous a conduit à choisir cette protéase comme enzyme pour le développement du système et ses

différentes applications. Contrairement à la protéase virale NS3-4 utilisée au départ par le laboratoire pour le développement d'un test de suivi d'infection virale, la protéase TEV possède l'avantage, contrairement à tous les autres tests protéases développés précédemment, d'être utilisée en tant qu'enzyme relais. L'activation du système par une protéase virale ou cellulaire permettra la libération de cette enzyme et donc l'activation du système entier. L'hyperactivité de cette protéase permet aussi de déclencher le système même à de très faibles quantités de TEVp de l'ordre du pg. Enfin, le signal de BRET basal de la sonde ne se verra pas modifié si le système est déclenché par une autre protéase virale ou cellulaire, le site de clivage de la TEVp étant toujours localisé entre les partenaires de BRET dans les différentes applications.

Les expériences de délocalisation de la sonde et de la protéase TEVp dans différents compartiments cellulaires rendent ce système adaptable à de nombreux processus biologiques. La sonde peut être aussi bien localisée dans le noyau que dans la mitochondrie, le cytoplasme ou encore à la membrane plasmique tout comme la TEVp. Les approches « TEV entière » ou « Split-TEV » permettent encore une fois d'adapter le système en fonction de l'application souhaitée.

Le BRET apporte également un avantage au système de par sa grande sensibilité qui permet la détection d'un signal même à de très faibles taux de protéines. L'optimisation du signal par les différents couples de filtres de BRET, ainsi que le ratio exagéré de l'activité luciférase après clivage de la sonde, sont des outils d'amplification dans le test proposé ici.

Enfin, la double approche BRET/HCS confère à ce système un dernier avantage dans le développement de futurs tests de criblage. Certaines molécules pouvant être des perturbateurs des signaux de BRET ou de fluorescence. Ce double mode de lecture permettra de confirmer ou non certains hits potentiels, même si la méthode de BRET reste cependant plus sensible que le HCS, y compris d'après nos expériences.

PARTIE EXPERIMENTALE

III Partie expérimentale

III.1 Clonages

Tous les vecteurs utilisés dans cette thèse ont été clonés par digestion enzymatique d'un insert et d'un vecteur ou par mutagenèse dirigée.

III.1.a Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification des fragments de PCR pour Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne est réalisée avec une polymérase ultra rapide de haute fidélité : la PrimeSTAR® Max DNA Polymerase. Pour un volume final de 20µL, 100 à 150 ng d'ADN matrice sont mélangés avec les oligonucléotides sens et anti-sens (1µM final chacun), ainsi que le PrimeSTAR Max premix à une concentration finale de 1X. La composition exacte de ce milieu réactionnel n'est pas donnée par le fournisseur, mais celui-ci contient la polymérase, son tampon et les différents dNTPs. L'amplification est réalisée sur un thermocycleur (SureCycler 8800, Agilent) selon les conditions suivantes : 10 secondes de dénaturation à 98°C ; 10 secondes d'hybridation à la température optimale des amorces et enfin 10 secondes d'élongation à 72°C. Le nombre des cycles de PCR varie entre 25 et 35.

III.1.b Purification sur gel des produits de PCR

Les fragments obtenus par PCR sont mélangés avec du Midori Green Direct DNA Stain (Nippon Genetic) dilués au 1/20ème puis déposés dans un gel d'agarose (de 1 à 2% selon la taille du fragment amplifié). Le gel est placé dans une cuve contenant du tampon TBE 1X (Tris-borate-EDTA). Après migration des échantillons pendant une vingtaine de minutes, la bande d'intérêt est découpée à l'aide d'un scalpel et purifiée grâce au kit de purification Macherey-Nagel Gel extraction© selon le protocole du fournisseur.

III.1.c Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est généralement réalisée à l'aide d'oligonucléotides qui viennent se fixer sur la séquence d'ADN d'intérêt et présentant la mutation souhaitée, réalisée par PCR, amplifiant le vecteur dans son ensemble. Au laboratoire, afin de muter ou d'échanger des parties des différentes constructions, des fragments de PCR (double brin) peuvent être utilisés comme longues amorces (Sens / Anti-sens) dans la réaction de mutagenèse. Ceci permet une zone d'hybridation plus importante des amorces par rapport à un simple couple d'oligonucléotides. La réaction est réalisée dans le même mélange

réactionnel que pour la PCR, mais dans un volume réactionnel plus petit et en présence de 30 à 50 ng de vecteur matrice à muter. La température d'hybridation conseillée pour les réactions de mutagenèse est de 55°C selon le protocole du fournisseur. L'étape d'élongation quant à elle dure entre 2 minutes et 2 minutes 30. Pour s'assurer que l'amplification a bien eu lieu, 2,5 µL du mélange avant mutagenèse sont prélevés avant et après la réaction puis déposés sur un gel d'agarose à 1% en présence de Midori Green Direct. Le produit de PCR est ensuite dialysé sur une membrane Millipore entre 15 et 20 minutes afin d'éliminer les sels du milieu réactionnel. L'ADN amplifié est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI (New England Biolabs) entre 3 et 8 heures. Cette enzyme est capable de couper la forme méthylée des vecteurs parentaux par reconnaissance du site de restriction GA^{*}/TC, dégradant ainsi uniquement les vecteurs non mutés, et ne laissant que le vecteur provenant de l'amplification de la PCR non méthylé. Le vecteur d'intérêt est ensuite transformé dans les bactéries compétentes.

III.1.d Transformation bactérienne

La technique utilisée pour intégrer le produit de mutagenèse dirigée après digestion par DpnI est le choc thermique de bactéries compétentes. Les bactéries *E. coli* DH5α sont préalablement sorties du congélateur -80°C pendant 20 minutes à 4°C. L'ADN d'intérêt est ensuite dilué dans un tampon contenant du chlorure de potassium (KCl) 0,1M, du chlorure de calcium (CaCl₂) 0,03 M, ainsi que du chlorure de magnésium (MgCl₂) 0,05 M ou KCM 1X. Un même volume de bactéries compétentes décongelées est ajouté au mélange. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 20 minutes dans la glace, puis un choc thermique est réalisé en incubant le tube 10 minutes à 37°C après avoir tenu le tube 2 minutes dans la main du manipulateur. Les bactéries sont ensuite étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB (Lysogeny Broth) Agar et de l'ampicilline à une dose de 125 ng/mL. La pousse des bactéries se fait sur la nuit à 37°C en aérobie et en atmosphère humide.

III.1.e Criblage des colonies bactériennes

Après une nuit de pousse sur boîte de Pétri, les bactéries transformées ayant intégré le vecteur d'intérêt par mutagenèse ou ligation sont sélectionnées, si la mutation le permet, par criblage par PCR. Pour cela, un mix de criblage d'un volume réactionnel de 10µL est réalisé contenant 0,8 µM d'amorces sens et anti-sens, 240 µM de dNTPs, 2,4 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8.3 ainsi que 0,35 unité de FastStartTM Taq DNA polymérase (Roche). Le mix de PCR est ensuite réparti dans une plaque PCR de 96 puits, le nombre de puits étant déterminé par le nombre de colonies à cribler. Les colonies sont piquées stérilement une par une sous bec Bunsen à l'aide d'un cône et d'une pipette de 10 µL, et sont déposées puits par puits dans la plaque de criblage. Avant de jeter le cône ayant

servi à piquer et prélever la colonie, celui-ci vient piquer une nouvelle boîte de LB Agar-Ampicilline (125 ng/mL) sur laquelle a été fixé un quadrillage numéroté. Cette boîte permet de retrouver les colonies positives une fois la PCR de criblage réalisée. Les criblages PCR sont généralement réalisés le matin, afin de laisser le temps aux potentiels positifs de pousser la journée (généralement 6 heures en conditions aérobie et en atmosphère humide à 37°C). Des témoins négatifs (vecteur de départ, gélose) et positifs (fragement de PCR) sont également disposés dans la plaque PCR comme contrôles expérimentaux. Après une étape de dénaturation des plasmides à 94°C pendant 4 minutes, l'amplification par PCR est réalisée avec les conditions de cycles suivantes : 10 secondes de dénaturation à 94°C, 10 secondes d'hybridation à la température optimale des amorces, 10 à 30 secondes d'élongation à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier (en moyenne 30 secondes par kilobase kb). Ce cycle est répété entre 27 et 35 fois, et la PCR se termine par une étape d'élongation de 4 minutes à 72°C. Les produits de criblage sont déposés sur gel d'agarose (entre 1 et 2 %) en présence de Midori Green Direct DNA Stain, dilué au 1/40 final dans l'échantillon. Les puits présentant l'amplification attendue sont alors sélectionnés.

III.1.f Culture de bactéries et extraction d'ADN plasmidique

La pousse de bactéries se fait en milieu liquide LB-Ampicilline (125 ng/mL) sous agitation, 200 tours par minute, à 37°C, en conditions aérobie et sur la nuit (environ 12 heures de culture). Que ce soit lors d'un criblage, sur boîte de Pétri, ou après une transformation bactérienne, les colonies sont toujours piquées stérilement sous bec Bunsen à l'aide d'un cône qui est ensuite éjecté dans un tube de 15 mL contenant 2.5 mL de LB ampicilline. Le lendemain, l'ADN plasmidique est extrait à partir des bactéries à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid Extraction (Macherey Nagel) selon le protocole décrit par le fournisseur.

Ce protocole met en jeu plusieurs étapes. 2 mL de la suspension bactérienne précédente sont centrifugés à 600 0g pendant 5 minutes et le culot est ensuite récupéré après centrifugation. Le culot est repris dans 250 µL d'un premier tampon (A1) contenant 12 unités de RNase A, puis 25 0µL de tampon de lyse (A2) sont ajoutés au mélange pendant 5 minutes pour lyser et dégrader l'ADN génomique des bactéries. La réaction de lyse est arrêtée à l'aide de 300 µL d'un troisième tampon (A3). Après une ultracentrifugation à 14000g pendant 5 à 10 minutes, le surnagent est récupéré et déposé sur une colonne d'extraction. Plusieurs lavages sont effectués à l'aide de différents tampons, et le produit d'ADN plasmidique final est récupéré après élution avec 35 µL d'eau chaude dans un nouveau tube eppendorf.

III.1.g Digestion des plasmides par des enzymes de restriction

L'insertion d'une mutation peut être vérifiée par digestion par des enzymes de restriction si la mutation en question introduit ou supprime un site de restriction, ou encore si le fragment intégré augmente la taille du vecteur. Une digestion de vérification est réalisée dans un volume réactionnel de 10 μ L contenant entre 100 et 200ng d'ADN, l'enzyme ou les enzymes de restriction choisies (New England Biolabs, 20 unités) ainsi que leur tampon spécifique dilué au 1X selon le protocole du fournisseur. Le mix réactionnel est laissé entre 1 heure et 3 heures à 37°C, température optimale de la plupart des enzymes de restrictions. Lors de la digestion DpnI, les fragments sont laissés plus longtemps, entre 1 heure et 8 heures pour dégrader un maximum de vecteurs parentaux. Généralement les enzymes nommées HF (pour High Fidelity en anglais) peuvent couper l'intégralité des sites de restriction en 15 minutes, mais pour plus de précautions les vecteurs sont toujours laissés au minimum 1 heure à 37°C.

III.1.h Clonage par ligation

Pendant cette thèse, certains vecteurs ont été réalisés par clonage, pour par exemple remplacer une protéine de fluorescence par une autre, ou inverser une séquence de localisation cellulaire avec une autre. Dans ce cas, une quantité de vecteur donnée (1000 ng de vecteur pour 2000 ng d'insert) peut être digérée par un couple d'enzymes de restrictions dans un volume réactionnel de 20 μ L contenant, comme précédemment, 20 unités de chaque enzyme ainsi que le tampon adéquat. Si un fragment de PCR est inséré dans un vecteur, la totalité du produit purifié sur gel peut être digérée pour avoir une quantité d'insert suffisante. Les ADN sont placés à l'étuve entre 2 et 3 heures à 37°C avant dépôt sur gel d'agarose à 1% et récupération des fragments comme dans le cas des techniques de PCR. Après purification des produits de digestion, un dépôt de vérification sur gel de l'insert et du vecteur peut être réalisé afin d'estimer la quantité d'insert à déposer par rapport à la quantité de vecteur dans le mix réactionnel de ligation. L'insert est toujours ajouté en excès. Les ADN digérés sont ligués dans un milieu réactionnel de 10 μ L contenant du tampon 30 mM Tris-HCl à pH 7.8, 10 mM de MgCl₂, 1 mM d'ATP, 10 mM de DTT ainsi que 1.5 unités de T4 DNA ligase (Promega). La réaction a lieu entre 15 minutes et 1 heure à 37°C, afin d'optimiser au maximum les chances de réussite de ligation. Un aliquot de ligation peut être prélevé et déposé sur gel afin de vérifier, avant transformation dans les bactéries, que la ligation s'est produite. Le produit de ligation est transformé dans les bactéries compétentes en fin de journée et pourra être criblé par PCR le lendemain comme développé précédemment.

III.1.i Dosage des acides nucléiques

L'ADN extrait et purifié est ensuite dosé à l'aide d'un appareil NanoDrop 1000 (ThermoScientific™). Une goutte de l'échantillon (environ 1.5 µL) est déposée directement sur le piédestal de l'appareil et la mesure s'effectue via un logiciel inclus avec le NanoDrop. Après quelques secondes de mesure, la concentration en acides nucléiques est affichée en ng/µL et la pureté de l'ADN est validée par le rapport de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm. L'échantillon est dit non contaminé par les ARN ou les protéines si la valeur du rapport est comprise entre 1.8 et 2.0.

III.1.j Vérification des plasmides par séquençage

Les plasmides sont séquencés par la société Genoscreen localisée sur le campus de l'Institut Pasteur de Lille. Les prestations de séquençage sont réalisées sur ABI3730XL. Les procédés sont automatisés et les données analysées sur les logiciels Chromas, Finch & Bioedit.

III.1.k Logiciels utilisés

Les cartes des plasmides, la construction des amorces et l'alignement des séquences sont réalisés avec les logiciels SnapGene et DNASTRIDDER. Les conditions de PCR et de mutagenèse sont déterminées à l'aide du logiciel Oligo4 ou encore SnapGene. L'analyse des séquences provenant du résultat de séquençage est réalisée à l'aide du logiciel FinchTV.

