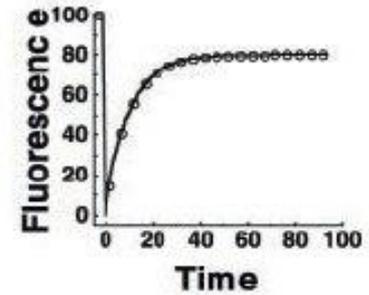
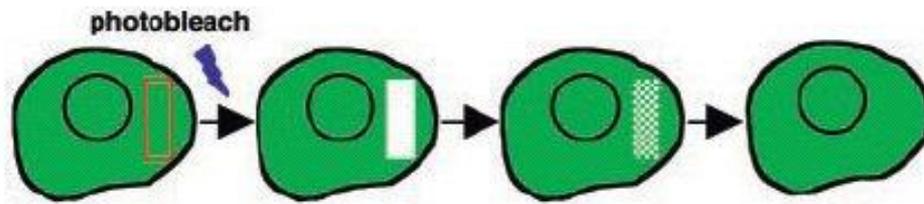


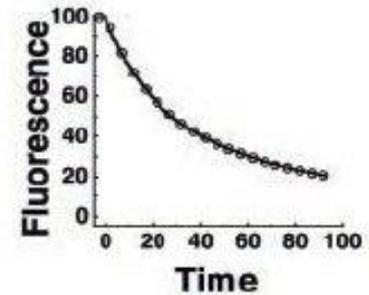
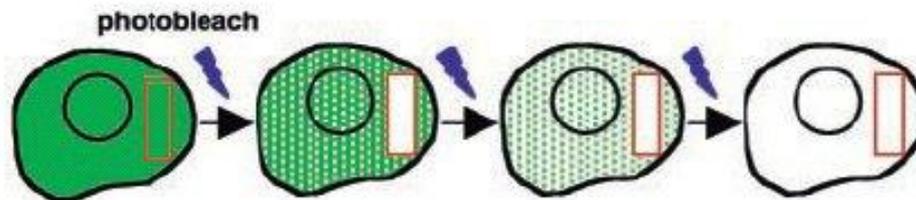
Dynamique et interactions moléculaires dans la cellule vivante: FRAP, PA-GFP, FLIP, FCS, FRET

Christophe KLEIN
Plateforme d'Imagerie ex-vivo
Centre de Recherche des Cordeliers - 75006 Paris
Christophe.Klein@crc.jussieu.fr

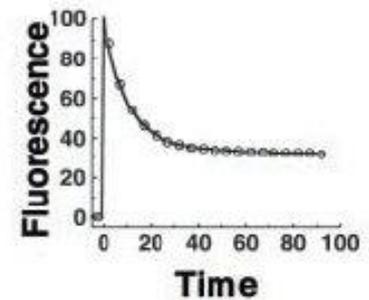
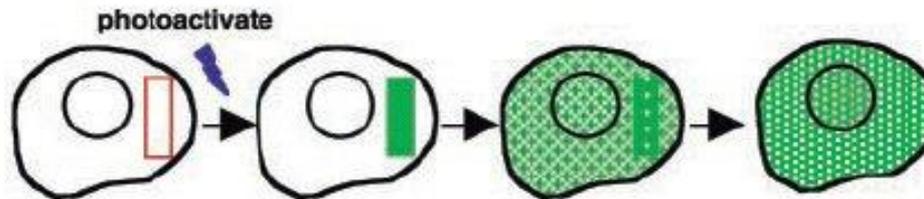
A Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)



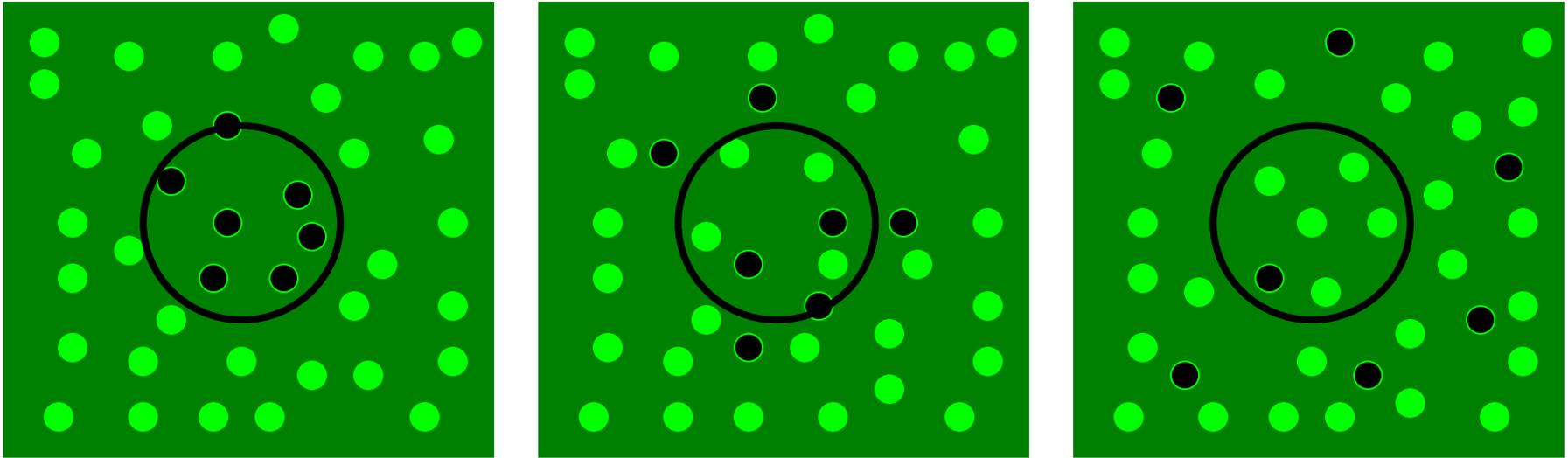
B Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP)



C Photoactivation

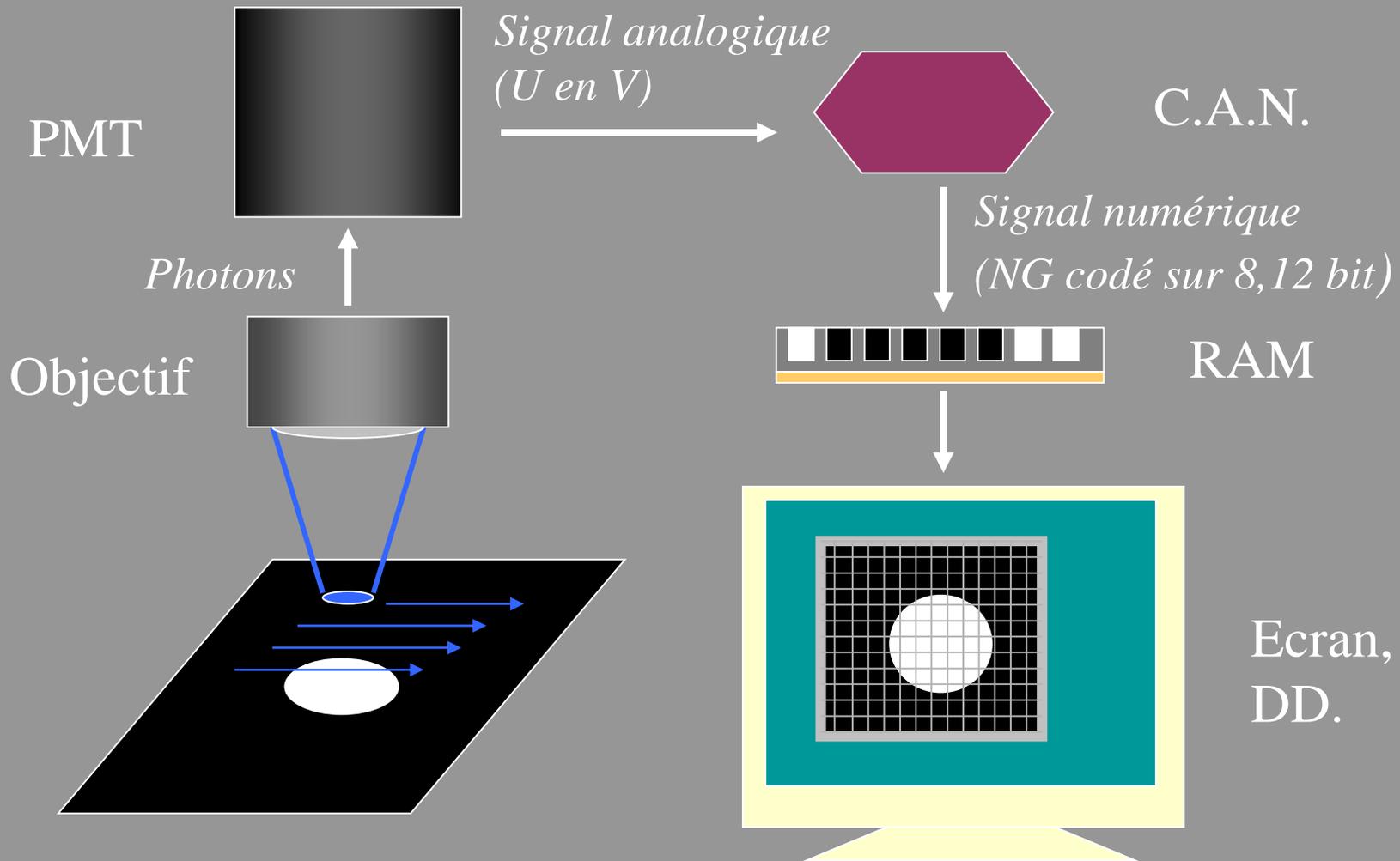


FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

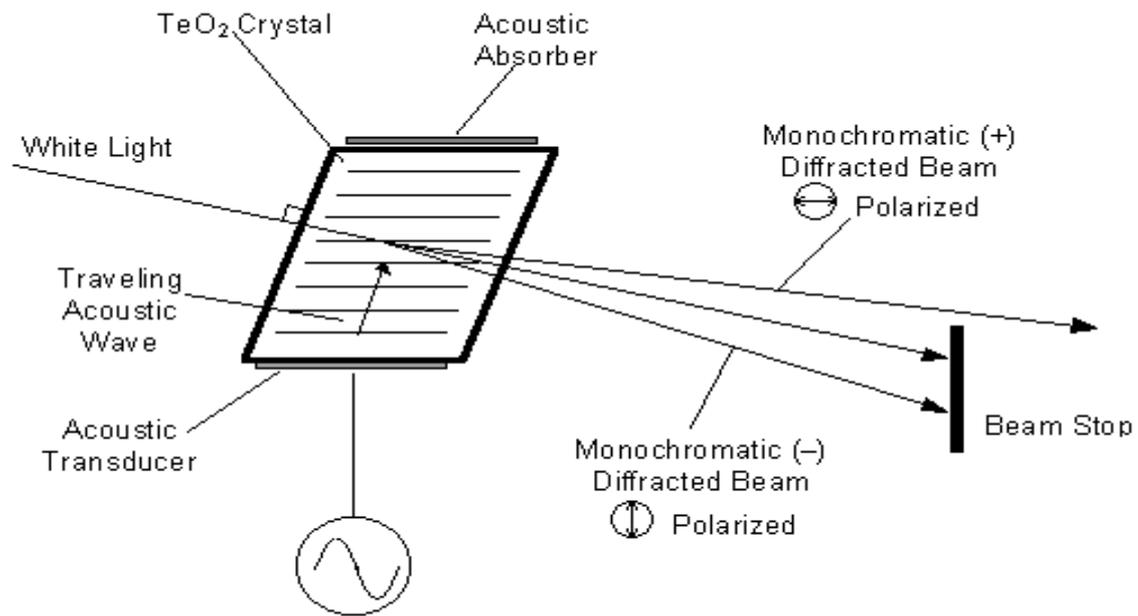


- Le photobleaching est un processus irréversible.
 - On crée une 2ème espèce moléculaire spatialement distincte.
 - Les molécules fluorescentes et bleachées se redistribuent (homogénéisation des concentrations) avec une vitesse « D ».
- > La fluorescence de la zone bleachée ré-augmente progressivement.

Microscope confocal à balayage laser



AOTF



Photobleaching

Jablonski Energy Diagram

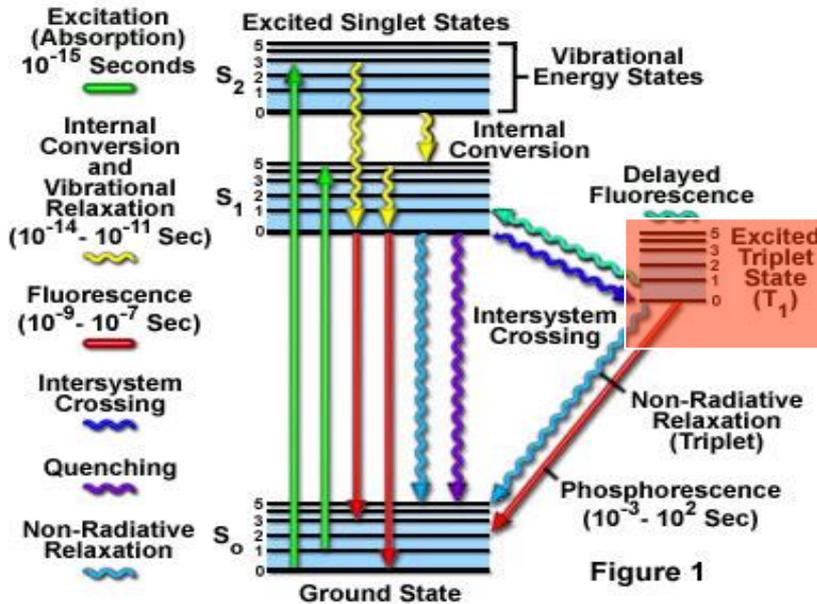


Figure 1

« Réactions photochimiques irréversibles »

- Oxydation (Oxygène sigulet : radical libre)
- Décomposition
- Polymérisation
- Réaction avec d'autres molécules

Photo-destruction (photobleaching, fading)

- Caractéristique d'un fluorochrome
- Dépend de l'environnement

Inhibition of Photobleaching and Specimen Fading

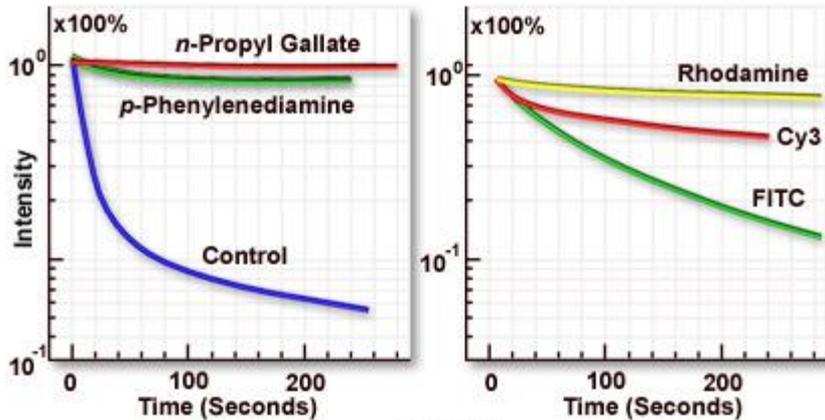


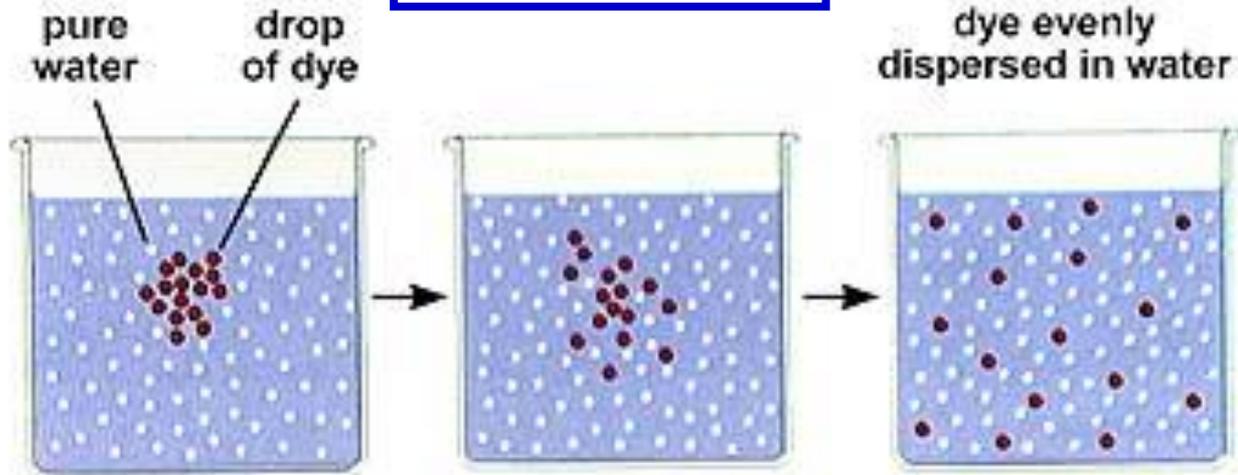
Figure 5

Ne pas confondre avec le quenching :

Inhibition réversible, dépendante de l'environnement.

- Oxygène
- Halogènes (I, Br... par ex : Br-dUTP)
- Transfert d'énergie (Chromosome banding par ex : DAPI/CA3, DAPI/Methyl Green...)

La diffusion



\vec{J}



$J = \text{flux en molécules/sec}$
à la position x_i

1^{ère} loi de Fick

$$J = -D \frac{dC}{dx}$$

$D = \text{coefficient de diffusion}$
latérale

Loi de Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\eta R_h}$$

On considère fluo $F(x,t)$ proportionnelle à concentration $C(x,t)$

2^{ème} loi de Fick : équation de diffusion (EDP)

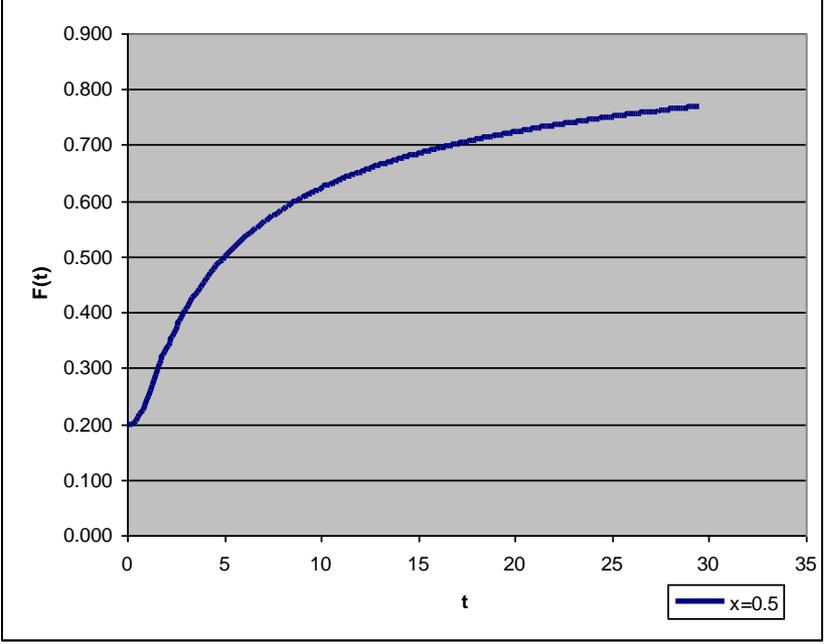
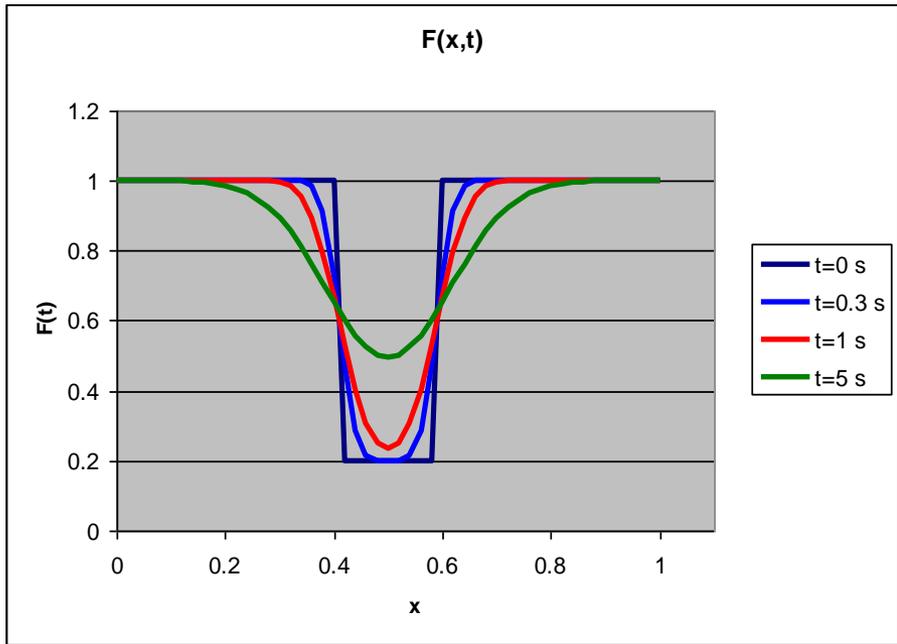
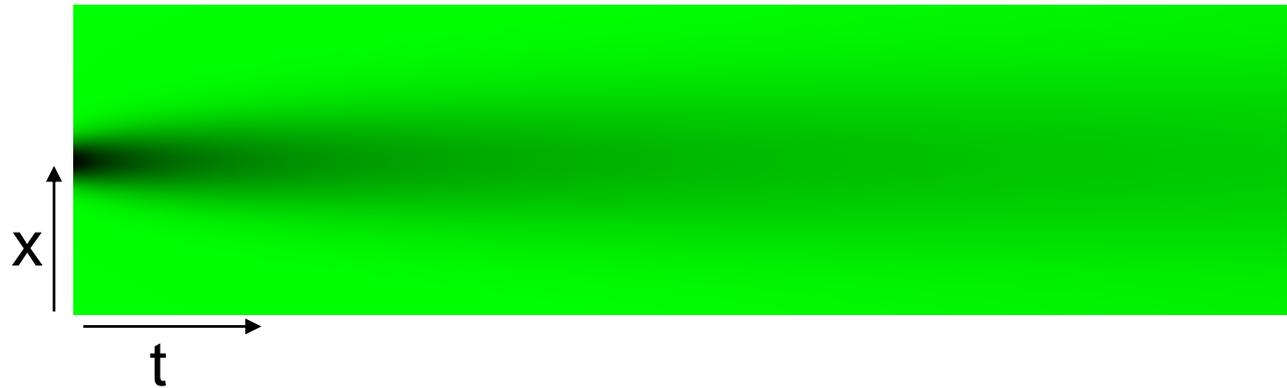
$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}$$

