



Introduction aux F-techniques : dynamiques et interactions moléculaires dans le vivant



Corentin Spriet
Plateau TISBio, IRI-UGSF
Lille




François Waharte
Plateforme Imagerie Cellulaire et Tissulaire
Institut Curie/CNRS, Paris

- Introduction aux F-techniques
- Introduction à la dynamique et aux interactions moléculaires
- Mesure de dynamique moléculaire par FRAP
- Mesure de proximité moléculaire par FRET

Utilisation de l'imagerie de fluorescence en biologie ?

Méthodes usuelles (biochimiques, cytométrie...):

- vue globale, pas d'information spatiale,
- pas de dynamique moléculaire,
- peu sensibles à une interaction localisée (faible proportion des protéines observées)

L'imagerie quantitative de fluorescence :

- donne une information spatiale donc mesure localisée des interactions, de la mobilité,
- permet l'utilisation de cellules vivantes, voire tissu/organisme..
- permet de tenir compte de l'hétérogénéité cellulaire (expérience sur cellule unique)

Pour quelles informations ?

- **localisation** : combien de protéines/cellules et à quel endroit ?
- **mobilité** : localisation fixe ou non, caractériser le mouvement cellulaire ou moléculaire
- **interactions** : entre cellules ou entre molécules

Au niveau **cellulaire** (cellule isolée) ou **pluri-cellulaire** (cellule dans un contexte : organisme ou tissu) et moléculaire...

Utilisation de l'imagerie de fluorescence en biologie ?

Propriétés de la fluorescence :

- Intensité (majoritairement)
- Spectre
- Durée de vie
- Polarisation

Intensité de fluorescence :

$$F(t) = k Q \int W(r) C(r, t) dr$$

$k Q$ = rendement quantique et efficacité de détection
 $W(r)$ = Volume d'observation
 $C(r, t)$: concentration du fluorophore au cours du temps, contient la "physique" du mouvement (diffusion)

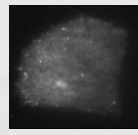
Les F-techniques

Utilisation de la fluorescence pour une étude fonctionnelle du vivant:

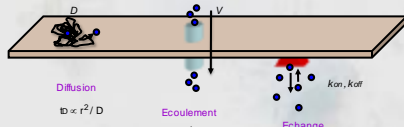
- **FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), photoconversion** : mobilité moléculaire (perturbation)
- **FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)** : mobilité moléculaire (mesure de fluctuations d'intensité)
- **FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging)** : mesure de modifications de l'environnement du fluorophore
- **FRET (Förster Resonance Energy Transfer)**: mesure de proximité moléculaire à l'échelle nanométrique

La dynamique moléculaire dans le vivant

Processus dynamiques complexes



Protéine Rab6-GFP



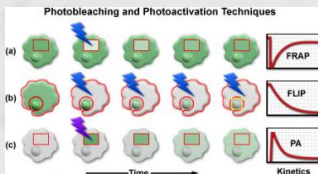
Diffusion
 $\tau_D \propto r^2 / D$
 $D: 0.01 - 100 \mu m^2 s^{-1}$

Ecoulement
 $\tau_V \propto r^3 / V$
 $V: 0.2 - 2 \mu m^3$

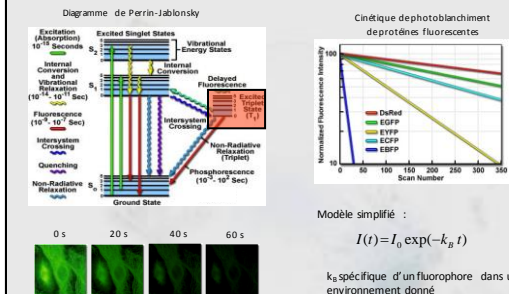
Echange
 $\tau_{chem} \propto r^0 / k_{on} = 1 / k_{on}$
 $k_{on}: 10^3 - 10^{10} M^{-1} s^{-1}$