III.1.l Liste des amorces utilisées

III.1.l.i Application CRISPR/Cas9

N°	Nom de l'amorce	Séquence
517	pspCAS9_Sens6	CCGGGGAGATCGTG TG
516	pspCAS9_Sens5	CCATATCGTGCC TCAG
515	pspCAS9_Sens4	CTTCCTGGACAATGAG
514	pspCAS9_Sens3	CTACAAGTTCATCAAG
513	pspCAS9_Sens2	GCGGCTGATCTATCTG
512	pspCAS9_Sens1	CTTCTCCTCCGGGCTG
504	MutaBsrGI-HypaCas9-sens	CGAGTATTTTACAGTCTACAACGAACTCACGAAAAG
481	hypaCAS9-Seq_Sens4	GTGTATGGTGATTACAAAAG
480	hypaCAS9-Seq_Sens3	CCGGAAAAACATTGTAATCG
479	hypaCAS9-Seq_Sens2	GACAAGAATTTACCGAACG
478	hypaCAS9-Seq_Sens1	TAACTTATAGCGCTCTCAC
476	hU6prom_Sens	GGCCTATTTCCCATGATTCCCTTC
471	hypaCas9-HpaI_AS	CAGACTTCTCTGCCCTCTCCACTGCCGTTAACCTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCG
470	AgeI-hypaCas9_Sens	CAGGTTGGACCGGTGCCACCATGGATAAAAAAGTATTCTATTGGTTTAG
434	72834-Seq+Crib_Sens	CAACTCCGCCCATTTGACGC
433	72834-Seq+Crib_AS	CCACAAC TAGAATGCAGTG
348	72834 mutNhe1AAVS1_Sens	CTAGTCTGTGCTCGCTCTTCCAGCC
347	72834 Nhe1 mutEco47III_AS	CATGGTGGCAGGGCTAGCGGATCTG
346	72834 Xho1 mutHpa1_Sens	GAATGCAATTGTTCTCGAGAACTTGTFTTATTGC
345	72834_AS	CCCTTCCCGGCCGCTGCTCTCG

III.1.1.ii Application virus ZIKA

N°	Nom de l'amorce	Séquence
505	T2A-Apal-AS	CCTTGCTGACGGGCCAGGATTCTCCTCG
503	Zika-AS2	GGGCACGTCATAGGGGTAAGCGCTGGCCTCTCCGAGAGTCTCTCCTGTGCCGCCCCCCC
502	Zika-AS1	TGTGCCGCCCCCTCCTCTTACCAGTCCAGCGTTTCTAGTAGCACCGGTCAGTTTGC
501	IRES-p450-Sens	CTTTGAAAAACAGATGATAATCTGGCCACAACCATGGATC CTGTC
500	Agel-p450-Sens	CACCGGTCAGTTTGCTCCTCCATAGCTCTGTTTCCACAGGCTCAGCAGCAGCAGGCAG
499	NheI-Kozak-p450-Sens	CGCTAGCCACCATGGATCCTGTCTGCTGCTGGGACTGTGCCCTGAGCTGCCCTGCTGCTG
468	ZNS2-T2A_AS	CACACTCTTTCCCGTCATTGGGCCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCATGTTAGCAGAC
467	ZNS3-T2A_Sens	GAGGAGACTCCGGTTGAGGGAAAGTGGAGAGGGGAGGGGAAAGTCTGCTAACATGCCGGTG
466	RRRR-SAGLA_AS	CCTGTGAGCGCTGGCGAGACCGGCAGACCTCCTCCTCCTCATCCTCGTCCCTCGTCC
465	RRRR-SAGLA_Sens	GGACGAGGACGAGGATGAGAGGAGGAGGAGGTCTGCCGGTCTCGCCAGCGCTCACAGG
464	VKKR-SAGLA_AS	CCTGTGAGCGCTGGCGAGACCGGCAGACCTCTTCTTACCCTCATCCTCGTCCCTCGTCC
463	VKKR-SAGLA_Sens	GGACGAGGACGAGGATGAGGTGAAGAAGAGGTCTGCCGGTCTCGCCAGCGCTCACAGG
474	T2A_Sens	GAGGAAGTCTGCTAACATGCG
462	Crib-zikaN-S3_sens	GTGGCACGTCACGAAAGGAG
461	zNS3-hpa1_AS	GGCCTAGTTAACTCACTCAACCGGAGTCTCC
459	zNS2-Xho1_AS	GCAATAAACAAAGTTCTCGAGTTACTCACGCATAGGTGGTC
458	IRES-zNS2_Sens_	GATAATCTGGCCACAACCATGACGGGAAAGAGTGTG

III.1.1.iii Application Caspase3

N°	Nom de l'amorce	Séquence
451	Del11-Scasp3-R8Full_AS1	CGTCGTACAGGTTCTCGGTGCCGAACCTCGGATCCTCCGGAGCCAGCGGCGGTCAGGAAC
450	Del11-Scasp3-R8Full_AS2	CGTACACCTTGCTTGTTCATGCTTCCGCCGCTGCCGTCCACTTCGTCTGTACAGGTTCTC
449	NLS3-SCasp3-IPS1_Sens1	CCGAGAACCTGTACGACGAAGTGGACGGCTCCGGAGGATCTGCTAGCGCTCACAGGCC
448	NLS3-SCasp3-IPS1_Sens2	GAAAGGTGACCGGTGCCGGCAGCGGAGGATCTGAGTTTGAACCGAGAACCTGTACGAC
436	SondesCaspBRET_AS1_new	CCTCGTCTGTACAGGTTCTCGGTGCCGAACCTCCTTGTACAGCTCGTTTCATGCCCTC
435	SondesCaspBRET_AS2_new	CGTACACCTTGCTTGTTCATGCTTCCGCCGCTGCCGTCCACTTCGTCTGTACAGGTTCTC
431	MutaTEVHpa1Xho1AS	CCCTCTAGACTCGAGTTCTTCTTGGTTAACCTAGGTCTGGAAGTTG
430	MutaTEVHpa1Xho1Sens_	CAACTTCCAGACCTAGGTTAACCAAGAAGAACTCGAGTCTAGAGGG
429	MutaTEVNLS3sPARP_AS	GTGAGGGCCTGTGAGCGCTGGCCACCTCGTCCACGCCGTCCACCTCGTCCGCTTCCCTC
428	MutaTEVNLS3sPARP_Sens	AAGAGAAAGGTGACCGGTGCTGTGAAGAGCGAGGGCAAGAGGAAGGGCGACGAGGTGG
427	MutaTEVNLS3Caspase_AS	GTGAGGGCCTGTGAGCGCTGGCGCTTCCGCCGCTGCCGTCCACCTCGTCTGTACAGGTTT
426	MutaTEVNLS3CaspaseSens	AAGAGAAAGGTGACCGGTGCTAAGGAGTTCCGGCACCGAGAACCTGTACGACGAGGTGG
425	MutaBRETcaspase3_AS	CGTACACCTTGCTTGTTCATGCTTCCGCCGCTGCCGTCCACTTCGTCTGTACAGGTTCTC
424	MutaBRETcaspase3_Sens	GGAGTTCTTGACCGCCGCTGAGTTCCGGCACCGAGAACCTGTACGACGAGGTGGACGGC
423	TEVCnoHpa1sTEV_AS	CCCTTGGAAATAAAGATTCTCAGCATTAACGTTTCATCAGCTGGGTGGCCCTC
182	PCR2_DEVG_AS	GAGCGCTGGCTTTCATCCACTCCTCCACCTCATCGCTTTTCTC
181	PCR2_DEVD_AS	GAGCGCTGGCTTTCATCCACTCCATCCACCTCATCGCTTTTCTC
180	PCR1_DEVD+G_AS	CATCGCTTTTCTCTTTTCTTCACTCTTGACTCCAGCACCGGTCACCTTTT
349	DEVDx2 R8full_sens	CGAGCTGTACAAGGGGAGCCGACGAGGTGGACGCCGACGAGGTGGACATGACAAGCAAGG
343	SondeDEVDx2_Sens1	GAGGCCACCCAGCTGATGAACGGAGGAGCGCTGAGAACTTTTATTTT
342	SondeDEVDx2_AS1	CCCGCATCCACCTCGTTCAGCATCCACCTCGTTCAGCAGAGCCACCGGTCACCTTTTCTC
341	SondeDEVDx2_AS2	GGTGAGGGCCTGTGAGCGCTGCCGCCCGCATCCACCTCGTTCAGC

III.1.1.iv Application TEV / Split-TEV

N°	Nom de l'amorce	Séquence
507	NLS3-STOP-Xho1_AS	CAATAAACAAAGTTCTCGAGTACACCTTTCTCTTTTCTTTT
498	Lyn-NheI-HA-AS	CACGTCATAGGGGTAGGCTAGCAGGGCTCCGGCAGAGTCC
497	Kozak-Lyn-Sens	CTATAGGGAGACCTGCCACCATGGGCTGCATCAAG
496	pcDNA3-NheI-Kozak-HA-Sens	CGACTCACTATAGAGAGACCCAAGCTCGCTAGCCACCATGGTGTACCCCTATGACGTGC
494	EcoR1-Nhe1_Sens	GGGTCTGAATTCTGCTAGCGAACGCTGACGTCATCAACC
488	pcDNA3-BamH1_Sens	CTCACTAGGATCCGACCCAAGCTAGCATGG
469	FinNLS4-IPS1Sens	CCTAAAAAGAAACGGAAGGTTGCTCACAGGCCCTCACC

III Partie expérimentale

457	finTEVN-IPS1_sens	GCCTCGTGACCACCAACTTCCAGACCGCTCACAGGCCCTCACCT
455	Flag-IPS1_Sens	GACTACAAGGATGACGATGACAAAGCTCACAGGCCCTCAC
454	NLS4-V5-TEVN_Sens	CTAAAAAGAAACGGAAGGTTGCCGGCAAGCCTATTCCTAATCCTCTCCTCGGACTGGAC
453	Flag-V5-TEVN_Sens	CAAGGATGACGATGACAAAGCCGGCAAGCCTATTCCTAATCCTCTCCTCGGACTGGAC
452	TEVN-Xho1_ASnew	GCGGGCCCTCTAGACTCGAGCTAGGTCTGGAAGTTGGTGGTCAC
419	ATGV5TEVNSens	GCAGCTAGCATGGGCAAGCCTATTCCTAATCC
418	FlagsTEVV5TEVN	GGACTATAAGGATGATGACGACAAGTCAGCAGAGAATTTGTATTTTCAAGG
417	sTEVV5TEVNSens	GCAGAGAATTTGTATTTTCAAGGAGCTATGGGCAAGCCTATTCCTAATCC
410	CribTEVN bis_Sens	GAAGCTTCGCTGGAGAAAAG
409	TEVN bis BamH1_AS	CCGGATCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCAGCTGTCTGGAAGTTGGTGGTCACGAG
408	TEVnbis HindIII_Sens	GGAAGCTTCGCTGGAGAAAAGCCTGTTCAAGGGCCCCCGCG
407	CribTEVC bis_AS	ATCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCGGCA
406	TEVC bis BamH1_AS	TAGGATCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCGGCATTCATCAGCTGGGTGGCCTC
405	TEVCbis HindIII_Sens	GGAAGCTTCGCTAAGAGCATGAGCAGCATGGTGAG
398	TEVCELYSVQStop Xho1_AS	CATGCTCGAGTCACTGGCTGTACACGAGTTCGTTTCATCAGCTGGGTGGC
394	CribTEVC bis_AS	CTGACCATAGAAGACATAGATTTAGC
393	TEVcELVYSQbisHind3_Sens	GGAAGCTTTGCTAAATCTATGTCTTCTATGGTCAGCGACACCTCCTGCACCTTCCCCAG
392	TEVC bis QLMN Hind3_AS	CCAAGCTTGAGTTCATCAACTGGGTGGCCTCC
391	Hind3 TEVcELVYSQ bis_AS	TGAAGCTTGACTGGCTGTACACGAGTTCGTTTCATCAGCTGGGTGGC
390	Hind3 TEVN Bis_Sens	GGAAGCTTCGCTGGAGAGAGCCTGTTTAAGGGACCAAGAGACTACAACCCCATCAGCAG
389	TEVN Bis Hind3_AS	CGAAGCTTGTCTGGAAGTTGGTGGTCAC
388	TEVN bis_AS	GGTCCCTTAAACAGGCTCTCTC
376	sTEV(GGGGS)1sTEV-BamH1_AS	GGATCCTCCGCCACCCTGGAAGTAGAGGTTCTC
375	Hind3 (GGGGS)2_Sens	AAGCTTCGCTGGGGGAGGAGGCTCTGGAGGCGGCGGCAGTGAGAACCCTCTACTTCCAG
374	sTEV (GGGGS)2 sTEV BamH1_AS	GGATCCGCCTCCACCCTGCTCCCTCCGCCACCCTGGAAGTAGAGGTTCTC
373	Hind3 (GGGGS)1_Sens	AAGCTTTGCTGGGGGCGGGGGCTCTGAGAACCTCTACTTCCAG
372	Nhe1 EcoR1ATGFKBP_Sens	GGAGCTAGCGAAATGGCAGTGCAGGTGGAAACCATCTC
371	Nhe1 EcoR1 ATG FRB_Sens	GCTAGCGAATTCGCAATGCTCTGGCATGAGATGTG
370	HindIII sTEV BamH1V5_Sens	GCCAAGCTTCGCTGAGAACCTCTACTTCCAGGGATCCGGCAAGCCTATTCC
369	BamH1 HA TEVC_Sens	GCGGATCCTACCCCTATGACGTGCCCGACTACGCCGCCAAGAGCATGAGCAGCATG
368	V5 R8_Sens	CTCCTCGGACTGGACAGCACTGCCACAAGCAAGGTGTAC
367	R8 Stop Xho1 pcDNA3_AS	CTCTAGATGCATGCTCGAGTTACTGTTCGTTCTTTCAGC
366	YPET Stop Xho1pcDNA3_AS	CCTCTAGATGCATGCTCGAGTCACTTGTACAGCTCGTTTCATG
365	finHA YPet_Sens	GACGTGCCCGACTACGCTGCAATCGTGAGCAAGGGCCGAG
363	V5 TEVN Sens_1	CCTCTCCTCGGACTGGACAGCACCCGCCGGCGAGTCCCTGTTCAAAG
362	BamH1 V5 TEVN Sens_2	GCTGGATCCGGCAAGCCTATTCCTAATCCTCTCCTCGGACTGGACAG
361	TEVN Stop Xho1_AS	CATGCTCGAGCTAGGTCTGGAAGTTGGTGG
360	Lyn Nhe1 EcoR1 Ypet_Sens1	GAAGGACTCTGCCGGAGCTAGCGAATTCGCAGTGAGCAAGGGAGAGGAGCTGTTTC
359	pcDNA3 LynSens2	ATAGGGAGACCTAAGCTGATGGGCTGCATCAAGAGCAAAGGGGAAGGACTCTGCCGGAGC
358	hFKBP Nest_Sens	GTCGCTGTTGGTCCACGCCGCCCG
357	hFKBP Nest_AS	CTCTCTGCTACCCATCAAACGCTG
356	Nhe1 EcoR1 FKBP_Sens	GGAGCTAGCGAATTCGCAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCC
355	FKBP HindIII_AS	GCCAAGCTTCCCTTCCAGTTTTTAGAAG
354	Nest FRB_Sens	CCAACAAGATTCTGAAGAACATGT
353	Nest FRB_AS	GCTGCCCATAAAGTGTCAATTTCCGGGG
352	Nhe1 EcoR1 FRB_Sens	GCTAGCGAATTCGCAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATG
351	FRB HindIII_AS	GCCAAGCTTCCCTGAGATTCGTCGGAAACATGATAATAG
325	NLS3 Flag_AS1	CATCCTTATAGTCTTCTCACCTTTTCGCGGATCCTTGGACTTTTC
324	Flag xho1_AS	GCATGCTCGAGTCACTTGTGTCATCATCCTTATAGTCTCTC
323	NLS4 crib_AS	TTAACCTTCCGTTTTCTTTTTTA
305	R8NLS4_Sens1	GGAGAGAGTGCTGAAGAACGAAACAGGCCGACCCCAAGAAAAACGCAAAG
304	NLS4Flag_AS1	CATCATCCTTATAGTCTTCTCACCTTTTTAACCTTCCGTTTTCTTTTTAG
303	R8NLS4_Sens2	GGGCAAGTACATCAAGAGCTTTCGTTGGAGAGAGTGCTGAAG
302	NLS4Flag_AS2	GAACAGGCTCTCTCGAGTCACTTGTGTCATCATCCTTATAGTCTCTC
270	ENLYFOGGSKV_Sens	GAGAACCTCTACTTCCAGGGCGGCAGCAAGGTGTACGACCCCG
200	Del_MNELYK_AS	GGAAGTAGAGGTTCTCAGCTCCTTCAGTGATCCCCGGC

