

La green fluorescent protein : application à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens

Virginie Georget
Jean-Claude Nicolas
Charles Sultan

La *green fluorescent protein* (GFP) est une protéine extraite de la méduse *Aequorea victoria*. Cette protéine a la particularité d'émettre de la fluorescence sous UV sans l'ajout de substrat ou de co-facteurs. Le clonage de son gène et l'étude de son expression dans des bactéries ou dans des organismes plus complexes tel que *C. elegans* ont enrichi les perspectives de son application dans la recherche biomédicale. Le gène de la GFP est aujourd'hui utilisé comme gène rapporteur, comme marqueur cellulaire ou encore comme marqueur moléculaire. Le gène codant pour la GFP a par exemple été fusionné aux gènes codant pour des récepteurs stéroïdiens afin de connaître la dynamique intracellulaire de ces récepteurs. A ce jour, ont été rapportées les protéines de fusion avec le récepteur des glucocorticoïdes (GFP-GR), le récepteur des minéralocorticoïdes (GFP-MR) et le récepteur des androgènes (GFP-AR). La fluorescence émise par la GFP permet de localiser les protéines dans les compartiments cellulaires et d'en définir ainsi les déplacements lors de stimulations diverses, rendant accessible la visualisation d'événements cellulaires dynamiques.

ADRESSES

V. Georget: étudiante en thèse. J.C. Nicolas: directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U.439, Pathologie moléculaire des récepteurs nucléaires, 70, rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France. C. Sultan: professeur de médecine à l'université de Montpellier I. Inserm U.439, Pathologie moléculaire des récepteurs nucléaires, 70, rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France. Unité BEDR, hôpital Lapeyronie, 34295 Montpellier Cedex 5, France. Unité d'endocrinologie pédiatrique, Hôpital A.-de-Villeneuve, 34295 Montpellier Cedex 5, France.

L'un des enjeux de la biologie cellulaire et moléculaire est de comprendre les mécanismes d'un événement qui se produit au sein d'un organisme ou d'une cellule vivante. Cependant, les techniques disponibles permettant d'étudier la cellule vivante sont encore rares. Le développement d'une méthode simple

qui permet la visualisation d'événements cellulaires dans leur environnement naturel constitue donc une avancée importante en biologie cellulaire: cette méthode repose sur la *green fluorescent protein* (GFP), protéine fluorescente extraite de la méduse *Aequorea victoria*. Le clonage du gène de la GFP dans un premier temps [1] et l'étude de son expres-

sion dans des organismes tels que la bactérie *Escherichia coli* ou le nématode *Caenorhabditis elegans*, dans un second temps, [2] ont ouvert de nombreuses perspectives dans l'utilisation de cette protéine en biologie cellulaire et en génétique moléculaire. Le système GFP est aujourd'hui utilisé comme marqueur cellulaire pour identifier puis trier une population cellulaire transformée [3], comme gène rapporteur pour mesurer l'expression d'un gène dans des cellules vivantes [2], ou encore comme marqueur moléculaire pour visualiser, dans une cellule vivante, la dynamique d'une protéine fusionnée à la GFP [4]. Dans cet article, nous développerons plus particulièrement ce dernier aspect dans l'étude de la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens.

Green fluorescent protein : structure, fonctionnement

Parmi les nombreux organismes bioluminescents, la méduse *Aequorea victoria* peut émettre une lumière verte de ses photocytes jusqu'aux bords de son ombrelle [5]. Cette fluorescence est engendrée par l'activation séquentielle de deux protéines : l'aequorine, une protéine dépendante du calcium et la *green fluorescent protein* (GFP) (figure 1). En présence d'oxygène, l'aequorine est couplée à la coelentérazine. La fixation de calcium provoque un changement conformationnel de l'aequorine qui induit une oxygénation de la coelentérazine. Cette réaction d'oxygénation s'accompagne d'une émission de lumière bleue. Dans la méduse, un transfert d'énergie entre l'aequorine et la GFP conduit à l'émission d'une lumière verte [6]. *In vitro*, la fluorescence de la GFP peut être obtenue par excitation en lumière bleue ou en UV.

La GFP est une protéine de 238 acides aminés avec une masse molaire de 27 à 30 kDa en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) [7]. Cette protéine est très stable et résistante à de nombreuses conditions physico-chimiques dénaturantes. *In vitro*, la GFP conserve sa fluorescence à des températures aussi élevées que 65 °C et dans une gamme de pH de 5,5 à 12 avec, toutefois, une diminution

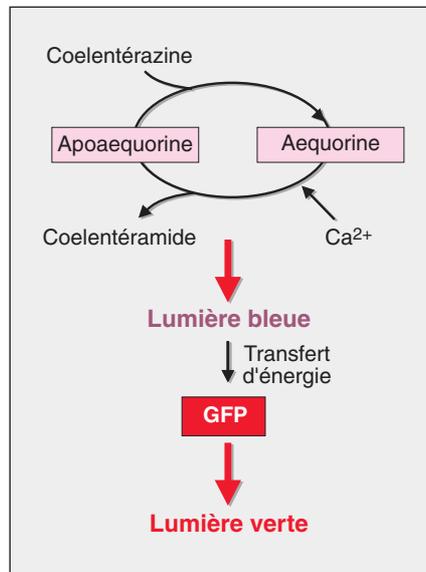


Figure 1. **Mécanisme d'activation de la GFP dans la méduse *Aequorea victoria*.** En présence d'oxygène, l'aequorine est une protéine dépendante du calcium couplée à la coelentérazine. La fixation de calcium provoque un changement conformationnel de l'aequorine qui induit une oxygénation de la coelentérazine. Cette réaction d'oxydation s'accompagne d'une émission de lumière bleue. Il s'établit alors un transfert d'énergie entre l'aequorine et la GFP. Ce transfert d'énergie conduit à l'émission d'une lumière verte de la GFP.

d'intensité pour des pH inférieurs à 7. La fluorescence de la GFP résiste dans des solutions qui contiennent jusqu'à 6M d'hydrochlorure de guanidium, 8M d'urée, 1 % de SDS ou dans des solvants organiques dilués. La GFP reste aussi fluorescente après fixation des cellules par du glutaraldéhyde ou du paraformaldéhyde. Même si la majeure partie de la protéine (acides aminés 7 à 229) est nécessaire à l'acquisition de la fluorescence de la GFP [8], son chromophore n'est constitué que de trois acides aminés en position Ser65-Tyr66-Gly67 [9]. *In vitro*, la GFP est donc fluorescente sans ajout de substrat ou de co-facteurs [2]. Sa cristallisation révèle que la protéine est constituée de 11 feuillets β , d'une hélice α qui contient le chromophore et de boucles entre les feuillets [10, 11]. Les 11 feuillets β forment une cage dans laquelle est emprisonné le chromophore, les boucles



Figure 2. **Structure cristallographique de la GFP.** La GFP est constituée de 11 feuillets β et d'une hélice α . Les feuillets β sont disposés en parallèle et forment une cage dans laquelle est enfermée l'hélice α qui contient le chromophore. Les boucles entre les feuillets β forment le plancher de la cage. Cette forme surprenante de la GFP est appelée « β can ». (Cette image a été reproduite avec l'aimable autorisation de M. T.D. Romo, Université de Rice.)