Photo-perturbation de la fluorescence

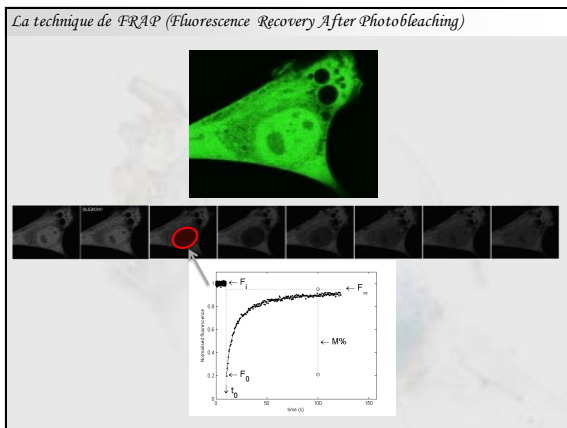
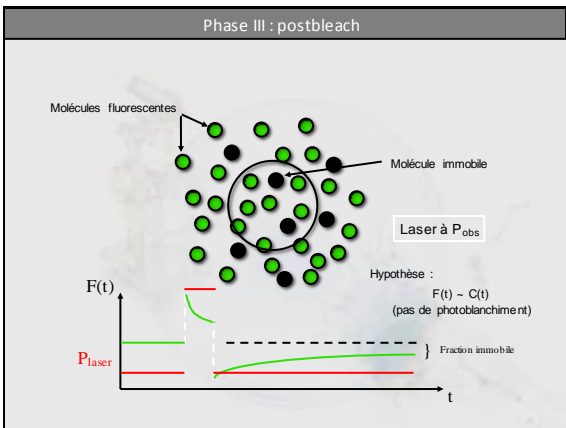
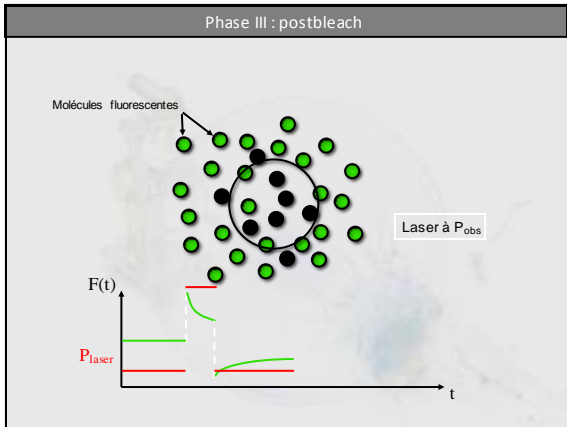
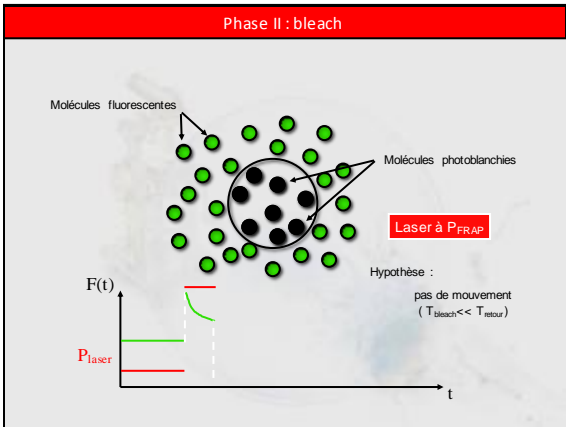
- perturber le système en faisant :
 - disparaître de la fluorescence (Photoblanchiment)
 - apparaître de la fluorescence (Photoactivation)
 - changer le spectre d'émission (Photoconversion)



Le photoblanchiment (photobleaching)



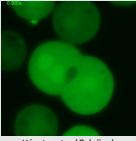
Modèle simplifié : $I(t) = I_0 \exp(-k_b t)$
 k_b spécifique d'un fluorophore dans un environnement donné
 Avantage : utilisable avec quasiment tous les fluorophores



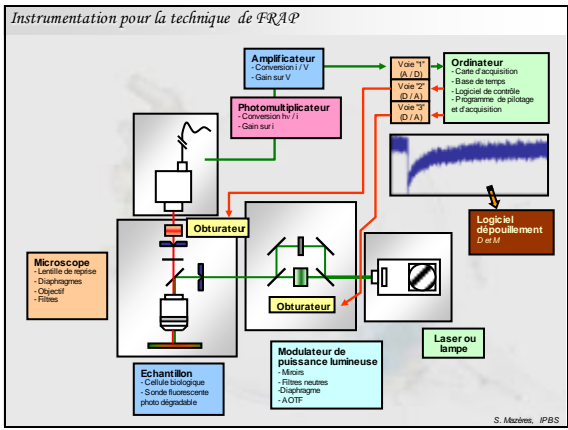
Quelles informations peut-on obtenir ?

- Diffusion
- Flux
- Echange (kon/koff)
- Fraction mobile/immobile
- Communication entre compartiments cellulaires ou entre cellules
- Formation ou désassemblage d' un complexe moléculaire
- Continuité d' une organelle
- Confinement de la diffusion
- autres informations fonctionnelles suivant le système étudié...