III Partie expérimentale

199	Del_ELYK_AS	GAAGTAGAGGTTCTCAGCGTTCATGCCCTCAGTGATCC
198	R8FlagStopXho1_AS	CGTTTTTTCTTGGGGTCTCGAGTCACTTGTTCATCGTCATCC
193	MutaTEV_H46A_Sens	ATCACCAACAAGGCCCTGTTCCGC
192	CribmutSTEV2_AS	CTTCTTTTTTAGGATCTGCGGG
191	CribmutSTEV1_Sens	CAGAGAATTTGTATTTTCAACCC
190	R8New_AS	CTTGCTGGGCAGGACGGTC
189	ENLYFQStopXho1_AS	CGTACACCTTGCCTCGAGCTCACTGGAAGTAGAGGTTTC
184	TEVC_sTEV_mutG>P_S	GAGAATCTTTATTTTCAACCCGAGATCCTAAAAAG
183	sTEV_TEVN_mutG>P_S	GAGAATTTGTATTTTCAACCCGCTGGATCCGCCG
171	TEVCXho1_AS	TGCTCGAGCTAGTGCAGACGCCGCC
170	MscITEVC_Sens	CGTGGCCACAACCATGTACCCCTATGACG
155	NLS4sTEVAS	CCAGCTCCTTGAAAATACAAATTTCTCTGCCTTGGGGTCAACCTTCCGTTTCTTTTTTAGG
150	TEVChpa1_AS	GGGTTAACGTTTCATCAGCTGGG
149	BamH1TEVC_Sens	CCGGATCCAAGAGCATGAG
146	NLS3sTEV AS	CAGGGGATCCAGCTCCTTGAAAATACAAATTTCTCTGCCTTTCCTTTTTTTTCTTAGGGTC
145	sTEVBamH1hpa1STOP_AS	GGTCTCGAGGCCTCTAGTTAACAGGGGATCCAGCTC
138	BamH1TEVN_Sens	GTGGATCCGCCGGAGAGAGCCTGTTCAAAGG
137	TEVNBamH1_sens	CGTGCCCGACTATGCTGGATCCGCCGCGAGAGC
136	hpa1sTEV_AS	CTTTTTTAGGATCTGCCCTTGAAAATAAAGATTTCTCAGCGTTAACGGTCTGGAAGTTGG
129	R8crib_Sens	CTACCTGAGAGCCAGCGACG
128	R8Flag_Sens	CTGAAGAACGAGCAAGCCGACTACAAGGATGACGATG
127	NLS4Stu1Xho1_AS	CTCGAGGCCTCTAAACCTTCCGTTTCTTTTTTAGGATCGACTTTTTCTTTTTTTTCTTAGGG
126	NewSplitTEV_Sens	GACCACCAACTTCCAGACCGTTAACGCCGACGAGGACGAGGACGAGGACG
125	NewSplitTEV_AS	CTGCTCATGCTCTTCATGCTAGCAGCGCTGGCGAGGTGTGAGGCGCACTCTTC
124	AllTEV_Sens	GCGAGAGCCTGTTCAAAGG
123	FlagNLS3_Sens	GACTACAAGGATGACGATGACAAGGCCGACCCCAAGAAAAAACG
122	NLS3Stu1Xho1_AS	CTCGAGGCCTCTAGACTTTCCCTTTTTTTTCTTAGG
121	MutASplitTEV_sens	GGTGGACCCCAAAAAGAAGAGAAAAGGTGGTTAACGCCGACGAGGACGAGG
120	MutASplitTEV_AS	CTGGAGCCACAGAGCCCAGGTGACATGCTAGCAGCGCTGGCGAGGTGTG
119	mutaHAecoR1TEVsens	GTACCCCTATGACGTGCCCGACTACGCCGAATTCGGCGAGAGCCTGTTTC
118	TEVN_AS	CTGGGGCTCGCGGAACCTTCAGCTTC
115	TEV_C151A_sens	CCAAGGACGGACAGGCCGGCAGCCCCCTGG
114	All_TEV_AS	CATCAGCTGGGTGGCCCTCC
113	TEV_D81N_Sens	CGACGGCCGCAACATGATCATCATCC
109	YPETStopnoBsrG1Xho1_AS	CTCGAGGCCTCACTTATACAGCTCGTTTCATGCC
108	FlagBsrG1noStopXho1_AS	TGTACAGCTTGTTCATCGTTCATCCTTGTAGTC
107	Bamh1Rluc8Sens	GGATCCAATCACAAAGCAAGGTG
106	Rluc8StopStu1Xho1_AS	CTCTCGAGGCCTGCTCGTTTCTTCAGCACTCTCTCC
105	PCR1_YesR8	CAAGTACAGGCCAGCAATCACAAAGCAAGGTGTAC
104	NLS3bisStopXho1_AS	CTCGAGTCACACCTTTTCTCTTC
103	TEVStop_Xho1_AS	CTCGAGTCAGTTTCATCAGCTGGG
101	Nhe1HATEV_sens	GCTAGCATGTACCCCTATGACGTGC
96	SiteTEVNLS3_Sens_(Ter)	GCTGTACAAGCCCGCCGAGAACCCTGTACTTCCAGTCCGCTCCTGACCCCAAGAAAAAAC
95	NLS3Stop_BamH1AS	GGATCCTAGACTTTCCCTTTTTTTTTC

III.1.1.v Introduction de la séquence IRES

N°	Nom de l'amorce	Séquence
185	IRESv21_AS (0%)	GGGTACAAGGTTGTGGCCAAATTATCATCTGTTTTTTC
179	NS3/4_S139A_AS	CGGCCCCCAGCGGACCCCTTCAAG
178	NS3/4_S139A_S	CTTCCCTCGGAACAACCATCTC
177	IRESv12_AS (15%)	CAGGGTTGTGGCCAGATTATCAGCTGTTTTTCAAAGG
176	IRESv10_AS (30%)	GGCCACATTATCACCTGTTTTTCAAAGG
175	IRESv5_AS (45%)	GGCCAGATTATCATCTGTTTTTCAAAGG
174	IRESv4_AS (67%)	CACGGTTGTGGCCATATTATCACCTGTTTTTCAAAGG
173	IRESv3_AS (80%)	CACGGTTGTGGCCATATTATC
172	IRESv1_AS (90%)	CATATTATCACCTGTTTTTCAAAGG

III Partie expérimentale

169	IRES_mutG_Sens	GCGTTTGTCTATATGTGATTTTCCACC
168	IRES_mut7A_AS	GGGGCCTAGACGTTTTTTTAACCTCGAC
167	IRES_Sens	CCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG
166	IRESmin_to_pref_Xho1_AS	CTCGAGCATGGTTGTGGCCA
165	IRESmin_Xho1_AS	CCTCGAGGGGTGGCCATATTATCATCGTG
164	IRESmin_hpa1_Sens	GCGTTAACTAGTTGACGAGCATTCCTAGG
163	IRES_xho1_AS	AACTCGAGCATGGTTGTGGCCATATTATCATC
162	IRES_hpa1_Sens	CAGTTAACTAGGCCCCCCCTAACGTTACTGG
161	Rluc8_Mut_Mscl_AS	CTCGATGTCGGGCCACTCGTC
160	Rluc8_Mut_Mscl_Sens	GAGCCCGTGGCAAGGTGCATC

III.1.i.vi tdTomato

N°	Nom de l'amorce	Séquence
506	Apal-tdTomato-Sens	GGAGAATCCTGGGCCCGTCAGCAAAGGAGAGGAGGTCATC
475	Crib-tdTomato_AS	CCTTGTAGATCAGCGTGCC
473	tdTomatoEGFP_AS	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
472	tdTomatoEGFP_Sens	GTGAGCAAGGGCGAGGAG

III.1.i.vii Constructions délétées YPet ; mVenus ; Rluc8 et amorces diverses

N°	Nom de l'amorce	Séquence
495	Nhel-Kozak-Ypet-sens	GGAGACCCAAGCTGGCTAGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
422	R8Del6_AS	TTCTCTGCTCGGGGTGCGCTTGGAAAGTAG
421	R8Del5_AS	CCTCTGCTCGGGGTGCTAGCCTTGGAAAGTAG
420	R8Del4AS	CTCGGGGTGCTACACGCCCTTGGAAAGTAG
404	mVenus FV_Sens	CACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTG
403	mVenus FV BsrG1_AS	CCTTGTACAGCTCGTCCATTCACAGAGTGATCCCGGCGCGGTACGAACTCCAGCAGG
402	mVenus/Ypet Age1_Sens	GGACCGGTGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
377	mVenus AAGITL STEV_AS	GCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCGAGAGTGATCCCGGCGGC
364	mVenus/YPet_Sens OK	CGTGTCCGGCGAGGGCGAGG
350	mVenus KS_Sens	CCAGTCCAAACTGAGCAAAG
322	YPet Del9	GAAGTAGAGGTTCTCGATCCCAGCGGCGGTC
321	YPet Del7	GAAGTAGAGGTTCTCCTCAGTGATCCCGGC
320	YPet Del8	GAAGTAGAGGTTCTCAGTGATCCCGGCGGC
319	YPet Del10	GAAGTAGAGGTTCTCCCAGCGGCGGTCAG
318	YPet Del11	GAAGTAGAGGTTCTCAGCGGCGGTCAGGAAC
317	YPet Del12	GAAGTAGAGGTTCTCGGCGGTCAGGAACTC
316	YPet Del13	GAAGTAGAGGTTCTCGGTCAGGAACTCCAG
315	YPet Del14	GAAGTAGAGGTTCTCCAGGAACTCCAGCAG
314	mVenus/YPet_Sens	CTGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
313	mVenus DELYK_AS	GCTCGTCCATTCCCAGAGTGATCCCGGCGG
312	mVenus FV_AS	CACGAACTCCAGCAGGACCATGTG
311	R8Full_Sens	GAACGAGCTGTACAAGGAGAACCTCTACTTCCAGGGCATGACAAGCAAGGTG
310	R8Del1_Sens	CTACTTCCAGGGCACAAGCAAGGTGTACG
309	R8Del5_Sens	CTACTTCCAAGGCTACGACCCCGAGCAGAGG
308	R8Del6_Sens	CTACTTCCAAGGCGACCCCGAGCAGAGGAAG
307	R8Del7_Sens	CTACTTCCAAGGCCCCGAGCAGAGGAA
306	R8Del11_Sens	CTACTTCCAAGGCAAGAGGATGATCACCCG
301	R8S257GAS	CCGGGGTGCCTTCGATGAACAGC
300	R8Del2_Sens	CTACTTCCAGGGCAGCAAGGTGTACGA
299	R8Del3_Sens	CTACTTCCAGGGCAAGGTGTACGACC
298	R8Del4_Sens	CTACTTCCAAGGCGTGTACGACCCCGAG
293	AAGITEENLYFOG_AS	GCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCCTCAGTGATCCCGGCGGC
292	AAGITEGGSsTEV_AS	GCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCAGATCCCCCAGAGTGATCCCGGCGGC
291	AAGENLYFOG_AS	CTGGAAGTAGAGGTTCTCCCAGGCGGCGGTCAGGAACTCC
290	AAGIENLYFOG_AS	CTGGAAGTAGAGGTTCTCAATCCCGGCGGCGGTCAGGAACTCC

III Partie expérimentale

274	mVenusA_Sens	GGCTACGGACTGCAGTGCTTCGCCGCTAC
273	mVenusA_AS	GTTGGGGTCTTTGCTCAGTTTGGACTGGTAGCTCAGGTAGTGG
272	mVenusStev_AS	GTAGAGGTTCCTCGGCCCTGTACAGCTCGT
271	mVenusC_Sens	CTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCACCGGC
229	Ypet_Sens9	GGATCACTGAGGGCATGAACGAGCTG
228	Ypet_Sens8	CTGGAGTTCCTGACCGCCGC
226	Ypet_Sens6	GGACGGCGGCGTGCAGCTCG
225	Ypet_Sens5	CATCAAGGCCAACTTCAAGATCC
224	Ypet_Sens4	CTATATCACCGCCGACAAGC
223	Ypet_Sens3	CCACATGAAGCAGCAGACTTC
222	Ypet_Sens2	GACCACCCTGGGCTACGGCG
197	YPETAS_new	GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTG
135	NES4YPETsens1	GGACTGGACATTGGCTCCCCATCACCAGTTCGAG
134	YPET_AS	GAAGAAGATGGTGCCTCC
130	YPET AS	CTTCGGGCATGGCGGACTTG
100	YPET_Stu1_Xho1_AS	CTCGAGGCCCTCACTTGTACAGCTCGTTCATGC
99	YPET_BamH1_sens	GGATCCAATCGTGAGCAAGGGCG
94	YPETstopBamH1AS	GGATCCTCACTTGTACAGCTCG
93	Nhe1NESYPETsens	GCTAGCATGCTGGACCTGGCTTCTCTGATCCTGGCTGTGAGCAAGGGCG

III.1.i.viii Amorges diverses

N°	Nom de l'amorce	Séquence
486	T7bis	AGAGAACCCACTGCTTACTG
485	SP6bis	GGGGAGGGGCAAACAACAGATG
132	Trip_AS	GCTACTTGTGATTGCTCCATG
131	Trip_Sens	CGACTCACTATAGGGAGACCC
209	M13ccSens	CACACAGGAAACAGCTATGAC
208	M13ccAS	GACGCTGTAAAACGACGGCCAG

III.1.m Liste des constructions plasmidiques réalisées

N°	Construction
312	pcDNA3-HA-TEV-NLS3
313	pcDNA3-HA-TEV
314	pcDNA3-HA-TEV-IPS1
315	pcDNA3-HA-TEV-NLS3-sHCV-IPS1
316	pcDNA3-HA-TEVN-NLS3-sHCV-IPS1
317	pcDNA3-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
318	pcDNA3-HA-TEVN-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
319	pcDNA3-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
320	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4
321	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS3
322	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4
323	pTRIP-NES1-Ypet-sTEV-NLS3-R8Flag
324	pTRIP-NES1-Ypet-sTEV-NLS3-NoStop
325	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS3-sTEV-TEVN
326	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS3-sTEV-TEVC
327	pTRIP-NES1-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4
328	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVC
329	pTRIP-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4
330	pTRIP-NES3-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN
331	pTRIP-NES1-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVC
332	pTRIP-NES1-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN
333	pTRIP-NES4-Ypet-sTEV-R8Flag-NLS4
334	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESwt(100%)-
335	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESwt(100%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
336	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(90%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1

III Partie expérimentale

337	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(80%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
338	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(67%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
339	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(45%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
340	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(30%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sH CV-IPS1
341	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(15%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
342	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRESv1(0%)-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
343	pTRIP-NES3-YPET-sTEV-R8Flag
344	pcDNA3-HA-TEV*C151A
345	pcDNA3-HA-TEV*D81N+*C151A
346	pcDNA3-HA-TEV*C151A-NLS3
347	pcDNA3-HA-TEV*D81N+*C151A-NLS3
348	pcDNA3-HA-TEV*C151A-IPS1
349	pcDNA3-HA-TEV*D81N+*C151A-IPS1
350	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-*sTEV1-TEVN-IRESv1(45%)-HA-TEVC-sTEV2-NLS3-sHCV-IPS1
351	pTRIP-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV1-TEVN-IRESv1(45%)-HA-TEVC-*sTEV2-NLS3-sHCV-IPS1
352	pcDNA3-YPetFull-sTEV-R8Full-Flag
353	pcDNA3-Ypet-Del7-sTEV-R8Full-Flag
354	pcDNA3-Ypet-Del8-sTEV-R8Full-Flag
355	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-R8Full-Flag
356	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-R8Full-Flag
357	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-R8Full-Flag
358	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-R8Full-NLS4-Flag
359	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-R8Full-Flag
360	pcDNA3-Ypet-Del13-sTEV-R8Full-Flag
361	pcDNA3-Ypet-Del14-sTEV-R8Full-Flag
362	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del1-R8-Flag
363	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del2-R8-Flag
364	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del3-R8-Flag
365	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del4-R8-Flag
366	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del5-R8-Flag
367	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del6-R8-Flag
368	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del7-R8-Flag
369	pcDNA3-YPetFull-sTEV-Del11-R8-Flag
370	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del1-R8-Flag
371	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del2-R8-Flag
372	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del3-R8-Flag
373	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del4-R8-Flag
374	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del5-R8-Flag
375	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-Del6-R8-Flag
376	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del1-R8-Flag
377	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del2-R8-Flag
378	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del3-R8-Flag
379	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del4-R8-Flag
380	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del5-R8-Flag
381	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-Del6-R8-Flag
382	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del1-R8-Flag
383	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del2-R8-Flag
384	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del3-R8-Flag
385	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del4-R8-Flag
386	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del5-R8-Flag
387	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-Del6-R8-Flag
388	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del1-R8-Flag
389	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del2-R8-Flag
390	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del3-R8-Flag
391	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del4-R8-Flag
392	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del5-R8-Flag
393	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-Del6-R8-Flag
394	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Full-R8-Flag