Mobilité dans la membrane : FRAP 2D

Utilisation de modèles d'analyse, solutions de l'équation de diffusion 2D pour différentes conditions initiales.

$$\frac{\partial C(x, y, t)}{\partial t} = D \cdot \left[\frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial y^2} \right]$$

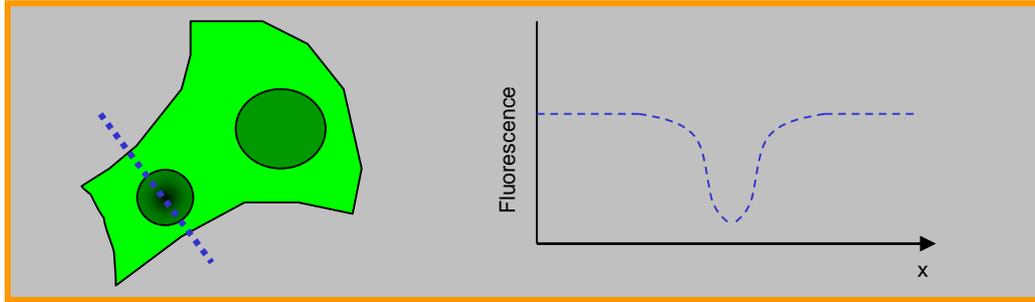
Solution de l'équation de diffusion 1D



$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}$$

→ $C(x,t)$ fonction décrivant le profil d'intensité au cours du temps

Cinétique de récupération de la fluorescence pour un profil de région bleachée *gaussien*



$$F(t) = MF^0 f(t) - MF^0 + F^0$$

$$f(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{-k^n}{n!} \left[\frac{1}{1 + n \left(1 + 2 \frac{t}{\tau_d} \right)} \right]$$

Axelrod et al. *Biophys. J.* (1976)

Avec :

$\tau_d = \omega^2 / 4D$: temps caractéristique de diffusion
 ω : demi-largeur du « spot » à la hauteur de $1/e^2$
 D : Coefficient de diffusion latérale

k : quantité de bleach

$$k = \alpha T I(0)$$

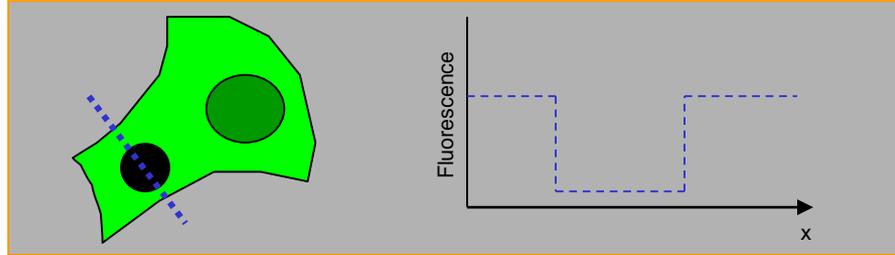
T : durée du bleach

$I(0)$: intensité du bleach

α : constante de vitesse du bleach

$$F(0)/F^0 = (1 - e^{-k})/k$$

Cinétique de récupération de la fluorescence normalisée pour un profil de région bleachée *circulaire uniforme*



Fluorescence normalisée

$$f(t) = \frac{F(t) - F(0)}{F(\infty) - F(0)}$$

$$f(t) = \exp\left(-2\tau d/t\right) \left[I_0\left(2\tau d/t\right) + I_1\left(2\tau d/t\right) \right]$$

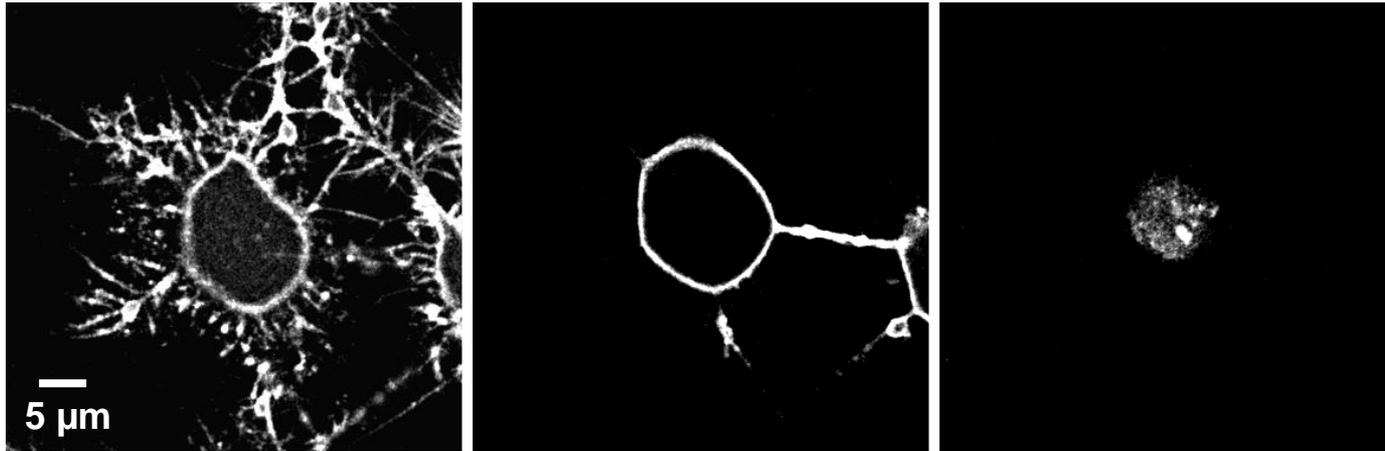
I_0 et I_1 les fonctions de Bessel modifiées d'ordre 0 et 1.

$$D = \omega^2 / 4\tau d$$

τd : temps de diffusion caractéristique
 ω : rayon de la région bleachée

- Axelarod et al. *Biophys. J.* (1976)
- Soumpasis *Biophys J.* (1983)
- Kubitschek et al. *Biophys. J.* (1994)

Mesure de la vitesse de diffusion de phospholipides membranaires *NBD-Sphingomyeline*



Cellules cultivées dans des Labtek 170μm
Incorporation NBD-SM 4μM 10 minutes

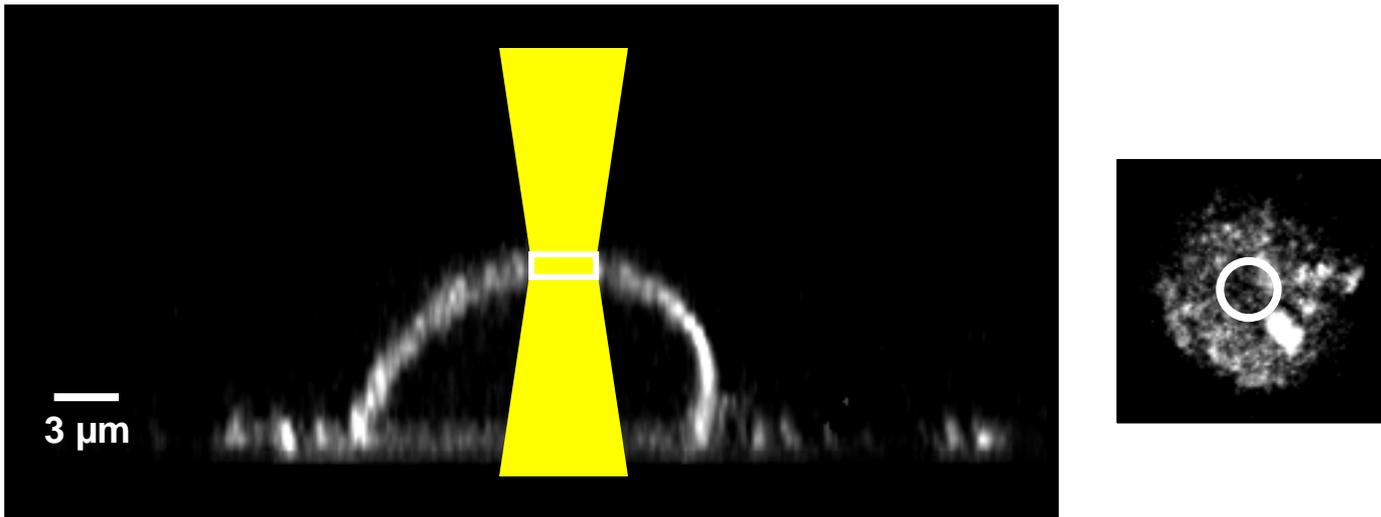
Problème de l'internalisation:

Après 10 min membranaire

Après 20 min Golgi

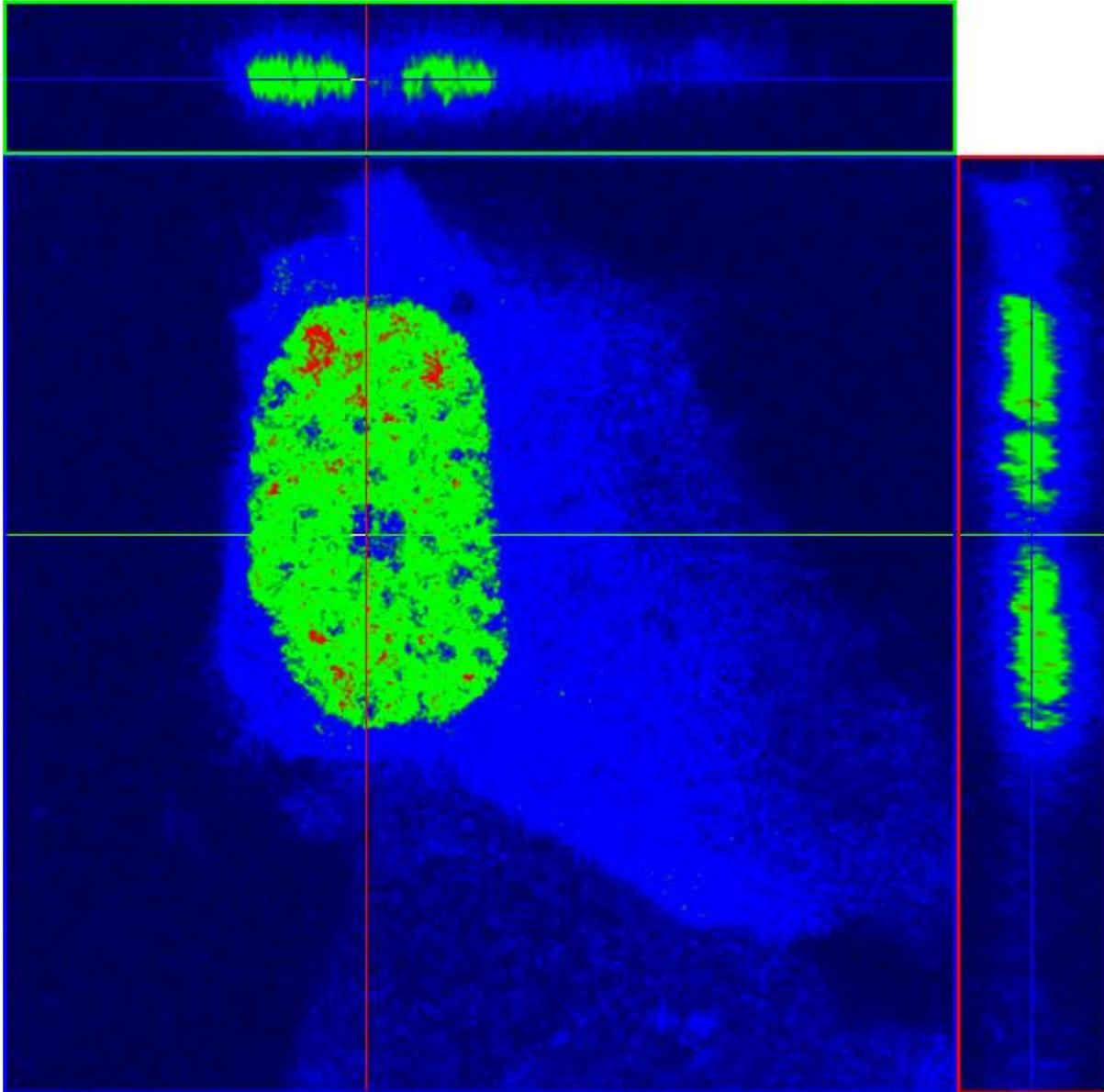
Après 40 min cytosol

Bleaching

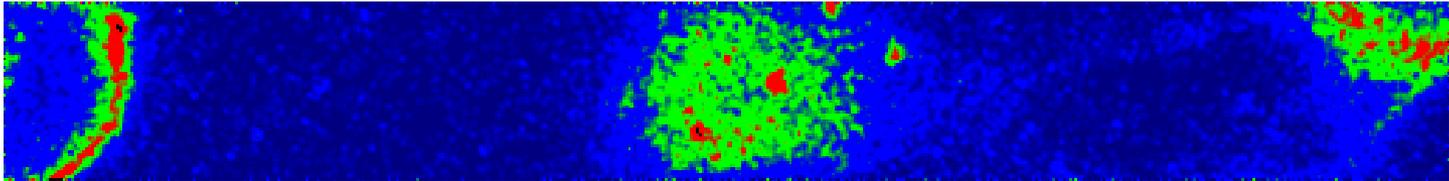


Zone Bleachée : ROI circulaire 3 μm, 22 pixels

Bleaching



Bleaching



Taille des images : 512x64

Vitesse de balayage: 1.76 μ sec/pixel, 196 msec/image

Durée du Bleach : 5 scans, 230 msec

Intensité : bleach 100% - images 0.5 à 1%

Intervalle :

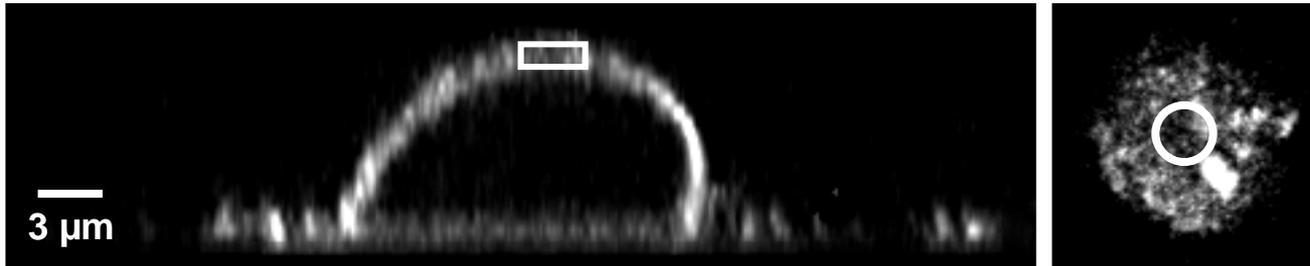
100 msec 10 sec

500 msec 10 sec

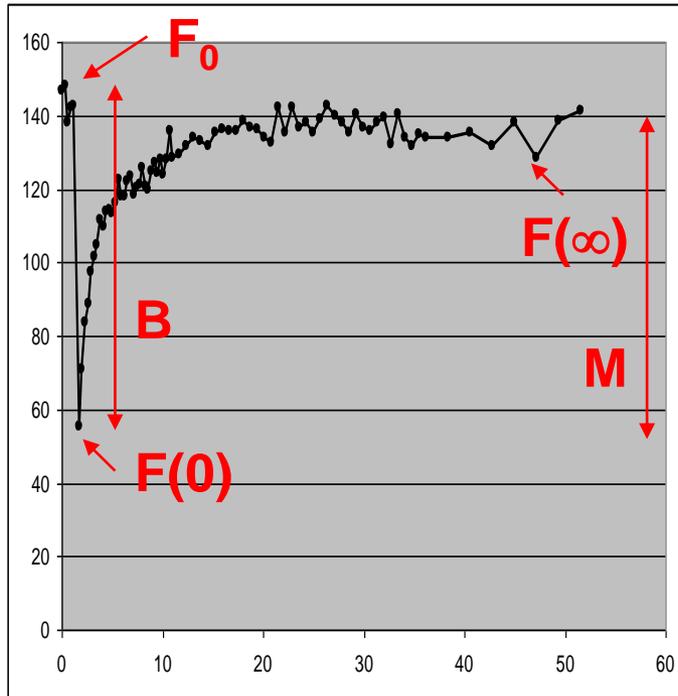
2 sec 60 sec

Vitesses plus élevées : Line scanning + spot bleaching

Analyse



Zone analysée:



B : % de bleaching

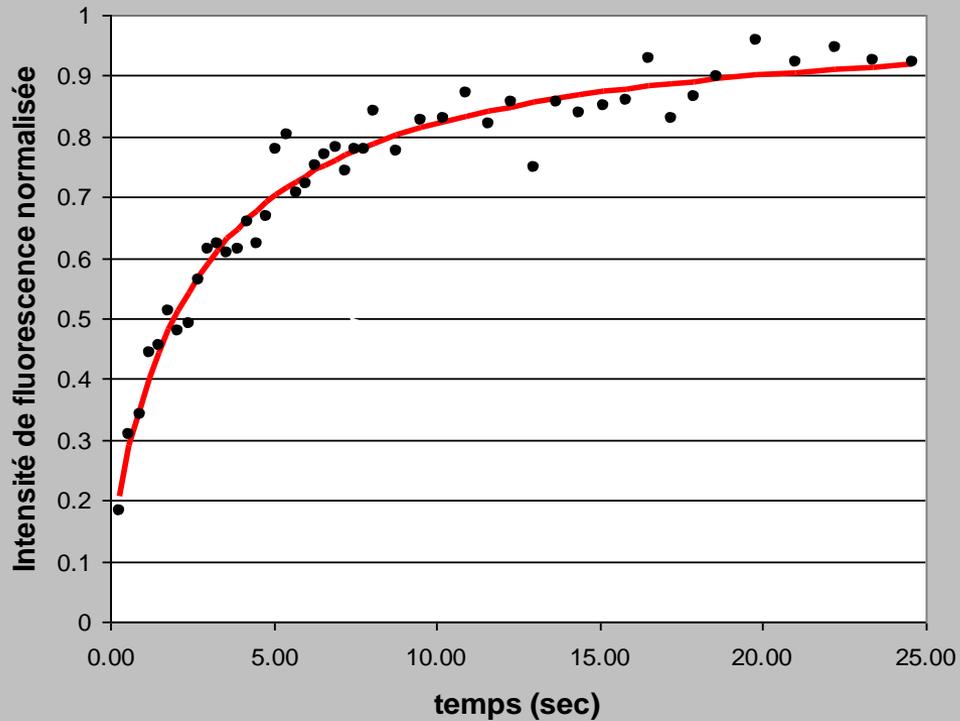
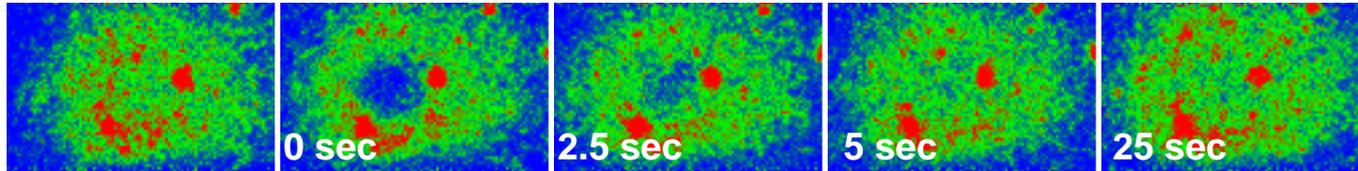
$$B = \left[1 - \frac{F(0)}{F_0} \right] \times 100$$

M : % de marqueur capable de diffuser

$$M = \frac{F(\infty) - F(0)}{F_0 - F(0)}$$

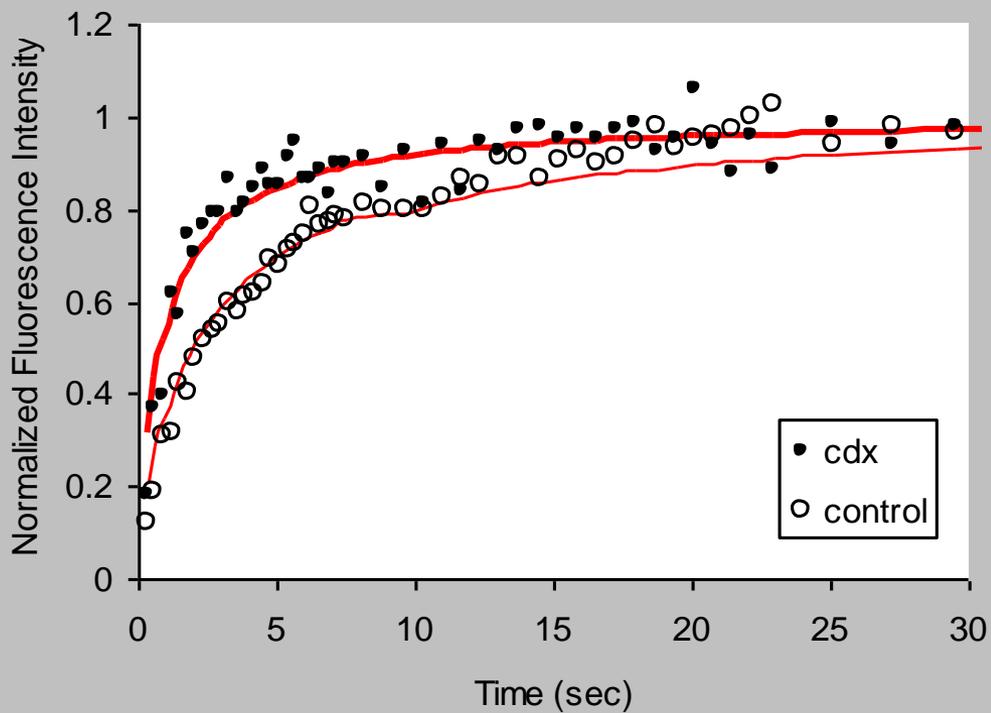
Fraction immobile = interaction?