formant le plancher de la cage (figure 2). Cette forme surprenante de la GFP est appelée forme « β -can ». La formation du chromophore au sein de la cage se produit par une modification post-traductionnelle autocatalytique des acides aminés 65-67. Ces trois résidus sont dans un premier temps cyclisés puis oxydés pour former le chromophore p-hydroxybenzylidène-imidazolidinone (figure 3) [7, 12, 13]. C'est seulement après l'oxydation que la GFP est fluorescente. Cette oxydation est également suivie d'un cycle de protonation-déprotonation. La formation de ce chromophore actif se produit en 2 à 4 heures environ. La GFP native présente deux pics d'absorption, un pic majeur à 395 nm et un pic d'une moindre intensité autour de 477 nm, et un pic d'émission à 509 nm. Ces deux pics d'absorption semblent être associés à deux formes isomères du chromophore qui peuvent être sous

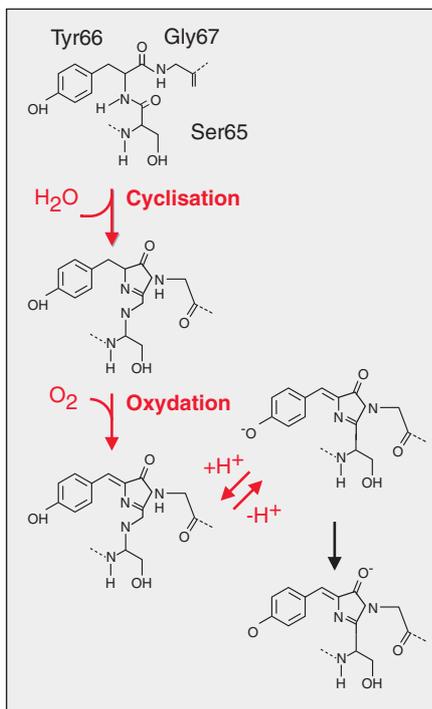


Figure 3. **Formation du chromophore de la GFP.** Le chromophore de la GFP est constitué des trois acides aminés Ser-Tyr-Gly en position 65 à 67. Sa formation se produit après une cyclisation entre les acides aminés 65 et 67 puis une oxydation. Le chromophore *p*-hydroxybenzylidène-imidazolidinone est alors constitué. Il sera sous forme protoné ou déprotoné. C'est seulement après l'oxygénation que la GFP peut être fluorescente.

forme stable et sous forme excitée. Après irradiation à 395 nm, la forme stable absorbe à 477 nm. Cette propriété est d'ailleurs à la base d'une application de la GFP. Elle consiste à irradier par un laser UV (395 nm) la GFP, ce qui augmente la forme qui absorbe à 477 nm et la fluorescence de la GFP lorsqu'elle est excitée à cette longueur d'onde d'où son nom de sur-fluorescence [14]. Ces deux isomères correspondent à des formes protonées et déprotonées [7] qui sont maintenant mieux comprises depuis la cristallisation de la GFP sauvage [11] et qui sont dues à des interactions spécifiques entre les acides aminés du chromophore et les acides aminés des feuilletts β positionnés sur la face interne de la cage [15]. A ce jour, de nombreuses variantes de la

GFP existent, chacune apportant de nouvelles propriétés de fluorescence. La GFP-S65T est mutée dans le chromophore en position 65 et substituée une thréonine à la sérine [16]. Cette GFP présente des caractéristiques de fluorescence modifiées (Tableau I). En effet, la mutation simplifie le spectre à un seul pic d'absorption à 488 nm [16], ce qui permet de détecter cette GFP avec des filtres classiques de fluorescéine isothiocyanate (FITC). De plus, cette substitution qui induit une fluorescence six fois plus forte que celle de la GFP sauvage est plus résistante au photoblanchiment. Certaines mutations telles que la S65T sont connues pour augmenter la vitesse de formation du chromophore et notamment la cyclisation, ce qui réduit le temps de latence entre la synthèse et la fluorescence de la GFP [16]. Pour la plupart des GFP, la formation optimale du fluorophore dépend du pH et de la température. Par exemple, la GFP native est plus fluorescente à 28 °C qu'à 37 °C [17]. Trois GFP mutées, l' α -GFP mutée en position F100S/M154T/V164A [18], l'EGFP (*enhanced-GFP*) mutée en F64L/S65T [19, 20] et la GFP mutée S65T/S147P [21] ont la capacité d'acquiescer la conformation correcte à toute température physiologique [21, 22] (Tableau I). Ces dernières, beaucoup plus fluorescentes que la GFP sauvage, sont les candidates idéales pour une étude en cellule vivante. Néanmoins, l'intensité de fluorescence des GFP S65T et de l'EGFP diminue très rapidement à des pH inférieurs à 7, contrairement à la GFP sauvage et l' α -GFP qui sont résistantes à une large gamme de pH [22]. Cette propriété est maintenant utilisée pour mesurer des variations de pH au sein de différents compartiments d'une seule cellule [23]. En revanche, ces GFP ne sont pas adaptées pour l'étude de phénomènes qui se déroulent dans des compartiments acides tels que les lysosomes ou les endosomes. La stabilité de la GFP représente un avantage dans des applications de marquage moléculaire mais elle peut aussi être un inconvénient quand le gène de la GFP est utilisé comme gène rapporteur. Cette stabilité ne permet pas d'étudier des phénomènes de synthèse rapide et transitoire. C'est

pourquoi, de nouvelles constructions de la GFP ont été récemment développées : il s'agit de la fusion à la partie carboxy-terminale de la GFP de petits peptides qui seraient susceptibles de rendre la GFP plus sensible aux protéases et donc de réduire son temps de demi-vie [24]. De plus, une nouvelle GFP déstabilisée est aujourd'hui commercialisée. Elle a un temps de demi-vie réduit à 2 heures. Il n'y a donc pas une seule GFP idéale pour toutes les recherches en biologie cellulaire ou moléculaire : chaque GFP présente des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte pour une utilisation efficace [22].

Le mutant Y66H et le double mutant Y66H/Y145F cristallisé par Watcher [25] émettent une lumière bleue à 445 nm lorsqu'ils sont excités à 381 nm [26] (Tableau I). Ces mutants ont été les premières GFP décrites qui émettent une fluorescence de couleur différente et sont donc appelés BFP (*blue fluorescent protein*). Il existe également maintenant l'EBFP [27]. De même que le mutant EYFP (S65G/S72A/T203Y/V68L) émet une fluorescence jaune à 527 nm après une excitation à 513 nm [10]. Toute cette nouvelle gamme de GFP avec des spectres d'excitation et d'émission altérés est importante pour au moins deux raisons. Tout d'abord, ces GFP sont un outil supplémentaire pour l'étude de plusieurs molécules exprimées simultanément dans la même cellule vivante. En effet, en utilisant des filtres très spécifiques, il est possible de détecter jusqu'à trois GFP différentes dans la même cellule [26]. Ces mutants peuvent également servir de donneur ou d'accepteur d'énergie dans un système de transfert d'énergie (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*) [26].

