

## M/S : médecine sciences



# FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM ... new techniques for a colourful life

Germain Trugnan, Philippe Fontanges, Danièle Delautier et Tounsia Ait-Slimane

Volume 20, numéro 11, novembre 2004

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/009705ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

### Éditeur(s)

SRMS: Société de la revue médecine/sciences  
Éditions EDK

### ISSN

0767-0974 (imprimé)  
1958-5381 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

### Citer cet article

Trugnan, G., Fontanges, P., Delautier, D. & Ait-Slimane, T. (2004). FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! *M/S : médecine sciences*, 20(11), 1027–1034.

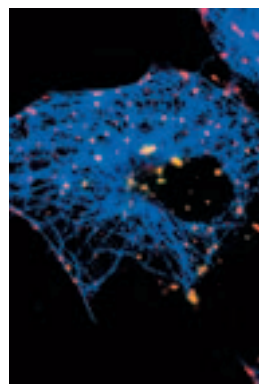
### Résumé de l'article

L'imagerie cellulaire et tissulaire connaît un développement considérable résultant à la fois de l'attente des scientifiques et des progrès concertés de nombreuses disciplines. Le développement de la microscopie confocale, de la vidéomicroscopie, de nouveaux fluorochromes, notamment des dérivés de la GFP (*green fluorescent protein*), et de nouveaux logiciels permettent d'accéder à la visualisation tridimensionnelle des processus biologiques. Leur quantification à l'échelle de la cellule unique est maintenant possible. L'imagerie cellulaire fournit des résultats pertinents sur la stoechiométrie et la dynamique des interactions moléculaires impliquées dans les régulations cellulaires. Des progrès importants ont également été réalisés dans l'optimisation de la résolution temporelle. À l'époque de la post-génomique, une utilisation rationnelle des approches d'imagerie passe par une bonne connaissance de leurs avantages et de leurs limites.

> L'imagerie cellulaire et tissulaire connaît un développement considérable résultant à la fois de l'attente des scientifiques et des progrès concertés de nombreuses disciplines. Le développement de la microscopie confocale, de la vidéomicroscopie, de nouveaux fluorochromes, notamment des dérivés de la GFP (*green fluorescent protein*), et de nouveaux logiciels permettent d'accéder à la visualisation tridimensionnelle des processus biologiques. Leur quantification à l'échelle de la cellule unique est maintenant possible. L'imagerie cellulaire fournit des résultats pertinents sur la stœchiométrie et la dynamique des interactions moléculaires impliquées dans les régulations cellulaires. Des progrès importants ont également été réalisés dans l'optimisation de la résolution temporelle. À l'époque de la post-génomique, une utilisation rationnelle des approches d'imagerie passe par une bonne connaissance de leurs avantages et de leurs limites. <

## FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur !

Germain Trugnan, Philippe Fontanges,  
Danièle Delautier, Tounsia Ait-Slimane



Inserm U.538 et Plate-forme  
d'imagerie cellulaire, IFR 65,  
CHU Saint-Antoine,  
27, rue de Chaligny,  
75012 Paris, France.  
[trugnan@st-antoine.inserm.fr](mailto:trugnan@st-antoine.inserm.fr)

micro- et de la nano-mécanique, de la technologie des lasers, de la chimie et de la biochimie des molécules fluorescentes et de la biologie moléculaire et cellulaire. En développant les interfaces entre ces domaines scientifiques, de nouvelles techniques ont vu le jour, qui permettent d'aborder des questions liées à l'intégration des fonctions des édifices moléculaires complexes dans l'espace et dans le temps. Ainsi, la microscopie confocale et l'émergence de nouveaux fluorochromes permettent à l'imagerie cellulaire et tissulaire de passer d'une vision limitée à deux dimensions à une imagerie en trois dimensions dans laquelle l'épaisseur de l'échantillon est prise en considération. Parallèlement, la prise en compte du facteur temporel permet d'accéder à une quatrième dimension, c'est-à-dire à la représentation des mouvements d'un objet tridimensionnel dans le temps. Enfin, l'étude de modifications des propriétés biochimiques ou spectrales des objets en fonction de l'environnement ouvre la possibilité d'accéder à une cinquième dimension dans laquelle ces modifications (pH, conformation, interactions moléculaires...) sont analysées dans un objet biologique vivant en fonction du temps.