Exemple d'acquisition

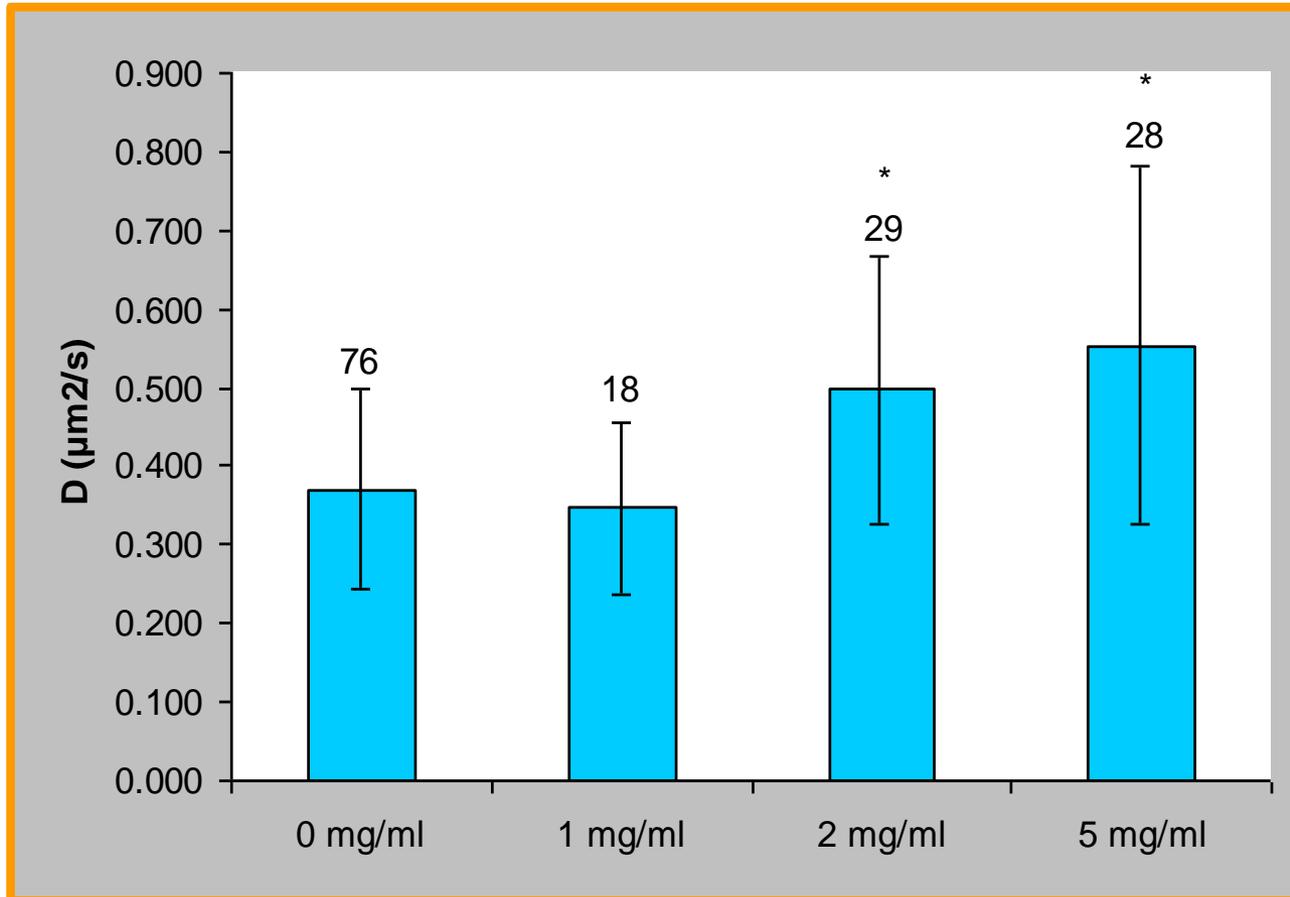


$\tau_d = 2.20 \text{ sec}$
 $D = 0.255 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec}$

Effet de la cyclodextrine

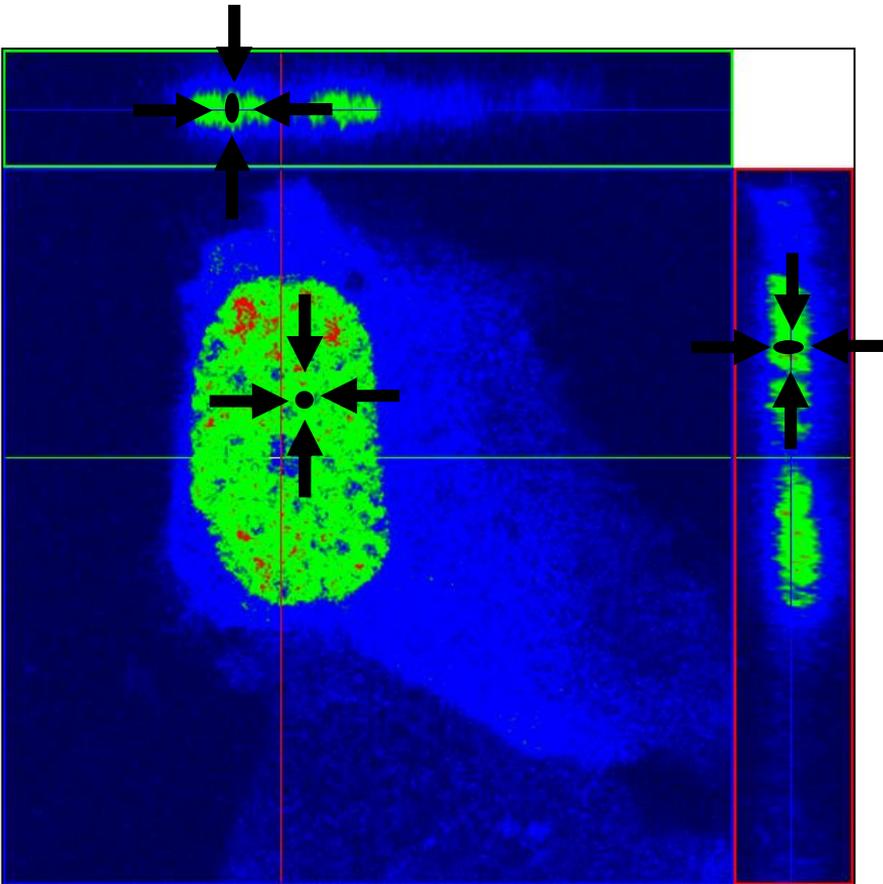


Effet de la cyclodextrine



Mobilité dans la cellule : FRAP 3D

$$\frac{\partial C(x, y, z, t)}{\partial t} = -D \cdot \left[\frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, z, t)}{\partial z^2} \right]$$

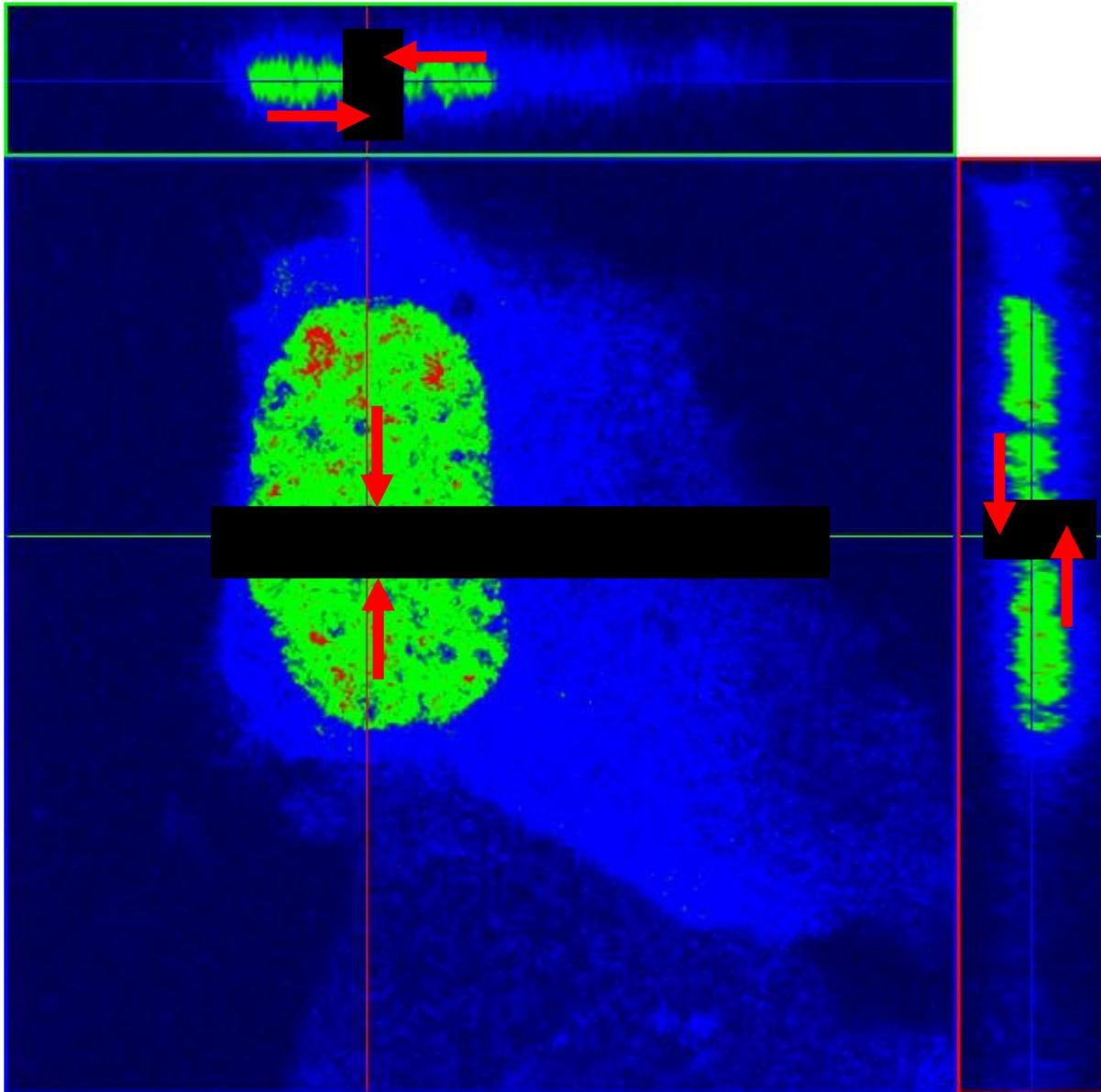


3D : en excitation multiphotonique
(bleaching & photoactivation)

Vitesse d'acquisition 3D limitante
3D,t : volume de données important.
Recalage des stacks.

-> difficile a mettre en oeuvre

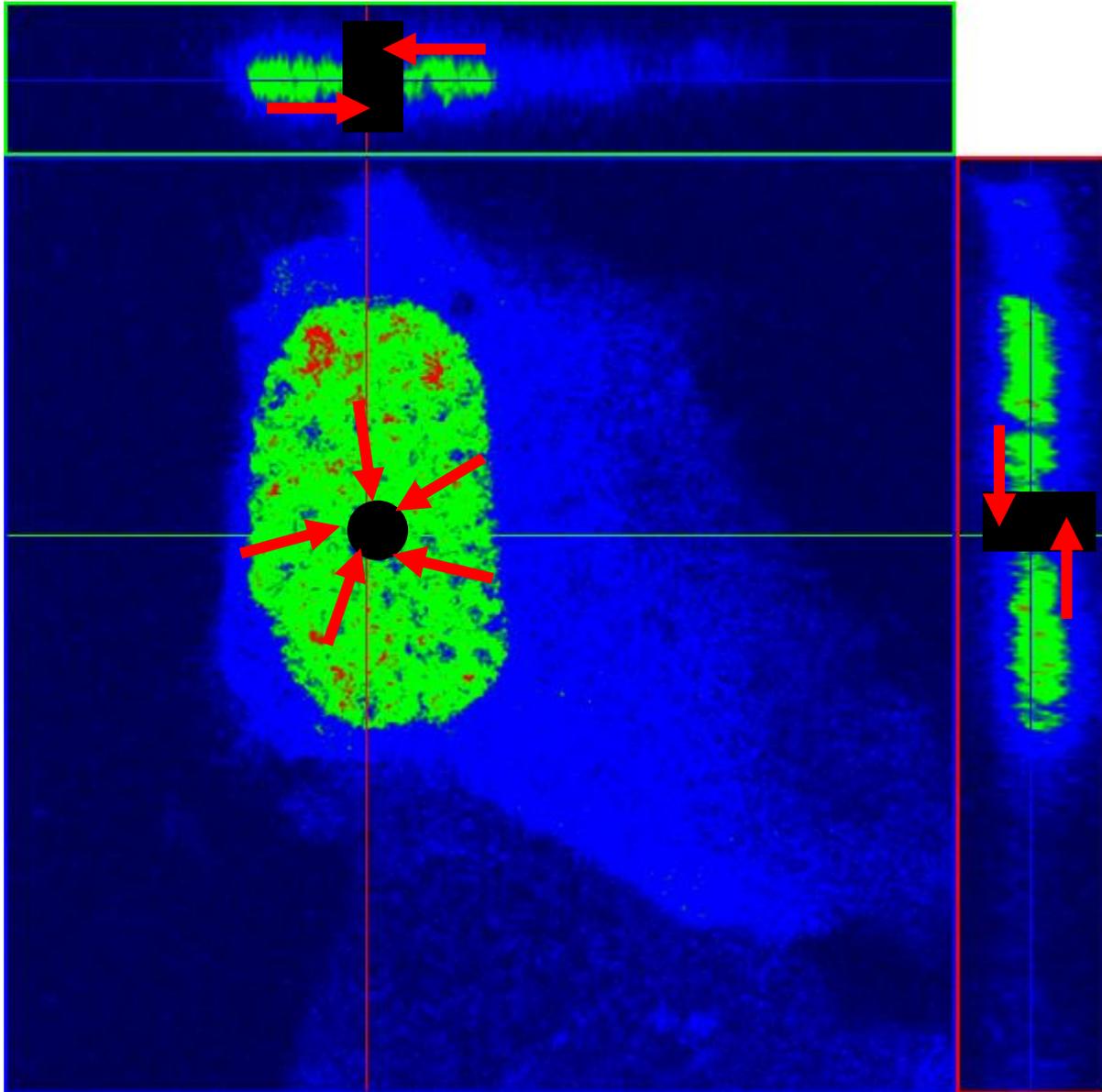
Approximation diffusion 1D : « Strip bleaching »



$$I(t) = I_{\text{final}} \left(1 - (w^2(w^2 + 4\pi Dt)^{-1})^{1/2} \right)$$

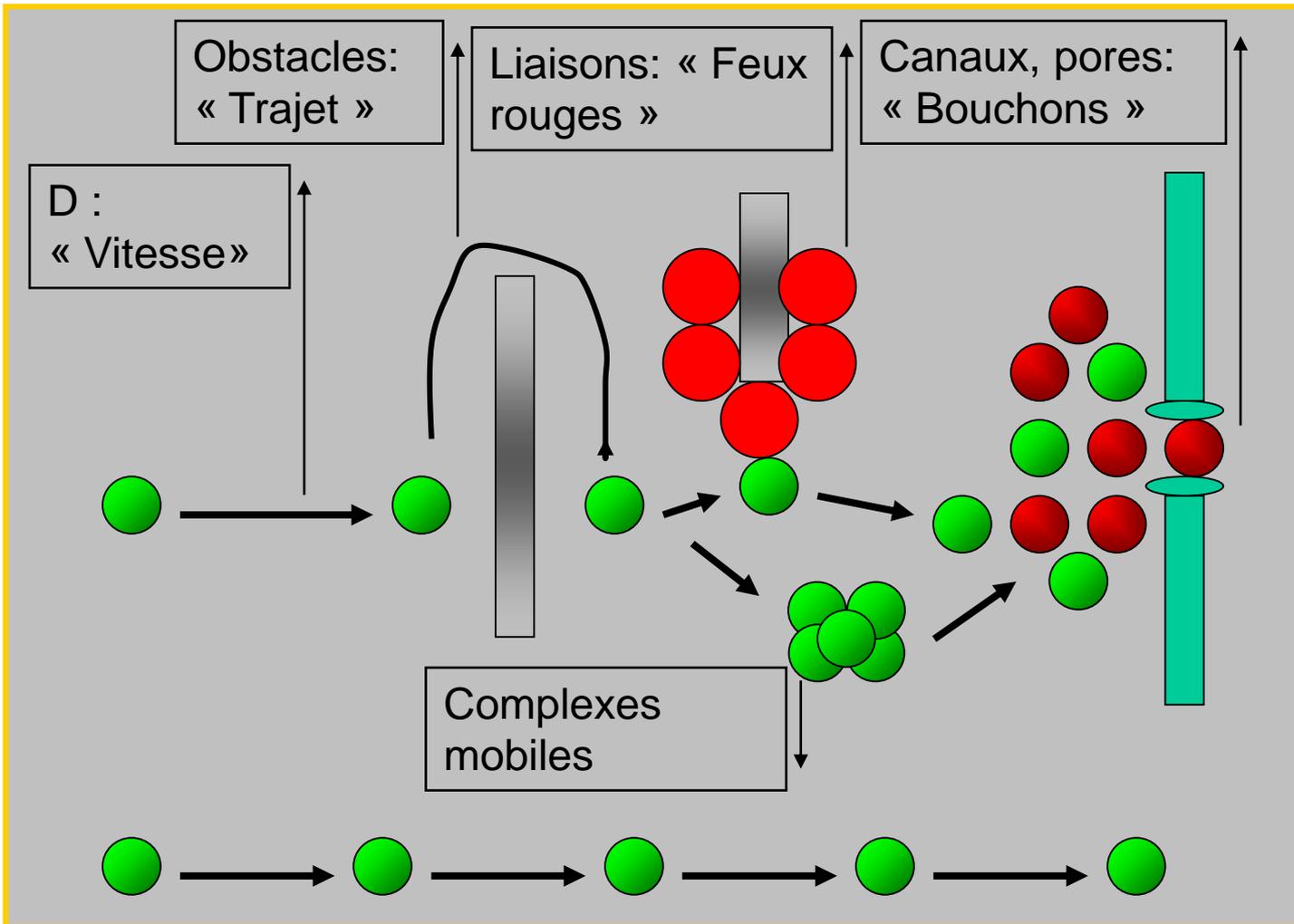
Ellenberg & Lippincott-Schwartz, Methods, 19, 362-372, (1999).