Green fluorescent protein : applications

Grâce à toutes ses propriétés, la GFP est une protéine de choix dans la biologie du vivant et de nombreuses applications ont déjà été rapportées à ce jour.

GFP gène rapporteur

Le gène de la GFP peut être utilisé en tant que gène rapporteur. Le

Tableau I
LES VARIANTS DE LA GFP ET LEURS CARACTÉRISTIQUES

Nom	Mutations	Caractéristiques spectrométriques		Propriétés
		absorption (nm)	émission (nm)	
GFP		395 (et 477)	509	utile pour les approches de surfluorescence
GFP-S65T	S65T	488	510	fluorescence augmentée (six fois) plus résistante au photoblanchiment vitesse de cyclisation augmentée fluorescence diminuée à pH < 7
α -GFP	F100S/MIS4T/V164A			formation du chromophore à 37 °C résistante à une large gamme de pH vitesse de cyclisation augmentée
E-GFP	F64L/S65T	488	507	formation du chromophore à 37 °C vitesse de cyclisation augmentée idéale pour une étude en cellule vivante fluorescence diminuée à pH < 7
d2EGFP		488	507	forme déstabilisée de la GFP temps de demi-vie de 2 heures utile comme gène rapporteur
S65T/S147P	S65T/S147P			formation du chromophore à 37 °C
BFP	Y66H ou Y66H/Y145F	381	445	fluorescence bleue
EBFP	F64L/Y66H	380	440	fluorescence bleue plus forte utile pour la colocalisation FRET
EYFP	S65G/S72A/T203Y/V68L	513	527	fluorescence jaune

De nombreux variants de la GFP dérivent de la GFP sauvage. Chacune de ces formes mutées de la GFP apportent de nouvelles propriétés de fluorescence et sont donc mieux adaptées pour certaines approches technologiques. Il n'y a donc pas une GFP idéale mais chacune présente des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte pour une utilisation efficace.

gène de la GFP, sous la dépendance d'un promoteur d'intérêt, témoigne de l'activité de ce promoteur par la simple fluorescence émise de la GFP. La GFP présente certains avantages par rapport à d'autres protéines telles que la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) ou la β -galactosidase, dont les gènes sont souvent utilisés comme gènes rapporteurs. Tout d'abord, la mesure de la fluorescence est une quantification du nombre de protéines synthétisées et non pas le dosage d'une activité enzymatique. La GFP est détectable dans des cellules vivantes, ce qui permet de mesurer une fluorescence émise par des cellules ou par un tissu, à plusieurs

reprises, à différents temps et dans des conditions expérimentalement maîtrisées. Il n'est pas nécessaire de fixer ou de préparer la cellule pour la révélation. Il est possible, avec la GFP, de caractériser l'induction de l'expression d'un gène dans une seule cellule. Ce modèle apparaît alors comme un système d'étude parfaitement adapté pour le criblage de produits. Il a en effet été décrit une lignée cellulaire exprimant la GFP sous la dépendance d'un promoteur HIV-1 *long terminal repeat* qui émet une fluorescence après infection de ces cellules [28]. Cette lignée cellulaire devient alors un outil de criblage rapide et sensible de molécules

antivirales. Cependant, à ce jour, peu d'études rapportent l'utilisation du gène de la GFP comme gène rapporteur, seuls quelques vecteurs tels que les adénovirus utilisés en thérapie génique ont été développés [29]. Il faut préciser que l'utilisation du gène de la GFP comme gène rapporteur présente quelques limites. Il est parfois techniquement difficile de détecter de trop faibles intensités de fluorescence. De plus, le temps de latence qui existe entre la synthèse de la GFP et sa fluorescence peut être une limite lorsque l'on veut étudier des événements rapides après une activation transcriptionnelle. La stabilité de la GFP peut aussi être une

limite dans des études d'expression très transitoire. Enfin, la restriction majeure à l'utilisation du gène de la GFP en tant que gène rapporteur est liée aux limites d'intensité de fluorescence quantifiables. La limite inférieure: le signal doit être distingué du bruit de fond de fluorescence qui est variable suivant les cellules, et la limite supérieure: toutes les GFP synthétisées ne sont pas fluorescentes lors d'une synthèse importante de protéines, car l'étape d'oxydation de la tyrosine devient limitante.

Apparemment, le gène rapporteur GFP ne constitue pas un progrès majeur par rapport au gène rapporteur *luciférase*, largement utilisé. Cependant, la synthèse de la GFP sous la dépendance d'un promoteur spécifique permet d'étudier l'expression d'un gène dans une seule cellule et de déterminer le lieu et le moment de son expression dans un organisme.

GFP marqueur cellulaire

Inversement, par sa facilité et sa rapidité de détection, la GFP est une protéine candidate idéale comme marqueur cellulaire. Cette application est d'ores et déjà très répandue: c'est certainement celle qui connaîtra le plus grand essor. Lors d'une co-transfection de deux vecteurs codant pour deux protéines, dont la GFP, la fluorescence permet de sélectionner, dans une population cellulaire, les cellules qui co-expriment les deux protéines par un simple tri des cellules fluorescentes. Ce tri se fait communément par un FACS (*fluorescence activated cell sorter*) et peut être réalisé dans le cadre d'une transfection transitoire dans le but d'établir une lignée stable [3]. Par FACS, il est également possible de trier des populations cellulaires exprimant des GFP différentes: des cellules positives pour la GFP, d'autres positives pour la BFP et des cellules qui co-expriment simultanément les deux protéines fluorescentes [30, 31]. Dans l'établissement d'animaux transgéniques, la sélection des cellules souches exprimant la protéine transgène est une étape importante. Elle peut maintenant se réaliser par un simple tri de cellules fluorescentes co-exprimant la GFP et la protéine transgène. De plus, la GFP n'est pas

toxique chez les animaux transgéniques. Ainsi, par une sélection de cellules souches positives pour l'EGFP, Okabe *et al.* ont obtenu des souris transgéniques vertes [32] dont tous les organes sont fluorescents.

La GFP peut également servir comme marqueur pour suivre le devenir d'un type cellulaire dans un organisme, par exemple la progression de cellules tumorales GFP-positives dans une souris *nude* [33].

GFP marqueur moléculaire

La GFP peut aussi être fusionnée à des protéines afin d'étudier leur localisation cellulaire et d'analyser leur devenir dans des cellules vivantes. La protéine de fusion peut être obtenue par des techniques classiques de sous-clonage à partir de toute une gamme de vecteurs d'expression commercialisés possédant des multisites de clonage adjacents aux séquences codant pour l'extrémité amino-terminale ou carboxy-terminale du gène de la GFP. Cette construction est introduite par transfection de manière transitoire ou stable dans le système d'expression choisi. La fluorescence peut ensuite être détectée par différentes technologies microscopiques munies d'un filtre FITC.