Les progrès fulgurants accomplis dans l'identification des gènes et de leurs produits protéiques, ainsi que dans la compréhension des interactions potentielles entre molécules impliquées placent les biologistes devant des questions d'une très grande complexité. La principale est probablement d'intégrer le fonctionnement de ces édifices moléculaires à l'échelle de la cellule, des tissus et des organismes entiers. C'est dans cette perspective que doit être analysée une autre révolution, celle de l'imagerie, dont les technologies ont littéralement explosé au cours des dix dernières années. Cette révolution est la résultante de progrès continus de l'optique physique, de l'informatique, de la

## Quelques rappels nécessaires

### La GFP : l'autre révolution verte...

L'innovation probablement la plus importante dans le domaine des fluorochromes est la découverte puis l'exploitation intensive de la GFP (*green fluorescent protein*) et de ses très nombreux variants (*Figure 1*) [1, 2]. Il s'agit de protéines, produites par des méduses ou des coraux [3], dont la fluorescence est liée à un arrangement spatial particulier de trois acides aminés. Les propriétés physicochimiques de ces protéines ont été très largement modifiées par mutagenèse, donnant naissance à des fluorochromes de propriétés spectrales ou biochimiques différentes (stabilité chimique, sensibilité au pH, aux ions, émission du bleu au rouge lointain). La mise à disposition des ADNc de ces protéines fluorescentes a permis, grâce à la production de nombreuses protéines chimériques, d'ouvrir un nouveau champ d'investigation des systèmes biologiques.

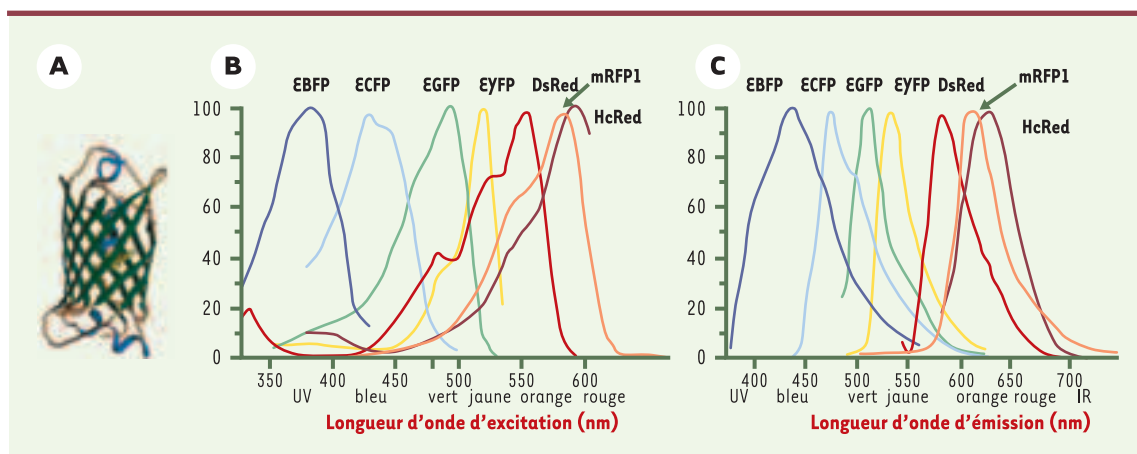
### Du microscope conventionnel aux microscopes confocaux et biphotoniques

Les microscopes optiques conventionnels, héritiers de celui de Leuwenhoek, sont limités par des contraintes optiques et géométriques qui restreignent les études morphologiques à des échantillons relativement fins. En effet, la source lumineuse doit traverser l'objet à analyser (transmission), ou réémettre des photons par fluorescence. Dans ce dernier cas, si l'échantillon est

trop épais, les différents plans optiques à partir desquels l'image se forme sont confondus et la résolution spatiale est insuffisante. L'introduction de sources lumineuses puissantes et cohérentes (laser) et de dispositifs optiques de type diaphragme (*pinhole*) a permis de construire des microscopes confocaux (*Figure 2*) qui lèvent en grande partie l'obstacle de l'épaisseur de l'échantillon, car ils permettent de collecter des images provenant d'un plan focal précis. Plus récemment, des lasers de type nouveau, bi- ou multiphotoniques, capables de n'illuminer qu'un point unique et défini de l'espace, ont été introduits. Ces lasers endommagent moins l'échantillon biologique et améliorent la résolution dans le plan *xz*.

### Où l'on retrouve la révolution numérique

Parallèlement aux avancées de la chimie des fluorochromes et de la physique des instruments, l'information a fait des progrès importants dans le traitement et la restitution des signaux, en particulier par la création de logiciels de traitement et de visualisation des séries d'images en 3, 4 et 5D et dans l'étude des cinétiques rapides en confocal. Ces avancées profitent également à la microscopie conventionnelle et à la vidéomicroscopie, grâce à l'introduction d'algorithmes de déconvolution spatiale qui permettent la restitution d'images pseudoconfocales. On peut également citer les nouveaux dispositifs de déconvolution spectrale (Méta chez Zeiss et AOBIS chez Leica) qui analysent des spectres de