...Ou diffusion 2D



*Blonk et al., J. Microscopy, (1993).
Phair and Misteli, Nature (2000).*

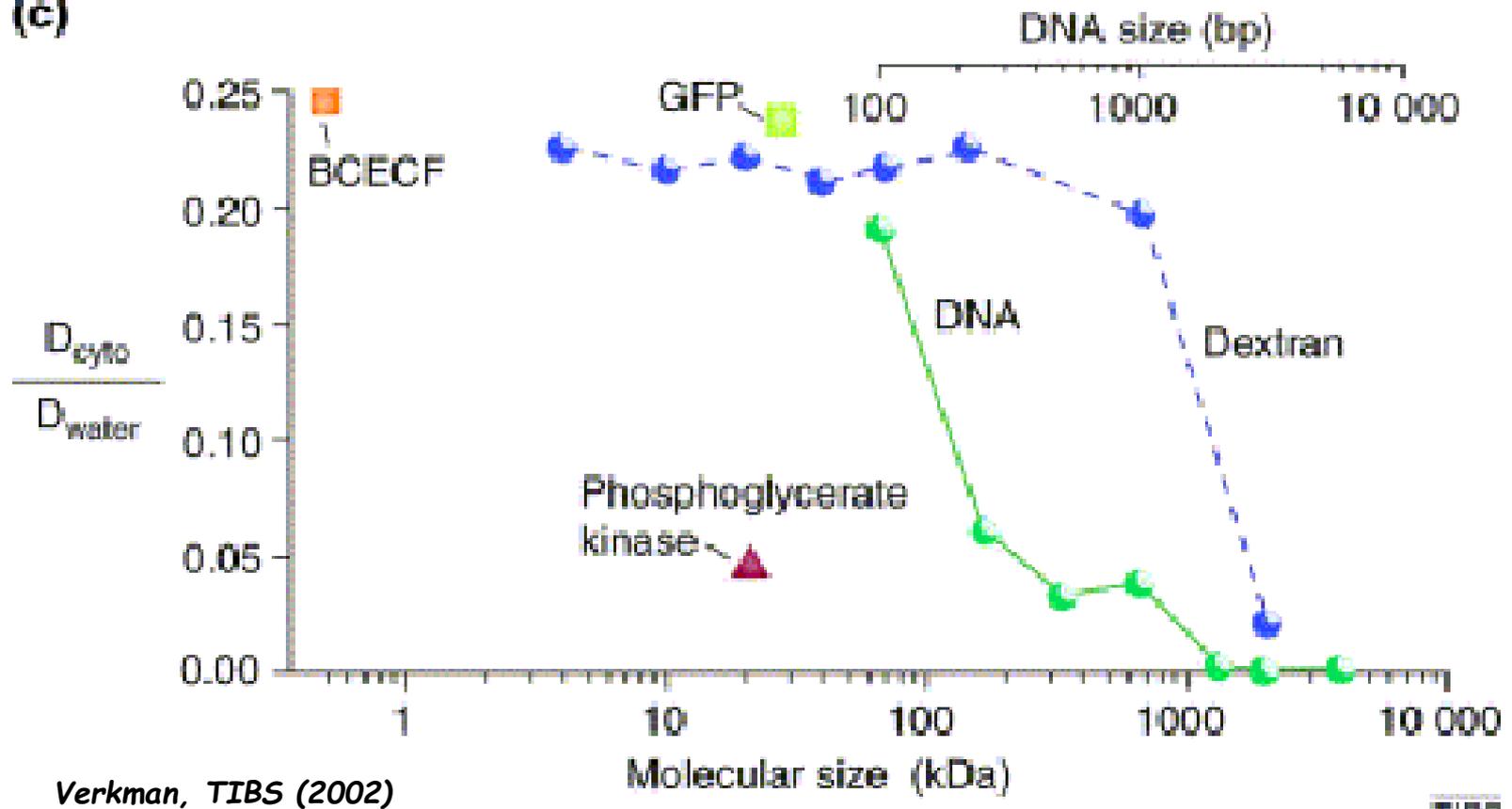
Mobilité = Diffusion + phénomènes complexes



Verkman, TIBS (2002)

Diffusion complexe dans le cytosol : diffusion relative

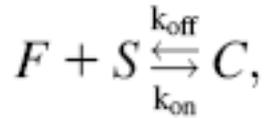
(c)



Verkman, TIBS (2002)

TIBS

Modèles de réaction-diffusion



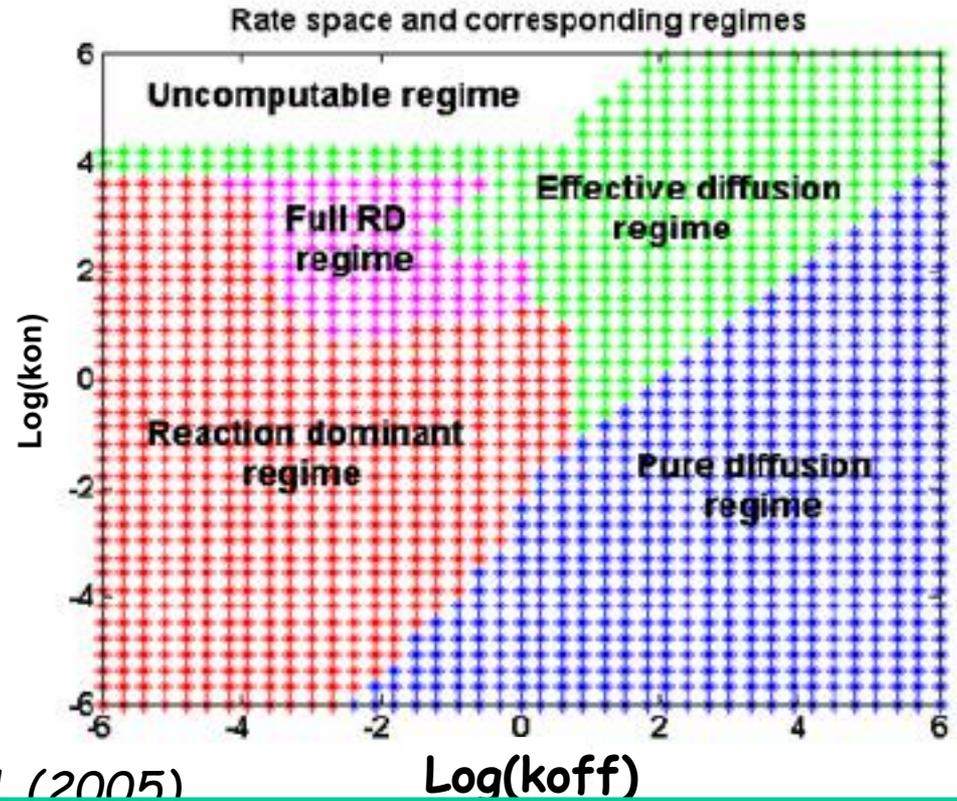
$$\frac{\partial f}{\partial t} = D_f \nabla^2 f - k_{\text{on}}^* f + k_{\text{off}} c$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = k_{\text{on}}^* f - k_{\text{off}} c.$$

$$F_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}^* + k_{\text{off}}} \quad \text{and} \quad C_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{on}}^*}{k_{\text{on}}^* + k_{\text{off}}}.$$

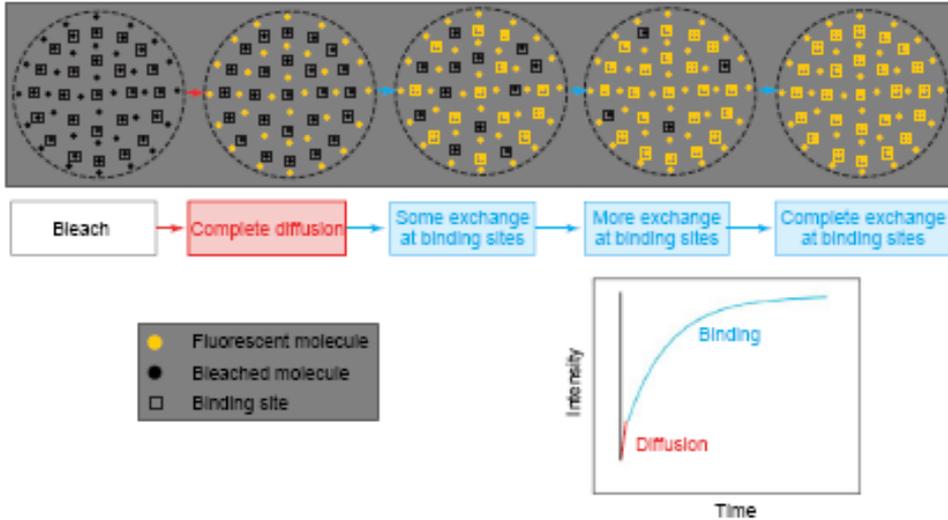
Sprague et al., Biophys J. (2004)

Sprague & McNally, Trends Cell Biol. (2005)

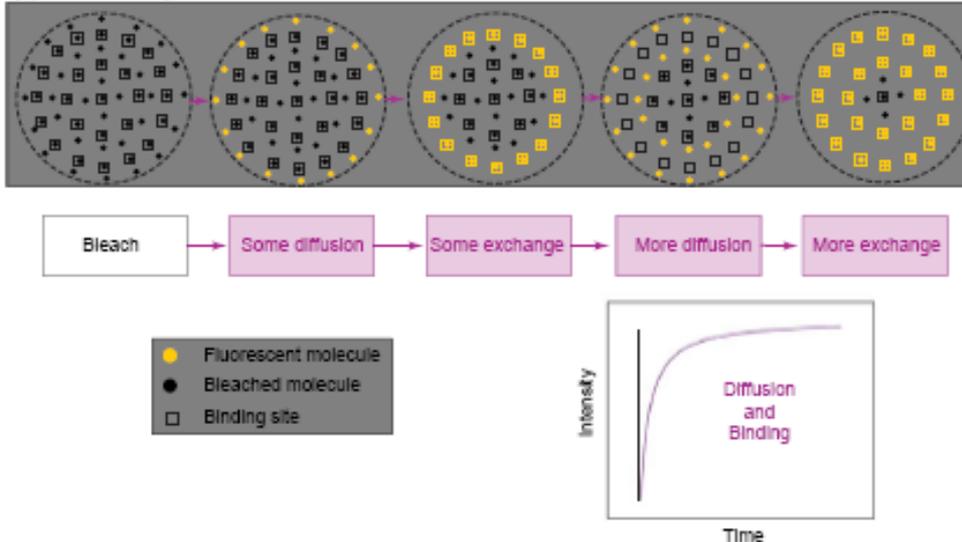


Modèles de réaction - diffusion

(a) Diffusion-uncoupled FRAP



(b) Diffusion-coupled FRAP



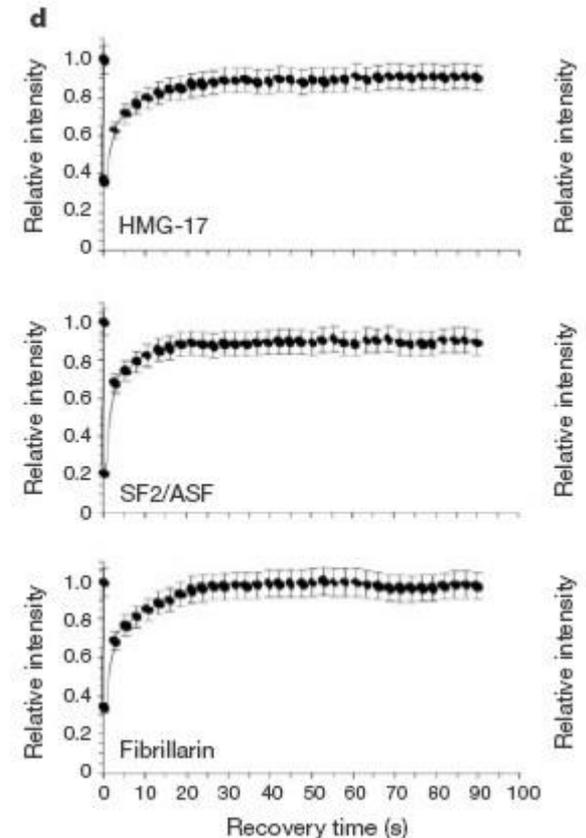
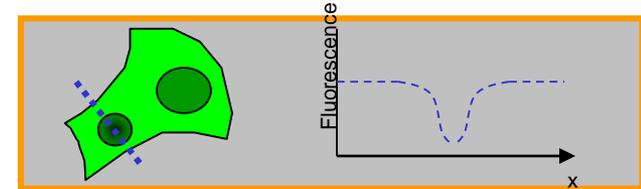
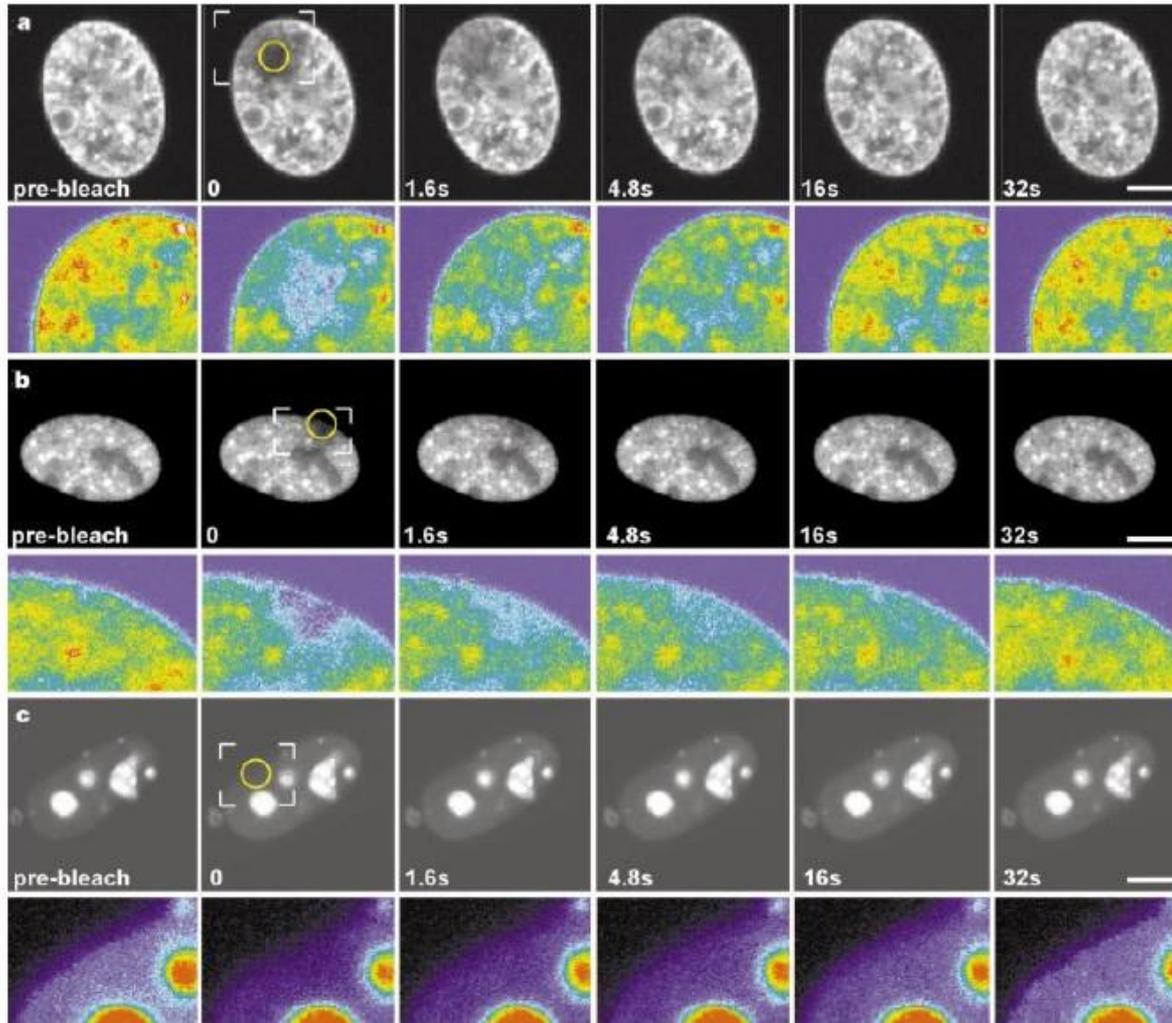
Diffusion uncoupled

Diffusion coupled

• Notion de diffusion apparente ou diffusion effective : D_{eff}

Exemple de mesure de D_{eff}

Interactions protéine-chromatine

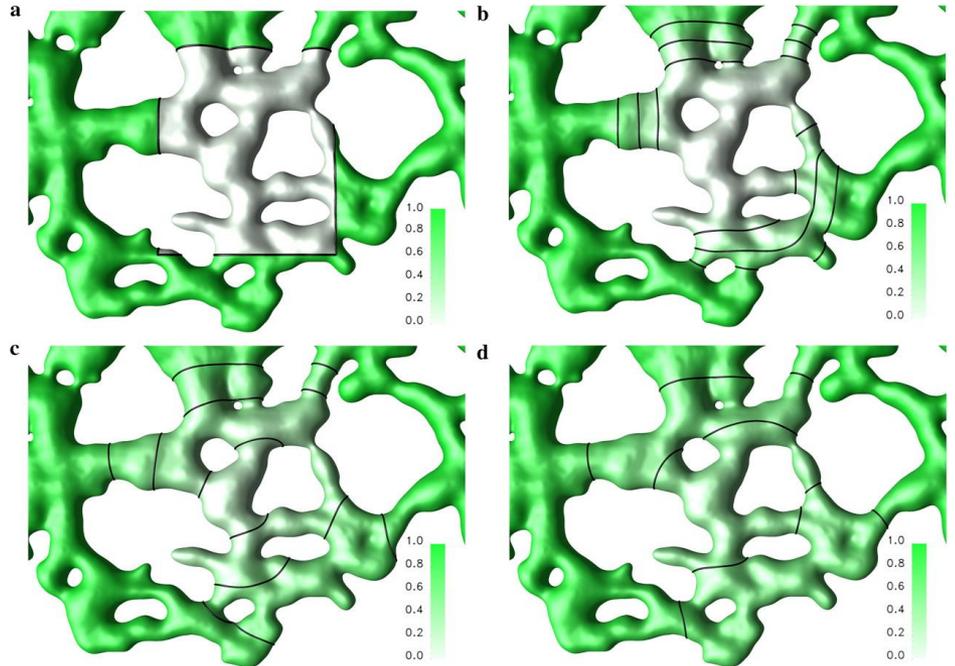
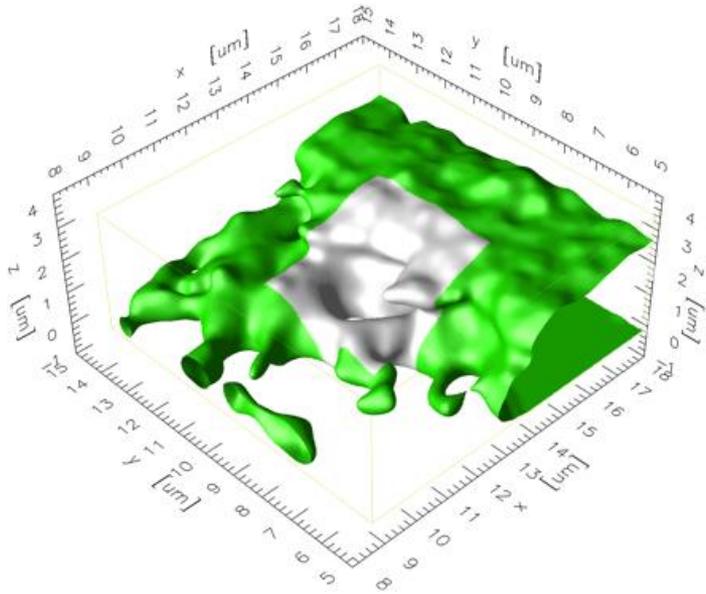


Phair and Misteli, Nature (2000).

Diffusion en géométrie complexe

Influence de la géométrie des organelles (ER)

Membrane non plane,
avec une anisotropie de courbure



Sous-estimation de D d'un facteur entre 2 et 4x !!

Exemple d'équation d'évolution : diffusion 2D + photoblanchiment

$$\frac{\partial C(x, y, t)}{\partial t} = D_C \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - k_b I_0^2 e^{-4 \frac{x^2 + y^2}{s^2}} C(x, y, t)$$

Problèmes :

- solution analytique pas toujours calculable (coeff. non-constants, géométrie complexe),
- hypothèses souvent non vérifiées expérimentalement : par ex, domaine infini !
- conditions aux bords variables et complexes en pratique,
- paramètres d'acquisition variables (donc modification du profil photoblanchi)

On utilise des valeurs numériques pour les fonctions à calculer (dérivées) au lieu d'une expression analytique, pas toujours disponible ou calculable.