La fluorescence dans la cellule peut être analysée par un microscope confocal qui permet une reconstitution tri-dimensionnelle de la cellule à partir des couches successives réalisées dans la cellule. Le microscope confocal apporte une très bonne définition de l'image de la cellule et donc une localisation précise de la fluorescence. Toutefois, il n'est pas très adapté dans des études de cinétique et est utilisé le plus souvent pour observer des cellules fixées: la durée et la répétition des mesures de la cellule conduisent à un photoblanchiment de la fluorescence et à la mort de la cellule.

Le cytomètre à balayage est une autre technique d'analyse de fluorescence. Le temps d'acquisition de l'image d'une cellule est plus long que celui d'un microscope confocal, ce qui permet d'utiliser une puissance de laser beaucoup plus faible et ainsi de conserver l'intégrité de la cellule. Il est, en revanche, beaucoup moins résolutif. Ce microscope muni de son laser à puissance maximale est parfaitement

adapté pour les études de photoblanchiment décrites ultérieurement.

Le microscope à épifluorescence offre un bon compromis entre la définition de l'image, la rapidité d'acquisition et la viabilité de la cellule. C'est également le plus adapté à des études de cinétique sur des cellules vivantes: ainsi, contrairement aux techniques d'immunomarquage, la même cellule peut être observée dans différentes conditions. La GFP permet donc de visualiser en temps réel et dans l'espace la protéine d'intérêt.

La GFP seule est distribuée uniformément dans la cellule alors que fusionnée à la protéine analysée, la fluorescence a pu être détectée dans des compartiments très divers de la cellule [34, 35]. La GFP a notamment été fusionnée avec des protéines impliquées dans le cytosquelette [36], des protéines du réticulum endoplasmique [37], de l'appareil de Golgi [38], des mitochondries [39], mais également des protéines membranaires pour suivre la localisation des récepteurs membranaires, leur internalisation et leur recyclage [40]. Précisons qu'en général la GFP ne modifie pas la fonction de ces protéines malgré son poids moléculaire élevé (27 kDa). Ont aussi été décrites des protéines chimériques de la GFP avec des protéines cytoplasmiques ou nucléaires, telles que les récepteurs stéroïdiens.

Application à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens

Les récepteurs stéroïdiens appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il s'agit de facteurs transcriptionnels qui règlent – après activation par un ligand spécifique – l'expression de gènes cibles [41, 42]. Cette famille comprend le récepteur des œstrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR), le récepteur des minéralocorticoïdes (MR), le récepteur des glucocorticoïdes (GR) [43] et enfin le récepteur des androgènes (AR).

Ces récepteurs présentent une grande homologie de leur structure primaire, fondée sur la présence de quatre grands domaines: le domaine amino-terminal, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière et

le domaine de liaison de l'hormone (LBD). Alors que le mécanisme d'action moléculaire des différents membres de la famille des récepteurs nucléaires apparaît très similaire, leur localisation cellulaire en l'absence d'hormone est différente [44].

L'analyse de la distribution cellulaire de ces récepteurs a été réalisée par immunomarquage de cellules ou de tissus. Il est généralement reconnu que ER et PR sont des récepteurs nucléaires en l'absence d'hormone [45, 46] avec toutefois une navette (*shuttle*) entre le cytoplasme et le noyau [47]. La localisation cellulaire de MR, GR et AR a été très longtemps controversée. En fonction de l'anticorps utilisé, MR apparaît uniquement cytoplasmique ou à la fois cytoplasmique et nucléaire [48]. Des données contradictoires ont été également rapportées pour GR en fonction des conditions de fixation et de perméabilisation des cellules [43]. AR a été trouvé dans le noyau des cellules dans des tissus cibles [49, 50], alors que dans des cellules transfectées, il a été visualisé dans le noyau ou le cytoplasme uniquement ou dans les deux compartiments cellulaires simultanément [51, 52]. Ces discordances de localisation ont souvent été attribuées aux techniques d'immunomarquage qui nécessitent la fixation et la perméabilisation des cellules, ainsi que l'utilisation d'anticorps avec des spécificités relatives, chacune de ces étapes pouvant conduire à des artéfacts.

C'est pourquoi différents groupes ont entrepris d'étudier la dynamique des récepteurs stéroïdiens. Il a été décrit une protéine de fusion entre la GFP et le GR (GFP-GR) [53, 54], entre la GFP et le AR (GFP-AR) [55] et, plus récemment, une protéine de fusion entre la GFP et le MR (GFP-MR) [56]. Chacune de ces constructions a été transfectée dans plusieurs types cellulaires. Dans un premier temps, la localisation cellulaire en l'absence d'hormone a été déterminée puis la dynamique du récepteur – sous forme de cinétique en présence d'agonistes, mais également d'antagonistes – a été analysée.

GFP-GR

C'est le groupe d'Ogawa qui le premier a décrit une GFP-GR en fusion-

nant la GFP à un GR tronqué de ses 131 premiers acides aminés [54]. GFP-GR est transcriptionnellement active. Cette protéine chimérique est cytoplasmique en l'absence d'hormone dans la lignée cellulaire COS-1, dans une lignée dérivée de tumeur épithéliale de carpe ou encore dans une culture primaire de cellules de la rétine d'un embryon de poulet. GFP-GR rentre très rapidement dans le noyau en présence de dexaméthasone. La fluorescence est uniformément distribuée dans le noyau mais est exclue des nucléoles. En revanche, Htun *et al.* observent que GFP-GR-C656G, en présence de dexaméthasone, forme rapidement des regroupements dans le noyau [53]. Cette GFP-GR-C656G est une protéine de fusion entre la GFP-S65T et une protéine GR mutée. Le remplacement de la cystéine 656 par une glycine dans le domaine de liaison de l'hormone a pour effet d'augmenter l'affinité du récepteur pour la dexaméthasone d'un facteur 9. A faible concentration de dexaméthasone, il y a activation de GFP-GR-C656G sans activation du GR endogène. GFP-GR-C656G est exprimée dans une lignée cellulaire qui a intégré dans son génome plusieurs copies du gène rapporteur MMTV-CAT. Ces regroupements sont observés par microscopie confocale et apparaissent comme des points très fluorescents dans le noyau. De plus, l'antagoniste RU486 induit le transfert de GFP-GR-C656G dans le noyau mais ne conduit pas à la formation de ces points fluorescents. D'après les auteurs, ces regroupements correspondraient donc à des sites potentiels transcriptionnellement actifs [53]. Afin de vérifier la spécificité de ces points fluorescents, les auteurs ont construit une protéine de fusion entre la GFP et un GR mutant incapable de lier l'ADN. Cette GFP-GR-mutant conserve la capacité de rentrer dans le noyau mais ne forme pas de regroupements; cela confirme l'hypothèse de la formation de ces regroupements sur des sites spécifiques d'ADN. Plus récemment, ces auteurs ont analysé la distribution de GFP-GR-C656G dans une autre lignée cellulaire (lignée 3134). Ces cellules contiennent un large fragment d'ADN intégré dans le génome comportant plusieurs MMTV en tandem [57]. Dans