**Figure 1. Structure et propriétés de la GFP (green fluorescent protein) et de ses variants.** A. Structure tridimensionnelle de la GFP sauvage obtenue par cristallographie. On note la structure en « tonneau  $\beta$  » qui forme une cage protégeant le fluorochrome formé par un repliement particulier de trois acides aminés. La structure compacte de la GFP rend compte, d'une part, du fait que de nombreuses molécules peuvent être marquées par la GFP sans que leurs propriétés ne soient altérées et, d'autre part, de la faible sensibilité du fluorochrome de la molécule de GFP sauvage aux modifications de l'environnement. Spectres d'excitation (B) et d'émission (C) des principaux variants de la GFP. EBFP: *enhanced blue fluorescent protein*; ECFP: cyan; EGFP: verte; EYFP: jaune; DsRed: protéine fluorescente rouge extraite d'un corail [3]; mRFP: *monomeric Red FP*; HcRed: protéine fluorescente dans le rouge lointain.

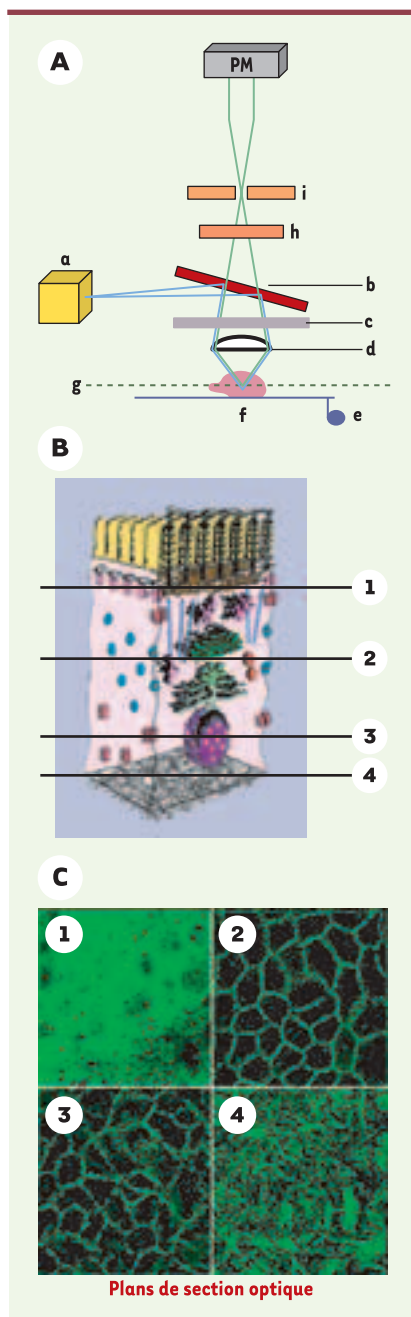
fluorescence émis par les molécules présentes dans l'échantillon et réattribuent la fluorescence analysée en un point à un fluorochrome donné. Ces systèmes permettent par exemple de distinguer la fluorescence provenant d'une molécule marquée par du FITC (*fluoresceine isothiocyanate*) de celle d'une molécule marquée par de la GFP, bien que ces deux fluorochromes présentent des spectres proches, ce qui est très utile en FRET (*voir plus loin*).

## Quelle est la question ? Nous avons la réponse

Ces avancées conceptuelles et technologiques permettent de répondre avec une précision inégalée aux questions « classiques » qui se posent lorsque l'on souhaite localiser une protéine d'intérêt ou colocaliser deux, trois, quatre, voire cinq molécules à l'échelle subcellulaire. Encore faut-il formuler précisément la problématique, exploiter au mieux les performances des machines et en connaître les limites ! Actuellement, il devient possible de répondre à des questions quantitatives et cinétiques. Enfin et surtout, la microscopie optique, dont la limite théorique de résolution est de l'ordre de 200 nm, est maintenant capable d'analyser les interactions moléculaires avec une résolution d'environ 50 Å grâce à l'exploitation des propriétés de la fluorescence (*voir FRET*).

## Applications « simples »

Elles représentent l'essentiel des applications actuelles et consistent à remplacer les techniques classiques d'immunocytochimie par la transfection ou la micro-injection d'une ou de plusieurs molécules