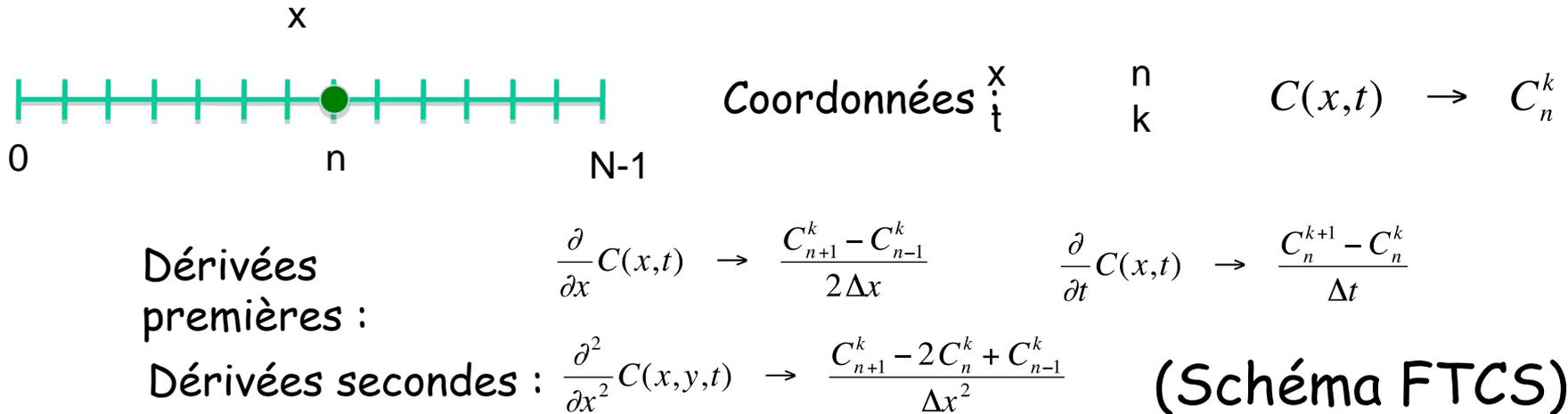
Principe général : discrétisation de l'espace et du temps simplifiant le calcul des dérivées sur l'espace discrétisé

Autre intérêt: explorer l'influence des différents paramètres d'acquisition sur les courbes de FRAP et sur les valeurs de D et M

Résolution numérique d'E.D.P.

• Différences finies

Echantillon décrit comme une grille fixe cartésienne, $N \times M \times P$ (3D), $N \times M$ (2D) ou N (1D)



$$C_n^{k+1} - C_n^k = \frac{\Delta t D}{(\Delta x)^2} (C_{n+1}^k - 2C_n^k + C_{n-1}^k) - \frac{\Delta t}{2} (\alpha_{n+1} C_{n+1}^k + \alpha_{n-1} C_{n-1}^k)$$

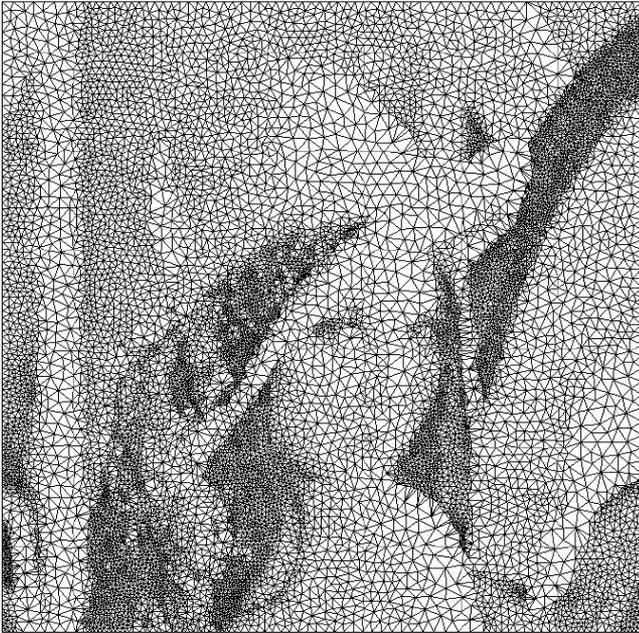
Condition de stabilité : $\frac{\Delta t D}{(\Delta x)^2} \leq 0.5$

- **Avantage** : équations discrétisées faciles à écrire, donc code « simple »
- **Inconvénients** :
 - Grille fixe et régulière, contrainte sur les pas dx et dt , donc calculs lourds (mémoire, tps de calcul)
 - Ecriture difficile (voire impossible) pour des géométries complexes

Résolution numérique d'E.D.P.

- **Éléments finis**

Grille (maillage) pas forcément régulière, éventuellement adaptative



Élément simple : typ. triangle (2D), tétraèdre (3D)

On calcule une approx. de la solution sur chaque élément

On « assemble » les différents éléments pour former la solution globale (« raboutage » des fonctions élémentaires)

- **Avantage :**

Adapté à des géométries complexes (cellule « réaliste », pas un carré !)

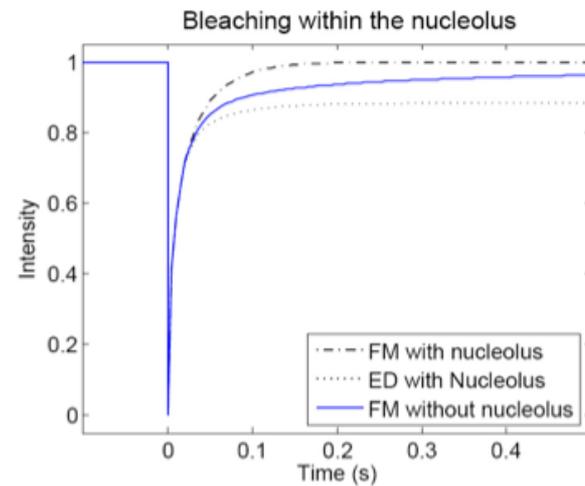
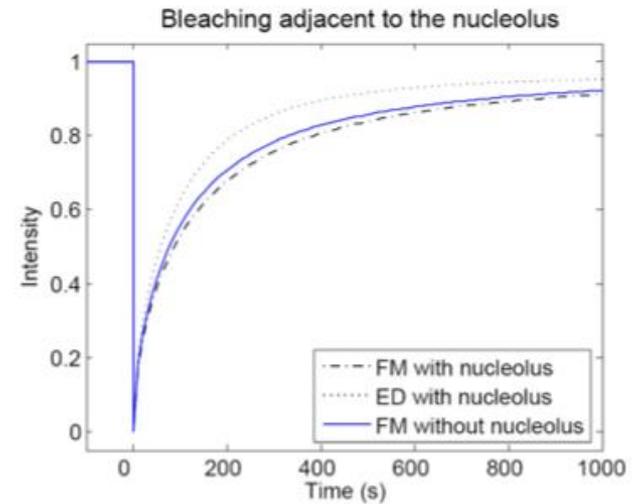
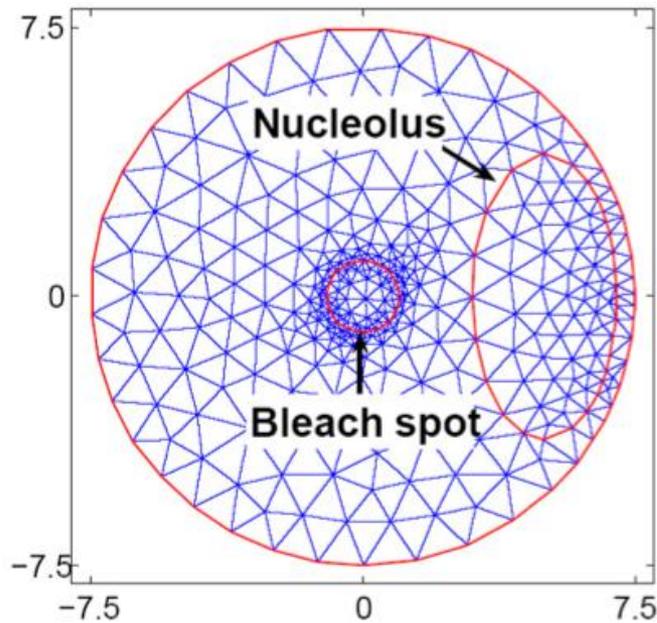
calcul plus rapide et optimisé en fonction de la précision nécessaire (maillage irrégulier)

Méthode très largement utilisée, donc de nombreux logiciels existent (pas forcément adaptés pour nos problèmes !)

- **Inconvénient :** formulation des éléments parfois difficile, méthode plus complexe

Résolution numérique d'E.D.P.

Exemple d'utilisation pour en FRAP



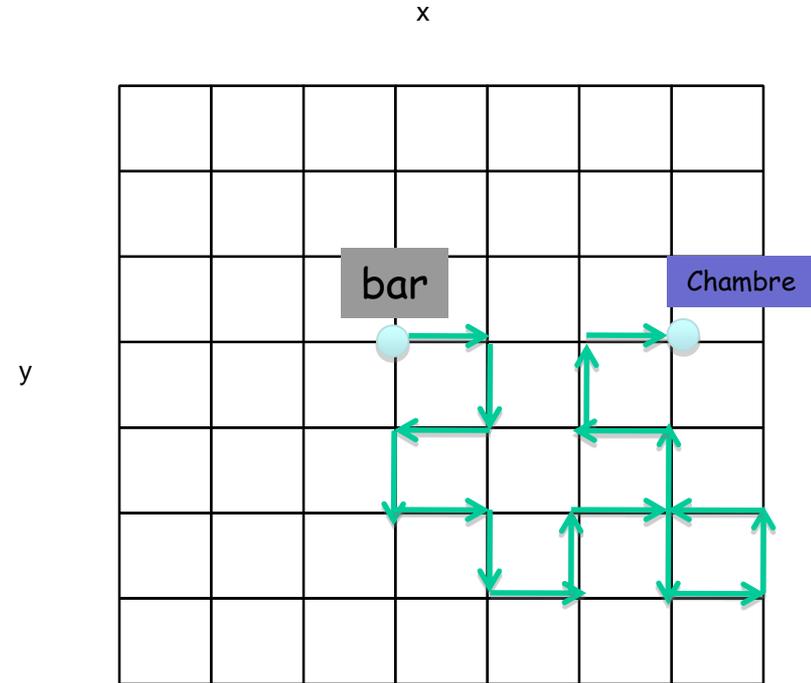
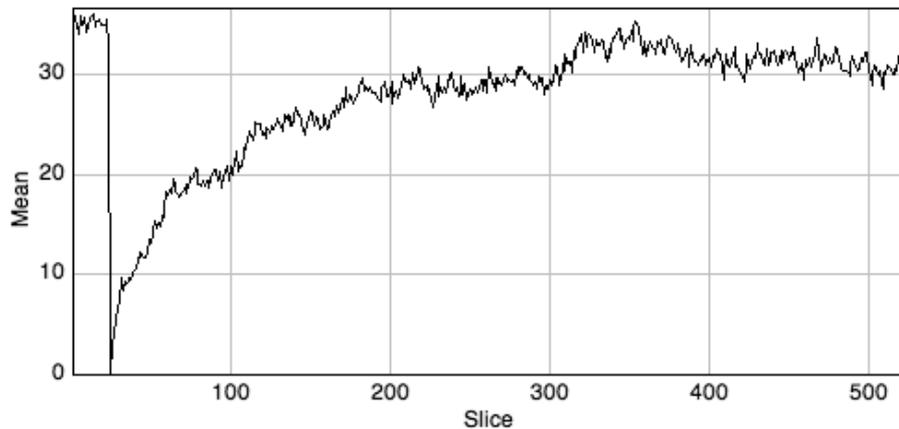
Simulation numérique par Monte-Carlo

Ex : marche aléatoire sur une grille (Random Walk)

Probabilité de « saut » d'un site à l'autre :
 $p = 1/4$ (quatre directions)

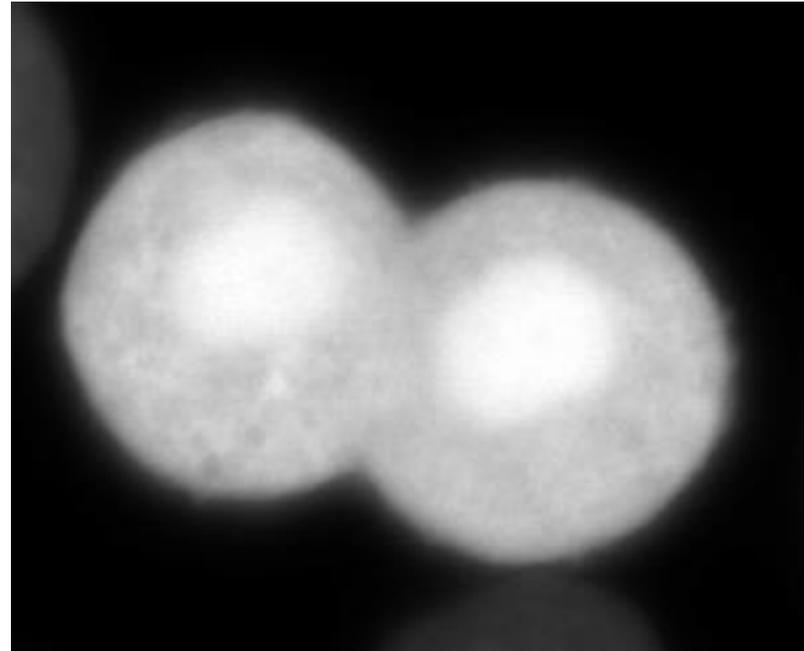
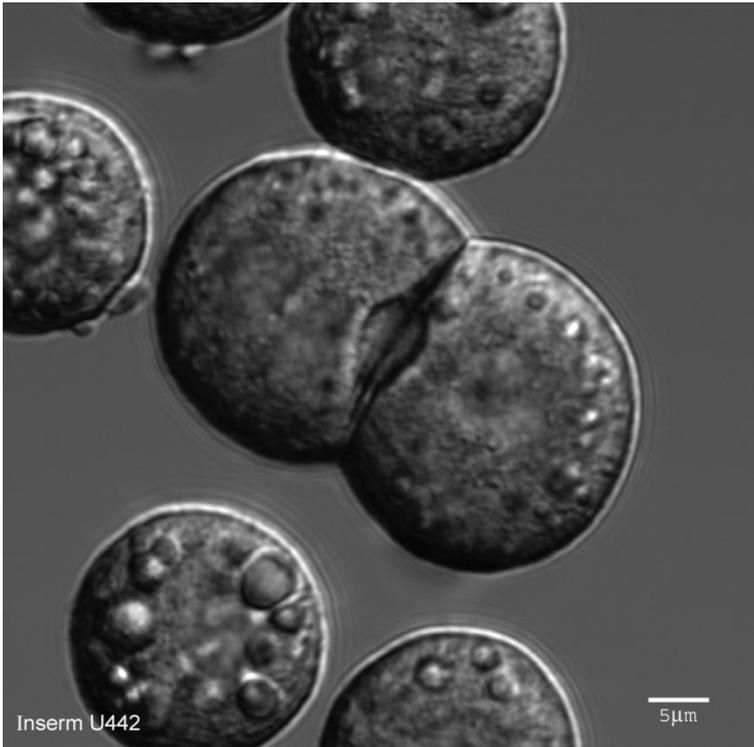
Pour la FRAP, on utilise N marcheurs pour représenter les molécules du système en train de diffuser

Exemple de données générées :

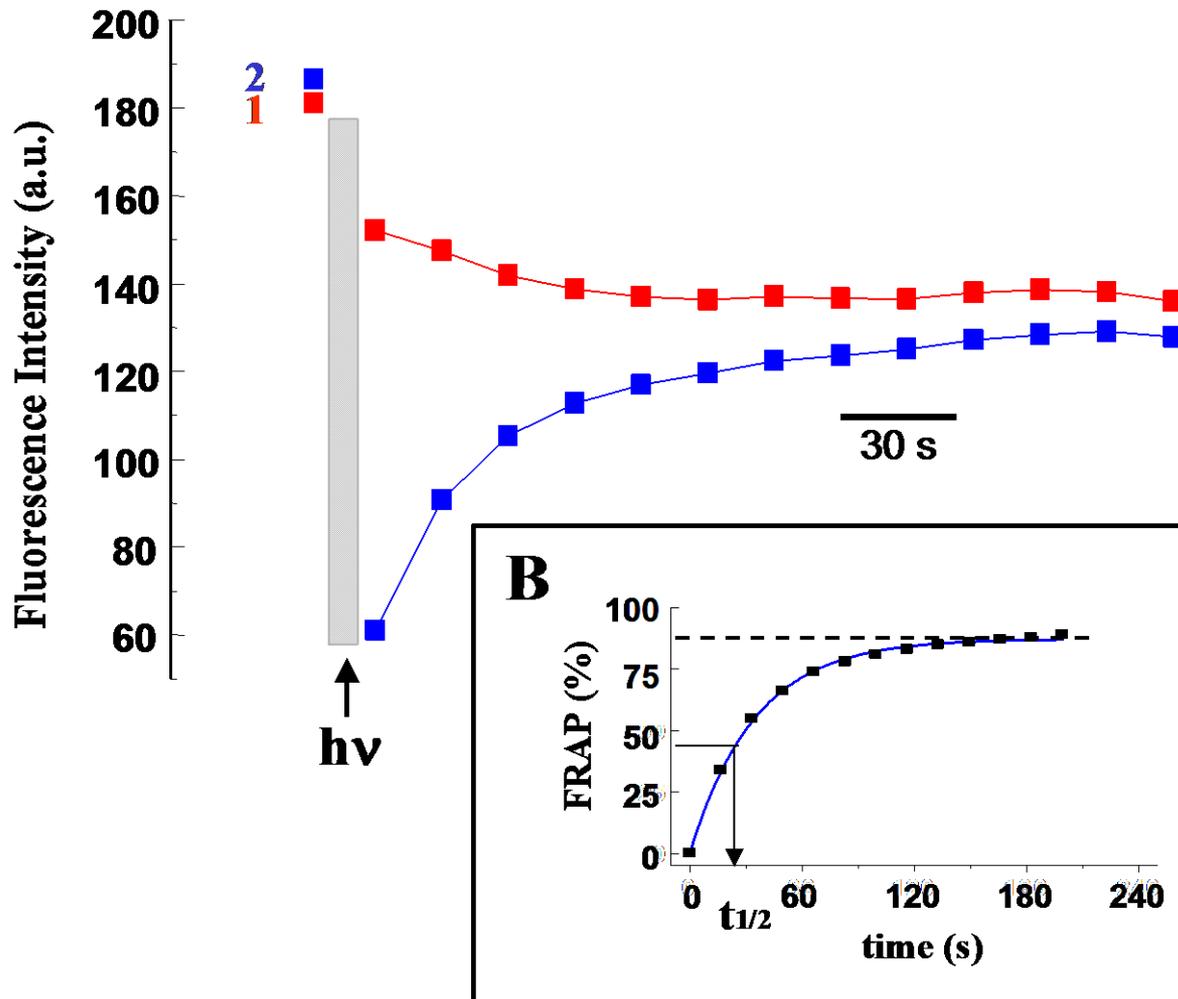
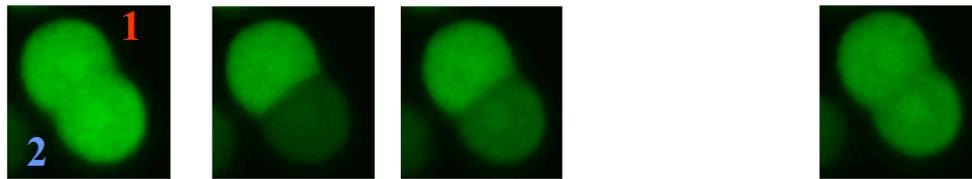


- **Avantages :**
 - extrêmement souple (lois locales, frontières, processus) et générique
 - simple à programmer (en première approche!)
- **Inconvénient :** calculs lourds (mémoire et temps), ne permet pas de fitter des données (pas de correspondance avec modèle théorique)

Mesure des flux intercellulaires : Perméabilité des gap junctions



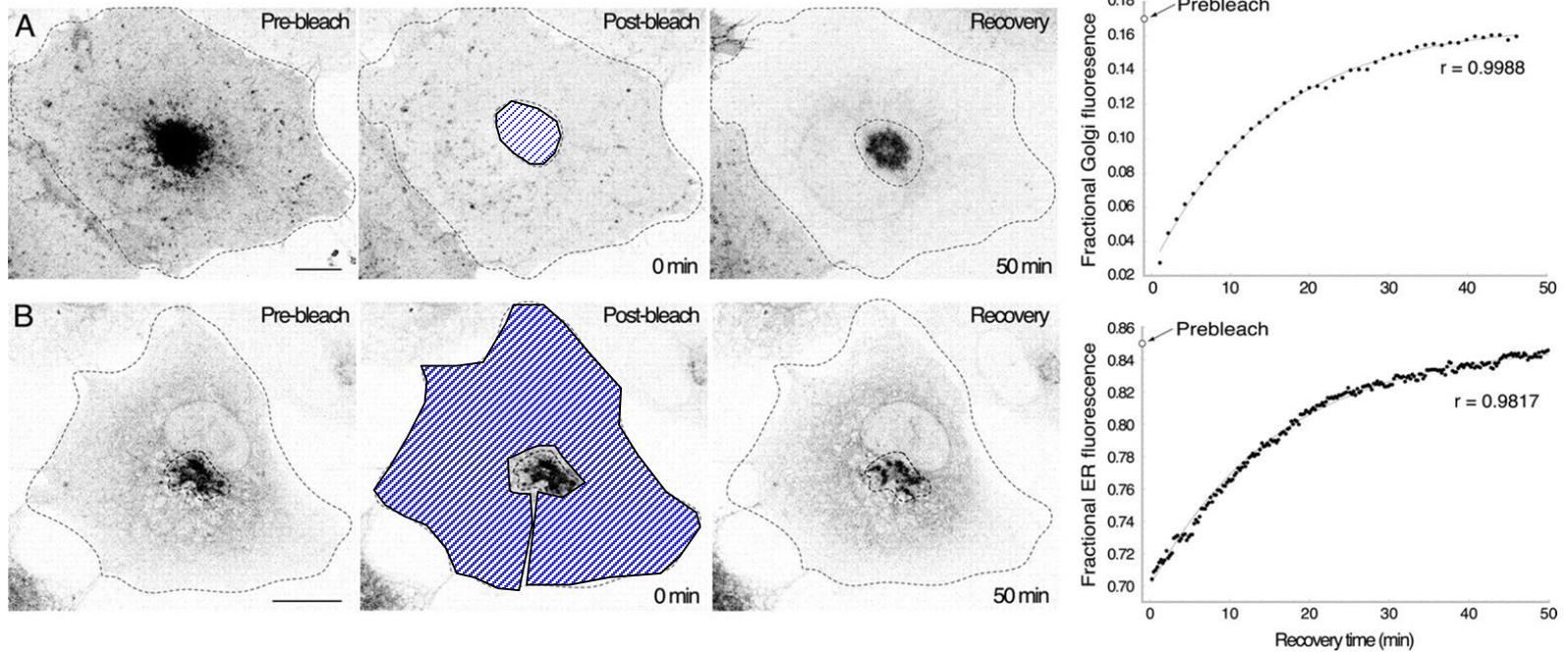
Hépatocytes isolés maintenus en culture 5 à 6h.
3μM Calcéine AM pendant 20 minutes, à 37°C.
Calcéine (623 Da), est un marqueur de la perméabilité des gap junctions.