cette lignée cellulaire, un large site fluorescent est observé par microscopie confocale, formant une structure en forme de ruban après reconstruction tridimensionnelle. Ce ruban fluorescent caractériserait la fixation de nombreux GFP-GR sur le tandem de MMTV. Cependant, la résolution de la microscopie confocale ne permet pas la visualisation de l'ADN sous forme chromatinienne; la visualisation de la fixation de protéines fluorescentes sur l'ADN n'est donc pas envisageable par cette technique. On ne peut assurer le caractère significatif de ce ruban fluorescent que par des méthodes indirectes. Ces auteurs ont également construit une protéine de fusion entre la GFP et un GR muté qui, cette fois, modifie la spécificité de reconnaissance de l'élément de réponse au GR [57]. Ce mutant reconnaît alors l'élément de réponse au ER. Transfectée dans la lignée 3134, cette nouvelle protéine chimère rentre dans le noyau après incubation avec la dexaméthasone mais ne forme pas de regroupements en forme de ruban. Cela confirme une fois encore la spécificité de ces points fluorescents. La formation de cette structure révélerait la liaison de GFP-GR sur le tandem de MMTV. Ainsi, par l'intermédiaire de la GFP, il serait possible de visualiser, dans des cellules vivantes, la liaison des récepteurs stéroïdiens sur l'ADN. Il reste toutefois à faire la preuve directe de l'interaction de GFP-GR-C656G sur ces MMTV.

GFP-MR

Une protéine de fusion entre l'EGFP et le MR de rat a été récemment rapportée [56]. Contrairement à GFP-GR, GFP-MR est à la fois cytoplasmique et nucléaire en l'absence d'hormone. Cette localisation cellulaire a été observée dans trois lignées cellulaires différentes: cellules CHO, MDCK et CV-1. En présence d'aldostérone, le récepteur est nucléaire dans toutes les cellules transfectées. Des études cinétiques ont alors été réalisées et ont révélé qu'en dix minutes, la totalité du récepteur était nucléaire [56]. Après cinq minutes d'incubation apparaissent des points concentrés fluorescents dans le noyau. En présence d'antagonistes, tels que la spironolactone ou le

ZK91587, le transfert au noyau est faible même à de fortes concentrations. Ces deux antihormones non seulement n'induisent pas la formation de points fluorescents dans le noyau mais inversent leur formation induite par l'aldostérone. Les auteurs évaluent à 1 500-4 500 le nombre de points fluorescents par noyau en présence d'agonistes. Même si ces structures sont retenues sur une préparation de matrice nucléaire, il paraît difficile de penser que chaque *cluster*, soit plusieurs GFP-MR, sont fixés sur son élément de réponse [56]. En effet, contrairement à ce qui était réalisé dans le travail de Htun *et al.* [53], les cellules utilisées dans cette étude ne contiennent dans leur génome que les sites naturels des gènes réglés par les minéralocorticoïdes. Le nombre de points fluorescents ne correspondrait donc pas au nombre de gènes cibles. Les auteurs retiennent l'hypothèse d'un regroupement des GFP-MR sur des régions de la chromatine qui dirigeraient ces récepteurs activés vers leurs gènes cibles [56].

GFP-AR

Nous avons développé une étude de la protéine de fusion GFP-AR [55]. Dans un premier temps, nous avons vérifié que la protéine de fusion conservait les caractéristiques fonctionnelles de l'AR. Nous avons, notamment, mesuré sa constante d'affinité pour l'androgène non métabolisable (le R1881), ainsi que sa capacité d'induire une activité transcriptionnelle sur un gène rapporteur luciférase sous la dépendance d'un promoteur spécifique des androgènes. Nos résultats montrent que la fusion de la GFP sur le domaine amino-terminal de l'AR ne modifie pas ses caractéristiques fonctionnelles. Ces propriétés étant conservées, nous avons analysé par fluorescence la GFP-AR exprimée dans des cellules COS-7 transfectées transitoirement. Alors que la GFP est distribuée uniformément dans la cellule entre le cytoplasme et le noyau, GFP-AR réside de manière prédominante dans le cytoplasme en absence d'hormone et devient nucléaire en présence d'androgène (figure 4). Nous avons alors étudié la cinétique de la dynamique de l'AR en présence

d'androgènes. Les cellules sont incubées en présence de R1881 sous le microscope à épifluorescence. Ce microscope est relié à une caméra CCD qui permet une capture et un stockage de l'image de la cellule. Nous observons et nous enregistrons le mouvement de la GFP-AR dans la même cellule toutes les 15 minutes environ. Nous avons observé que des enregistrements plus fréquents de la cellule ne diminuent pas la fluorescence mais sont létales pour la cellule. Pour chaque image acquise, nous pouvons quantifier le pourcentage de la fluorescence nucléaire par rapport à la fluorescence totale. Nous avons démontré que l'AR, qui est cytoplasmique en l'absence d'hormone, est rapidement transporté dans le noyau. Ce phénomène est visible après seulement quelques minutes d'incubation; il est complet après une heure d'incubation en présence de forte concentration d'androgènes (R1881 10^{-6} M). Cette dynamique intracellulaire de l'AR dépend de la concentration. Ce n'est pas la vitesse d'entrée du récepteur dans le noyau qui varie en fonction de la concentration d'hormone mais la quantité de récepteurs importés dans le noyau. La quantité de récep-

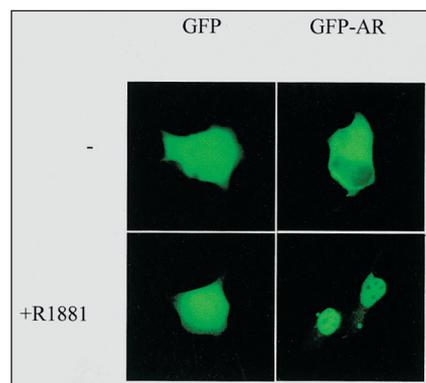


Figure 4. Localisation cellulaire de la GFP et de la protéine de fusion GFP-AR. La GFP et la protéine de fusion entre GFP et le récepteur des androgènes (GFP-AR) sont exprimées dans des cellules COS-7 puis observées en microscopie à fluorescence. La GFP est distribuée uniformément dans toute la cellule et cette localisation n'est pas modifiée en présence d'androgène non métabolisable (R1881). GFP-AR, en l'absence d'hormone, est cytoplasmique et elle est nucléaire après addition de R1881.

teurs importés dépend également de l'affinité du récepteur pour le ligand. Ainsi, pour les trois principaux androgènes testés, l'importance du transfert nucléaire est formulée ainsi: R1881 > dihydrotestostérone > testostérone. Le transport nucléaire de l'AR est donc également hormono-dépendant.