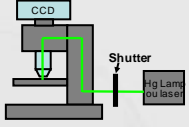
Exemple de communication intercellulaire (perméabilité des gap-junctions)



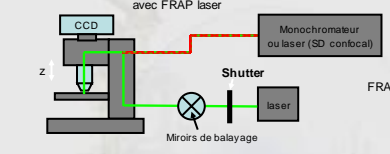
Hépatocytes (Calcéine)

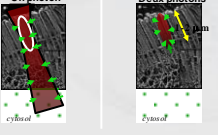


Combinaisons instrumentales possibles

- FRAP en champ large
 

- FRAP sur confocal
 - Module FRAP présent sur tous les confocaux commerciaux
 - Souplesse dans le mode de balayage (spot, ligne, image) et dans la forme de la région de photoblanchiment.

Combinaisons instrumentales possibles

- FRAP + 4D : Combinaison d'acquisition vidéo WF ou spinning-disk 3D rapide avec FRAP laser
 

FRAP en point ou ROI
- FRAP + 2 photons
 

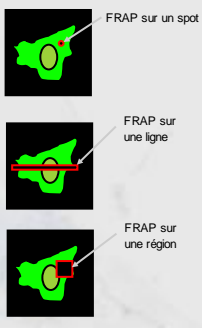
Mesure locale de la mobilité, en 3D (volume défini)

Même possibilités d'acquisition qu'en confocal

Modalités expérimentales pour la technique de FRAP

Temps d'acquisition ↓

- FRAP en spot, acquisition en spot (T)
(T_{bleach} et $dt \sim 10 \mu s$)
- FRAP en ligne, acquisition en ligne (XT)
(T_{bleach} et $dt \sim 1 ms$)
- FRAP en spot, acquisition en image (XYT)
(T_{bleach} et $dt \sim 10 - 1000 ms$)
- FRAP en ligne, acquisition en image (XYT)
- FRAP en région, acquisition en image (XYT)



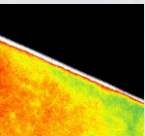
FRAP sur un spot

FRAP sur une ligne

FRAP sur une région

Intérêt de l'acquisition d'images

- Détermination de la région analysée (taille et position): important pour l'analyse et la modélisation
- Mesurer l'anisotropie de la redistribution de fluorescence
- Utiliser d'autres régions d'analyse pour corriger les courbes
- Possibilité d'analyser les profils d'intensité
- Distinguer la diffusion et flux



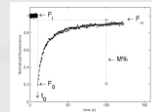
Multilayer of DMPC labeled with 1% mol/mol NBD PC ($T = 25^\circ C$)
(C. Favard)

Analyse quantitative des données de FRAP

- Détermination des paramètres d'acquisition
di images, Tbleach, taille zone bleachée
- Préparation des données brutes
correction éventuelle des données
- Extraction des courbes et profils
mesure F(t), C(x,t)
- Traitement des données extraites
normalisation, filtrage (logbin), représentation, moyenne
- Ajustement des données avec un modèle théorique :
 - manuel : pas de calcul d'erreur sur les paramètres mais fourchette de valeurs
 - régression non-linéaire (fit)

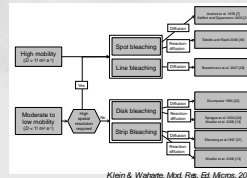
Modélisation mathématique

But : extraire des images ou de la courbe de retour une information sur la mobilité moléculaire



Comment ?

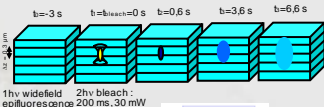
établir ou utiliser un modèle mathématique décrivant la dynamique moléculaire supposée des molécules d'intérêt



Klein & Wahrate, Mol. Res. Cell. Microsc. 2010

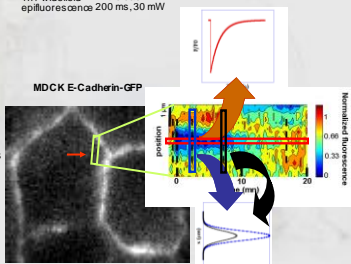
Exemple d'application biologique complète

Combinaison FRAP 2 photons et acquisition WF 4D



1hv widefield 2hv bleach : epifluorescence 200 ms, 30 mW

Dynamique de la E-cadhérine aux jonctions adhérentes

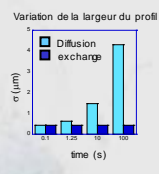
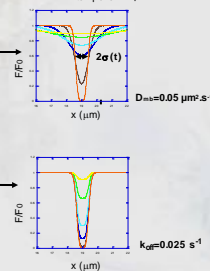
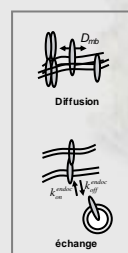