A

	% de récupération	t1/2 (sec)
Contrôle	64 +/-2	105 +/-6
Vasopressine (10 nM)	56 +/-3	84 +/-11
Noradrenaline (10µM)	76 +/-10	81+/-14
Octanol (500 µM)	11 +/-3	ND

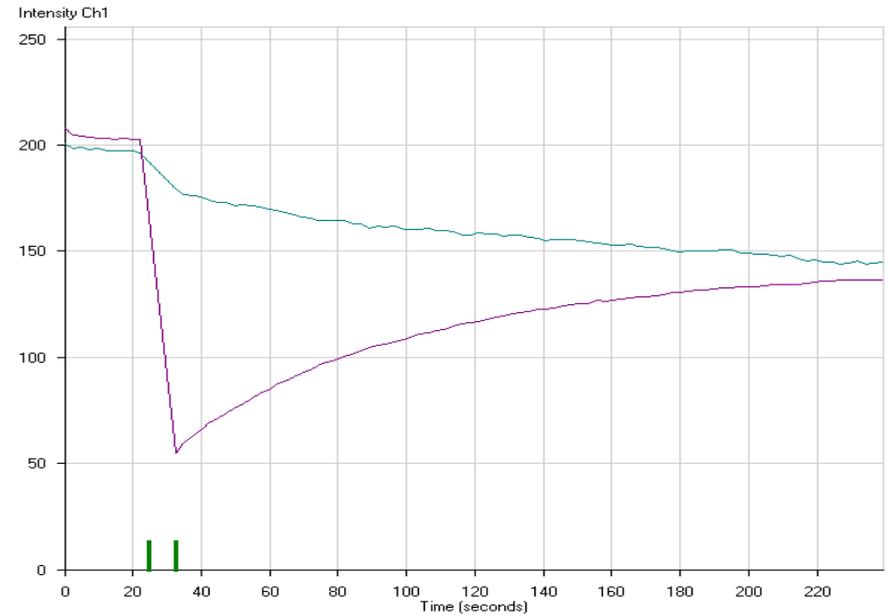
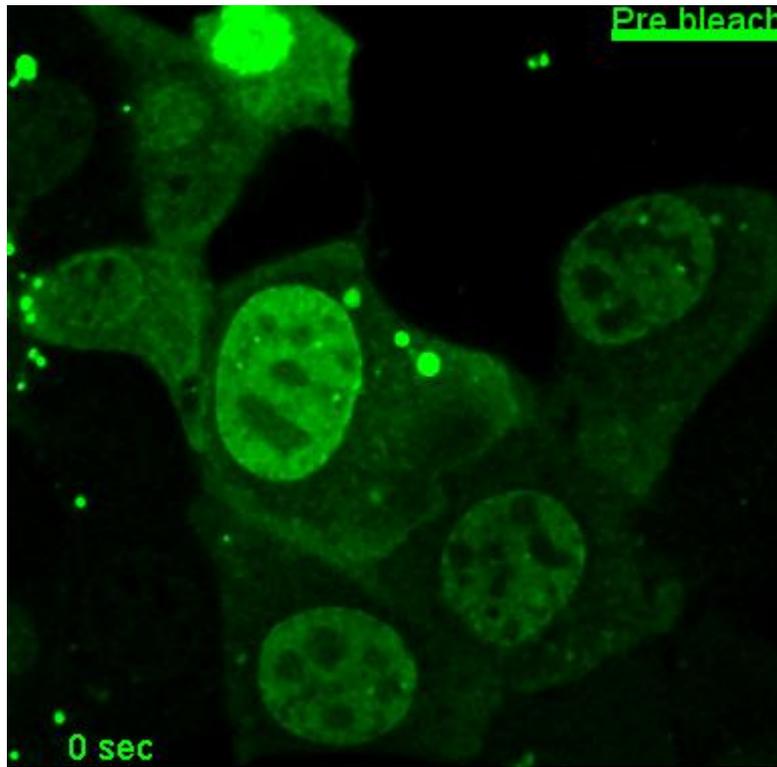
Clair et al., J. Cell Sci (2001) 114, 1999-2007

Mesure des flux Golgi \leftrightarrow RE

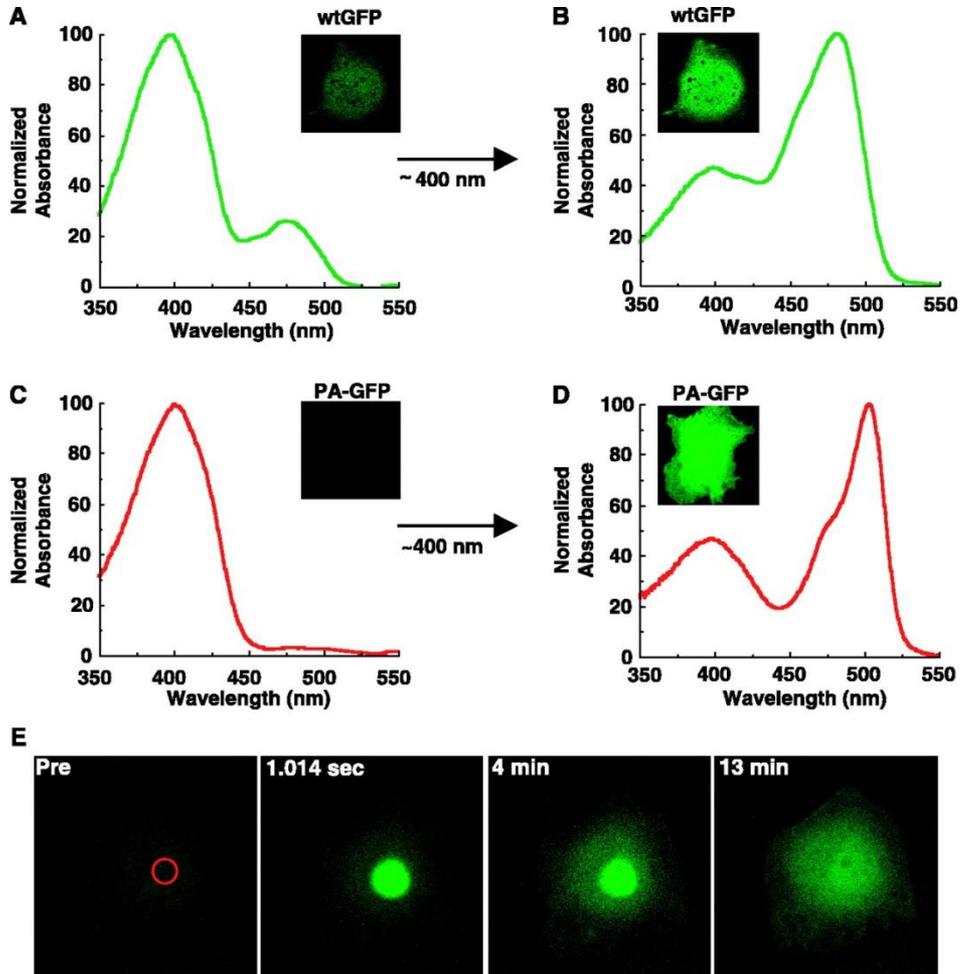


Dahm et al. , *Mol. Biol. Cell* (2001).

Mesure des flux nucléo-cytoplasmiques



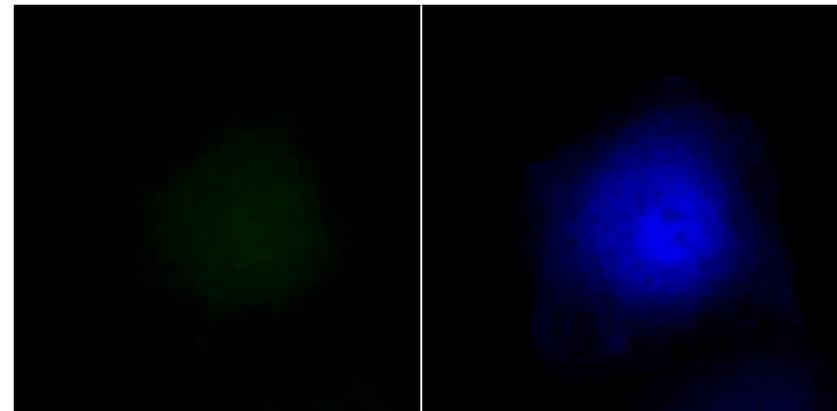
PA GFP = Photo-Activable GFP



Avant photoactivation:

Exc 488nm

Exc 405nm



*Seules les molécules activées sont fluorescentes. On peut suivre leur durée de vie (dégradation) et leur comportement en absence de synthèse.

*Photoactivation est généralement rapide <1sec : équivalent voir meilleur que le photobleaching.

*Permet de marquer spécifiquement une cellule et de suivre son devenir au sein d'une population. A condition qu'il n'y ait pas de communication entre les cellules.

PA-GFP : Après irradiation à ~400nm excitabilité à 488 est augmentée d'un facteur 100. Patterson et Lippincott-Schwartz (2002)

Kaede : " feuille d'érable " (corail) : abs508/em518 → abs572/emm582 après irradiation à ~400nm (Ando et al. 2002). Forme des tétramères.

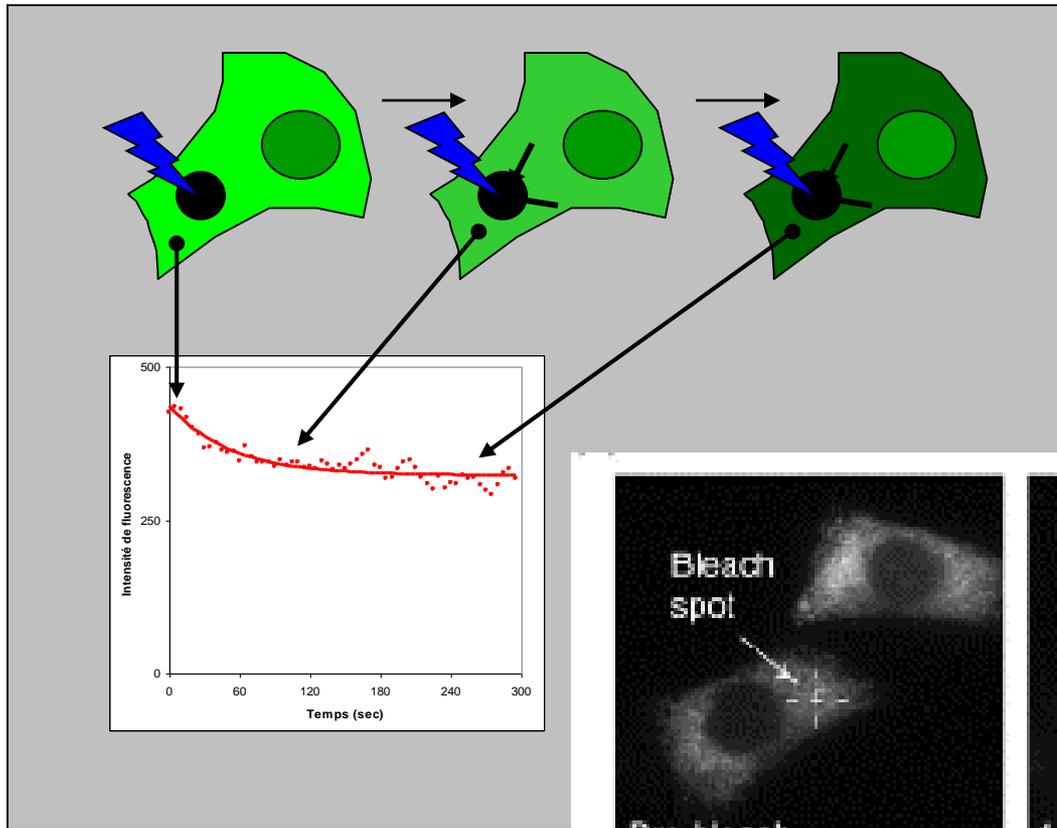
KFP1 : (anémone de mer) Augmentation de la fluo rouge (x30) après irradiation en vert (~532nm) (Chudakov et al. 2003). Forme des tétramères.

PS-CFP : (anémone de mer) 402/468 → 490/511 le ratio vert/cyan augmente de 1500 . Monomérique. (Chudakov et al. 2004)

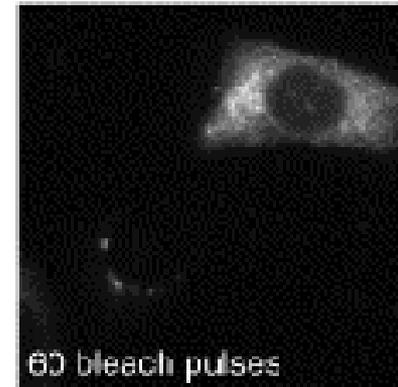
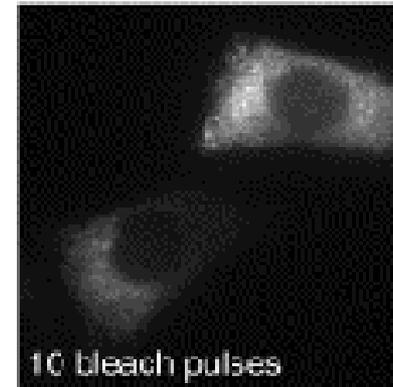
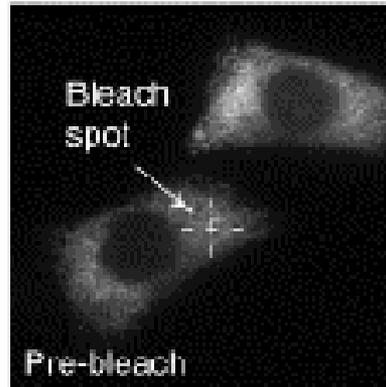
Dronpa : (Corail) " Erasable " **PA-GFP** Dron : ninja " disparaître " PA : photoactivable... Excitation 503/em518nm. « Bleache » très rapidement à 490nm retrouve sa fluorescence très rapidement après irradiation à 400nm. (Ando et al. 2004).

Dendra : (Dendronephthya, corail de la mer rouge). exc486/emm505 → exc558/emm575 après irradiation à 405nm ou **488 nm**. Monomérique. (Gurskaya et al. 2006)

FLIP : Fluorescence Loss Induced by Photobleaching

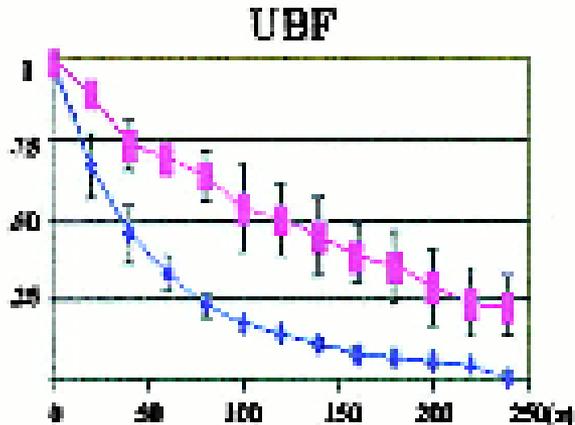
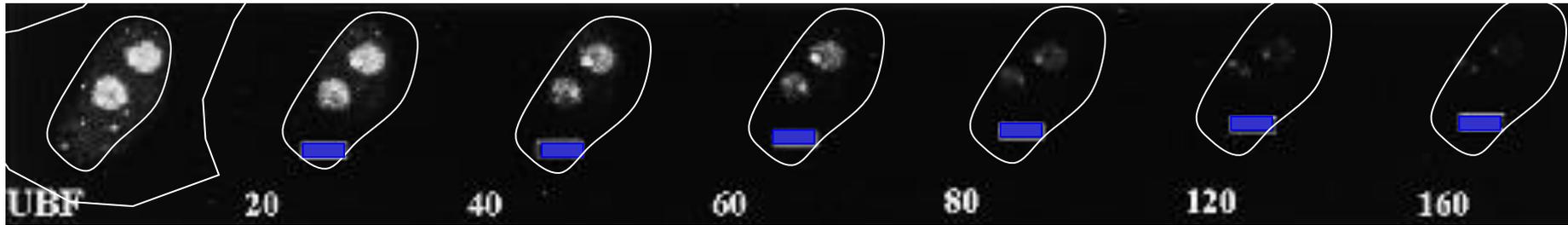


Résultat qualitatif
RE = structure continue



FLIP : temps de résidence

Quand il est impossible de faire du FRAP...