Les androgènes, *via* l'AR, sont impliqués dans la différenciation, le développement et le maintien des organes génitaux internes et externes. De nombreuses mutations de l'AR ont été rapportées au cours d'insensibilités partielles aux androgènes (IPA) et d'insensibilités complètes aux androgènes (ICA) [58, 59]. Parmi les diverses mutations décrites dans notre groupe [60, 61], nous avons appliqué le modèle de la GFP-AR à trois mutations. L'une d'entre elles, la substitution L707R est associée à une ICA [62] et deux autres mutations, R840C et dans une forme plus sévère G743V sont associées à des IPA [63]. Ces trois mutations sont situées dans le domaine de liaison de l'hormone du récepteur. Elles présentent toutes une altération de l'affinité pour R1881, allant jusqu'à l'absence totale de liaison de l'hormone pour la mutation L707R. Cependant, une différence importante apparaît entre les mutants R840C et G743V: bien qu'ils présentent une diminution similaire de l'affinité pour le R1881, l'augmentation de la vitesse de dissociation qu'ils induisent est nettement plus élevée pour G743V que pour R840C. Nous avons réalisé des cinétiques sur des cellules COS-7 transfectées par des vecteurs d'expression codant pour chacun de ces récepteurs mutés. Les cellules sont alors incubées en présence de 10^{-6} , 10^{-7} ou 10^{-9} M de dihydrotestostérone. La GFP-AR-L707R est cytoplasmique en l'absence d'hormone et reste dans le cytoplasme en présence de DHT 10^{-6} M. GFP-AR-R840C et GFP-AR-G743V entrent dans le noyau en présence de 10^{-6} M de DHT, de manière quasi identique au récepteur sauvage. En revanche, à une concentration physiologique (10^{-9} M), GFP-AR-R840C entre très lentement et partiellement dans le noyau alors que GFP-AR-G743V n'y est que faiblement transporté même après 24 heures d'incubation (figure 5) [63]. Une certaine instabilité du complexe hor-

monorecepteur due à cette baisse d'affinité du récepteur pour l'hormone et surtout à une vitesse de dissociation augmentée peut expliquer ces données. Nous observons que la capacité de ces mutants à entrer dans le noyau est en corrélation avec le degré de sévérité de l'insensibilité aux androgènes des trois patients. Contrairement à d'autres techniques *in vitro*, le modèle GFP-AR nous permet d'observer la dynamique du complexe hormone-récepteur dans des cellules vivantes et aussi l'impact d'une mutation du LBD. Ainsi, nous mettons en évidence une relation directe entre la dynamique intracellulaire de l'AR et le degré de sévérité de l'insensibilité associée à des mutations du LBD. GFP-AR devient alors un outil complémentaire pour la compréhension des relations structure/fonction de l'AR dans le cadre des IPA.

Les anti-androgènes agissent à travers une compétition avec les androgènes

pour une liaison à AR. Après liaison à l'AR, certaines de ces molécules ont une action antagoniste mais également une activité agoniste aux fortes concentrations. Il s'agit alors d'agonistes partiels contrairement aux autres antihormones qui sont des antagonistes purs. Nous avons analysé la capacité de plusieurs anti-androgènes de freiner le transfert de GFP-AR dans le noyau et essayé de le corréler à leurs activités agonistes et antagonistes. Nous avons testé des anti-androgènes stéroïdiens (l'acétate de cyprotérone et le RU 2956) et des anti-androgènes non stéroïdiens (l'hydroxy-flutamide, le casodex, l'inocotérone et le nilutamide). En l'absence d'androgène, la plupart des anti-androgènes ont la capacité d'induire le transport de GFP-AR dans le noyau (*figure 6*). Cependant, le casodex et le nilutamide n'induisent que peu le transfert de GFP-AR dans le noyau. De plus, en compétition avec l'androgène, ces deux anti-

androgènes sont capables de retenir partiellement GFP-AR dans le cytoplasme (*figure 6*). Ces deux anti-androgènes peuvent être considérés comme des anti-androgènes purs par leur seule activité antagoniste.

GFP-AR apparaît alors comme un nouvel outil de criblage d'anti-androgènes.

Conclusions et perspectives

L'application de la GFP aux récepteurs stéroïdiens a permis de déterminer que GR et AR sont cytoplasmiques en l'absence d'hormone alors que le MR semble être dans le cytoplasme mais également dans le noyau. En présence de ligand, GFP-AR, GFP-GR et GFP-MR sont nucléaires. Les protéines de fusion GFP-récepteurs stéroïdiens apportent de nombreuses informations sur leur dynamique dans la cellule et sur leur mécanisme d'action; elles ouvrent également de nombreuses pistes d'investigation nouvelles. Les récepteurs stéroïdiens sont des protéines qui, tout au long de leur action dans la cellule, sont associées à des protéines. Il s'agit des protéines chaperonnes telles que les *heat shock protein* ou encore des facteurs de transcription lors de l'action transcriptionnelle. L'une des applications de la GFP est l'étude d'interaction protéine-protéine. Elle repose sur l'utilisation de deux protéines GFP et BFP qui ont, par leur spectre d'absorption, la capacité de se transférer de l'énergie à condition que ces protéines soient physiquement assez proches [26, 65]. Cette application a notamment été développée avec une protéine de fusion dénommée « caméléon ». Elle est constituée en tandem d'une GFP, de la calmoduline, une protéine qui fixe le calcium, d'un peptide M13 capable de se lier à la calmoduline et d'une BFP. Après fixation de calcium, le peptide M13 interagit avec la calmoduline, ce qui favorise un rapprochement des deux GFP et permet ainsi un transfert d'énergie. Ce transfert d'énergie est réversible. La protéine caméléon représente un nouveau système de dosage de la concentration de calcium. Ce transfert d'énergie pourrait être adapté aux récepteurs stéroïdiens et les protéines avec lesquelles

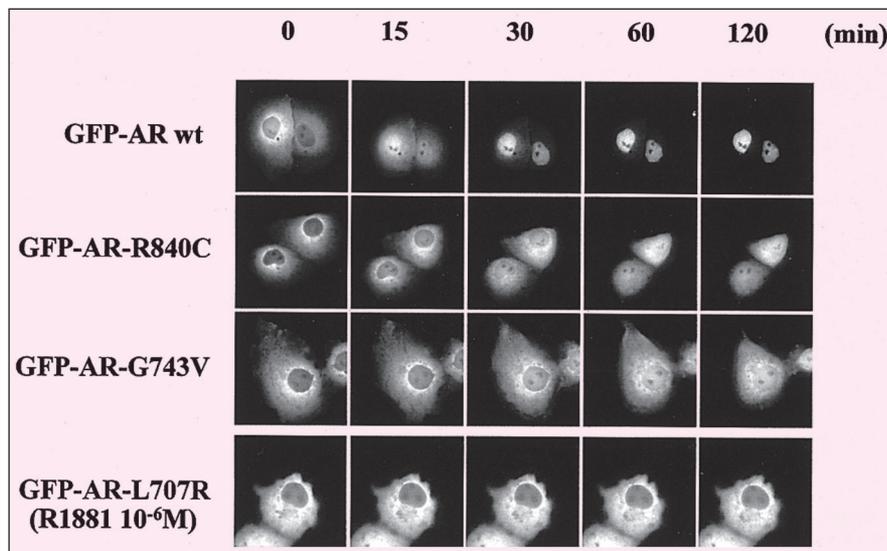


Figure 5. **Dynamique intracellulaire de mutants naturels du AR fusionnés à la GFP.** De nombreuses mutations du AR ont été décrites chez des patients atteints d'insensibilité aux androgènes. Les trois mutations étudiées se situent dans le domaine de liaison de l'hormone: deux mutations associées à des insensibilités partielles (la substitution R840C et dans un stade plus sévère la mutation G743V) et une mutation décrite dans une insensibilité complète (L707R). Ces trois mutants présentent tous des caractéristiques de liaison de l'androgène anormales. Leur dynamique intracellulaire a été évaluée après fusion de ces récepteurs à la GFP par l'observation régulière des cellules transfectées en présence d'androgène. Alors que la GFP-AR est très rapidement nucléaire, les mutants GFP-AR-R840C et GFP-AR-G743V entrent dans le noyau de manière lente et partielle. GFP-AR-L707R reste cytoplasmique en présence d'androgène. Une étude complète de ces mutants révèle une corrélation directe entre la capacité de ces mutants à entrer dans le noyau et le degré de sévérité de l'insensibilité des trois patients.