Thèse S. de Becco, PNAS 2009

Exemple d'application biologique complète

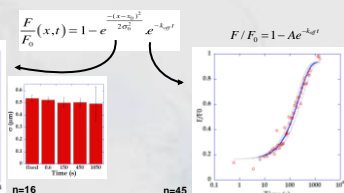
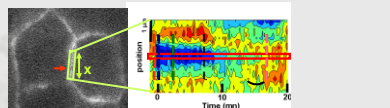
Distinction diffusion/échange

$$\frac{F}{F_0}(x,t) = 1 - \underbrace{\alpha(t)}_{\text{temporel}} \underbrace{e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2(t)}}}_{\text{spatial}}$$



Thèse S. de Becco, PNAS 2009

Exemple d'application biologique complète



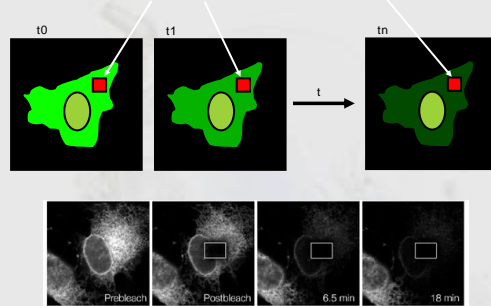
$\tau_{\text{résidence}} = k_{off}^{-1} = 230 \pm 50$ s

Dynamique dominée par l'échange du premier ordre

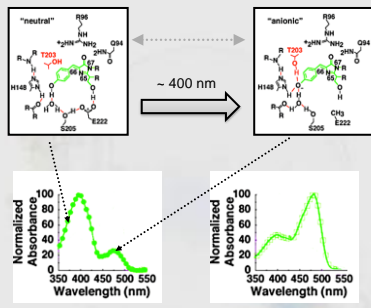
Thèse S. de Becco, PNAS 2009

Une autre approche : le FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching)

Photoblanchiment continu dans une région



Une autre approche : La photoconversion de fluorescence



Patterson et al. Science 2002, 297:1873

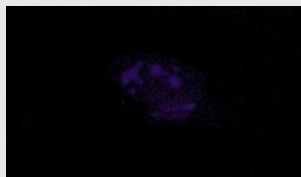
Une autre approche : La photoconversion de fluorescence

FP variant	Oligomerization state (no. of protomers)	Type of fluorescence activation	Wavelengths (nm) required for fluorescence activation	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	Molar extinction coefficient	Quantum yield	Relative brightness* (% of EGFP)
PA-GFP (62)	1	Off-On	488	504	517	17,400	0.79	43
PS-CFP (73)	1	Cyan-Green Conversion	405	402/490	468/511	34,000/27,000	0.16/0.19	17/16
Kaede (64)	4	Green-Red Conversion	~400	508/572	518/580	98,000/90,400	0.88/0.33	27/63
KaGFP (76)	4	Green-Red Conversion	~400	507/563	517/593	53,700/55,100	0.70/0.65	118/72
EosFP (66)	4	Green-Red Conversion	~400	506/571	516/581	72,000/41,000	0.70/0.62	159/80
DsRed2 (77)	1	Green-Red Conversion	~400	490/513	505/573	45,000/55,000	0.50/0.53	71/61
mCherry (79)	1	Green-Red Conversion	~400	505/580	515/591	49,000/28,000	0.69/0.63	106/56
mEosFP (79)	1	Green-Red Conversion	~400	506/569	516/581	84,000/33,000	0.66/0.60	174/62
mCherry (80)	1	Green-Red Conversion	~400	505/569	516/581	67,200/37,000	0.64/0.62	135/72
mEosFP2 (80)	1 ^a	Green-Red Conversion	~400	506/573	516/584	56,000/46,000	0.84/0.66	148/96
Dendra (73)	1	Reversible On/Off switching	~400-488	503	518	95,000	0.85	254
mEosFP2 (72)	1	Reversible On/Off switching	~400-488	496	518	39000	0.77	94
mCherry (81)	1	Reversible On/Off switching	~450-550	572	610	80,000	0.009	5
mCherry (81)	1	Reversible On/Off switching	~450-550	572	608	84,000	0.007	11.3
FluorCherry1 (79)	1	Reversible On/Off switching	390-440/ 570	570	596	18,000	0.46	26
ImFP (82)	4	Green-Red Conversion, Reversible On/Off switching	405 (conversion), ~400-488 (red)	488/551	516/580	52,200/35,400	0.43/0.47	71/52

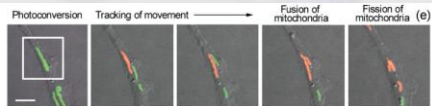
Wiedenmann et al. 2009

Exemples d'application

Dynamique moléculaire par photoactivation de la PA-GFP



Dynamique d'organelles par photoconversion de la Id-EosFP



Wiedenmann et al. 2009

Conclusion sur les techniques de photoperturbation

En perturbant l'équilibre du système, on peut sonder sa dynamique via l'utilisation de méthodes optiques avec une résolution spatiale au micron et sur des temps <1s jusqu'à plusieurs heures...