**Figure 2.** La microscopie confocale classique, outil d'exploration tridimensionnelle des cellules et des tissus.

**A.** Principe de base d'un microscope confocal. Une source de lumière cohérente (laser, a) délivre un faisceau de lumière cohérente (tracé bleu). Ce faisceau est réfléchi par un miroir dichroïque (b) qui illumine l'échantillon biologique à analyser (f) au travers de l'objectif du microscope (d). Un dispositif de balayage (c) permet de déplacer le faisceau sur la totalité de l'échantillon. Un moteur de haute précision (e), dont le pas est de 25 à 40 nm, permet de déplacer la platine du microscope par rapport à l'objectif dans l'axe xz pour obtenir une succession de coupes sur des plans focaux successifs (g) dans la profondeur de l'objet. Les fluorochromes présents dans l'objet biologique excités par le faisceau lumineux vont réémettre des photons de longueur d'onde supérieure (tracé vert) qui traverseront le miroir dichroïque puis un filtre d'émission ou un prisme (h) calibrant la longueur d'onde émise. Un dispositif de diaphragme ou *pinhole* (i) ne laisse passer que les photons provenant spécifiquement du plan focal analysé et les envoie sur un photomultiplicateur (PM). **B.** Les images recueillies par le dispositif confocal correspondent à des plans optiques définis. Dans l'exemple choisi, le plan 1 est situé sous la bordure en brosse d'une cellule épithéliale, le plan 2 est supranucléaire, le plan 3 traverse le noyau et le plan 4 est placé au niveau de la base cellulaire. **C.** Échantillon de cellules intestinales en culture (Caco-2) analysé par immunofluorescence utilisant de la phalloïdine fluorescente (marqueur de l'actine polymérisée) et microscopie confocale. Les quatre plans présentés correspondent aux plans du panneau B. On note les formes d'organisation très différentes de l'actine selon le plan considéré: réseau sous-cortical correspondant à la base de la bordure en brosse (en 1), réseau sous-membranaire organisé en paquets correspondant au cytosquelette de la membrane latérale (en 2 et 3) et organisation en fibres de stress correspondant à la zone d'interaction cellule-matrice (en 4).

marquées par une protéine fluorescente. Ces approches ont réactivé l'intérêt pour de très nombreux marqueurs « vitaux » naturels ou de synthèse (voir [www.molecular.probes.com](http://www.molecular.probes.com)) qui permettent de localiser des structures cellulaires parallèlement aux protéines marquées par un variant de la GFP. C'est notamment le cas des marqueurs lipophiles (FM1-43, dérivés NBD ou Bodipy de lipides) qui peuvent être utilisés pour marquer des membranes cellulaires. À côté de ces applications devenues rapidement très classiques, il est également possible d'utiliser la famille des GFP pour mesurer l'activité d'un promoteur, localiser un gène ou son produit sur des organismes génétiquement modifiés (souris vertes et plantes vertes !) [4], ou cloner des types cellulaires peu représentés [5]. Un domaine d'application en expansion rapide est celui de l'analyse dynamique sur cellules ou tissus vivants. La vidéomicroscopie à bas niveau de lumière, qui bénéficie des propriétés photophysiques remarquables des GFP, permet d'étudier des processus rapides, impliquant un petit nombre de molécules [6, 7].

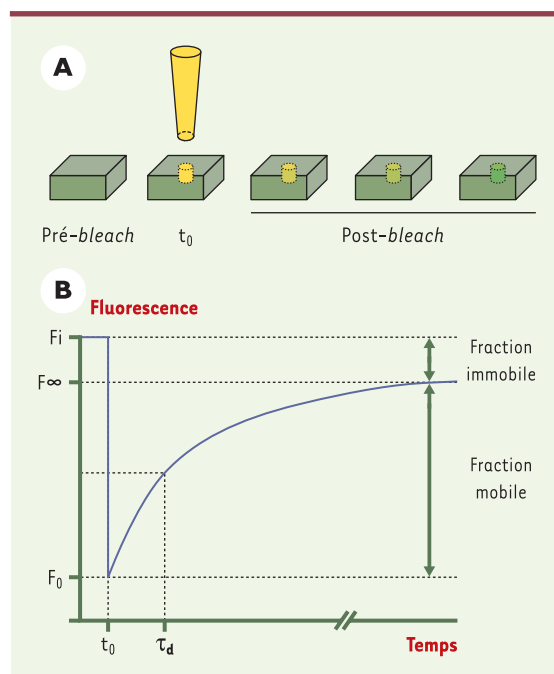
### Du qualitatif au quantitatif : applications modernes de la microscopie photonique

La quantification des processus biologiques a longtemps été réservée à la biochimie ou à la biophysique. L'introduction de nouveaux appareillages, de nouveaux logiciels et de nouvelles molécules fluorescentes rend possible la quantification des processus observés par microscopie photonique : c'est le concept de « biochimie cellulaire quantitative ». Cette approche permet par exemple de corréler quantitativement le niveau d'expression et la topologie d'une protéine transporteuse au transport de son substrat [8]. Le fait que les propriétés physiques des fluorochromes (rendement quantique, coefficient d'extinction...) sont connues permet de mesurer précisément la quantité présente dans un échantillon et de réaliser des dosages *in situ* à l'échelle de la cellule unique (voir plus loin).