III Partie expérimentale

395	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del1-R8-Flag
396	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del2-R8-Flag
397	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del3-R8-Flag
398	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del4-R8-Flag
399	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del5-R8-Flag
400	pcDNA3-Ypet-Del9-sTEV-GGS-Del6-R8-Flag
401	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Full-R8-Flag
402	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del1R8-Flag
403	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del2-R8-Flag
404	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del3-R8-Flag
405	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del4-R8-Flag
406	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del5-R8-Flag
407	pcDNA3-Ypet-Del10-sTEV-GGS-Del6-R8-Flag
408	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Full-R8-Flag
409	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del1-R8-Flag
410	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del2-R8-Flag
411	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del3-R8-Flag
412	pcDNA3-MVenusDel7-sTEV-R8-Full-Flag
413	pcDNA3-MVenusDel8-sTEV-R8-Full-Flag
414	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-R8-Full-Flag
415	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-R8-Full-Flag
416	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-R8-Full-Flag
417	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-R8-Full-Flag
418	pcDNA3-MVenusDel13-sTEV-R8-Full-Flag
419	pcDNA3-MVenusDel14-sTEV-R8-Full-Flag
420	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-R8Full-Flag
421	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del1-R8-Flag
422	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del2-R8-Flag
423	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del3-R8-Flag
424	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del4-R8-Flag
425	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del5-R8-Flag
426	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del6-R8-Flag
427	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del7-R8-Flag
428	pcDNA3-MVenusFull-sTEV-Del11-R8-Flag
429	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del1-R8-Flag
430	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del2-R8-Flag
431	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del3-R8-Flag
432	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del4-R8-Flag
433	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del5-R8-Flag
434	pcDNA3-MVenusDel9-sTEV-Del6-R8-Flag
435	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del1-R8-Flag
436	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del2-R8-Flag
437	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del3-R8-Flag
438	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del4-R8-Flag
439	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del5-R8-Flag
440	pcDNA3-MVenusDel10-sTEV-Del6-R8-Flag
441	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del1-R8-Flag
442	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del2-R8-Flag
443	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del3-R8-Flag
444	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del4-R8-Flag
445	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del5-R8-Flag
446	pcDNA3-MVenusDel11-sTEV-Del6-R8-Flag
447	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del1-R8-Flag
448	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del2-R8-Flag
449	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del3-R8-Flag
450	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del4-R8-Flag
451	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del5-R8-Flag
452	pcDNA3-MVenusDel12-sTEV-Del6-R8-Flag

III Partie expérimentale

453	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del4-R8-Flag
454	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del5-R8-Flag
455	pcDNA3-Ypet-Del11-sTEV-GGS-Del6-R8-Flag
456	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Full-R8-Flag
457	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Del1-R8-Flag
458	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Del2-R8-Flag
459	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Del3-R8-Flag
460	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Del4-R8-Flag
461	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGS-Del5-R8-Flag
462	pcDNA3-Ypet-Del12-sTEV-GGSDel6-R8-Flag
463	pcDNA3-ATG-FRB-sTEV-V5- <i>Rluc8</i>
464	pcDNA3-ATG-FRB-sTEV-HA-Ypet
465	pcDNA3-ATG-FRB-sTEV-HA-TEVC
466	pcDNA3-ATG-FRB-sTEV-V5-TEVN
467	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-V5- <i>Rluc8</i>
468	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-HA-Ypet
469	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-HA-TEVC
470	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-V5-TEVN
471	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)1-sTEV-V5-TEVN
472	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-(GGGGS)1-V5-TEVN
473	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)1-sTEV-(GGGGS)1-V5-TEVN
474	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)1-sTEV-TLGEPGTSPN-V5-TEVN
475	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)1-sTEV-LSDKPGNPV-V5-TEVN
476	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)1-sTEV-LPPGPGPFPV-V5-TEVN
477	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)2-sTEV-V5-TEVN
478	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-(GGGGS)2-V5-TEVN
479	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)2-sTEV-(GGGGS)2-V5-TEVN
480	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)3-sTEV-V5-TEVN
481	pcDNA3-Lyn-FRB-sTEV-(GGGGS)3-V5-TEVN
482	pcDNA3-Lyn-FRB-(GGGGS)3-sTEV-(GGGGS)3-V5-TEVN
483	pcDNA3-Lyn-FKBP-sTEV-V5- <i>Rluc8</i>
484	pcDNA3-Lyn-FKBP-sTEV-HA-Ypet
485	pcDNA3-Lyn-FKBP-sTEV-V5-TEVN
486	pcDNA3-Lyn-FKBP-sTEV-HA-TEVC
487	pcDNA-ATG-FKBP-sTEV-V5- <i>Rluc8</i>
488	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-HA-Ypet
489	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-V5-TEVN
490	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-HA-TEVC
491	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)1-sTEV-HA-TEVC
492	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-(GGGGS)1-HA-TEVC
493	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)1-sTEV-(GGGGS)1-HA-TEVC
494	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)1-sTEV-TLGEPGTSPN-HA-TEVC
495	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)1-sTEV-LSDKPGNPV-HA-TEVC
496	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)1-sTEV-LPPGPGPFPV-HA-TEVC
497	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)2-sTEV-HA-TEVC
498	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-(GGGGS)2-HA-TEVC
499	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)2-sTEV-(GGGGS)2-HA-TEVC
500	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)3-sTEV-HA-TEVC
501	pcDNA3-ATG-FKBP-sTEV-(GGGGS)3-HA-TEVC
502	pcDNA3-ATG-FKBP-(GGGGS)3-sTEV-(GGGGS)3-HA-TEVC
503	72834-YPetDel11-sTEV-R8-NLS4-Flag
504	72834-YPetDel11-sTEV-R8-Flag
505	72834-YPet
506	72834-YPet-NLS3
507	pcDNA3-CMV-YpetDel11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN
508	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-(+HpaI)-XhoI
509	pTrip-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES-HA-TEVC(Δ HpaI)-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
510	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1

III Partie expérimentale

511	pcDNA3- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
512	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
513	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES90%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
514	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES80%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
515	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES67%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
516	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
517	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES30%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
518	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES15%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
519	72834- Δ polylinker-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES0%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
520	pcDNA3-Ypet-sCaspBRET-R8-Flag
521	pTrip-NES1-Ypet Δ 11-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
522	pTrip-NES1-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
523	72834-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
524	72834-NES1-YPET-sTEV-R8Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
525	pTrip-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
526	pTrip-Ypet-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
527	pTrip-NES1-Ypet-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
528	pTrip-NES1-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
529	pTrip-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
530	pTrip-Ypet Δ 11-sTEV-R8-NLS4-Flag-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
531	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
532	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
533	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
534	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES90%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
535	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES80%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
536	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES67%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
537	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES30%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
538	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES15%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
539	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES0%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
540	pcDNA3-HA-TEVC
541	pcDNA3-HA-TEVC-NLS3
542	pcDNA3-HA-TEVC-IPS1
543	pcDNA3-Lyn-HA-TEV
544	pcDNA3-Lyn-HA-TEVC
545	pcDNA3-Lyn-HA-TEVC-NLS3
546	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
547	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES100%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
548	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES30%-HA-TEVC-sTEV-NLS3-sHCV-IPS1
549	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4
550	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-IPS1
551	pcDNA3-Lyn-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag
552	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-V5-TEVN
553	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-V5-TEVN
554	pcDNA3-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-V5-TEVN-IPS1
555	pcDNA3-Lyn-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-V5-TEVN
556	72834-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-NLS3-sZika(RRRR)-IPS1
557	pcDNA3-kozack-HA-TEVC
558	pcDNA3-kozack-HA-TEVC-NLS3
559	pcDNA3-kozack-HA-TEVC-IPS1
560	pcDNA3-kozack-Lyn-HA-TEVC
561	pcDNA3-kozack-p450-HA-TEVC
562	pcDNA3-kozack-HA-TEV
563	pcDNA3-kozack-HA-TEV-NLS3
564	pcDNA3-kozack-HA-TEV-IPS1
565	pcDNA3-kozack-Lyn-HA-TEV
567	72834-kozack-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-HA-TEVC-NLS3-sHCV-IPS1
568	72834-ZikaNS3-IRES-ZikaNS2
569	72834-ZikaNS3-T2A-ZikaNS2

570	72834-kozack-Ypet Δ 11-sTEV-R8-Flag-NLS4-sTEV-V5-TEVN-IRES45%-p450-sZika-HA-TEVC
599	pTG-NS3/4 protease du HCV
600	Addgene 72833 => AAVS1 T2 CRIPR in pX330 = U6gRNA[AAVS1-T2] + Cas9
601	Addgene 72834 => pMK232 (CMV-OsTIR1-PURO)=> vecteur Donneur site AAVS1 génome humain
602	Addgene 48138=>pSpCas9(BB)-2A-EGFP (PX458)
603	Addgene 101178 => BPK4410 - human expression plasmid for SpCas9 Cluster 1 (HypaCas9)
604	HypaCas9-2A-GFP (PX458)
605	48138-U6gRNA[AAVS1-T2] + HypaCas9-2A-EGFP (PX458)
606	48138-U6gRNA[AAVS1-T2]-HypaCas9-T2A-tdTomato (PX458)
607	Addgene bZIPRO (protease Zika de vecteur bactérien)

III.2 Culture cellulaire

III.2.a Entretien des lignées cellulaires HeLa et HEK

Les cellules HeLa (Henrietta Lacks) et HEK (Human Embryonic Kidney) sont utilisées en routine au laboratoire pour leur capacité à se transfecter facilement. Elles présentent une forme plus aplatie que certains types cellulaires comme les cellules HuH-7 (Human Hepatocytes), ce qui en fait de très bonnes candidates pour le développement de notre test. Ces cellules se cultivent en milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium), additionné de 10% de FBS (Foetal Bovine Serum), 2% L-Glutamine, 1% Pénicilline-Streptomycine. Elles se cultivent à 37°C en présence de 5% de CO₂. Après rinçage au PBS 1X (Phosphate Buffer Saline), l'addition de trypsine va permettre leur décollement par clivage des protéines d'attachement. Pour stopper la réaction, du milieu complet est ajouté après 3 minutes d'incubation à 37°C. Les cellules sont généralement diluées au 1/10^{ème} et 1/20^{ème} tous les 3 jours. La quantité de cellules est estimée après comptage en cellule de Malassez.

III.2.b Transfections transitoires

La transfection transitoire est un processus de transfert d'ADN dans les cellules eucaryotes. Classiquement, elle s'effectue par l'ouverture transitoire de pores dans les cellules et permet l'entrée de molécules extracellulaires comme les plasmides d'ADN. Pour permettre cette introduction d'ADN étranger dans la cellule, des agents polycationiques ou dendrimères de la famille des polyéthylènes (PEI) sont couramment utilisés pour lier l'ADN et le transporter dans la cellule. Le polycation se fixe aux phosphates négatifs de l'ADN et l'englobe entièrement, formant ainsi un complexe ADN-PEI chargé positivement. Celui-ci pourra se fixer aux polysaccharides de la membrane plasmique des cellules chargées négativement. Une fois fixé, le complexe est endocyté et adressé à l'endosome. Le polyéthylèneimine possède également des propriétés uniques d'éponge à protons, permettant la capture des protons des lysosomes cellulaires lors de la fusion avec l'endosome, inactivant ainsi les hydrolases cellulaires acides pouvant dégrader l'ADN. Ce complexe est ensuite transloqué au noyau des cellules où l'ADN pourra ensuite être exprimé.

Les transfections transitoires peuvent être réalisées en plaques 6, 12, 24, 96 ou 384 puits. Dans le cas des plaques 384 puits, les transfections sont réalisées à l'aide de la robotique (cf. **publication Echo I.2.B**). Pour une plaque 96 puits par exemple, les plaques sont préparées la veille de la transfection avec un ensemencement de 5000 à 6500 cellules/puits, en fonction du type cellulaire. Le lendemain, les différents plasmides à tester sont dilués à des concentrations d'intérêt généralement comprises entre 0 et 100 ng selon les expériences à mener, et sont répartis dans différents microtubes Eppendorf. Du chlorure de sodium (NaCl 150 mM) est ajouté à tous les tubes selon la quantité prescrite par le fournisseur (Polyplus). Les tubes sont vortexés pendant 10 secondes et un mix réactionnel de transfection constitué de jetPEI 1 mM (Polyplus) et de NaCl 150 mM est ajouté dans chaque tube, toujours selon le protocole du fournisseur pour une transfection avec le jetPEI, tous les réactifs de transfection ne répondant pas toujours au même protocole. Les tubes sont de nouveau vortexés pendant 10 secondes, laissés entre 15 et 25 minutes à température ambiante sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique). Le contenu des différents tubes est distribué dans les différents puits, chaque puits correspondant à une condition expérimentale différente. La plaque est agitée doucement pour permettre une répartition homogène sur les cellules avant d'être placée pendant 48 heures à 37°C à 5% en CO₂. Les expériences de BRET sont réalisées en plaques 96 puits blanches (Référence 655073 Greiner) et celles de fluorescence en plaques noires (Référence 655906 Greiner).

III.2.c Immunomarquage

Après la lecture à 24 ou 48 heures des plaques transfectées transitoirement, des expériences d'immunomarquage peuvent être réalisées si les constructions d'intérêt portent des tags ou des étiquettes de marquage spécifiques. Une étiquette HA a été placée à l'extrémité N-terminale de la protéase TEV ou de la partie TEV_C de la protéase pour la version Split-TEV. Un anticorps anti-HA (3F10) produit chez le rat (Sigma-Aldrich) a été utilisé comme anticorps primaire, et un anticorps secondaire de chèvre anti-rat (AlexaFluor 568 Goat anti-Rat IgG H+L) émettant dans le rouge a été utilisé dans les expériences liées à la protéase TEV. Une autre étiquette V5 a été placée à l'extrémité N-terminale de la protéase TEV_N. Celle-ci est reconnue par un anticorps primaire de lapin (Cell signaling) et un anticorps secondaire, produit chez le poulet et émettant dans le rouge lointain, permet la détection de cet anticorps (AlexaFluor 647 chicken anti-rabbit IgG H+L).

Dans un premier temps la plaque de cellules est retournée puis fixée au paraformaldéhyde à 3% pendant 20 minutes. Le Hoechst (Life technologies - 1 mg/mL), un marqueur de détection des noyaux, est utilisé pour permettre le dénombrement des cellules. Celui-ci est dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS 1X et est ajouté après fixation sur les cellules

pendant 15 minutes. Une solution de perméabilisation constituée de PBS 1X - 0.1% Triton X-100 est ensuite préparée et ajoutée pendant 5 minutes sur les cellules, permettant ainsi l'entrée des anticorps dans les compartiments cellulaires. Afin de limiter tout marquage non spécifique, une étape de saturation des sites non spécifiques est réalisée à l'aide de sérum de rat dilué à 10% pendant 15 minutes avant le dépôt de chaque anticorps primaire. L'anticorps primaire 3F10 de rat est dilué au 1/300^{ème} dans du sérum de rat à 10%, et laissé en incubation pendant 1 heure sur les cellules sous agitation légère, en atmosphère humide. L'anticorps secondaire anti-rat est dilué au 1/1000^{ème} et laissé comme l'anticorps primaire 1 heure en incubation sur les cellules. Si un double marquage HA / V5 est réalisé en parallèle, les mêmes procédures sont répétées. De plus, entre les différentes étapes, des rinçages au PBS 1X d'une durée de 5 minutes sont réalisés : ils permettent l'élimination complète des différentes solutions. Les puits sont finalement repris dans du PBS 1X, puis une lecture au microscope à fluorescence est faite. La plaque est stockée à l'abri de la lumière à 4°C.

III.2.d Transfections stables et génération de lignées (Système CRISPR/Cas9)

La technique utilisée pour la génération des lignées stables est identique à celle utilisée pour la transfection transitoire. Le plasmide d'intérêt ainsi que le plasmide ARN guide (ARNg) sont transfectés simultanément avec le jetPEI dans des plaques 6, 12, 24 ou 96 puits. La différence majeure va résider dans la sélection des clones. Après intégration de l'ADN d'intérêt à l'ADN génomique de la cellule, les clones exprimant le plasmide sont sélectionnés à l'aide d'un antibiotique. Ici, le plasmide d'intérêt exprime un gène de résistance à la puromycine (Life technologie). Après deux semaines de sélection par la puromycine à des doses allant de 0.25 à 6 µg/mL en cellules HEK et de 0.5 à 8 µg/mL en cellules HeLa, les premiers îlots de cellules positives apparaissent. Ceux-ci peuvent être récupérés et transférés dans des plaques plus grandes pour commencer l'amplification cellulaire. Les lignées cellulaires stables peuvent être cultivées avec du milieu conditionné, supplémenté de 20% de FBS. Le milieu conditionné est obtenu en filtrant stérilement (membrane Millipore 0.25 µM) du milieu complet déjà utilisé par les cellules. Ce milieu contient les éléments essentiels à la croissance des cellules, sécrétés par les cellules elles-mêmes. L'étape de filtration permet d'éliminer les débris cellulaires.