Si possible utiliser une méthode basée sur l'acquisition d'images (information spatiale, traitement plus complet, analyse postbleach...)

Prudence sur l'interprétation des expériences et sur le choix du modèle mathématique !

- Introduction aux F-techniques
- Introduction à la dynamique et aux interactions moléculaires
- Mesure de dynamique moléculaire par FRAP
- Mesure de proximité moléculaire par FRET
 - Introduction
 - FRET par mesures d'intensité
 - FRET par FLIM

FRET: Förster resonance energy transfer

FRET: Förster resonance energy transfer

Non radiative energy transfer between the donor (CFP) and the acceptor (YFP)

FRET visualization by donor's excitation and acceptor's observation

R_0/k^2

Fluorescent Protein Architectural Features

Average FRET Radius (R_0) - 5 nm

Inter-Chromophore Minimum Separation Distance

Donor - Acceptor

Properties of Selected Fluorescent Protein FRET Pairs

Protein Pair	Donor Excitation Wavelength (nm)	Donor Emission Wavelength (nm)	Acceptor Excitation Wavelength (nm)	Acceptor Emission Wavelength (nm)	Average FRET Radius (R_0) (nm)	Fluorescence Data
EGFP-mCherry	488	527	640	660	5.4	5.2
EGFP-YFP	440	527	500	530	5.4	5.4
Cerulean-Venus	440	528	500	530	5.4	5.2
Hi-C mCherry	472	528	640	660	5.3	5.2
Hi-C Venus	482	528	640	660	5.3	5.1
CyPet-Venus	477	528	500	530	5.1	5.4
EGFP-mCherry	487	528	640	660	5.1	5.5
Venus-mCherry	528	528	640	660	5.7	5.1
Venus-Venus	528	528	500	530	5.8	5.2
Venus-mCherry	528	528	640	660	5.7	5.1

Figure 3

Förster Distance and Orientation Factor Variables in FRET

FRET Distance and Energy Transfer Efficiency

Orientation Factor (κ^2) Critical Angles

Figure 3

FRET applications

Protein-protein interactions

Conformational changes

FRET

Several properties of light to measure FRET

Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy

Stéphane A. Joann-Espinoz and Thomas M. Jovin

Table 2

Methods for determining FRET in fluorescence microscopy^a

No.	Method	Comments	References
I. Donor quenching and/or acceptor sensitization			
1a1	1a Combined donor (D) and acceptor (A) emission signals	Multiplexed; spectral unmixing	[10, 16, 73-76]
1a3	2,3 Signals; spectra	New reagents and detection methods	[77]
1b Fluorescence-detected excited state lifetime(s) (FLIM, FLI)			
1b1	D lifetime	Time and frequency domain	[72, 74, 76, 79, 80*, 81, 82, 83*, 84-88]
1b2	Luminescence RET (LRET)	New reagents and procedures	[22, 90]
1b4	Spectral FLIM (sFLIM)	Calibration, spectral and temporal resolution	[76, 89]
1d donor depletion			
1d1	D job kinetics (dFRET)	Improved procedures and analysis techniques	[22, 90]
1e acceptor depletion FRET (adFRET)			
1e1	Direct A job (irreversible)	Method in widespread use	[16, 75, 93]
1e2	Photochromic A (goFRET)	Reversible adFRET; organic and QD reagents	[41, 42, 91]
1e3	A saturation (saturated FRET)	Reversible adFRET; acceptor saturation levels	
II. anisotropy			
IIa steady-state anisotropy			
IIa1	D anisotropy /	Molecular association - 1 (lower η)	[17, 27, 92, 93]
IIa2	A anisotropy /	Sensitized emission is depolarized	[92, 94]
IIb homotransfer, energy migration FRET (homoFRET, emFRET)			
IIb1	Steady-state anisotropy /	Homo-association; concentration depolarization	[27, 28, 93]

^aSee [1, 72] for previous versions of the table and citations therein. *A. Espinoz, PhD thesis, University of Utrecht, 2006. *M. Butler, R. Verma, T.M. Jovin, R. Hentschmann, unpublished.