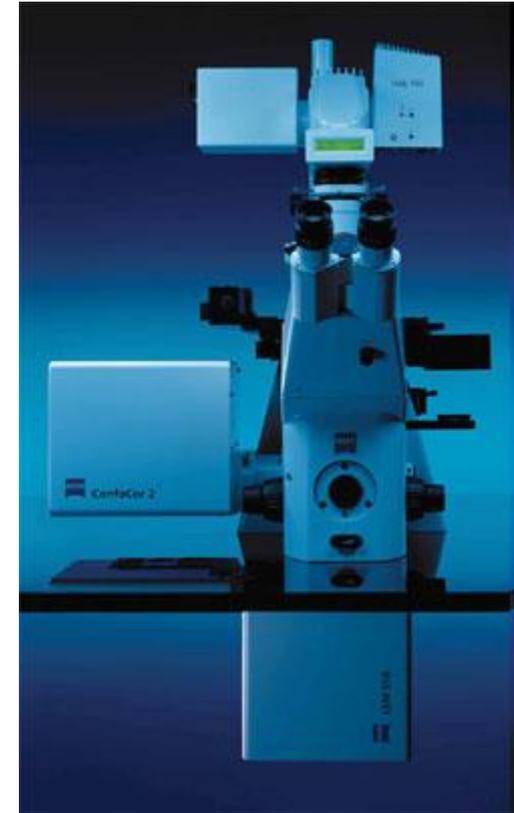
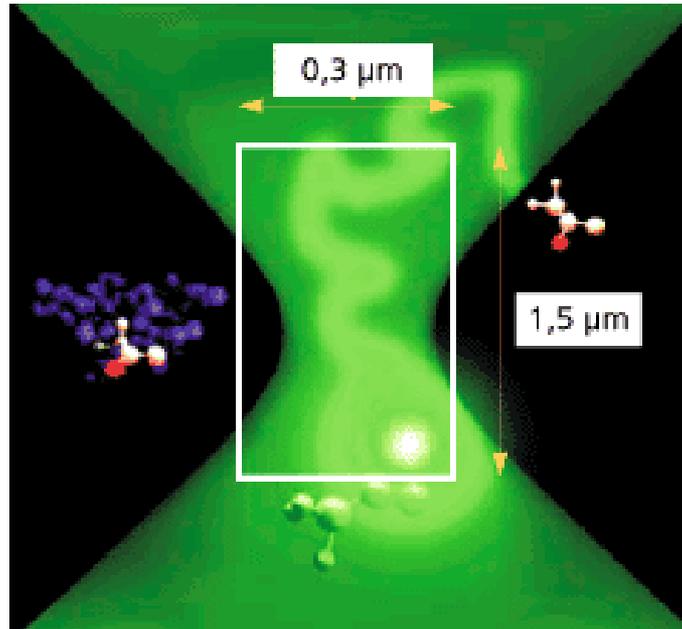
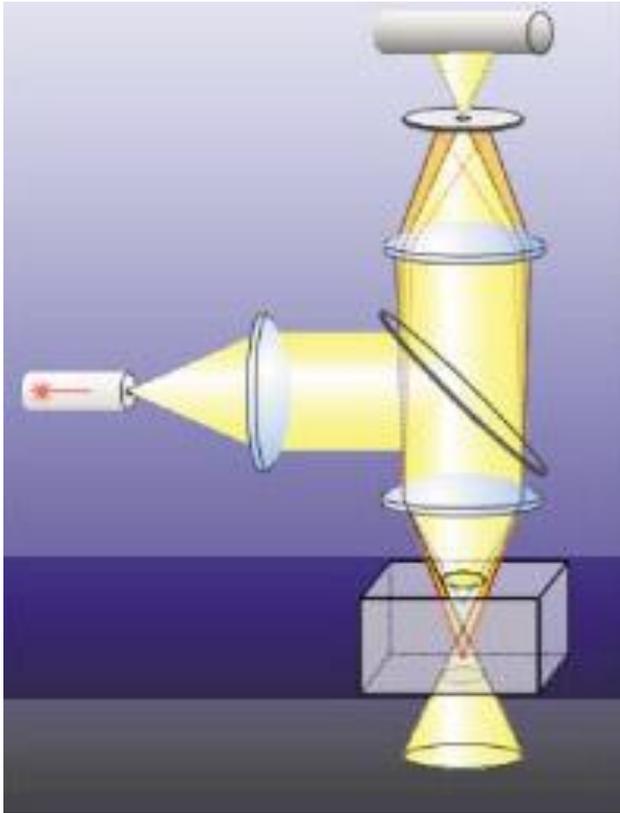
+ActD

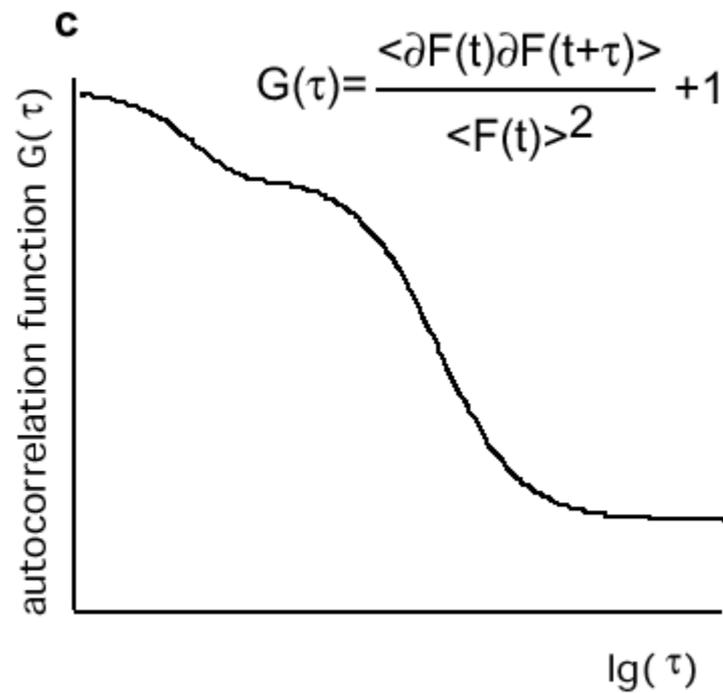
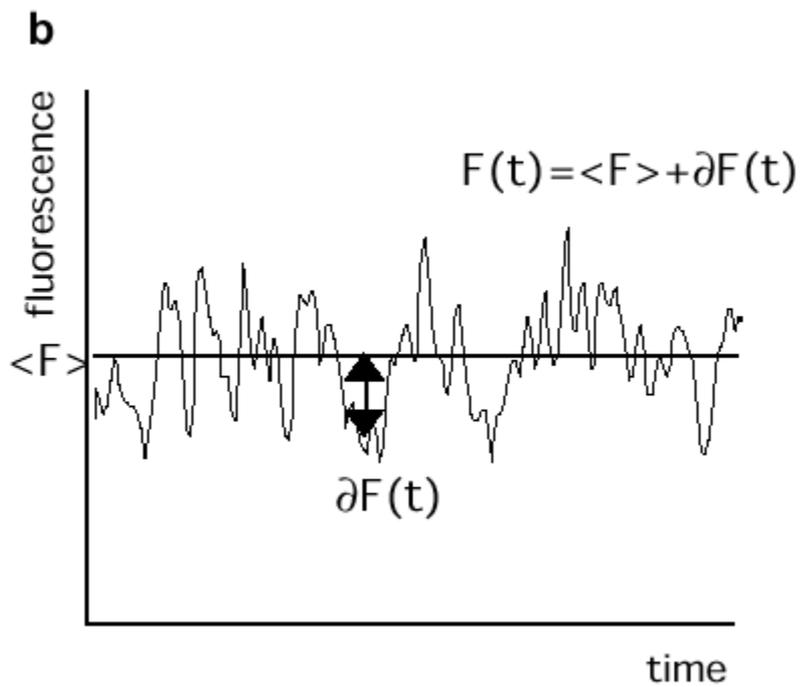
	$t_{1/2}$
- Act D	45 sec
+Act D	120 sec

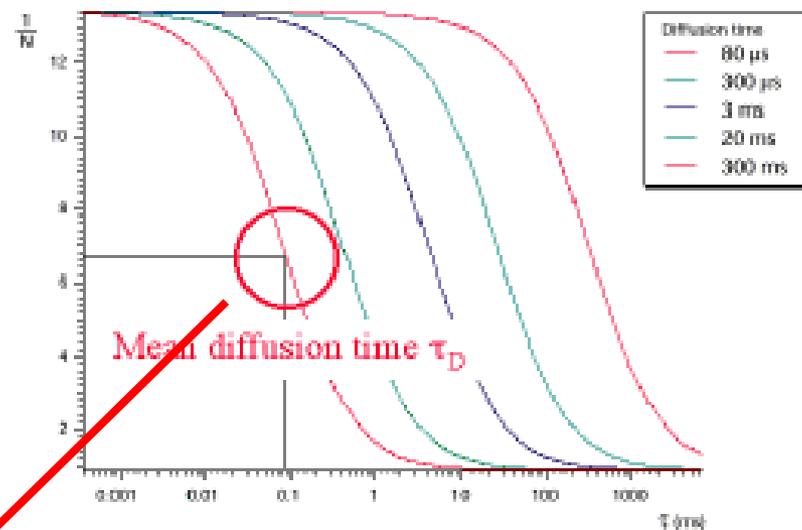
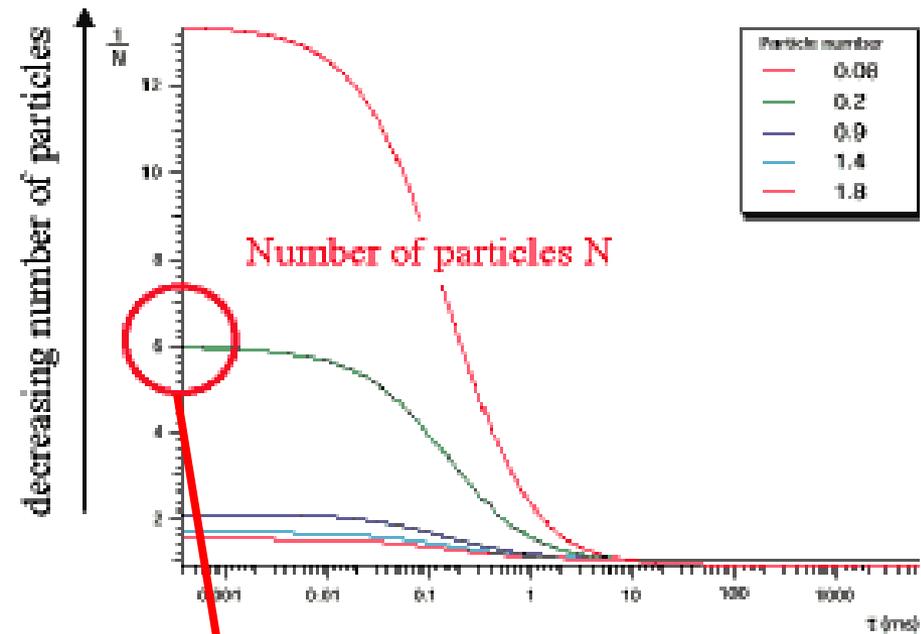
Chen and Huang, *J. Cell Biol* (2001)

En présence d'ActD, UBF reste plus longtemps sur son site.

FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy







increasing diffusion time = mass

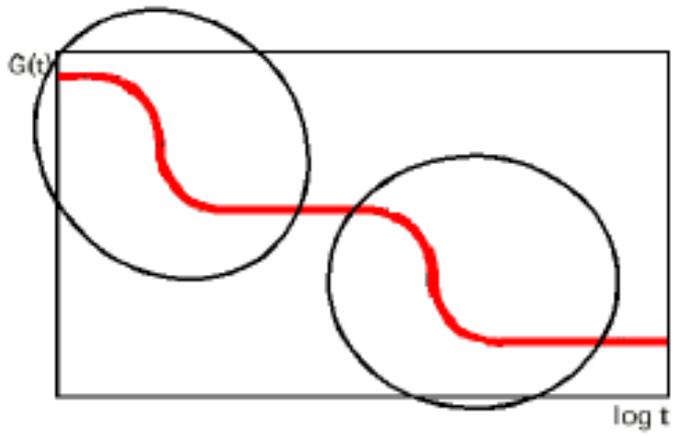


curve mainly determined by particle 1

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right] \left[\frac{1}{1 + \frac{\tau}{K^2 \tau_D}} \right]^{\frac{1}{2}} + D.C.$$

$$K = \omega_2 / \omega_1$$

$$\tau_D = \frac{\omega_1^2}{4D}$$



curve mainly determined by particle 2

- **Direct read out:**

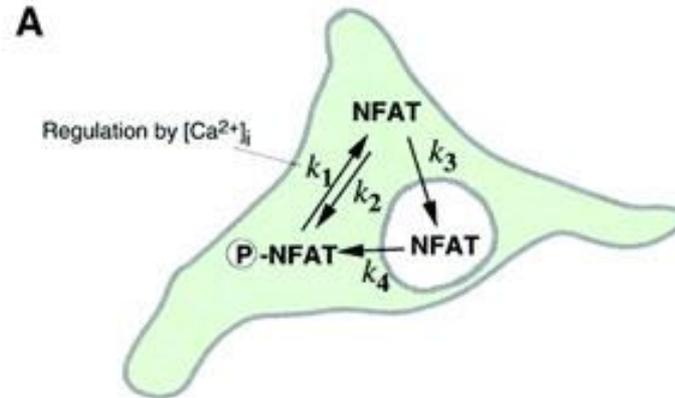
- Mean Number of Molecules
- Diffusion times
- Bound/free ratio

- **Calculated molecular parameters:** ·

- Concentration c [mol/l]
- Binding constants K [mol⁻¹]
- On/off-rate constants k_{ass} [mol⁻¹s⁻¹]; k_{diss} [s⁻¹]

Notion de modélisation de cinétique

Décodage de la fréquence des oscillations calciques par NFAT.



y_1 : NFAT cytoplasmique phosphorylé

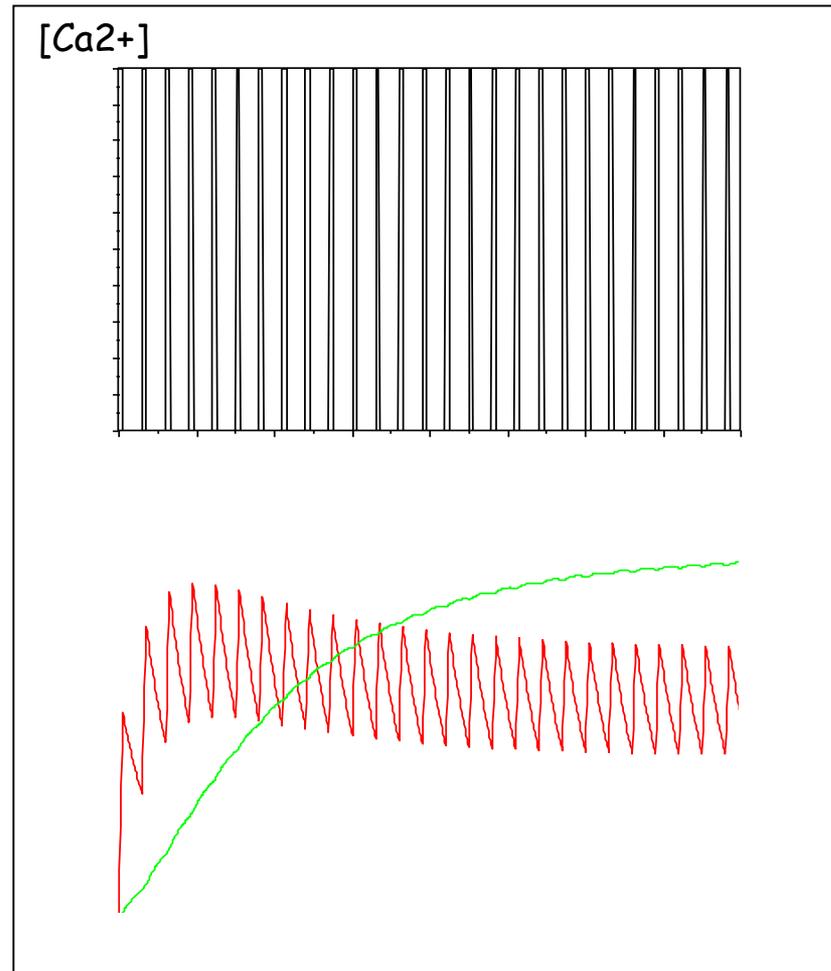
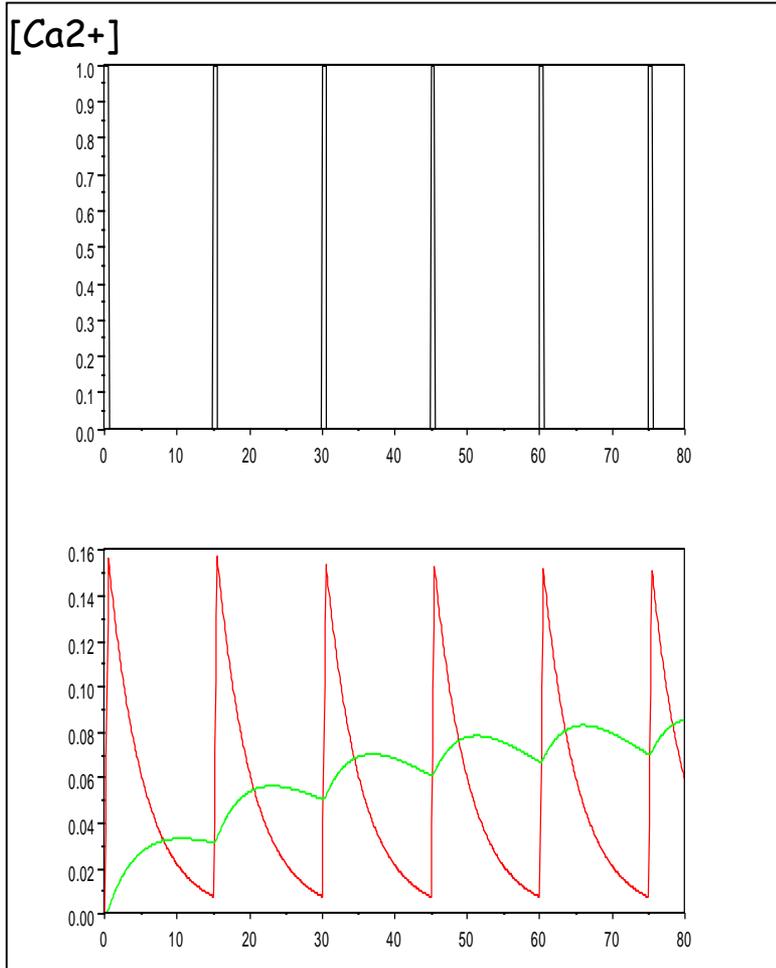
y_2 : NFAT cytoplasmique déphosphorylé (par calcineurine)

$1 - y_1 - y_2$: NFAT nucléaire

$$dy_1/dt = -k_1 \cdot y_1 + k_2 \cdot y_2 + k_4 \cdot (1 - y_1 - y_2)$$

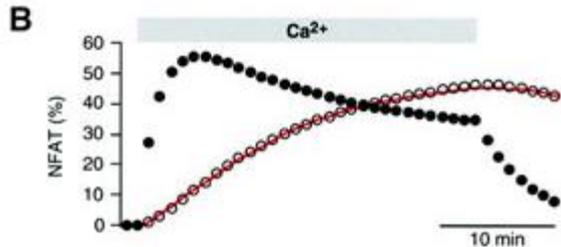
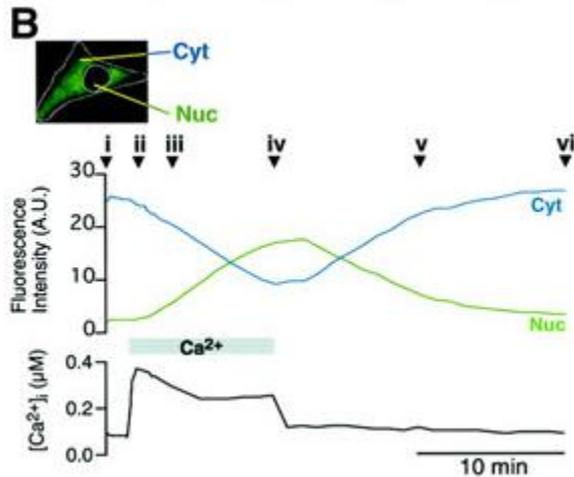
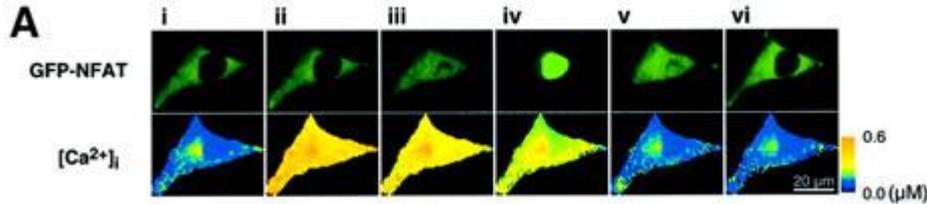
$$dy_2/dt = k_1 \cdot y_1 - (k_2 + k_3) \cdot y_2$$

En absence de calcium, $k_1=0$



— NFAT cytoplasmique déphosphorylé= y_2
— NFAT nucléaire = $1-(y_1+y_2)$

Mesure des paramètres cinétiques in-vivo...



1- Acquisition d'une série d'image time-lapse.

2- Analyse des images : mesure de l'intensité de fluorescence moyenne dans le noyau et dans le cytoplasme au cours du temps.

3- Fit des données et détermination des valeurs expérimentales des paramètres du modèle.

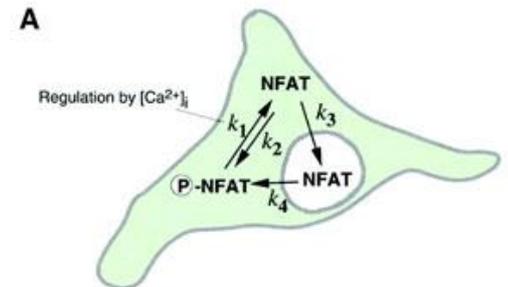
$$K_1 = 0.359 \text{ min}^{-1}$$

$$K_2 = 0.147 \text{ min}^{-1}$$

$$K_3 = 0.060 \text{ min}^{-1}$$

$$K_4 = 0.035 \text{ min}^{-1}$$

La déphosphorylation est 10 fois plus rapide que la phosphorylation !