III.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPadPrism 7.00. Des tests ANOVA à une voie, correction de Dunette, ou deux à voies, correction de Bonferroni, ont été utilisés dans le cadre de nos expériences.

III.4 Techniques et modes de lecture

III.4.a BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

Pour mesurer le signal de BRET, les cellules transfectées en plaque 96 puits blanches depuis 48 heures sont rincées manuellement ou à l'aide d'un petit robot dispenseur (MicroFlo, BioTek) avec du milieu DMEM (Life technologies) complet sans rouge de phénol, pour éviter toute interférence de mesure. Ce milieu DMEM est également supplémenté avec 10% de FBS, 2% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline-Streptomycine et 1% de pyruvate. Après deux rinçages par retournement de plaque, le substrat de la *Rluc8* (coelenterazine-h) est dilué à une concentration de 5 μ M finale dans le puits. La plaque est lue avec le Mithras LB940 de chez Berthold qui permet de mesurer la lumière émise par la YPet et la *Rluc8* grâce au logiciel Mikrowin 2000 relié à l'appareil qui transmet les données chiffrées sous forme de fichier Excel. Le signal de BRET est obtenu, comme détaillé en introduction, en calculant le rapport YFP/*Rluc* et multiplié par 1000. L'appareil réalise une série de mesures pour chaque puits, ce qui permet de calculer une moyenne des valeurs de BRET. Cette moyenne est calculée après stabilisation du signal de l'activité Luciférase, environ 15minutes, durée pendant laquelle le signal est le plus stable.

III.4.b Microscopie à haut débit (INCell Analyzer 6000)

Les techniques de HCS pour High Content Screening ou microscopie à haut contenu sont basées sur l'acquisition d'images de microscopie à fluorescence à haut débit et sur leur analyse cellule par cellule, de façon automatisée, à partir de scripts d'analyse d'images. L'appareil utilisé pour les images de fluorescence présentées dans cette thèse est le microscope INCell Analyzer 6000, localisé sur la plateforme Imaginex Biomed de l'Institut de Biologie de Lille. En choisissant différents lasers d'excitation et filtres d'émission, il permet de visualiser le noyau des cellules (marquage DAPI ou Hoechst), la TEV_C par immunomarquage de l'étiquette HA (filtre DsRed), la TEV_N par immunomarquage de l'étiquette V5 (filtre Cy5) ainsi que la fluorescence directe de la YPet (filtre FITC). Avant toute mesure, le manipulateur a le choix du type de plaque, du plan de plaque, du nombre de champs, de l'objectif. Le temps d'exposition, le contraste et d'autres paramètres nécessaires à la bonne acquisition des images peuvent aussi être définis avant toute prise d'image.

III.4.c Transfection transitoire avec l'Echo550 (Labcyte)

Une partie de la thèse a été consacrée à l'optimisation de la technique de transfection transitoire afin d'optimiser du temps sur la mise au point des applications proposées. Une méthode de « transfection reverse haut débit » a donc été développée, par automatisation des différentes étapes du protocole de transfection classique. Pour ce faire l'Echo550 de chez Labcyte disponible au laboratoire a été utilisé. Un premier programme permet de

déposer le diluant (NaCl 150 mM ou milieu Opti-MEM selon le transfectant utilisé), un deuxième, les ADN d'intérêt (ici les protéines fluorescentes tdTomato et mVenus) et un troisième, le réactif de transfection lui-même. Une pick-list est générée grâce à une macro Excel pour chaque programme avec des informations concernant le puits source, le puits destination ainsi que le volume à transférer. Les différents composés à transférer sont déposés dans une plaque source Echo (diluant, ADN, transfectant), et l'Echo vient ensuite distribuer les différents éléments dans une ou plusieurs plaques destinations (blanches et/ou noires). Nous pouvons ainsi mener des expériences de BRET / HCS en parallèle à partir d'une même dilution d'ADN ou d'un même puits source. A la fin des trois programmes, les cellules sont ajoutées stérilement dans les puits, de façon automatisée grâce au MicroFlo (Biotek), un robot dispenseur (cf. **publication Echo I.2.B**).

III.4.c.i Plasmides

Le plasmide tdTomato codant pour la protéine dimère tomato (Addgene plasmid #54562) a été transfecté. La séquence codante de la protéine mVenus humanisée a été obtenue par amplification par PCR et mutagenèse (Takara PrimeStarMax, Roche) à partir du vecteur pcDNA3-YPet-TEV-*Rluc8*²²⁴ préalablement décrit. Le fragment mVenus a été cloné par PCR dans le vecteur tomato (Addgene plasmid #54562) par digestion enzymatique (AgeI/BsrGI) à la place de la séquence codante de la tdTomato.

III.4.c.ii Extraction plasmidique

Les plasmides ont été extraits à partir de bactéries *E. coli* DH5 α selon la même technique que développée précédemment (NucleoBond extraction kit, Macherey Nagel).

III.4.c.iii Transfectants

Les expériences ont été menées en comparant deux réactifs : le jetPEI® transfection reagent (Polyplus, Transfection France) et le *TransIT*®-X2 Dynamic Delivery System (Mirus, Madison USA). Selon les instructions du fournisseur, du NaCl 150 mM ou du milieu de culture Opti-MEM medium (Life technologies, CA) ont été respectivement utilisés.

III.4.c.iv Echo550 transfection reverse

L'Echo550 (Labcyte) a été utilisé et réglé sur le mode 384LDV_AQ_B2 pour de meilleures conditions de transfert, de tensions de surface et de viscosité ; ces caractéristiques permettant un transfert optimal des solutions aqueuses comme l'ADN. Trois pick-listes indépendantes sont générées à partir d'une macro Excel permettant le design de la position de chaque puits source et de chaque puits destination ainsi que le volume de transfert de chacun des puits (P1: diluant, P2: transfert d'ADN, P3: mix réactif de transfection). Les fichiers d'extension '.csv' sont importés et glissés dans le logiciel de l'Echo (Echo Cherry Pick 1.5.3) pour le transfert de la plaque source (384LDV Microplate, Labcyte) à la plaque

destination (384 well, Microplate μ Clear Black, Greiner Bio-one). Les trois programmes ont été réalisés indépendamment.

III.4.c.v Culture cellulaire

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu complet (DMEM, Life technologies, CA) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, de 4.5 g/L de glucose, de 100 U/mL de pénicilline et de 0.1 mg/mL de streptomycine (Life technologies, CA). A la fin des trois programmes, 1500 cellules par puits sont distribuées automatiquement dans les plaques à l'aide du robot dispenser Microflo Select Reagent Dispenser (Biotek). Les cellules sont incubées 48 heures à 37°C, 5% CO₂.

III.4.c.vi Fixation des cellules et stockage

48 heures après la transfection, les plaques 384 puits sont fixées à une concentration finale de formaline 10% neutral buffered (Sigma Aldrich, MO) pendant 15 minutes. Un marquage des noyaux est également réalisé avec du Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate 1 μ g/mL (Invitrogen, CA) dilué dans du tampon phosphate (PBS 1X, Life Technologies, CA). Les cellules sont rincées au PBS 1X trois fois et les plaques sont stockées à 4°C.

III.4.c.vii Acquisition et analyse d'images

Les images des deux ou trois canaux de fluorescence (Hoechst, tdTomato, mVenus) ont été séquentiellement acquises (3 champs) sur l'INCell Analyzer 6000 (GE Healthcare, Life Sciences) en utilisant l'objectif 10X ainsi que les bons filtres d'émission (DAPI, dsRed, and FITC respectivement). Le pourcentage d'efficacité de transfection est déterminé facilement en calculant le rapport des cellules fluorescentes rouges ou vertes sur le nombre total de cellules marquées au Hoechst. Le logiciel Columbus software (Perkin Elmer) permet de déterminer ce pourcentage à l'aide de scripts d'analyse d'images.

III.5 Techniques d'analyse d'images

Au cours de cette thèse, deux logiciels d'analyse d'images (Columbus - Perkin Elmer ou ImageJ - Fiji) ont été utilisés pour l'analyse des données acquises en HCS. Après acquisition des images, 3 étapes principales sont mises en place : le traitement des images, la sélection des objets ou des régions d'intérêt ainsi que l'analyse statistique qui permettra la transformation des images en données numériques exploitables par l'expérimentateur.

Tableau 10 : Principales étapes de l'analyse d'image

Traitement des images	Sélection des objets d'intérêt	Analyse statistique
-Modification luminosité et contraste -Correction du bruit de fond -Élimination des artefacts de mesure -Correction des illuminations non uniformes	-Binarisation de l'image -Segmentation des particules -Sélection de la région d'intérêt (ROI)	-Taille, Morphologie -Nombre -Forme -Texture -Granularité -Intensité

III.5.a Logiciel ImageJ

Durant cette thèse, nous avons voulu comparer les résultats obtenus par le logiciel Columbus à un autre logiciel d'analyse d'images. Nous avons décidé d'utiliser le logiciel gratuit ImageJ (à la différence de Columbus). Une étudiante en stage au sein de notre équipe, Rym Ben Boubaker, a pris en charge cette partie d'analyse d'images en développant trois macros lors de son stage de fin d'études.

III.5.a.i Macro de visualisation des images

En raison de la grande quantité de données générée par le microscope à haut débit IN Cell Analyzer 6000 et d'une visualisation difficile des images par le logiciel Image J (une image = une fenêtre), nous avons eu besoin de générer une macro capable de reproduire le plan de chaque plaque comme le propose le logiciel Columbus. Cette macro permet donc d'avoir un aperçu global des différentes expériences, notamment quand plusieurs marqueurs fluorescents et plusieurs champs sont mis en évidence au sein d'une même plaque. Cette macro de visualisation offre donc 4 types de possibilités à l'expérimentateur :

- a. Visualisation d'un champ par marqueur fluorescent
- b. Visualisation d'un à quatre champs par marqueurs fluorescents
- c. Visualisation de deux marqueurs fluorescents comme le DAPI et le FITC avec fusion des deux sur un même champ final
- d. Visualisation d'un à quatre marqueurs fluorescents par champs (DAPI, FITC, dsRed, Cy5) avec possibilité d'ajout de couleurs. Cette macro trouve son utilité principalement pour les expériences d'immunofluorescence dans lesquelles plusieurs marquages fluorescents sont nécessaires.

Pour chacune des macros, l'expérimentateur a le choix du type de plaque (96 ou 384 puits), du marqueur fluorescent (DAPI, FITC, dsRed, Cy5 ou visible), de la résolution ainsi que la taille des images à afficher, mais aussi du nombre de champs à analyser. La **Figure 71** propose un aperçu de visualisation d'un champ d'une même plaque dans le cas des différentes macros ainsi que le temps total nécessaire à la création de ces différents plans de plaque.

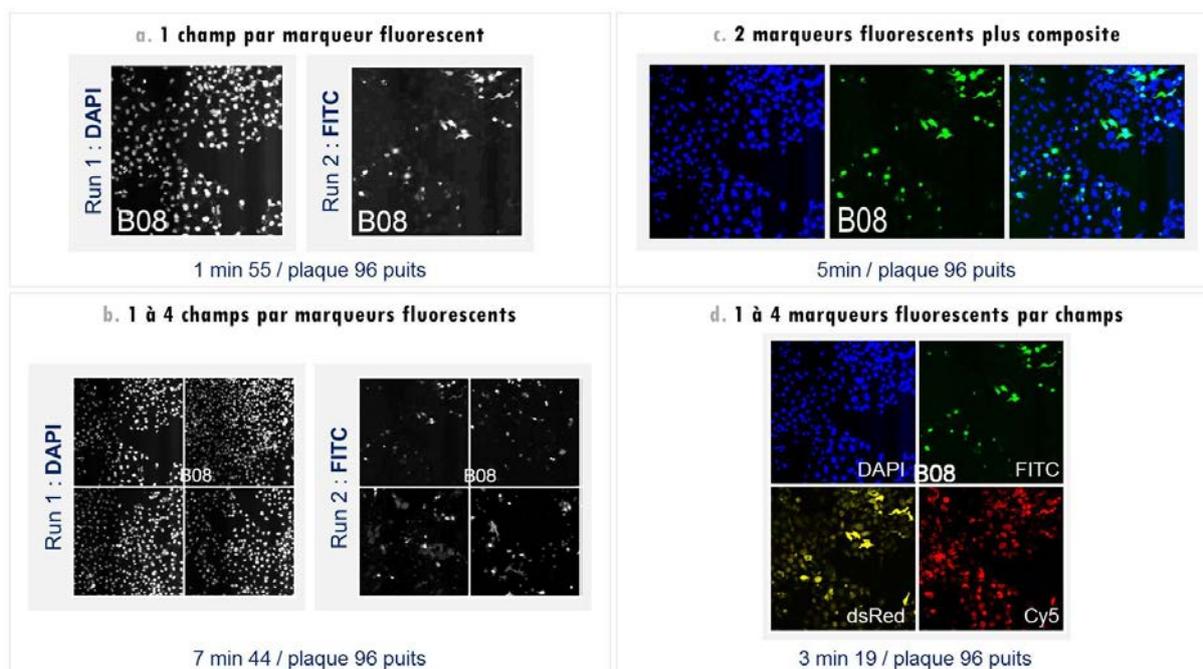


Figure 70 : Exemple de représentation des différentes macros de visualisation

Exemple d'un champ (ici B08) d'une même plaque. Résultats donnés pour une plaque 96 puits, Objectif 20X, résolution 500 pixels

III.5.a.ii Macro d'analyse des cellules marquées

Cette macro ImageJ permet d'analyser les images quantitativement en dénombrant automatiquement les cellules présentes dans chaque image acquise à l'IN Cell Analyzer 6000, en distinguant les cellules marquées des non marquées. Cette macro a été développée dans le cadre de l'optimisation de la transfection avec l'Echo, afin de calculer les pourcentages d'efficacité de transfection.

III.5.a.iii Macro d'analyse phénotypique

Une dernière macro d'analyse phénotypique dédiée à notre système a été développée pour quantifier la fluorescence de la YPet présente dans le noyau des cellules à l'état basal (cellules dites négatives) ainsi que dans la cellule entière après clivage de la sonde BRET/HCS par la protéase TEV (cellules positives). Après comparaison des paramètres de cette macro avec le logiciel ImageJ, ce nouvel outil semble aussi efficace

mais a encore besoin d'être optimisé sur certains paramètres. Le travail effectué pendant cette thèse a principalement été réalisé sur des expériences de transfection transitoire mais toutes les cellules au sein d'un même puits ne sont pas forcément transfectées de façon homogène. De plus, dans nos études aux fortes doses de protéase TEV, les cellules mortes sont parfois considérées comme des cellules négatives de par leur forme arrondie, malgré un champ de cellules 100% positives. Le travail du script reste donc à améliorer mais nous espérons obtenir de meilleurs résultats en couplant ces paramètres à nos lignées de cellules stables et à notre technique d'optimisation de transfection.