### Manipulation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps : FRAP, FLIP

L'introduction des lasers comme source de lumière permet de disposer d'un faisceau dont la longueur d'onde et l'intensité sont parfaitement calibrées. Cette dernière propriété a permis l'essor de nouvelles techniques fondées sur la manipulation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps et de l'espace. La technique

de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) (Figure 3), connue depuis plus de 30 ans, a fait l'objet d'un important développement avec l'introduction de protéines fluorescentes chimériques, marquées par la GFP, dont la stabilité photochimique est grande. Deux paramètres peuvent être dérivés d'une expérience de FRAP (Figure 3) : la fraction mobile (R) (qui correspond à la quantité de fluorescence effectivement récupérée après *photobleaching*) et le temps de diffusion ( $\tau_D$ ). La valeur de la fraction mobile est influencée par les interactions d'une protéine fluorescente avec d'autres molécules ou une membrane (des microdomaines lipidiques par exemple vont limiter les mouvements d'une protéine). Le temps de diffusion est proportionnel à la constante de diffusion (D) qui dépend elle-même des



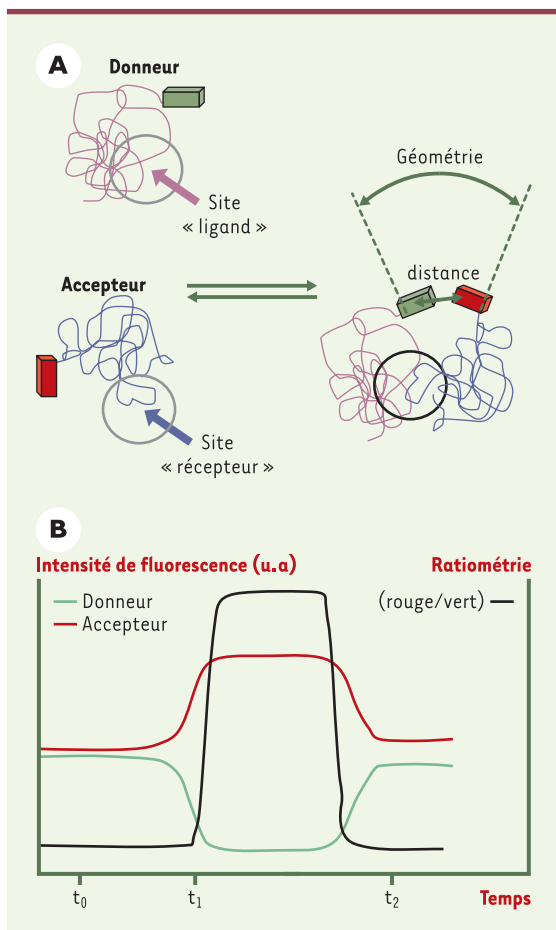
**Figure 3. Principe du FRAP (fluorescence recovery after photobleaching).** **A.** Cette technique consiste à illuminer temporairement une portion d'un échantillon avec une forte intensité de lumière, de manière à provoquer une extinction localisée (*photobleaching* ou photoblanchiment) de la fluorescence (indiquée par le petit cylindre pointillé jaune), puis à mesurer la réapparition de la fluorescence dans la zone concernée (en vert, qui témoigne de l'arrivée de molécules qui étaient hors de la région photoblanchie). **B.** Tracé caractéristique d'une expérience de FRAP.  $F_i$  représente l'intensité de fluorescence avant le début de l'expérience.  $F_0$  correspond à la fluorescence minimale obtenue après photoblanchiment.  $F_\infty$  correspond au maximum de fluorescence récupérée à la fin de l'expérience. Le temps de diffusion  $\tau_D$  (voir texte) correspond au temps nécessaire pour récupérer la moitié de la fluorescence maximale.

propriétés hydrodynamiques de la molécule observée et de son environnement (c'est-à-dire du milieu cellulaire). La technique de FRAP est donc particulièrement bien adaptée à la mesure du trafic et des mouvements dans et entre les compartiments cellulaires. Cette technique a ainsi été utilisée pour mesurer l'intensité et la vitesse du passage d'une protéine de son lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique, à son lieu de maturation, l'appareil de Golgi [9], ainsi que la vitesse de renouvellement d'une protéine membranaire, sa vitesse de diffusion latérale dans les membranes, et la vitesse comparée des différentes voies d'endocytose [10-12]. Dans la technique de FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*), dérivée de la précédente, une portion de l'échantillon est illuminée de manière permanente, ce qui provoque une extinction complète de la fluorescence dans un compartiment. Cette technique permet de mesurer le temps et la vitesse de décroissance de la fluorescence, la fraction résiduelle (qui correspond à la fluorescence restant présente de manière stable après *photobleaching*). Ces paramètres vont renseigner sur la continuité d'un compartiment et

l'existence de relations entre plusieurs compartiments. Elle donne également accès à la mesure des volumes des compartiments intracellulaires, à la vitesse de diffusion interne dans ces compartiments et à leur éventuel degré d'inhomogénéité (voir [9]).