Introduction aux F-techniques

Introduction à la dynamique et aux interactions moléculaires

Mesure de dynamique moléculaire par FRAP

Mesure de proximité moléculaire par FRET

- Introduction
- FRET par mesures d'intensité
- FRET par FLIM

Measuring FRET with an epifluorescence microscope

Critical points

- Direct excitation of the acceptor in the FRET channel
- Donor's emission in FRET channel

Overcoming this

- Using 3 filters sets
- Measuring donors and acceptors fluorescence with all filters
- Compensation of fluorescence leakage
- FRET calculation

Erickson et al. biophys J. 2003

Donor and acceptor's stoichiometry = 1

Same number of donors and acceptors:

- same proportion of each fluorophores
- only two filters needed

Remaining issues

- avoiding photobleaching
- low signal/High noise

Calculating ratios:

- impact of noise
- impact on uneven excitation
- misalignment between channels

Differences between I_{488} and I_{514} field illumination

FRET measurements for activity imaging

FRET measurements for activity imaging

(Vandame et al., 2014)

Introduction aux F-techniques

Introduction à la dynamique et aux interactions moléculaires

Mesure de dynamique moléculaire par FRAP

Mesure de proximité moléculaire par FRET

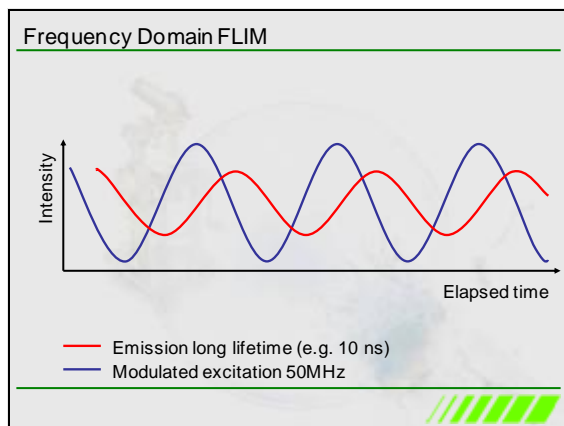
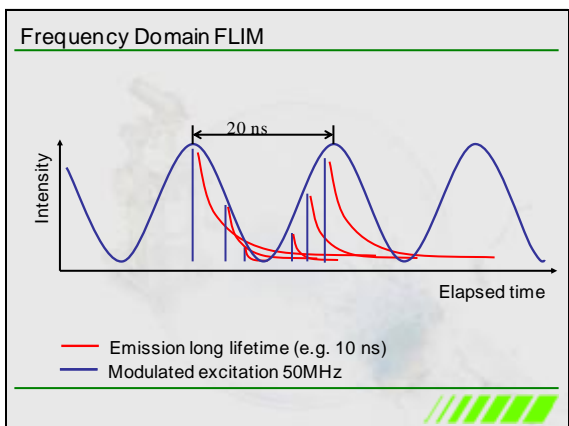
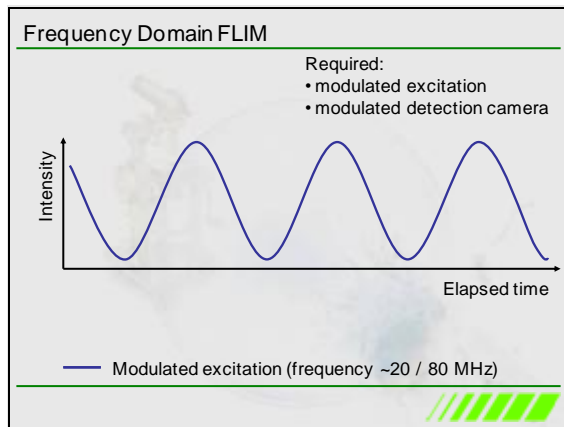
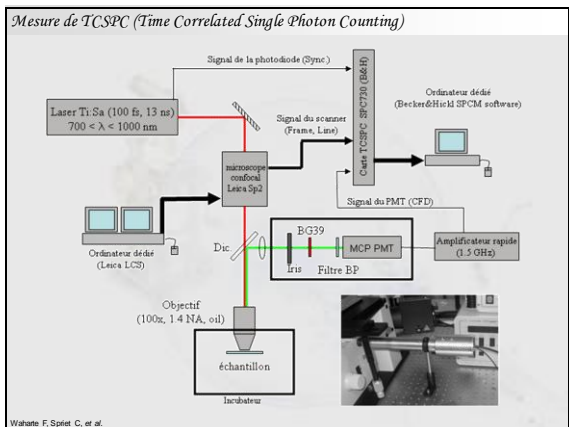
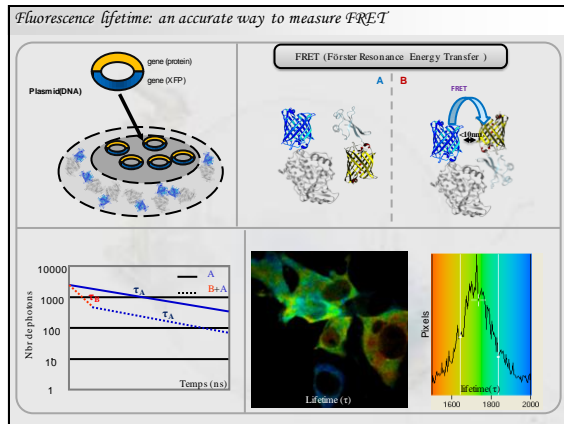
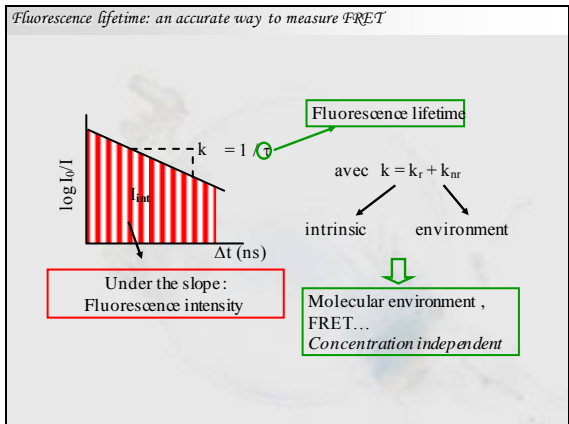
- Introduction
- FRET par mesures d'intensité
- FRET par FLIM