III.5.a.iv Diagrammes informatiques des différentes macros d'analyse d'images

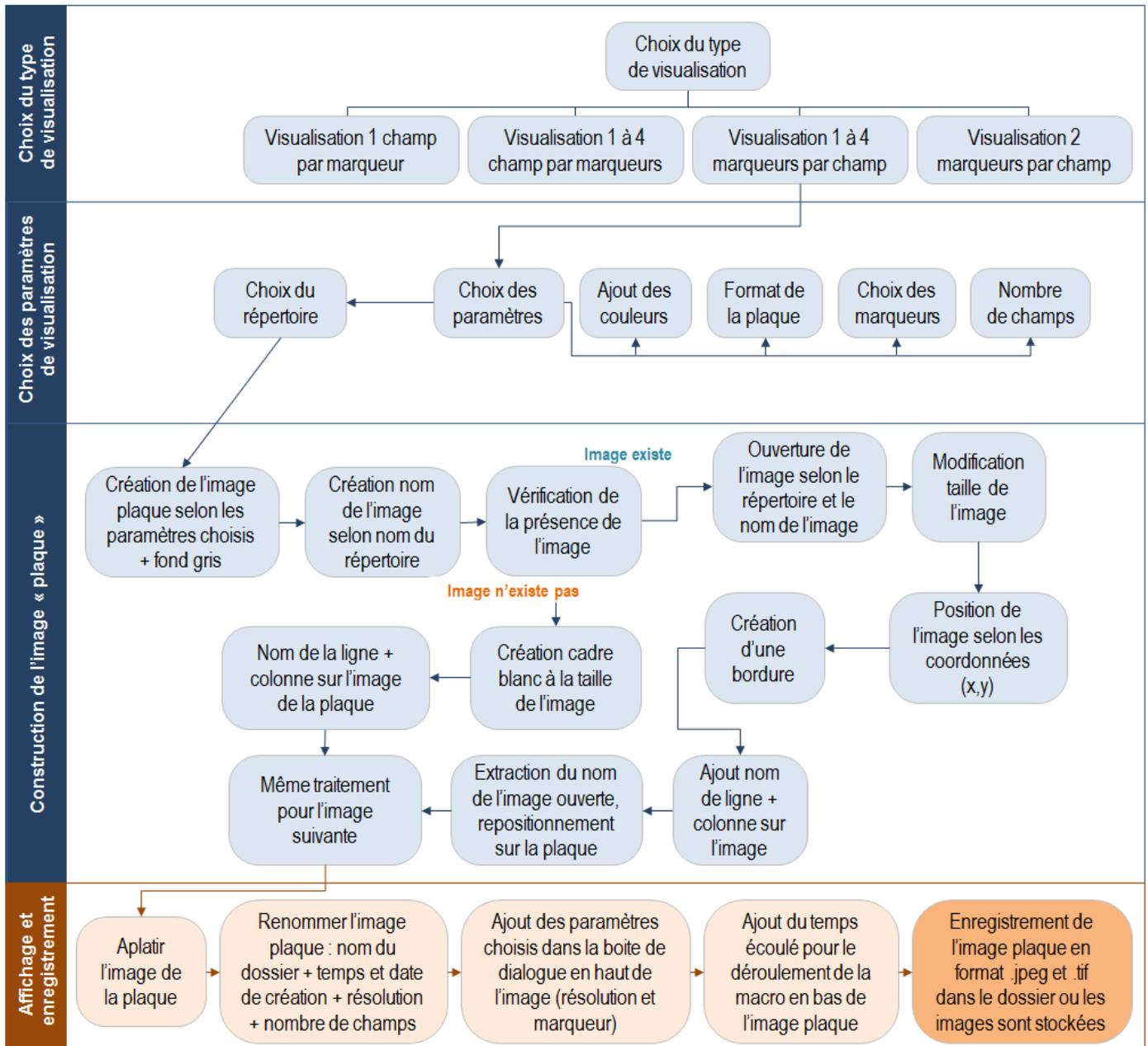


Figure 71 : Diagramme informatique de la macro de visualisation d'images
D'après le rapport de stage de fin d'études de Rym Ben Boubaker

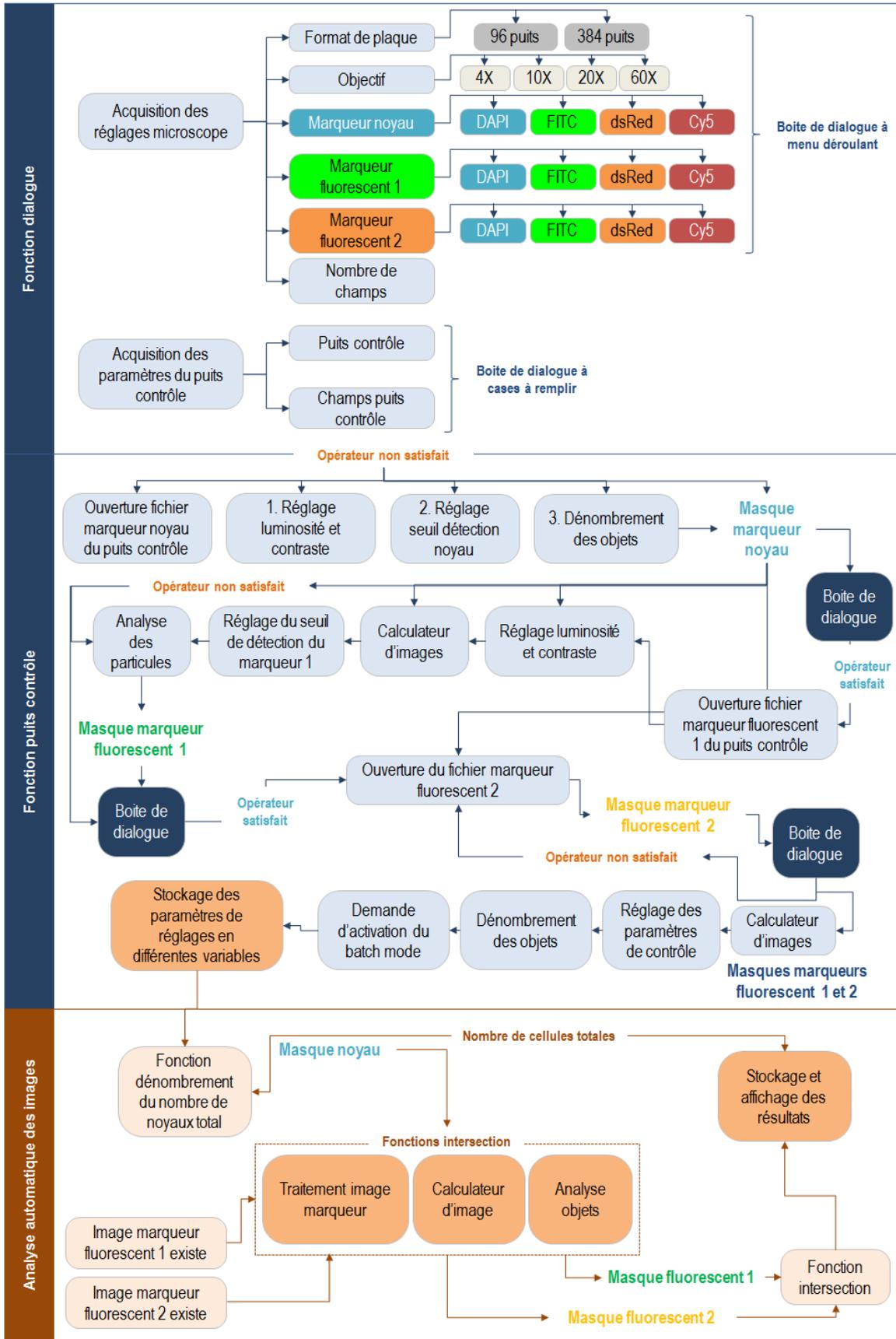


Figure 72 : Diagramme informatique de la macro d'analyse de cellules marquées
D'après le rapport de stage de fin d'études de Rym Ben Boubaker

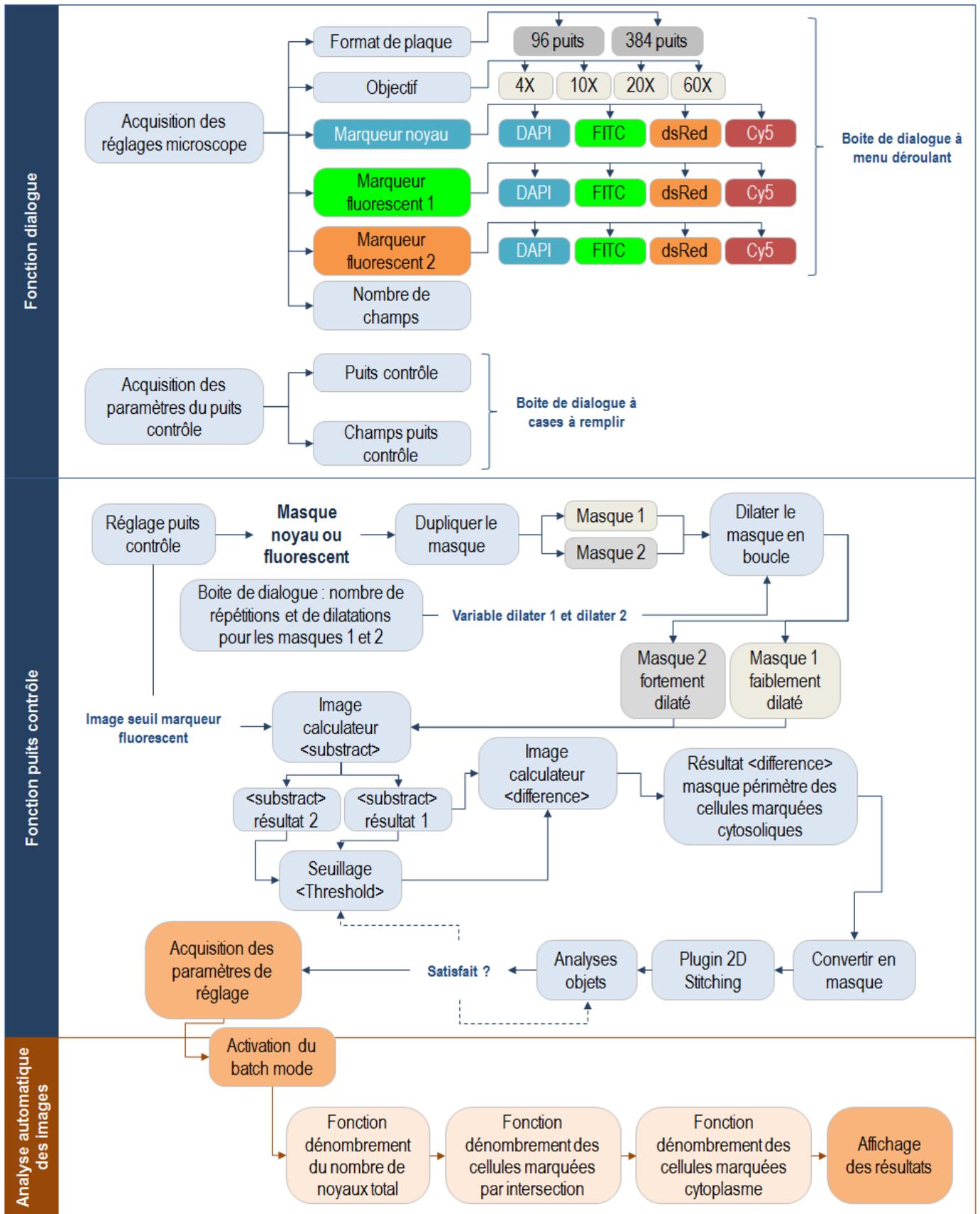


Figure 73 : Diagramme informatique de la macro d'analyse phénotypique
D'après le rapport de stage de fin d'études de Rym Ben Boubaker

III.5.b Logiciel Columbus

III.5.b.i Détail du script d'analyse d'images des expériences d'optimisation de transfection à l'Echo

Recherche des noyaux	Canal : DAPI ROI : aucune	Méthode : B Threshold : 0.4 Aire > 30 μm^2 Split-factor : 5 Contraste > 0.1	Population sortante : Noyaux
Calcul des propriétés morphologiques	Population : Noyaux Région : Noyau	Méthode : Standard Aire Rondeur	Propriétés sortantes : Noyau
Sélection population	Population : Noyaux	Méthode : Filtre par propriété Aire du noyau [μm^2] > 190	Population sortante : Noyaux sélectionnés
Calcul des propriétés d'intensité	Canal : dsRed Population : Noyaux sélectionnés Région : Noyau	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité des noyaux rouges
Sélection population	Population : Noyaux sélectionnés	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 200	Population sortante : Cellules rouges
Résultats	<p>Méthode : Standard Noyaux sélectionnés – Nombre d'objets : Nombre Nom de sortie : Noyaux sélectionnés nombre d'objets</p> <p>Méthode : Standard Cellules rouges – Nombre d'objets : Nombre Nom de sortie : Cellules rouges nombre d'objets</p> <p>Méthode Standard Cellules rouges – Intensité moyenne des noyaux : Moyenne Nom de sortie : Cellules rouges intensité moyenne du noyau, moyenne par puits</p>		

Figure 74 : Script d'analyse d'images Columbus utilisé lors des expériences d'optimisation de transfection à l'Echo550

Script d'analyse utilisé lors des expériences de transfection du vecteur tdTomato seul (Figures 1 et 2 de la publication d'optimisation de la transfection au format haut débit).

III.5.b.ii Détail du script d'analyse d'images des expériences de co-transfection à l'Echo

Recherche des noyaux	Canal : DAPI ROI : aucune	Méthode : B Threshold : 0.4 Aire > 30 μm^2 Split-factor : 7 Contraste > 0.1	Population sortante : Noyaux
Calcul des propriétés morphologiques	Population : Noyaux Région : Noyau	Méthode : Standard Aire Rondeur	Propriétés sortantes : Noyau
Sélection population	Population : Noyaux	Méthode : Filtre par propriété Aire du noyau [μm^2] > 100 Aire du noyau [μm^2] < 1000 Boolean Operations F1 et F2	Population sortante : Vrais noyaux
Calcul des propriétés d'intensité (1)	Canal : dsRed Population : Vrais noyaux Région : Noyau	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité noyaux DAPI
Calcul des propriétés d'intensité (2)	Canal : dsRed Population : Vrais noyaux Région : Noyau	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité noyaux Rouges
Calcul des propriétés d'intensité (3)	Canal : dsRed Population : Vrais noyaux Région : Noyau	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité noyaux Verts
Sélection population (1)	Population : Vrais noyaux	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 200	Population sortante : Cellules vertes
Sélection population (2)	Population : Vrais noyaux	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 500	Population sortante : Cellules rouges
Sélection population (3)	Population : Vrais noyaux	Méthode : Filtre par propriété Intensité noyaux verts moyenne > 200 Intensité noyaux rouges moyenne > 500	Population sortante : Cellules Rouges + Vertes

Sélection population (4)	Population : Cellules vertes	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 200	Population sortante : Cellules vertes qui sont rouges
Sélection population (5)	Population : Cellules rouges	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 500	Population sortante : Cellules rouges qui sont vertes
Résultats	<p>Méthode : Standard Noyaux sélectionnés – Nombre d’objets : Nombre Nom de sortie : Noyaux sélectionnés nombre d’objets</p> <p>Méthode : Standard Cellules rouges – Nombre d’objets : Nombre Nom de sortie : Cellules rouges nombre d’objets</p> <p>Méthode : Standard Cellules vertes – Nombre d’objets : Nombre Nom de sortie : Cellules vertes nombre d’objets</p> <p>Méthode Standard Cellules rouges – Intensité moyenne des noyaux : Moyenne Nom de sortie : Cellules rouges intensité moyenne du noyau, moyenne par puits</p> <p>Méthode Standard Cellules vertes – Intensité moyenne des noyaux : Moyenne Nom de sortie : Cellules vertes intensité moyenne du noyau, moyenne par puits</p>		

Figure 75 : Script d’analyse d’images Columbus utilisé lors des expériences d’optimisation de co-transfection à l’Echo550

Script d’analyse utilisé lors des expériences de co-transfection des vecteurs tdTomato et mMVenus (Figures 3 de la publication d’optimisation de la transfection au format haut débit).

III.5.b.iii Détail du script d'analyse d'images du comptage des cellules marquées

Recherche des noyaux	Canal : DAPI ROI : aucune	Méthode : B Threshold : 0.4 Aire > 30 μm^2 Split-factor : 5 Contraste > 0.1	Population sortante : Noyaux
Recherche du cytoplasme	Canal : DAPI Région : Noyaux	Méthode : A Threshold individuel 0.1	
Sélection région	Population : Noyaux Région : Noyau	Méthode : Calcul region [$\mu\text{m}/\text{px}$] Frontière extérieure -6px Frontière interne : INF px	Région sortante : Noyau redimensionné
Calcul des propriétés d'intensité (1)	Canal : FITC Population : Noyaux sélectionnés Région : Noyau	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité des noyaux verts
Calcul des propriétés d'intensité (2)	Canal : FITC Population : Noyaux sélectionnés Région : Noyau redimensionné	Méthode : Standard Moyenne	Propriétés sortantes : Intensité des noyaux verts redimensionnés
Sélection population (1)	Population : Noyaux	Méthode : Filtre par propriété Intensité moyenne des noyaux > 200	Population sortante : Cellules positives (fluorescence verte dans noyau et cytoplasme des cellules)
Sélection population (2)	Population : Cellules positives	Méthode : Filtre par propriété Formule 0.4	Population sortante : Cellules positives sélectionnées
Résultats	<p>Méthode Population Cellules positives Nombre d'objets Intensité Noyaux FITC moyenne Intensité Noyaux FITC redimensionnés moyenne Formule : cellules positives sélectionnées</p> <p>Méthode Population Noyaux Nombre d'objets Intensité Noyaux FITC moyenne Intensité Noyaux FITC redimensionnés moyenne Formule : cellules positives</p> <p>Formule : $a/b*100$ Population type Objets Variable A : Cellules positives : nombre d'objets Variable B : Cellules positives : nombre d'objets Nom : Formule output 2</p>		

Figure 76 : Script d'analyse d'images du comptage des cellules marquées noyaux versus cytoplasme

Script d'analyse d'image Columbus utilisé lors des expériences de comptage des cellules positives et négatives pour l'analyse HCS de notre sonde BRET optimisée.