### FRET et BRET, FLIM

Le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes est un processus physique, connu et exploité depuis de nombreuses années, dont le principe est rappelé sur la *Figure 4*. Cette propriété de transfert de l'énergie n'est observable que lorsque la molécule « donneur » de photons est suffisamment proche de la molécule « accepteur », de 10 à 70 Å selon la géométrie des molécules et du système d'observation. Les approches de FRET (*fluorescence resonance energy transfert*) offrent la possibilité de mesurer des interactions moléculaires, c'est-à-dire avec un gain de résolution considérable par rapport à la limite théorique de résolution de la microscopie optique (environ 200 nm). Il existe deux grandes familles de techniques de FRET : celles fondées sur la mesure de la quantité de fluorescence transférée entre un donneur et un accepteur (FRET



**Figure 4. Principe du FRET (fluorescence resonance energy transfer).** **A.** La molécule « donneur » porte un fluorochrome dont la longueur d'onde d'émission correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome placé sur la molécule « accepteur ». La molécule « donneur » présente un domaine susceptible de se lier spécifiquement à un domaine de la molécule « accepteur ». Lorsque les conditions biologiques sont favorables, ces deux molécules interagissent, permettant le rapprochement des deux fluorochromes. Si les paramètres de distance et d'orientation (géométrie) entre les deux fluorochromes sont corrects, un transfert d'énergie pourra se produire et conduire à des modifications analysables de la fluorescence (voir texte). **B.** Profil caractéristique d'une expérience de FRET. Entre  $t_0$  et  $t_1$ , les deux molécules fluorescentes n'interagissent pas et émettent chacune leur fluorescence propre, verte pour l'une et rouge pour l'autre. Au temps  $t_1$ , sous l'effet d'une stimulation, les deux molécules vont interagir et le phénomène de transfert d'énergie conduit à la diminution de l'intensité de fluorescence du donneur (tracé vert), parallèlement à l'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'accepteur (tracé rouge). La mesure du rapport d'intensité des deux fluorochromes (ratiométrie, tracé noir) est également représentée. Au temps  $t_2$ , l'interaction entre les deux molécules est interrompue (présence d'un compétiteur, par exemple) et le transfert d'énergie disparaît.



proprement dit) et celles fondées sur la mesure du déclin de fluorescence du donneur ou de l'accepteur (FLIM, *fluorescence lifetime imaging microscopy*). Pour les mesures de la quantité d'énergie transférée, il est possible de quantifier soit la diminution de la fluorescence du donneur, soit l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur [13]. La principale difficulté, quel que soit le système choisi, est que les spectres de nombreux fluorochromes se recoupent. C'est pourquoi le choix des couples de fluorochromes donneur/accepteur est tout à fait critique et constitue le plus souvent une limitation à l'application pratique du FRET.

À la différence des mesures de quantité de fluorescence, les mesures du déclin de fluorescence (FLIM) nécessitent des appareillages spécialisés qui vont mesurer la demi-vie de la fluorescence d'une molécule donnée. La propriété physique à la base de cette approche repose sur le fait que ce temps de demi-vie de la fluorescence est plus court en l'absence d'interaction produisant du FRET. L'allongement du temps de demi-vie est proportionnel à l'intensité du transfert d'énergie, donc des interactions. Cette technique dynamique, extrêmement sensible et spécifique, connaît des développements spectaculaires qui donnent accès notamment à la mesure du transfert d'énergie en temps réel sur cellules vivantes [14].

Les applications des techniques de FRET et de FLIM sont nombreuses et concernent aussi bien les interactions intermoléculaires (récepteur-ligand) que les interactions intramoléculaires (repliement de l'ADN, structure quaternaire d'une protéine) [15]. Une application particulièrement prometteuse consiste à produire, par génie génétique, des molécules fluorescentes (fondées sur les variants de GFP) qui vont servir de bio-capteurs d'ions ou de molécules à doser (AMPc, par exemple) directement dans une cellule unique [16]. La conformation de ces bio-capteurs va se modifier en fonction de la quantité de molécules présentes et ce changement va permettre ou empêcher un transfert d'énergie de fluorescence. Cette approche a été initialement développée dans le groupe de Roger Tsien qui a créé des molécules « caméléons » dont la fluorescence change de couleur en fonction de la concentration de calcium [17].

Le BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) est une application également fondée sur le principe du transfert d'énergie. La principale différence avec le FRET est que l'énergie du « donneur » provient d'une molécule bioluminescente, la luciférase, qui va émettre des photons, non pas en réponse à une excitation lumineuse, comme dans le cas des GFP, mais lorsqu'elle sera mise en présence de son substrat [18]. Ces photons seront transférés sur une molécule fluorescente de type

GFP qui va émettre une fluorescence si les conditions de proximité et de géométrie pour un transfert d'énergie sont remplies. Le champ d'application de cette méthode est important. Il concerne notamment l'étude à haut débit des interactions ligands-récepteurs et la pharmacologie qui lui est associée. Il est à noter que la technique de BRET est actuellement plus adaptée à la fluorimétrie en cuve qu'à l'imagerie.