Modélisation et FRAP (ou iFRAP) Mesure du temps d'élongation de RP1 *in vivo*

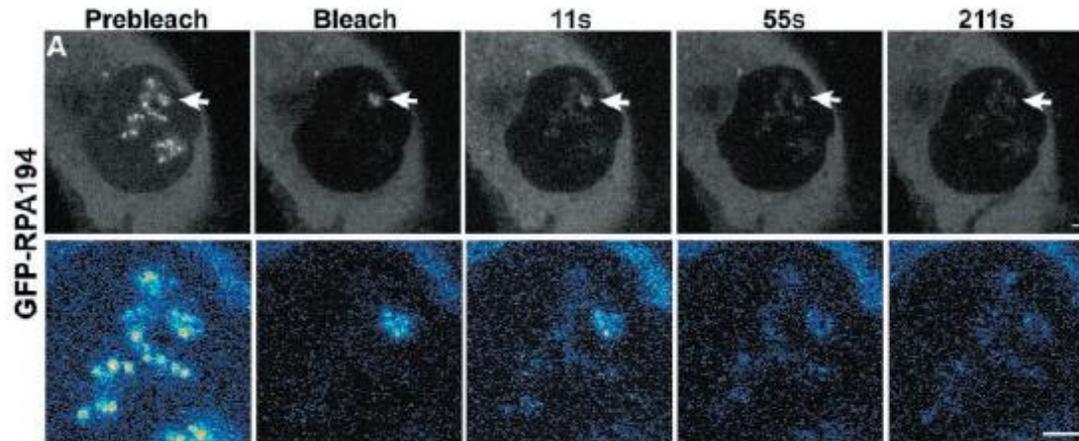
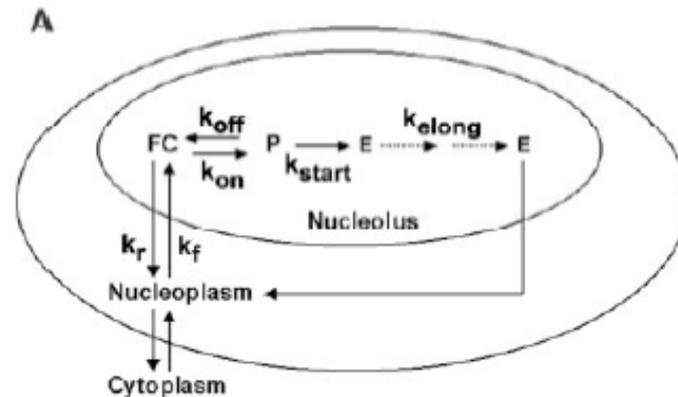
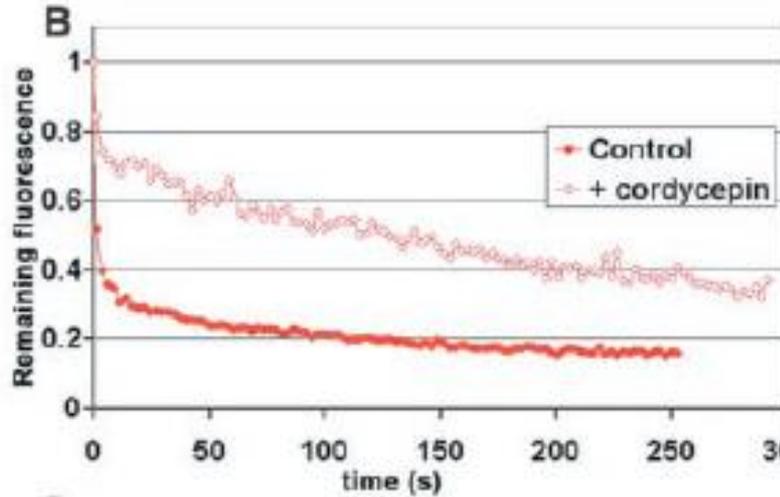


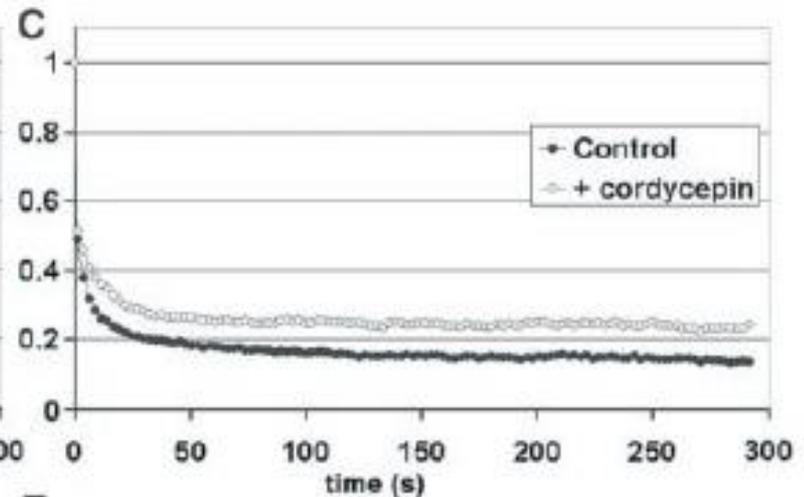
Fig. 4. Kinetic modeling of pol I assembly and elongation. **(A)** Kinetic model of RNA pol I kinetics. k_r , nucleolar dissociation rate; k_f , nuclear association rate; k_{off} , promoter off rate; k_{on} , promoter on rate; k_{start} , elongation entry rate; and k_{elong} , elongation rate. **(B)** Sensitivity analysis of the least-squares best-fit of GFP-RPA194 by altering elongation time.



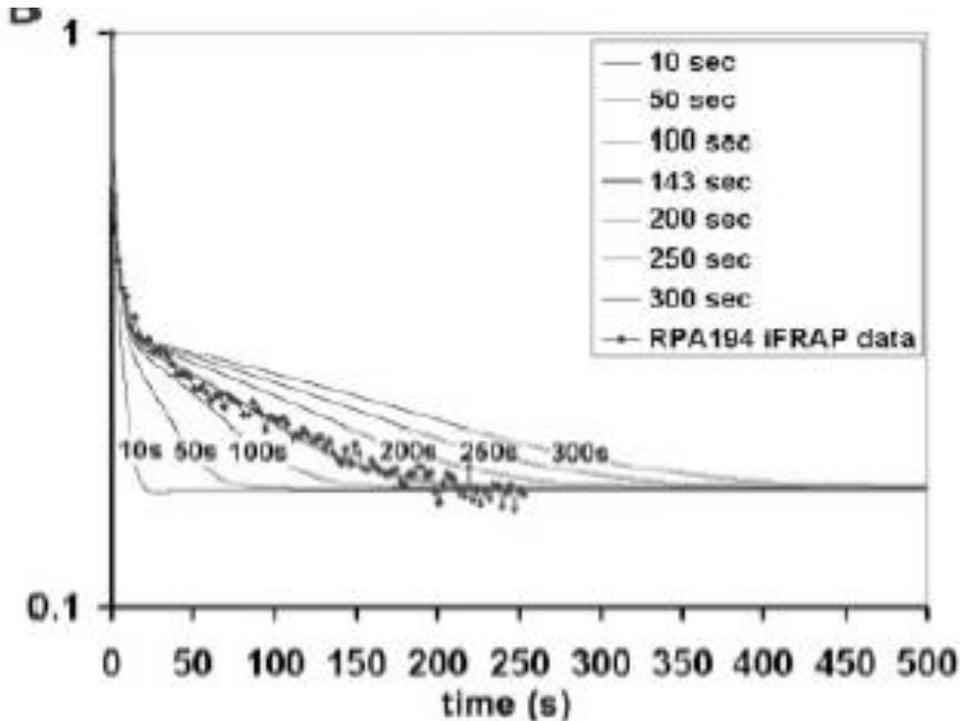
GFP-RPA194



GFP-UBF

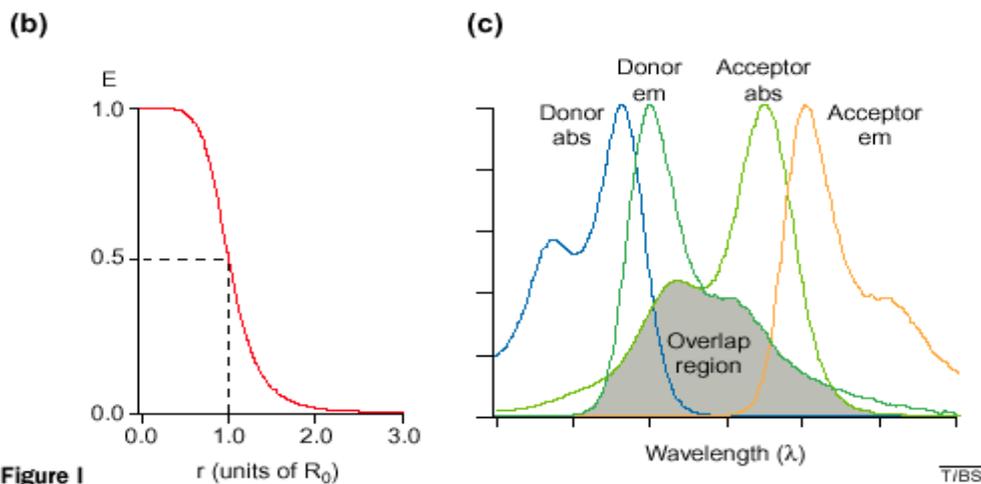
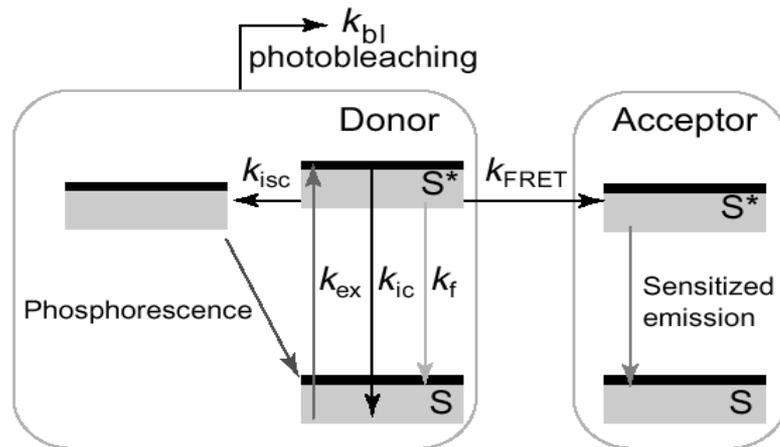
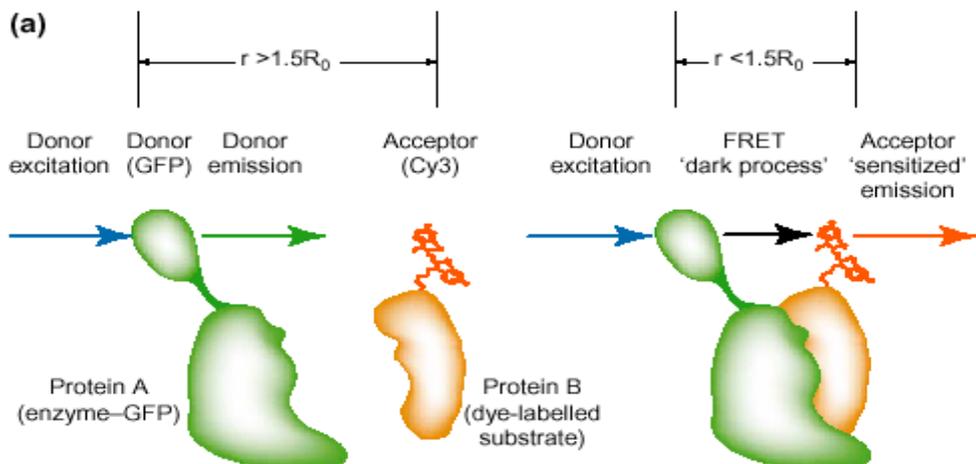


Rq : La cordycepine bloque la RPI en phase d'élongation mais pas UBF qui est un facteur d'initiation



Elongation : 140sec
soit 93 nucléotides/sec pour un gène d'ADNr humain de 13.3kb.

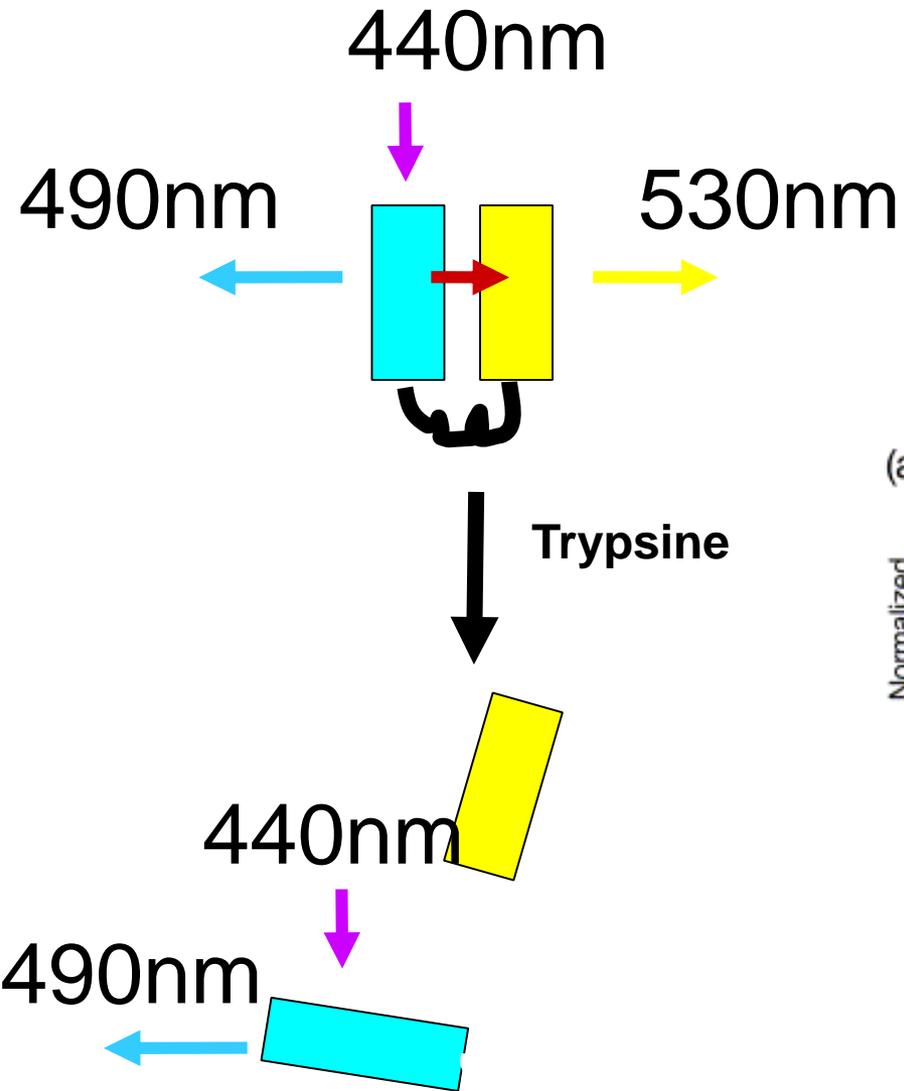
Interactions moléculaires in situ : FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer



r : Forester radius :
Distance pour laquelle le transfert
d'énergie est actif à 50%

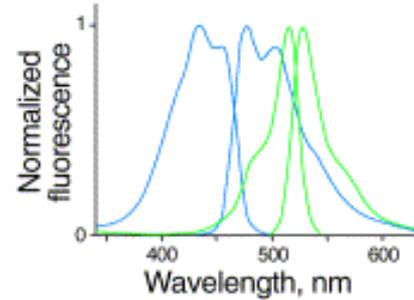
Figure 1

Sondes basées sur le FRET

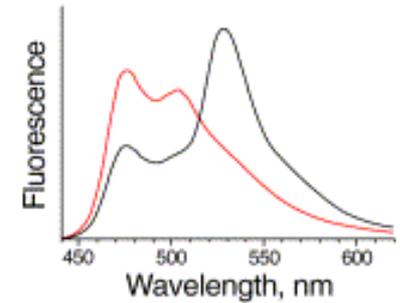


CFP-YFP pair

(a) Spectral overlap



(c) Cleavage by trypsin



A

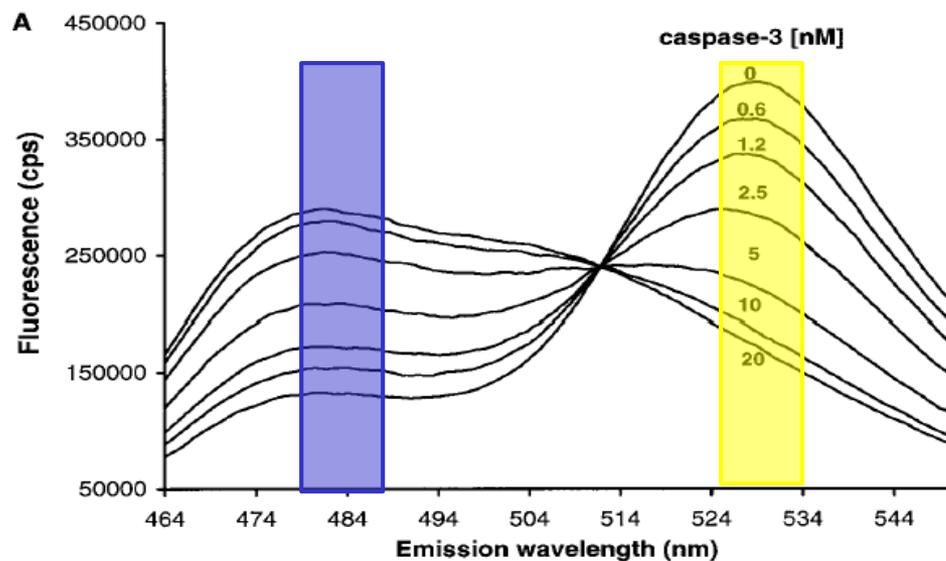
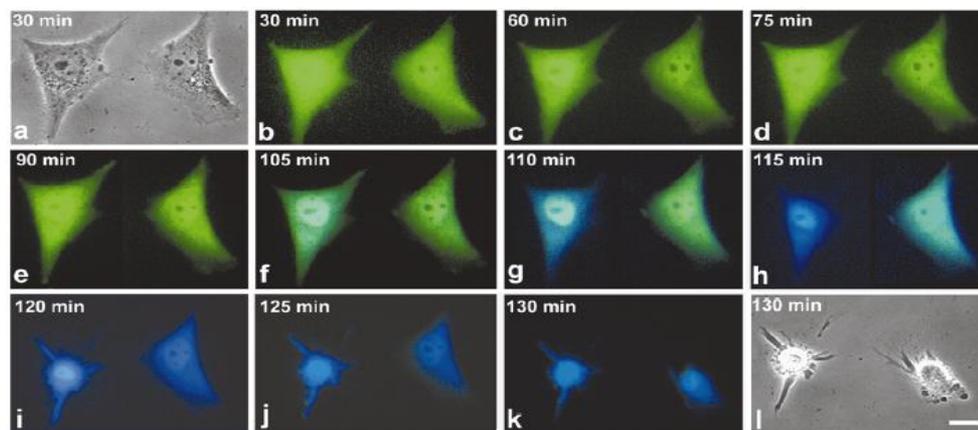
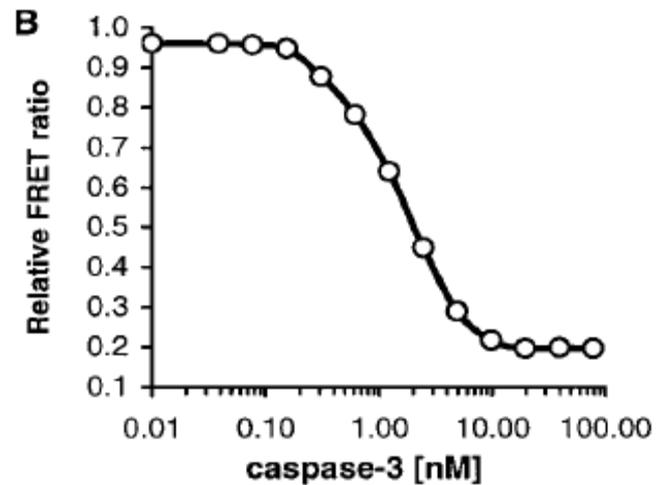
CFP-YFP: CFP ----- YFP

sensor C3: CFP ----- *D-E-V-D* ----- YFP

linker size

12 aa

16 aa

**B**

Conclusion

Les méthodes de photoblanching et photoactivation peuvent être utilisées, entre autre, pour étudier:

- *Mobilité des molécules membranaires (lipides et protéines).
 - *Mobilité des molécules intracellulaires (GFP-protéine).
 - *Interactions moléculaires (Ex : protéines de la chromatine)
 - *Echanges entre compartiments intracellulaires (Ex : trafic nucléocytoplasmique).
 - *Interactions cellulaires (Ex : fonctionnalité des gap-junctions).
- *La technique de FRET permet de mettre en évidence des interactions moléculaires