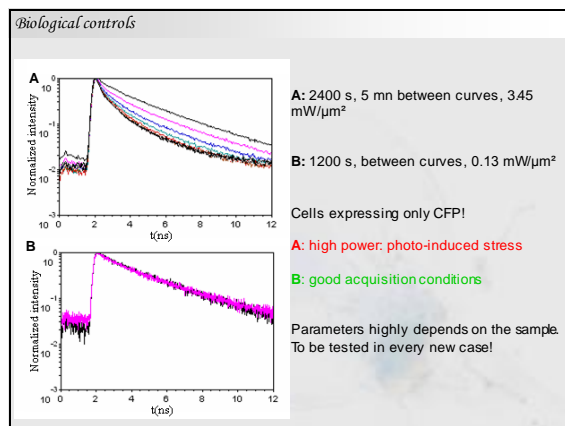
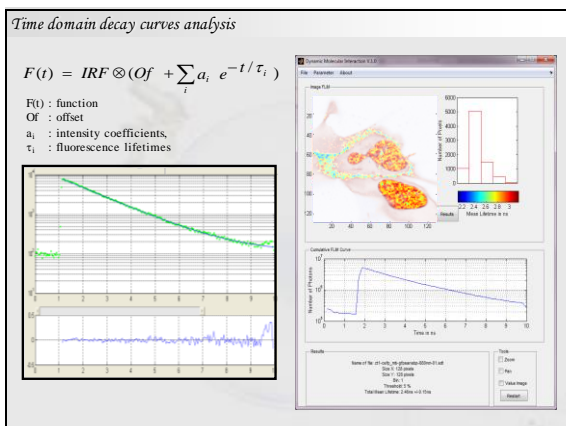
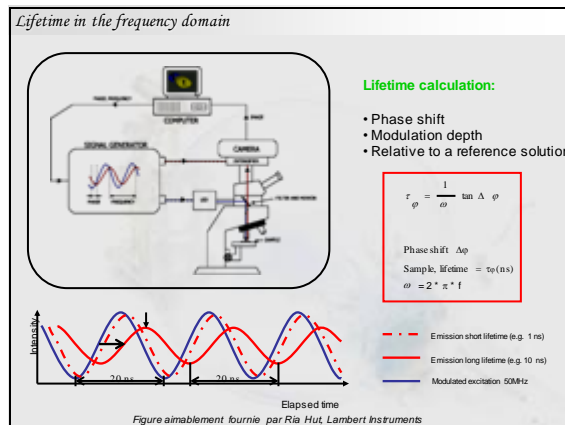
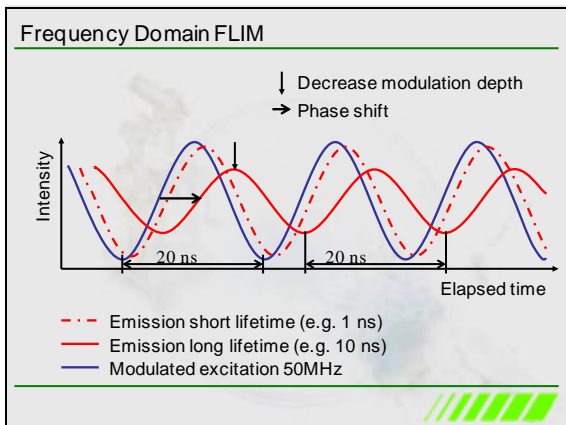
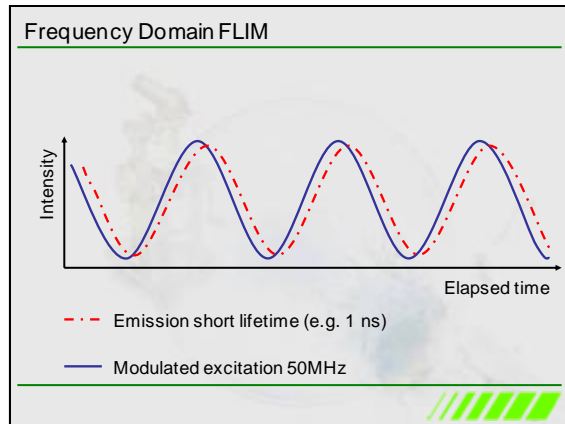
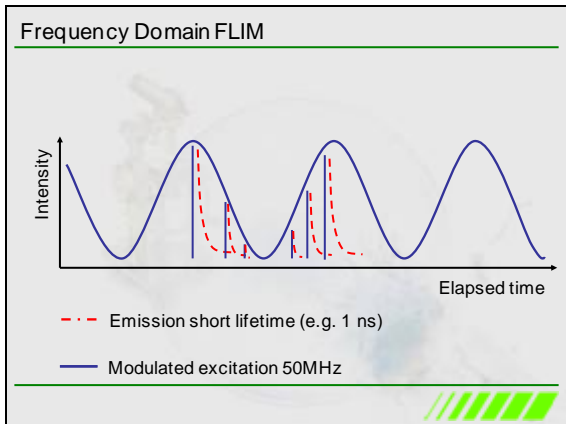
Fluorescence lifetime: an accurate way to measure FRET