### **Manipulation des propriétés spectrales : PRIM, pHluorin, Timer**

L'étude approfondie des propriétés photophysiques des GFP et le développement des approches de mutagenèse combinatoire fondée sur la structure ont également permis l'émergence de nouveaux outils moléculaires. Il s'agit pour l'essentiel du PRIM (*proximity imaging*), des pHluorin et des molécules GFP Timer.

Le PRIM est une technique dont le principe repose sur le fait que la forme monomérique de la GFP sauvage présente un pic d'excitation maximale à 395 nm et un pic d'excitation secondaire à 475 nm, ces deux excitations conduisant à une émission unique à 510 nm [19]. Lorsque la GFP passe de la forme monomérique à une forme dimérique, ou lorsque deux GFP sont en étroite interaction, le spectre d'absorption de la GFP change radicalement, puisque le pic maximal d'excitation est alors à 475 nm et l'excitation à 395 nm devient secondaire. En effectuant des mesures ratio-métriques de la fluorescence récupérée après une excitation aux deux longueurs d'onde, il est possible de mesurer la « proximité », c'est-à-dire en pratique l'homo-oligomérisation d'une molécule qui aura été couplée à la GFP sauvage. En développant cette technique, le groupe de James Rothman a pu mettre ainsi en évidence la formation de *clusters* de protéines dans des microdomaines lipidiques, ou la dimérisation d'une protéine particulière, l'immunophiline (FKBP) [19].

C'est également le groupe de James Rothman qui a récemment décrit une nouvelle famille de molécules, les pHluorin, dérivées de la GFP, rendues sensibles aux variations de pH par mutagenèse [20]. De nombreuses variantes de pHluorin existent, qui fonctionnent sur un principe similaire à celui décrit pour le PRIM: le rapport d'émission de fluorescence à 510 nm après excitation soit à 395 nm, soit à 475 nm, change de manière proportionnelle à la concentration en ions H<sup>+</sup>. Les applications sont nombreuses et permettent par exemple de mesurer en temps réel l'exocytose de vésicules synaptiques, en transfectant une chimère de la synaptobrevine (une protéine associée à la membrane des vésicules synap-

tiques) et d'une pHluorin dans des cellules neuronales. Cette chimère présentera un profil d'émission différent selon que la vésicule intracellulaire (pH acide) a ou n'a pas fusionné avec la membrane plasmique (pH 7,4). Les changements de profil d'émission traduiront les événements de fusion à la membrane [20].

Une dernière famille de molécules dérivées de la GFP, les GFP-Timer, présente également des propriétés prometteuses pour divers champs de la biologie. Ces molécules contiennent des mutants de GFP dont le spectre d'émission change en fonction du temps. Vertes (émission à 500 nm) dans les premières heures suivant leur biosynthèse, elles deviennent rouges (émission à 580 nm) à des temps plus tardifs. Cette propriété est liée à des changements de conformation dus à la maturation de la protéine GFP en fonction du temps. Ce type d'outil permet donc de « dater » un événement cellulaire, comme par exemple la séquence temporelle de l'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire [21].

### Une nouvelle maîtrise du facteur espace-temps : les caged compounds

Le principe des composés « encagés » est simple. Des composés chimiques non fluorescents traversant les membranes sont introduits dans un système cellulaire. Selon leurs propriétés, ils vont interagir avec les molécules de la cellule hôte et se localiser dans des organites donnés. En utilisant une source laser, il est possible de modifier la molécule introduite par une réaction de type photochimique et de la transformer en molécule fluorescente détectable en microscopie confocale [22]. Avec les lasers biphotoniques, le faisceau peut être dirigé de manière précise sans risquer d'activer des molécules voisines [23]. On peut également produire des molécules fluorescentes à partir des composés chimiques introduits par activation enzymatique. Une application très élégante de ce principe a été récemment utilisée pour cloner des cellules vivantes [24].

### Conclusions

Les bouleversements en cours dans le domaine de l'imagerie cellulaire et tissulaire, liés à la révolution des appareillages comme au foisonnement des nouveaux fluorochromes, ouvrent un champ immense à la créativité et à la découverte de nouveaux processus biologiques, ou à leur caractérisation dans le contexte des systèmes vivants en temps réel. La mise en évidence et la caractérisation des interactions moléculaires dans les édifices complexes des réseaux de produits de gènes

deviennent accessibles. Il faut cependant noter que nos connaissances restent encore insuffisantes dans les domaines de la photophysique et de la photochimie des nouveaux fluorochromes, et des propriétés d'interaction des lasers avec la matière biologique. Ainsi, il reste difficile de prévoir et d'étalonner un laser biphotonique pour l'excitation d'un fluorochrome donné. De plus, les performances remarquables des systèmes de traitement des images peuvent conduire à des interprétations erronées, voire à la production illicite de résultats. C'est évidemment le lot de tout domaine innovant, mais c'est également la responsabilité des scientifiques que d'exploiter ces nouveaux outils avec autant d'enthousiasme que de circonspection. ♦