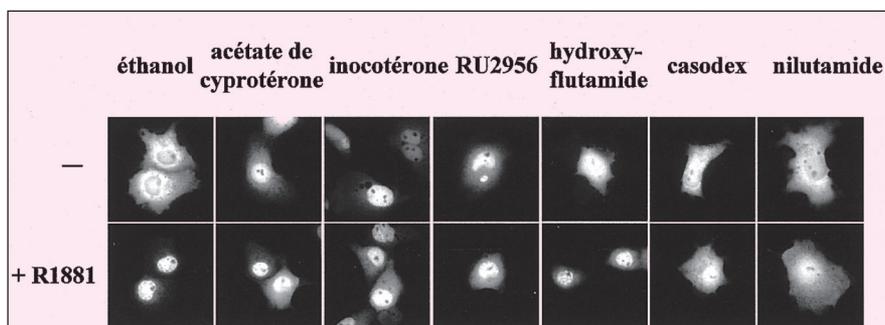


Figure 6. **Effet des anti-androgènes sur la localisation cellulaire du AR.** Les anti-androgènes, largement utilisés en clinique, sont classés comme agonistes partiels ou purs antagonistes. Ont été testés des anti-androgènes stéroïdiens (acétate de cyprotérone et RU2956) et des anti-androgènes non stéroïdiens (inocotérone, hydroxy-flutamide, casodex et nilutamide). Leur effet sur la localisation cellulaire d'AR est évalué par l'incubation des cellules en présence de chaque anti-androgène seul ou en compétition avec le R1881. En l'absence d'androgène, la plupart des anti-androgènes testés induisent un transfert d'AR dans le noyau. Le casodex et le nilutamide ont la capacité de retenir partiellement GFP-AR dans le cytoplasme.

ils interagissent en construisant par exemple des protéines chimères GFP-récepteurs stéroïdiens et BFP-heat shock protein afin de visualiser les interactions entre ces protéines *in situ* dans la cellule. Day *et al.* ont tout récemment décrit la visualisation de la formation d'un homodimère du facteur de transcription Pit-1 par FRET entre GFP- et BFP-Pit1 [66]. De plus, l'un des moyens d'étude par la GFP est le photoblanchiment ou inversement la surfluorescence d'une région de la cellule. Cette méthode est aujourd'hui utilisée pour analyser le mouvement de protéines fluorescentes au sein de la cellule. Le photoblanchiment est abordé selon deux approches: sous le nom de FLIP (*fluorescence loss in photobleach*) et sous le nom de FRAP (*fluorescence recovery after photobleach*). L'une (FLIP) consiste à éblouir par un laser un point de la cellule et de suivre la disparition progressive de fluorescence dans toute la cellule, qui révèle le passage des molécules fluorescentes dans la zone d'irradiation du laser. Le FLIP est déjà utilisé pour des protéines du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi [67]. L'autre (FRAP) consiste à blanchir une zone de la cellule et à observer la réapparition de la fluorescence dans cette zone qui est due à la migration de protéines fluorescentes. La surfluorescence consiste à illuminer dans un premier temps en UV, ce qui modifie les propriétés de la GFP et

entraîne une augmentation de la fluorescence lors de l'excitation à 470 nm. Cette surfluorescence permet d'étudier la diffusion de la protéine marquée en mesurant, soit la disparition au point d'irradiation, soit l'apparition de la fluorescence dans des zones non irradiées par le laser UV [14].

La vitesse de diffusion (ou coefficient de diffusion) d'une protéine peut être également évaluée par la mesure de corrélation de fluorescence. Il devrait être possible de déterminer la taille du complexe formé contenant la protéine fluorescente et ainsi d'étudier les interactions avec d'autres constituants de la cellule.

Ces techniques apparaissent donc comme des nouveaux moyens d'étude de la dynamique des récepteurs stéroïdiens dans le cytoplasme et dans le noyau et permettent de visualiser dans une cellule vivante des modifications de l'environnement cellulaire et des interactions entre macromolécules ■

Remerciements

Nous remercions les Drs Béatrice Térouanne et Paul Mangeat pour leur aide scientifique et technique. Une partie de ce travail a été soutenue par l'ARC (V.G.: boursière de l'ARC) et par un contrat CEE Biomed.

RÉFÉRENCES

1. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111: 229-33.
2. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-5.
3. Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, Miller JL. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 347-50.
4. Wang S, Hazelrigg T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 1994; 369: 400-3.
5. Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends Genet* 1995; 11: 320-3.
6. Kojima S, Hirano T, Niwa H, Ohashi M, Inouye S, Tsuji FL. Mechanism of the redox reaction of the *Aequorea* green fluorescent protein (GFP). *Tetrahedron Lett* 1997; 38: 2875-8.
7. Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12501-4.
8. Li XQ, Zhang GH, Ngo N, Zhao XN, Kain SR, Huang CC. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem* 1997; 272: 28545-9.
9. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 1993; 32: 1212-8.
10. Örmö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996; 273: 1392-5.
11. Yang FY, Moss LG, N PG. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1246-51.
12. Chattoraj M, King BA, Bublitz GU, Boxer SG. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8362-7.
13. Niwa H, Inouye S, Hirano T, *et al.* Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13617-22.
14. Yokoe H, Meyer T. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1252-6.
15. Brejc K, Sixma TK, Kitts PA, *et al.* Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2306-11.
16. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; 373: 663-4.