BIBLIOGRAPHIE

Références

1. Förster, T. Energy migration and fluorescence. *J. Biomed. Opt.* **17**, 011002 (2012).
2. Cottet, M. *et al.* BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front. Endocrinol.* **3**, (2012).
3. Bosse, R., Illy, C. & Chelsky, D. Principles of AlphaScreen. 8
4. Eglen, R. M. *et al.* The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status. *Curr. Chem. Genomics* **1**, 2–10 (2008).
5. Sieracki, E. *et al.* A cell-free approach to accelerate the study of protein-protein interactions in vitro. *Interface Focus* **3**, 20130018 (2013).
6. Garbison, K. E., Heinz, B. A., Lajiness, M. E., Weidner, J. R. & Sittampalam, G. S. Phospho-ERK Assays. in *Assay Guidance Manual* (eds. Sittampalam, G. S. *et al.*) (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004).
7. Veloria, J. R., Devkota, A. K., Cho, E. J. & Dalby, K. N. Development of a cost effective and robust AlphaScreen® platform for application. *BioTechniques* **64**, 181–183 (2018).
8. Janzen, W. P. Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art. *Chem. Biol.* **21**, 1162–1170 (2014).
9. Lakowicz, J. R. & Masters, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* **13**, 029901 (2008).
10. Clegg, R. M. Fluorescence resonance energy transfer. 8
11. Shimomura, O. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 5590–5602 (2009).
12. Pollok, B. A. & Heim, R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol.* **9**, 57–60 (1999).
13. Hanson, M. R. & Köhler, R. H. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 529–539 (2001).
14. Nguyen, A. W. & Daugherty, P. S. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* **23**, 355–360 (2005).
15. Gregan, B., Schaefer, M., Rosenthal, W. & Oksche, A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44 Suppl 1**, S30-33 (2004).
16. He, L. *et al.* A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP-->YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **55**, 71–85 (2003).
17. Valentin, G. *et al.* Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments. *Nat. Methods* **2**, 801 (2005).
18. Degorce, F. *et al.* HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery –A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genomics* **3**, 22–32 (2009).

19. Xu, Y., Piston, D. W. & Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 151–156 (1999).
20. Angers, S. *et al.* Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3684–3689 (2000).
21. Subramanian, C., Xu, Y., Johnson, C. H. & von Arnim, A. G. In vivo detection of protein-protein interaction in plant cells using BRET. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **284**, 271–286 (2004).
22. Gehret, A. U., Bajaj, A., Naider, F. & Dumont, M. E. Oligomerization of the Yeast α -Factor Receptor IMPLICATIONS FOR DOMINANT NEGATIVE EFFECTS OF MUTANT RECEPTORS. *J. Biol. Chem.* **281**, 20698–20714 (2006).
23. Ward, W. W. & Cormier, M. J. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **254**, 781–788 (1979).
24. Bokman, S. H. & Ward, W. W. Renaturation of Aequorea green-fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1372–1380 (1981).
25. Pflieger, K. D. G. & Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods* **3**, 165–174 (2006).
26. Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S. & Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* **3**, 311–324 (2008).
27. Reddy Chichili, V. P., Kumar, V. & Sivaraman, J. Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **22**, 153–167 (2013).
28. Drinovec, L., Kubale, V., Nøhr Larsen, J. & Vrecl, M. Mathematical Models for Quantitative Assessment of Bioluminescence Resonance Energy Transfer: Application to Seven Transmembrane Receptors Oligomerization. *Front. Endocrinol.* **3**, (2012).
29. Mercier, J.-F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. Quantitative Assessment of β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931 (2002).
30. Couturier, C. & Deprez, B. Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells. *Front. Endocrinol.* **3**, (2012).
31. Couturier, C. & Jockers, R. Activation of the Leptin Receptor by a Ligand-induced Conformational Change of Constitutive Receptor Dimers. *J. Biol. Chem.* **278**, 26604–26611 (2003).
32. Xu, Y., Piston, D. W. & Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 151–156 (1999).
33. Pflieger, K. D. G., Seeber, R. M. & Eidne, K. A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat. Protoc.* **1**, 337–345 (2006).

34. Kocan, M., See, H. B., Seeber, R. M., Eidne, K. A. & Pflieger, K. D. G. Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J. Biomol. Screen.* **13**, 888–898 (2008).
35. Xing, Y., So, M.-K., Koh, A. L., Sinclair, R. & Rao, J. Improved QD-BRET conjugates for detection and imaging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 388–394 (2008).
36. Bertrand, L. *et al.* The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **22**, 533–541 (2002).
37. De, A., Ray, P., Loening, A. M. & Gambhir, S. S. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.* **23**, 2702–2709 (2009).
38. Gammon, S. T., Villalobos, V. M., Roshal, M., Samrakandi, M. & Piwnica-Worms, D. Rational design of novel red-shifted BRET pairs: Platforms for real-time single-chain protease biosensors. *Biotechnol. Prog.* **25**, 559–569 (2009).
39. Pflieger, K. D. G., Seeber, R. M. & Eidne, K. A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat. Protoc.* **1**, 337–345 (2006).
40. Dimri, S., Basu, S. & De, A. Use of BRET to Study Protein-Protein Interactions In Vitro and In Vivo. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1443**, 57–78 (2016).
41. Dragulescu-Andrasi, A., Chan, C. T., De, A., Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12060–12065 (2011).
42. Li, F. *et al.* Use of hGluc/tdTomato pair for sensitive BRET sensing of protease with high solution media tolerance. *Talanta* **109**, 141–146 (2013).
43. Machleidt, T. *et al.* NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1797–1804 (2015).
44. Cui, B. *et al.* Bioluminescence Resonance Energy Transfer System for Measuring Dynamic Protein-Protein Interactions in Bacteria. *mBio* **5**, (2014).
45. Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S. & Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* **3**, 311–324 (2008).
46. Borroto-Escuela, D. O., Flajolet, M., Agnati, L. F., Greengard, P. & Fuxe, K. BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (BRET) METHODS TO STUDY G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR - RECEPTOR TYROSINE KINASE HETERORECEPTOR COMPLEXES. *Methods Cell Biol.* **117**, 141–164 (2013).
47. Sun, S., Yang, X., Wang, Y. & Shen, X. In Vivo Analysis of Protein-Protein Interactions with Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET): Progress and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
48. Angers, S. *et al.* Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3684–3689 (2000).

49. Ayoub, M. A. Preferential Formation of MT1/MT2 Melatonin Receptor Heterodimers with Distinct Ligand Interaction Properties Compared with MT2 Homodimers. *Mol. Pharmacol.* **66**, 312–321 (2004).
50. Salahpour, A. & Bouvier, M. S. *Angers a.*
51. Ayoub, M. A. *et al.* Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 21522–21528 (2002).
52. Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: MECHANISM AND APPLICATIONS. *J. Biol. Chem.* **276**, 29188–29194 (2001).
53. Jiang, L. I. *et al.* Use of a cAMP BRET Sensor to Characterize a Novel Regulation of cAMP by the Sphingosine 1-Phosphate/G₁₃ Pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 10576–10584 (2007).
54. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B. & Bouvier, M. Monitoring Protein-Protein Interactions in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). in *Current Protocols in Neuroscience* (eds. Crawley, J. N. *et al.*) (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1002/0471142301.ns0523s34
55. Nagai, T. *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002).
56. Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J. & Bouvier, M. High-Throughput Screening of G Protein-Coupled Receptor Antagonists Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer 1-Based β -Arrestin2 Recruitment Assay. *J. Biomol. Screen.* **10**, 463–475 (2005).
57. You, X. *et al.* Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18458–18463 (2006).
58. Loening, A. M., Dragulescu-Andrasi, A. & Gambhir, S. S. A Red-shifted Renilla Luciferase Variant Optimized for Transient Reporter Gene Expression. *Nat. Methods* **7**, 5–6 (2010).
59. Merzlyak, E. M. *et al.* Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* **4**, 555–557 (2007).
60. Shcherbo, D. *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* **4**, 741–746 (2007).
61. Stepanyuk, G. A. *et al.* Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renilla muelleri luciferase. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1809–1817 (2010).
62. Inouye, S. & Shimomura, O. The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 349–353 (1997).
63. Otto-Duessel, M. *et al.* In vivo testing of Renilla luciferase substrate analogs in an orthotopic murine model of human glioblastoma. *Mol. Imaging* **5**, 57–64 (2006).
64. Tannous, B. A., Kim, D.-E., Fernandez, J. L., Weissleder, R. & Breakefield, X. O. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **11**, 435–443 (2005).

65. Li, F. *et al.* Buffer enhanced bioluminescence resonance energy transfer sensor based on Gaussia luciferase for in vitro detection of protease. *Anal. Chim. Acta* **724**, 104–110 (2012).
66. England, C. G., Ehlerding, E. B. & Cai, W. NanoLuc: A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug. Chem.* **27**, 1175–1187 (2016).
67. Low, J. C. & Tu, S.-C. Energy Transfer Evidence for In Vitro and In Vivo Complexes of *Vibrio harveyi* Flavin Reductase P and Luciferase. *Photochem. Photobiol.* **77**, 446–452 (2003).
68. Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905–909 (2005).
69. Rekas, A., Alattia, J.-R., Nagai, T., Miyawaki, A. & Ikura, M. Crystal Structure of Venus, a Yellow Fluorescent Protein with Improved Maturation and Reduced Environmental Sensitivity. *J. Biol. Chem.* **277**, 50573–50578 (2002).
70. Hsu, S.-T. D. *et al.* Folding Study of Venus Reveals a Strong Ion Dependence of Its Yellow Fluorescence under Mildly Acidic Conditions. *J. Biol. Chem.* **285**, 4859–4869 (2010).
71. Saito, K. *et al.* Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* **3**, 1262 (2012).
72. Takai, A. *et al.* Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4352–4356 (2015).
73. Boute, N., Jockers, R. & Issad, T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 351–354 (2002).
74. JIANG, T., XING, B. & RAO, J. Recent Developments of Biological Reporter Technology for Detecting Gene Expression. 36
75. Silva-Rocha, R. & de Lorenzo, V. A GFP-lacZ bicistronic reporter system for promoter analysis in environmental gram-negative bacteria. *PLoS One* **7**, e34675 (2012).
76. Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M. & Virta, M. Reporter Genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors. *Anal. Biochem.* **301**, 235–242 (2002).
77. Hong, H., Yang, Y. & Cai, W. Imaging Gene Expression in Live Cells and Tissues. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, pdb.top103 (2011).
78. Rajamanickam, C. & Jeejabai, R. Evaluation of the cardiac isoform of alpha2-macroglobulin as a factor inducing cardiac hypertrophy. *Methods Mol. Med.* **112**, 261–275 (2005).
79. Selbert, S. & Rannie, D. Analysis of transgenic mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **180**, 305–341 (2002).
80. Arnone, M. I., Dmochowski, I. J. & Gache, C. Using reporter genes to study cis-regulatory elements. *Methods Cell Biol.* **74**, 621–652 (2004).
81. Jacob, F., Perrin, D., Sánchez, C., Monod, J. & Edelman, S. [The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. C.R.Acad. Sci. Paris 250 (1960) 1727-1729]. *C. R. Biol.* **328**, 514–520 (2005).

82. Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8447–8451 (1986).
83. Alonso-Peral, M. M. The HVE/CAND1 gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 3755–3766 (2006).
84. Alonso-Peral, M. M. *et al.* The HVE/CAND1 gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 3755–3766 (2006).
85. Choy, G. *et al.* Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *BioTechniques* **35**, 1022–1026, 1028–1030 (2003).
86. Bhaumik, S. & Gambhir, S. S. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 377–382 (2002).
87. Tannous, B. A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring of biological processes in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 582–591 (2009).
88. Andreu, N. *et al.* Optimisation of Bioluminescent Reporters for Use with Mycobacteria. *PLoS ONE* **5**, (2010).
89. Noguchi, T. & Golden, S. Bioluminescent and fluorescent reporters in circadian rhythm studies. 24
90. Dixit, R. & Cyr, R. Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **36**, 280–290 (2003).
91. Sacchetti, A. *et al.* Green fluorescent protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **Suppl 36**, 117–128 (2001).
92. Ferrer-Vaquero, A. *et al.* A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/ β -catenin signaling in the mouse. *BMC Dev. Biol.* **10**, 121 (2010).
93. Tzou, P. *et al.* Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* **13**, 737–748 (2000).
94. ALLARD, S. T. M. & KOPIK, K. Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. 4 (2008).
95. Li, Q., Yi, L., Marek, P. & Iverson, B. L. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Lett.* **587**, 1155–1163 (2013).
96. Szecsi, P. B. The aspartic proteases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **52**, 5–22 (1992).
97. Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63–88 (1997).
98. Drag, M. & Salvesen, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701 (2010).
99. Hao Ong, I. L. & Yang, K.-L. Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst* **142**, 1867–1881 (2017).
100. Smith, C. G. & Vane, J. R. The discovery of captopril. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**, 788–789 (2003).
101. Jensen, C., Herold, P. & Brunner, H. R. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 399–410 (2008).

102. Matheson, A. J. & Goa, K. L. Desirudin: a review of its use in the management of thrombotic disorders. *Drugs* **60**, 679–700 (2000).
103. Kakar, P., Watson, T. & Lip, G. Y. H. Drug evaluation: rivaroxaban, an oral, direct inhibitor of activated factor X. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2000** **8**, 256–265 (2007).
104. Eriksson, B. I., Smith, H., Yasothan, U. & Kirkpatrick, P. Dabigatran etexilate. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 557–558 (2008).
105. Adams, J. & Kauffman, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* **22**, 304–311 (2004).
106. Flexner, C., Bate, G. & Kirkpatrick, P. Tipranavir. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 955–956 (2005).
107. Mattos, C. *et al.* Multiple solvent crystal structures: probing binding sites, plasticity and hydration. *J. Mol. Biol.* **357**, 1471–1482 (2006).
108. Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M. & Oleksy, A. The many faces of protease–protein inhibitor interaction. *EMBO J.* **24**, 1303–1310 (2005).
109. Eglen, R. M. Assessing GPCR activation using protein complementation: a novel technique for HTS. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 746–748 (2007).
110. Mitra, R. D., Silva, C. M. & Youvan, D. C. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* **173**, 13–17 (1996).
111. Rehm, M. *et al.* Single-cell Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis Demonstrates That Caspase Activation during Apoptosis Is a Rapid Process ROLE OF CASPASE-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 24506–24514 (2002).
112. O'Brien, M. A. Homogeneous, Bioluminescent Protease Assays: Caspase-3 as a Model. *J. Biomol. Screen.* **10**, 137–148 (2005).
113. Kohl, T., Heinze, K. G., Kuhlemann, R., Koltermann, A. & Schwille, P. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12161–12166 (2002).
114. Liu, Y. & Liao, J. Quantitative FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Analysis for SENP1 Protease Kinetics Determination. *J. Vis. Exp. JoVE* (2013). doi:10.3791/4430
115. Tsai, M.-T. *et al.* Real-Time Monitoring of Human Enterovirus (HEV)-Infected Cells and Anti-HEV 3C Protease Potency by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 748–755 (2009).
116. Sabariego, R. *et al.* Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Assay for Characterization of Hepatitis C Virus NS3-4A Protease Activity in Live Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 728–734 (2009).
117. Peppard, J. *et al.* Development of an Assay Suitable for High-Throughput Screening to Measure Matrix Metalloprotease Activity. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **1**, 425–433 (2003).
118. Lombard, C., Saulnier, J. & Wallach, J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* **87**, 265–272 (2005).

119. Singh, H. *et al.* Chikungunya virus inhibition by peptidomimetic inhibitors targeting virus-specific cysteine protease. *Biochimie* **149**, 51–61 (2018).
120. Aggarwal, M., Sharma, R., Kumar, P., Parida, M. & Tomar, S. Kinetic characterization of trans-proteolytic activity of Chikungunya virus capsid protease and development of a FRET-based HTS assay. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
121. Windsor, I. W. & Raines, R. T. Fluorogenic Assay for Inhibitors of HIV-1 Protease with Sub-picomolar Affinity. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
122. Jin, S., Ellis, E., Veetil, J. V., Yao, H. & Ye, K. Visualization of HIV Protease Inhibition Using a Novel FRET Molecular Probe. *Biotechnol. Prog.* **27**, 1107–1114 (2011).
123. Medintz, I. L. *et al.* Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot–peptide conjugates. *Nat. Mater.* **5**, 581–589 (2006).
124. Algar, W. R., Tavares, A. J. & Krull, U. J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. *Anal. Chim. Acta* **673**, 1–25 (2010).
125. Dacres, H., Dumancic, M. M., Horne, I. & Trowell, S. C. Direct comparison of fluorescence- and bioluminescence-based resonance energy transfer methods for real-time monitoring of thrombin-catalysed proteolytic cleavage. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1164–1170 (2009).
126. den Hamer, A. *et al.* Bright Bioluminescent BRET Sensor Proteins for Measuring Intracellular Caspase Activity. *ACS Sens.* **2**, 729–734 (2017).
127. Hu, K. *et al.* A human immunodeficiency virus type 1 protease biosensor assay using bioluminescence resonance energy transfer. *J. Virol. Methods* **128**, 93–103 (2005).
128. Blommel, P. G. & Fox, B. G. A Combined Approach to Improving Large-Scale Production of Tobacco Etch Virus Protease. *Protein Expr. Purif.* **55**, 53–68 (2007).
129. Cesaratto, F., Burrone, O. R. & Petris, G. Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *J. Biotechnol.* **231**, 239–249 (2016).
130. Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Beaudoin, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 471–487 (2005).
131. Shafee, T. Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity. (University of Cambridge, 2014). doi:10.17863/CAM.16528
132. Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* **61**, 2540–2548 (1987).
133. Dougherty, W. G. & Parks, T. D. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**, 449–456 (1991).
134. Phan, J. *et al.* Structural Basis for the Substrate Specificity of Tobacco Etch Virus Protease. *J. Biol. Chem.* **277**, 50564–50572 (2002).
135. Parks, T. D., Howard, E. D., Wolpert, T. J., Arp, D. J. & Dougherty, W. G. Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology* **210**, 194–201 (1995).

136. Dougherty, W. G., Cary, S. M. & Parks, T. D. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* **171**, 356–364 (1989).
137. Kapust, R. B., Tözsér, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 949–955 (2002).
138. Boulware, K. T., Jabaiah, A. & Daugherty, P. S. Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 339–346 (2010).
139. Kostallas, G., Löfdahl, P.-Å. & Samuelson, P. Substrate profiling of tobacco etch virus protease using a novel fluorescence-assisted whole-cell assay. *PLoS One* **6**, e16136 (2011).
140. Renicke, C., Spadaccini, R. & Taxis, C. A tobacco etch virus protease with increased substrate tolerance at the P1' position. *PLoS One* **8**, e67915 (2013).
141. Yi, L. *et al.* Engineering of TEV protease variants by yeast ER sequestration screening (YESS) of combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7229–7234 (2013).
142. Carrico, Z. M., Strobel, K. L., Atreya, M. E., Clark, D. S. & Francis, M. B. Simultaneous selection and counter-selection for the directed evolution of proteases in *E. coli* using a cytoplasmic anchoring strategy. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1187–1193 (2016).
143. He, Y.-H., Li, Y.-M. & Chen, Y.-X. Phosphorylation regulates proteolytic efficiency of TEV protease detected by a 5(6)-carboxyfluorescein-pyrene based fluorescent sensor. *Talanta* **150**, 340–345 (2016).
144. Nunn, C. M. *et al.* Crystal structure of tobacco etch virus protease shows the protein C terminus bound within the active site. *J. Mol. Biol.* **350**, 145–155 (2005).
145. Cesaratto, F., López-Requena, A., Burrone, O. R. & Petris, G. Engineered tobacco etch virus (TEV) protease active in the secretory pathway of mammalian cells. *J. Biotechnol.* **212**, 159–166 (2015).
146. Taxis, C., Stier, G., Spadaccini, R. & Knop, M. Efficient protein depletion by genetically controlled deprotection of a dormant N-degron. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 267 (2009).
147. Wehr, M. C. & Rossner, M. J. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies. *Drug Discov. Today* **21**, 415–429 (2016).
148. Wehr, M. C. *et al.* Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Methods* **3**, 985–993 (2006).
149. Wehr, M. C., Reinecke, L., Botvinnik, A. & Rossner, M. J. Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.* **8**, 55 (2008).
150. Williams, D. J., Puhl, H. L. & Ikeda, S. R. Rapid modification of proteins using a rapamycin-inducible tobacco etch virus protease system. *PLoS One* **4**, e7474 (2009).
151. Capdevila-Nortes, X., López-Hernández, T., Ciruela, F. & Estévez, R. A modification of the split-tobacco etch virus method for monitoring interactions between membrane proteins in mammalian cells. *Anal. Biochem.* **423**, 109–118 (2012).
152. Jones, S. & Thornton, J. M. Review Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **8** (1996).

153. Yaciuk, P. Co-immunoprecipitation of protein complexes. *Methods Mol. Med.* **131**, 103–111 (2007).
154. Bain, A. L., Harris, J. L. & Khanna, K. K. Identification of ATM-Interacting Proteins by Co-immunoprecipitation and Glutathione-S-Transferase (GST) Pull-Down Assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1599**, 163–181 (2017).
155. Sambrook, J. & Russell, D. W. Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique. *CSH Protoc.* **2006**, (2006).
156. Vikis, H. G. & Guan, K.-L. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **261**, 175–186 (2004).
157. Zhang, G. *et al.* A Novel Interaction between the SH2 Domain of Signaling Adaptor Protein Nck-1 and the Upstream Regulator of the Rho Family GTPase Rac1 Engulfment and Cell Motility 1 (ELMO1) Promotes Rac1 Activation and Cell Motility. *J. Biol. Chem.* **289**, 23112–23122 (2014).
158. Michnick, S. W., Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I. & Stefan, E. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 569–582 (2007).
159. Magliery, T. J. *et al.* Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 146–157 (2005).
160. Remy, I. & Michnick, S. W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat. Methods* **3**, 977–979 (2006).
161. Stefan, E. *et al.* Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16916–16921 (2007).
162. Kerppola, T. K. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2876–2886 (2009).
163. Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X. & Michnick, S. W. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12141–12146 (1998).
164. Ghosh, I., Hamilton, A. D. & Regan, L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein [12]. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5658–5659 (2000).
165. Bellón-Echeverría, I. *et al.* MultiBacMam Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) tool-kit identifies new small-molecule inhibitors of the CDK5-p25 protein-protein interaction (PPI). *Sci. Rep.* **8**, 5083 (2018).
166. Galarnau, A., Primeau, M., Trudeau, L.-E. & Michnick, S. W. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nat. Biotechnol.* **20**, 619–622 (2002).
167. Luker, K. E. *et al.* Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12288–12293 (2004).

168. Kaihara, A., Kawai, Y., Sato, M., Ozawa, T. & Umezawa, Y. Locating a protein-protein interaction in living cells via split Renilla luciferase complementation. *Anal. Chem.* **75**, 4176–4181 (2003).
169. Galinski, S., Wichert, S. P., Rossner, M. J. & Wehr, M. C. Multiplexed profiling of GPCR activities by combining split TEV assays and EXT-based barcoded readouts. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
170. Shekhawat, S. S. & Ghosh, I. Split-Protein Systems: Beyond Binary Protein-Protein Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 789–797 (2011).
171. Kerppola, T. K. BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BiFC) ANALYSIS AS A PROBE OF PROTEIN INTERACTIONS IN LIVING CELLS. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 465–487 (2008).
172. Rybakina, V., Clamme, J.-P., Ampudia, J., Yachi, P. P. & Gascoigne, N. R. J. CD8 α and - $\alpha\beta$ isotypes are equally recruited to the immunological synapse through their ability to bind to MHC class I. *EMBO Rep.* **12**, 1251–1256 (2011).
173. Vidi, P.-A. & Watts, V. J. Fluorescent and Bioluminescent Protein-Fragment Complementation Assays in the Study of G Protein-Coupled Receptor Oligomerization and Signaling. *Mol. Pharmacol.* **75**, 733–739 (2009).
174. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246 (1989).
175. Mehla, J., Caufield, J. H., Sakhawalkar, N. & Uetz, P. A comparison of two hybrid approaches for detecting protein-protein interactions. *Methods Enzymol.* **586**, 333–358 (2017).
176. Cottier, S. *et al.* The yeast three-hybrid system as an experimental platform to identify proteins interacting with small signaling molecules in plant cells: potential and limitations. *Front. Plant Sci.* **2**, 101 (2011).
177. Moosavi, B., Mousavi, B., Yang, W.-C. & Yang, G.-F. Yeast-based assays for detecting protein-protein/drug interactions and their inhibitors. *Eur. J. Cell Biol.* **96**, 529–541 (2017).
178. Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J. & Dijck, P. V. Diversity in Genetic In Vivo Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 331–382 (2012).
179. Das, J. *et al.* Exploring mechanisms of human disease through structurally resolved protein interactome networks. *Mol. Biosyst.* **10**, 9–17 (2014).
180. Caligiuri, M. *et al.* MASPIT: Three-Hybrid Trap for Quantitative Proteome Fingerprinting of Small Molecule-Protein Interactions in Mammalian Cells. *Chem. Biol.* **13**, 711–722 (2006).
181. Hounsou, C. *et al.* Time-resolved FRET binding assay to investigate hetero-oligomer binding properties: proof of concept with dopamine D1/D3 heterodimer. *ACS Chem. Biol.* **10**, 466–474 (2015).
182. Borroto-Escuela, D. O. *et al.* Existence of Brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor-Receptor Interactions Regulating 5-HT_{1A} Receptor Recognition. *ACS Omega* **2**, 4779–4789 (2017).

183. Tao, Y.-M. *et al.* Heteromers of μ opioid and dopamine D1 receptors modulate opioid-induced locomotor sensitization in a dopamine-independent manner. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2842–2861 (2017).
184. Armando, S. *et al.* The chemokine CXCR4 and CXCR2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and β arrestin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 4509–4523 (2014).
185. Ayoub, M. A. & Pin, J.-P. R. Interaction of Protease-Activated Receptor 2 with G Proteins and β -Arrestin 1 Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Front. Endocrinol.* **4**, (2013).
186. Siddiqui, S., Cong, W.-N., Daimon, C. M., Martin, B. & Maudsley, S. BRET Biosensor Analysis of Receptor Tyrosine Kinase Functionality. *Front. Endocrinol.* **4**, 46 (2013).
187. Sanni, S. J. *et al.* A bioluminescence resonance energy transfer 2 (BRET2) assay for monitoring seven transmembrane receptor and insulin receptor crosstalk. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **37**, 590–599 (2017).
188. De, A., Jasani, A., Arora, R. & Gambhir, S. S. Evolution of BRET Biosensors from Live Cell to Tissue-Scale In vivo Imaging. *Front. Endocrinol.* **4**, (2013).
189. Kamal, M. *et al.* Improved donor/acceptor BRET couples for monitoring β -arrestin recruitment to G protein-coupled receptors. *Biotechnol. J.* **4**, 1337–1344 (2009).
190. Dacres, H., Michie, M., Wang, J., Pflieger, K. D. G. & Trowell, S. C. Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 625–629 (2012).
191. Li, X. *et al.* Deletions of the Aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J. Biol. Chem.* **272**, 28545–28549 (1997).
192. Dacres, H., Michie, M. & Trowell, S. C. Comparison of enhanced bioluminescence energy transfer donors for protease biosensors. *Anal. Biochem.* **424**, 206–210 (2012).
193. Ossovskaya, V., Lim, S.-T., Ota, N., Schlaepfer, D. D. & Ilic, D. FAK nuclear export signal sequences. *FEBS Lett.* **582**, 2402–2406 (2008).
194. Huang, S. *et al.* A Second CRM1-Dependent Nuclear Export Signal in the Influenza A Virus NS2 Protein Contributes to the Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins. *J. Virol.* **87**, 767–778 (2013).
195. Lange, A. *et al.* Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α . *J. Biol. Chem.* **282**, 5101–5105 (2007).
196. Shimozono, S., Tsutsui, H. & Miyawaki, A. Diffusion of Large Molecules into Assembling Nuclei Revealed Using an Optical Highlighting Technique. *Biophys. J.* **97**, 1288–1294 (2009).
197. Wang, R. & Brattain, M. G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett.* **581**, 3164–3170 (2007).
198. Ghavami, A., van der Giessen, E. & Onck, P. R. Energetics of Transport through the Nuclear Pore Complex. *PLoS One* **11**, e0148876 (2016).
199. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397–405 (2013).

200. Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P. & Boutros, M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin. Cancer Biol.* (2018). doi:10.1016/j.semcan.2018.04.001
201. Büssow, K. Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 81–90 (2015).
202. Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
203. Bak, R. O., Gomez-Ospina, N. & Porteus, M. H. Gene Editing on Center Stage. *Trends Genet. TIG* (2018). doi:10.1016/j.tig.2018.05.004
204. Li, L., Hu, S. & Chen, X. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. *Biomaterials* **171**, 207–218 (2018).
205. Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y. & Kanemaki, M. T. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Rep.* **15**, 210–218 (2016).
206. Peng, J., Zhou, Y., Zhu, S. & Wei, W. High-throughput screens in mammalian cells using the CRISPR-Cas9 system. *FEBS J.* **282**, 2089–2096 (2015).
207. Jones, C. T. *et al.* Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat. Biotechnol.* **28**, 167–171 (2010).
208. Tóth, D. J. *et al.* Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J. Cell Sci.* **125**, 2185–2197 (2012).
209. Sato, H. *et al.* Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J. Med. Chem.* **51**, 1831–1841 (2008).
210. Couturier, C. *et al.* Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19476–19481 (2007).
211. Kawamata, Y. *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* **278**, 9435–9440 (2003).
212. Duboc, H., Taché, Y. & Hofmann, A. F. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **46**, 302–312 (2014).
213. Bochkov, Y. A. & Palmenberg, A. C. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *BioTechniques* **41**, 283–284, 286, 288 passim (2006).
214. Koh, E. Y. C. *et al.* An Internal Ribosome Entry Site (IRES) Mutant Library for Tuning Expression Level of Multiple Genes in Mammalian Cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
215. Poordad, F. *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1195–1206 (2011).
216. Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405–2416 (2011).

217. Issad, T., Boute, N., Boubekeur, S. & Lacasa, D. Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* **87**, 111–116 (2005).
218. Dudgeon, D. D. *et al.* Characterization and Optimization of a Novel Protein–Protein Interaction Biosensor High-Content Screening Assay to Identify Disruptors of the Interactions Between p53 and hDM2. *Assay Drug Dev. Technol.* **8**, 437–458 (2010).
219. Banaszynski, L. A. & Wandless, T. J. Conditional Control of Protein Function. *Chem. Biol.* **13**, 11–21 (2006).
220. Djannatian, M. S., Galinski, S., Fischer, T. M. & Rossner, M. J. Studying G protein-coupled receptor activation using split-tobacco etch virus assays. *Anal. Biochem.* **412**, 141–152 (2011).
221. Galinski, S., Wichert, S. P., Rossner, M. J. & Wehr, M. C. Multiplexed profiling of GPCR activities by combining split TEV assays and EXT-based barcoded readouts. *Sci. Rep.* **8**, 8137 (2018).
222. Zetsche, B., Volz, S. E. & Zhang, F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* **33**, 139–142 (2015).
223. Wintgens, J. P., Rossner, M. J. & Wehr, M. C. Characterizing Dynamic Protein–Protein Interactions Using the Genetically Encoded Split Biosensor Assay Technique Split TEV. in *Synthetic Protein Switches* 219–238 (Humana Press, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6940-1_14
224. Kamal, M. *et al.* Improved donor/acceptor BRET couples for monitoring beta-arrestin recruitment to G protein-coupled receptors. *Biotechnol. J.* **4**, 1337–1344 (2009).