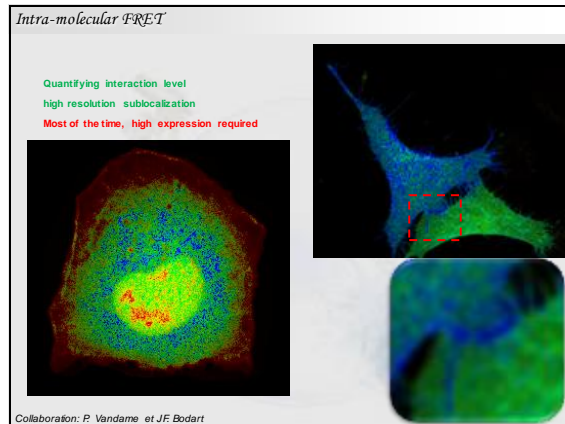
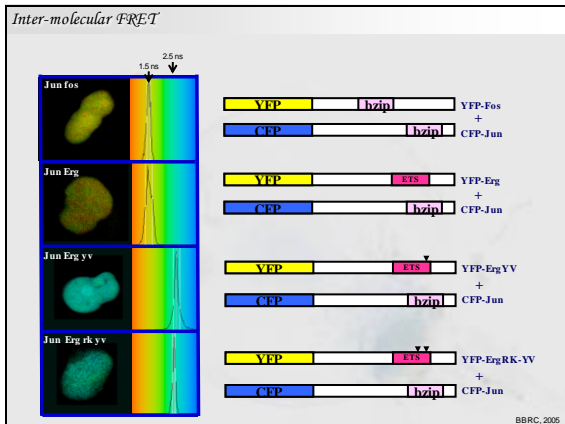
Simplified Perrin-Jablonski diagram

Fluorescence lifetime: an accurate way to measure FRET

Simplified Perrin-Jablonski diagram







Conclusion I

Les F-techniques permettent d'aller beaucoup plus loin que l'imagerie classique en donnant accès aux informations suivantes :

- mobilité moléculaire (FRAP)
- environnement local des molécules étudiées , état physiologique (FLIM)
- proximité moléculaire (FRET)

Elles sont de plus utilisables sur cellules intactes et vivantes, avec une résolution spatiale des processus (contrairement à la biochimie).