RÉFÉRENCES

17. Pines J. GFP in mammalian cells. *Trends Genet* 1995; 11: 326-7.
18. Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer PC. Improved GFP by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 315-9.
19. Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 707-11.
20. Cormack B, Valdivia R, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 1996; 173: 33-8.
21. Kimata Y, Iwaki M, Lim CR, Kohno K. A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 69-73.
22. Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 1997; 73: 2782-90.
23. Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6803-8.
24. Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2240-6.
25. Wachter RM, King BA, Heim R, et al. Crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein. *Biochemistry* 1997; 36: 9759-65.
26. Heim R, Tsien R. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 1996; 6: 178-82.
27. Yang TT, Sinai P, Green G, et al. Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 8212-6.
28. Gervais A, West D, Leoni LM, Richman DD, Wong-Staal, Corbeil J. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4653-8.
29. Peel AL, Zolotukhin S, Schrimsher GW, Muzyczka N, Reier PJ. Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther* 1997; 4: 16-24.
30. Ropp JD, Donahue CJ, Wolfgang-Kimball D, et al. *Aequorea* green fluorescent protein: simultaneous analysis of wild-type and blue-fluorescing mutant by flow cytometry. *Cytometry* 1996; 24: 284-8.
31. Anderson MT, Tjioe IM, Lorincz MC, et al. Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8508-11.
32. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. «Green mice» as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997; 407: 313-9.
33. Chishima T, Miyagi Y, Wang XE, et al. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 2042-7.
34. Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, Murgia M, Pozzan T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 1995; 5: 635-42.
35. Rizzuto R, Brini M, De Giorgi F, et al. Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants *in vivo*. *Curr Biol* 1996; 6: 183-8.
36. Olson KR, Mcintosh JR, Olmsted JB. Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J Cell Biol* 1995; 130: 639-50.
37. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. Subcellular localization of the type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1996; 271: 15436-42.
38. Cole N, Smith C, Sciaky N, Teresaki M, Edidin M, Lippincott-Schwartz J. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* 1996; 273: 797-801.
39. Yano M, Kanazawa M, Terada K, et al. Visualization of mitochondrial protein import in cultured mammalian cells with green fluorescent protein and effects of overexpression of the human import receptor Tom20. *J Biol Chem* 1997; 272: 8459-65.
40. Tarasova NI, Stauber RH, Choi JK, et al. Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 14817-24.
41. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95.
42. Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-9.
43. Brink M, Humbel BM, De Kloet ER, Van Driel R. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* 1992; 130: 3575-81.
44. Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Milgrom E. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56: 1-6.
45. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-7.
46. Perrot-Appanat M, Logeat F, Groyer-Picard M, Milgrom E. Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology* 1985; 116: 1473-84.
47. Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Appanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J* 1991; 10: 3851-9.
48. Lombes M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, Rafestinoblin ME. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J* 1994; 302: 191-7.
49. Husmann DA, McPhaul MJ. Localization of the androgen receptor in the developing rat gubernaculum. *Endocrinology* 1991; 128: 383-7.
50. Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 1990; 127: 3180-6.
51. Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 1993; 293: 761-8.
52. Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 510-8.
53. Htun H, Barsony J, Renyi I, Gould DL, Hager GL. Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent chimera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4845-50.
54. Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the *aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11899-903.
55. Georget V, Lobaccaro J, Térouanne B, Mangeat P, Nicolas J, Sultan C. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 129: 17-26.
56. FejesToth G, Pearce D, NarayFejesToth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2973-8.
57. Htun H, Walker D, Hager GL. Optical imaging approach to study protein-DNA interaction and nuclear organization in cultured living cells. *Proc 10th Confers Biomol Stereodyn* 1999 (sous presse).
58. Quigley CA, Debellis A, Marschke KB, Elawady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Rev* 1995; 16: 271-321.

RÉFÉRENCES

59. Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 234-8.

60. Sultan C, Lumbroso S, Poujol N, Belon C, Boudon C, Lobaccaro JM. Mutations of the androgen receptor gene in androgen insensitivity syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 519-30.

61. Sultan C, Savage MO. Intersex states. In: Grossman A, ed. *Clinical endocrinology*. Londres: Blackwell Science, 1998: 795-809.

62. Lumbroso S, Lobaccaro JM, Georget V, et al. A novel substitution (Leu707Arg) in exon 4 of the androgen receptor gene causes complete androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1984-8.

63. Georget V, Terouanne B, Lumbroso S, Nicolas J, Sultan C. Trafficking of the androgen receptor mutants fused to the green fluorescent protein: a new investiga-

tion of partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; in press.

64. Gerdes MJ, Dang TD, Larsen M, Rowley DR. Transforming growth factor-beta 1 induces nuclear to cytoplasmic distribution of androgen receptor and inhibits androgen response in prostate smooth muscle cells. *Endocrinology* 1998; 139: 3569-77.

65. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997; 388: 882-7.

66. Day RN. Visualization of Pit-1 transcription factor interactions in the living cell nucleus by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1410-9.

67. Lippincott-Schwartz J, Smith CL. Insights into secretory and endocytic membrane traffic using green fluorescent protein chimeras. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 631-9.

Summary

Green fluorescent protein: its application to the study of intracellular dynamics of steroid receptors

The green fluorescent protein (GFP) comes from the *Aequorea victoria* jellyfish. *In vivo*, it acquires the capacity of fluorescence by activation of aequorin. *In vitro*, it is activated by simple exposure to standard long-wave ultraviolet or blue light. GFP does not require the addition of substrate or cofactors for generation of its green light and it represents a new tool for monitoring the dynamic processes in living cells and organisms. It can produce fluorescence in various organisms, such as bacteria, plants and mammals. GFP is now applied as a reporter for gene expression, as a marker to study cell lineage and as a tag to localize proteins in living cells. GFP does not require cell fixation or other chemical steps for analysis, contrary to immunocytochemistry. Immunodetection needs fixation and permeabilization steps, which may lead to artefacts in the pattern of localization. This would explain particularly the contradictory results about the localization of the steroid receptors. Several studies have thus been developed using GFP tagged to different steroid receptors: glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR) and androgen receptor (AR). In absence of hormone, GFP-GR and GFP-AR were described to be cytoplasmic, while the GFP-MR was both cytoplasmic and nuclear. In presence of each specific ligand, GFP-steroid receptors were all nuclear. Formation of nuclear clusters were observed in the presence of agonists for GFP-GR and GFP-MR. GFP permits the analysis of dynamic cellular events and has already been established as an important tool for many branches of biological research.

Sixième NAT (Nantes-Actualités-Transplantation) 10-11 juin 1999 - Nantes (France) Targeting Recipient Immune Response through Bioreagents

B. Malissen : Molecular interaction in first signal.

T. Strom : Manipulation of allo-recognition through T-cell growth factor.

J. Thomas : Tolerance induction using anti-CD3 immunotoxine antibodies.

L. Chatenoud : Immuno-intervention through lymphocyte receptor targeting.

R. Zhong : Prevention rejection and induction of tolerance by monoclonal antibodies against CD45RB.

J. Bluestone : Second signals in allo and xeno-recognition.

D. Latinne : Immuno-intervention through CD2/LFA3 inhibition.

T.C. Pearson : Manipulation of B7/CD28-CTL44 in primates.

S. Knechtle : Inhibition of CD40 L pathway.

A. Wörn : Engineering of scFv fragments for extracellular and intracellular applications.

B. Vanhove : ScFv and intra-cellular bioreagents.

R. Dunbar : HLA tetramers.

G. Grassy : Computer-assisted rational design of immunosuppressive peptides.

N. Suci-Foca : Altered peptides *in vivo*.

F. Sanfilippo : Inhibition of complement *in vivo*.

J.S. Pober : Targeting second signals provided by vascular endothelial cells.

Renseignements et formulaires d'Abstracts :

NAT Secrétariat ITERT, CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes (France).

Fax: (33) 2 40 08 74 11.

Inscriptions :

1 900 FF (déjeuners et dîners compris).

Date limite de remise des abstracts: 1^{er} avril 1999.

TIRÉS À PART

C. Sultan.