### SUMMARY

#### FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM ... new techniques for a colourful life

Cell and tissue imaging provides scientists with wonderful tools, thanks to a fruitful dialog between chemistry, optical, mechanical, computational sciences and biology. Confocal microscopy, videomicroscopy together with a new generation of fluorochromes (especially those derived from green fluorescent protein, GFP) and image analysis software allow to visualize life in all its dimensions (space and time). Cell imaging also allows to quantify biological processes at the cellular level, to analyse both stoichiometry and dynamics of molecular interactions involved in cell and tissue regulations. Entering the new era of post-genomics requires a better knowledge of advantages and limitations of these new approaches. ♦

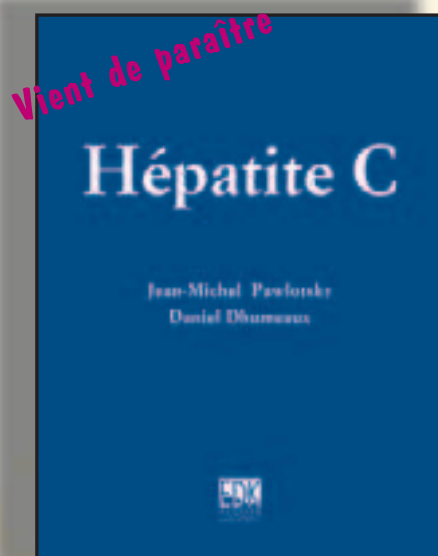
### RÉFÉRENCES

1. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44.
2. Cubbitt AB, Heim R, Adams SR, et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 448-55.
3. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 969-73.
4. Welsh S, Kay SA. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8: 617-22.
5. Galvez S, Roche O, Bismuth E, et al. Mitochondrial localization of a NADP-dependent [corrected] isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7813-8.
6. Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, et al. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* 2001; 355: 1-12.
7. Chamberlain C, Hahn KM. Watching proteins in the wild: Fluorescence methods to study protein dynamics in living cells. *Traffic* 2000; 1: 755-62.
8. Chen Y, Sanford MS. *In situ* biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *J Cell Biol* 2000; 148: 863-70.



9. Presley JF, Cole NB, Schroer TA, et al. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 1997; 389: 81-5.
10. Reits EA, Neeffjes JJ. From fixed to FRAP: Measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E145-7.
11. Oancea E, Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 1998; 95: 307-18.
12. Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 1998; 140: 485-98.
13. Wouters FS, Vermeer PJ, Bastiaens PI. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 203-11.
14. Vermeer PJ, Wouters FS, Reynold AR, Bastiaens PI. Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science* 2000; 290: 1567-70.
15. Truong K, Ikura M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 573-8.
16. Klaus Hahn K, Touthchikine A. Live-cell fluorescent biosensors for activated signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 167-73.
17. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997; 388: 882-7.
18. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 151-6.
19. De Angelis DA, Miesenböck G, Zelman BV, Rothman JJ. PRIM: Proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12312-6.
20. Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998; 394: 192-5.
21. Verkhusa VV, Otsuna H, Awasaki T, et al. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J Biol Chem* 2001; 276: 29621-4.
22. Wang SS, Augustine GJ. Confocal imaging and local photolysis of caged compounds: Dual probes and synaptic function. *Neuron* 1995; 15: 755-60.
23. Brown EB, Shear JB, Adams SR, et al. Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation. *Biophys J* 1999; 76: 489-99.
24. Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, et al. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 1998; 279: 84-8.

**TIRÉS À PART**  
G. Trugnan



ISBN : 2-84254-096-4 512 pages

Le quinzième anniversaire de l'identification du virus de l'hépatite C offre une occasion idéale pour la publication d'un ouvrage de référence sur l'hépatite C écrit en français par des spécialistes francophones de renommée internationale.

Ce livre fait le point des connaissances, alors que les traitements actuels semblent avoir atteint le maximum de ce qu'ils pouvaient offrir et que de nouvelles approches thérapeutiques voient le jour.

**Jean-Michel Pawlotsky**  
**Daniel Dhumeaux**

**BON DE COMMANDE**

À retourner à EDK, 10, Villa d'Orléans - 75014 PARIS

Tél. : 01 53 91 06 06 - Fax : 01 53 91 06 07 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : ..... Adresse e-mail : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage :

**Hépatite C: 65 € + 3 € de port = 68 € TTC**

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

Par chèque, à l'ordre de EDK

Par carte bancaire :

Visa

Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |