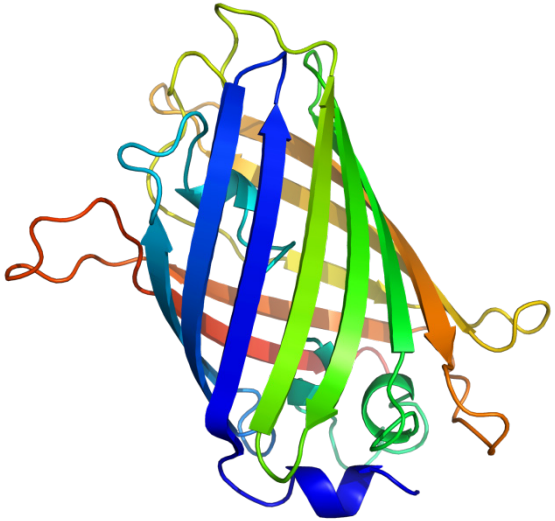
FRAP & FLIP

Dossier technique



Adrien Paoli

M1 VRV 2011 – Université de Strasbourg

Aurore Strugala

FRAP & FLIP

Dossier technique

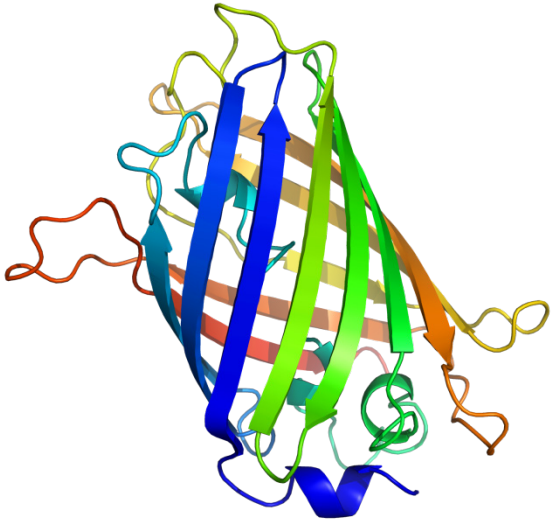
Technique FRAP

Technique FLIP

Avantages & inconvénients

Exemples d'application

Alternatives



Introduction

- Mouvements moléculaires
  Exemples : microtubules, lipides et protéines membranaires

- Échanges cellulaires
  Exemple : jonctions

→ FRAP & FLIP servent à étudier ces mouvements

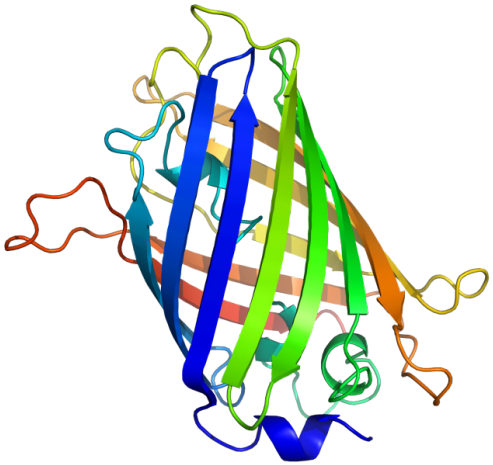
Introduction

GFP : Green Fluorescent Protein

> Fluorophore intrinsèque naturel

> Excitée à 488nm (bleu), émission à 510nm (vert)

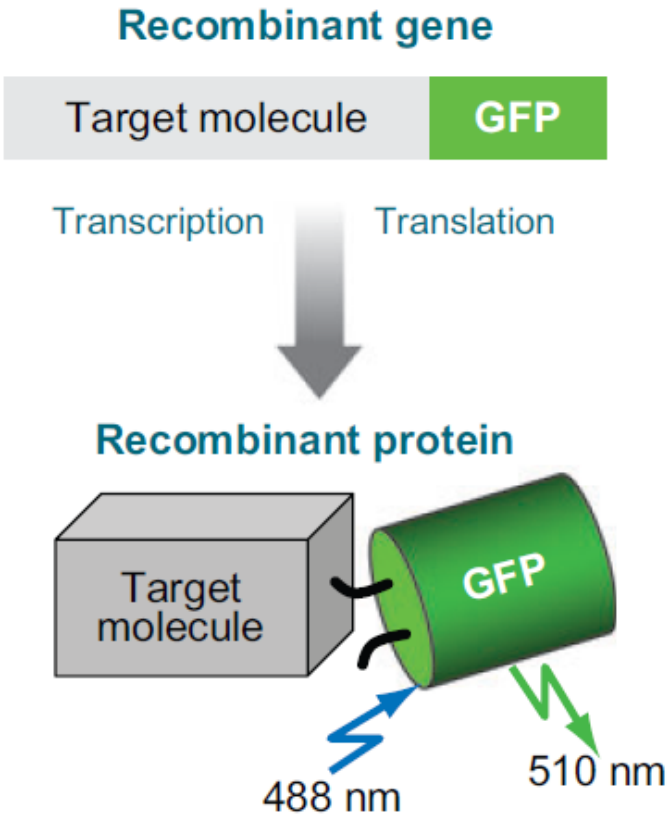
> Stable



Introduction

GFP : Green Fluorescent Protein

Utilisation par fusion de gènes
> Protéine chimérique marquée

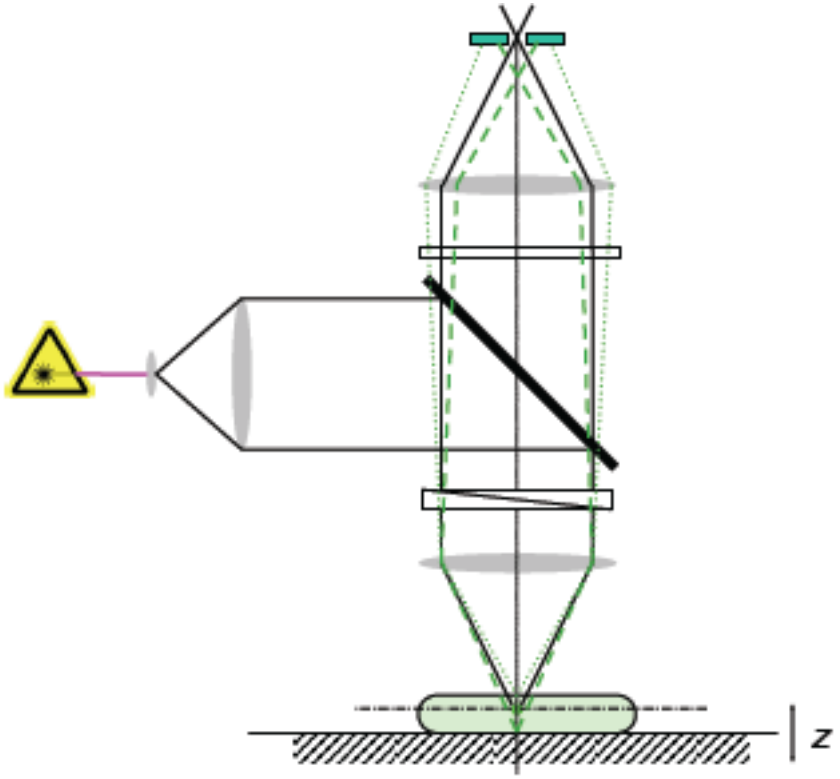


Introduction

Microscopie confocale

> Coupe optique virtuelle

- Meilleure résolution
- Fluorescence dans le plan focal



Principe

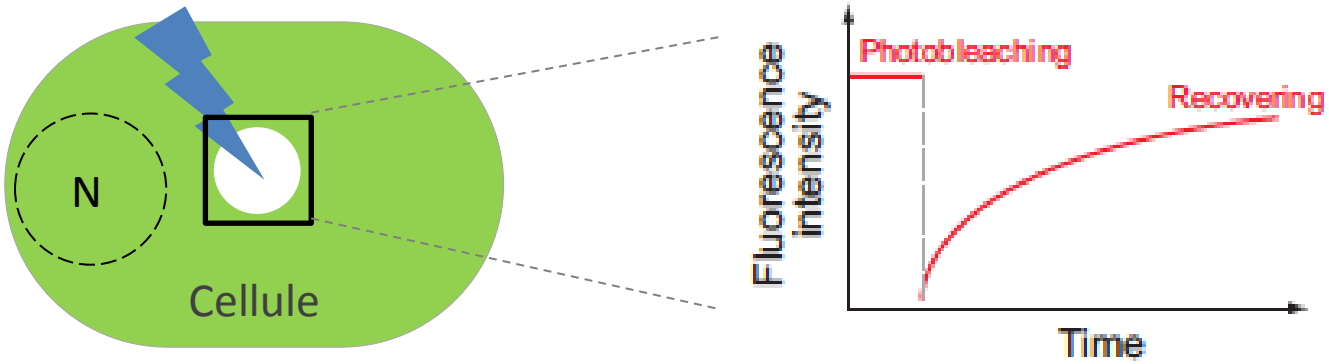
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

> Hypothèse : homogénéité spatiale des molécules

> Forte illumination (flash) d'une zone cellulaire

> Photoblanchiment de la GFP **irréversible**

> Réapparition de la fluorescence dans la zone (ex : mouvement membranaire)



Applications

> Mesure du coefficient de diffusion des molécules

Temps de diffusion = temps de récupération de la moitié de la fluorescence maximale

> Mesures de volumes (si le temps de diffusion est connu)

> Degré d'homogénéité

> Vitesse de synthèse de la molécule d'intérêt

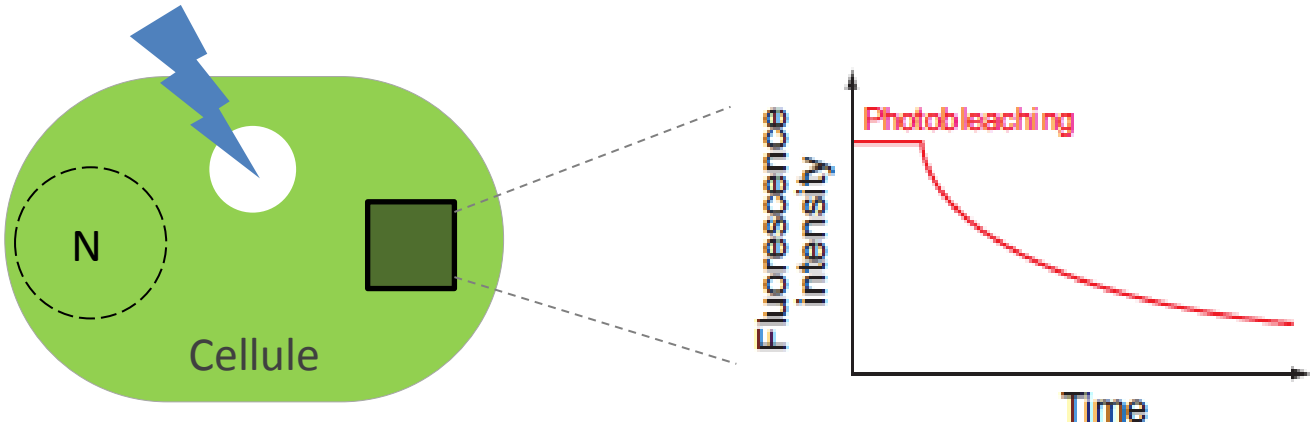
Principe

FLIP : Fluorescence Loss Induced by Photobleaching

> Illumination continue (par flashs) au laser sur une zone précise : photoblanchiment

> Déplacement des molécules

> Atténuation progressive de la fluorescence



Applications

> Mobilité et dynamisme des molécules dans l'espace intracellulaire

> Continuité des structures cellulaires (ex : jonctions)

> Échanges entre compartiments

Avantages

- Approches faciles à mettre en œuvre

- *In vivo*

- Complémentarité des deux techniques

- Méthodes fiables

Inconvénients

- Cellule 3D et approche en 2D : zone photoblanchie plus étendue

- Contournement des autres protéines, des jonctions intercellulaires, etc.

- Possible endommagement de la cellule

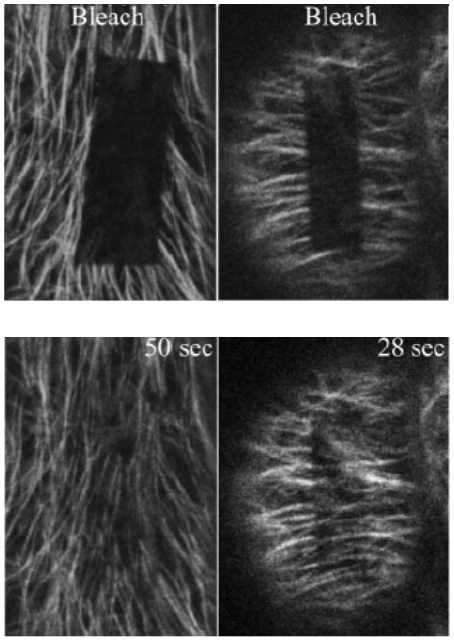
- Les protéines se déplacent pendant le blanchissement : erreur

- La fusion de la GFP avec les protéines ne doit pas perturber son fonctionnement

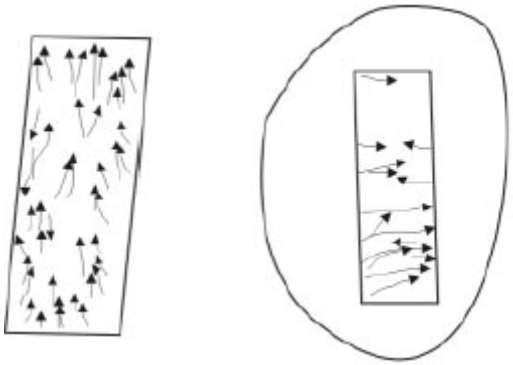
Exemples d'application

FRAP : dynamique des microtubules

Construction GFP-TUB6, microscopie confocale



> Détermination de la dynamique
> Détermination du sens de polymérisation



Establishment of Polarity during Organization of the Acentrosomal Plant Cortical Microtubule Array, Molecular Biology of the Cell, Vol. 17, 2006

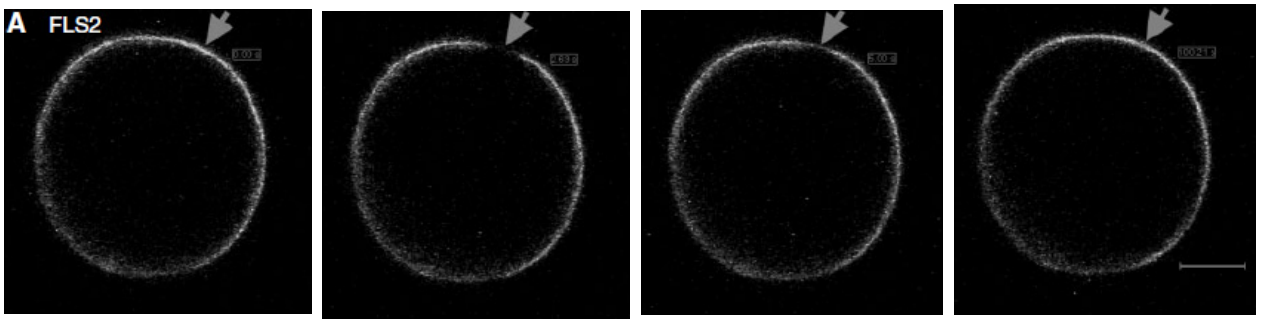
Exemples d'application

FRAP : interactions entre protéines

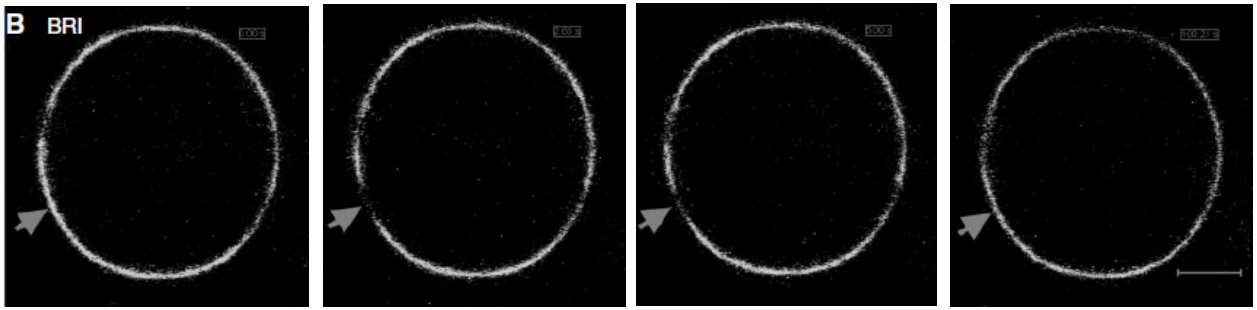
Construction FLS2-YFP, microscopie confocale

Pré-blanchiment | 0s | 5s | 100s

FLS2-YFP



BRI1-YFP

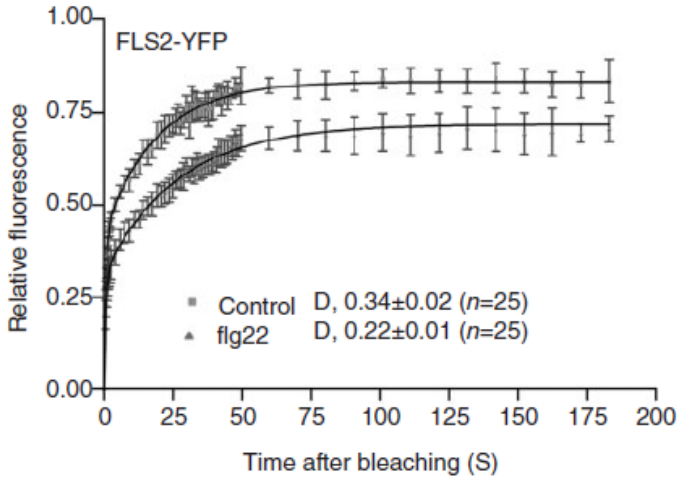


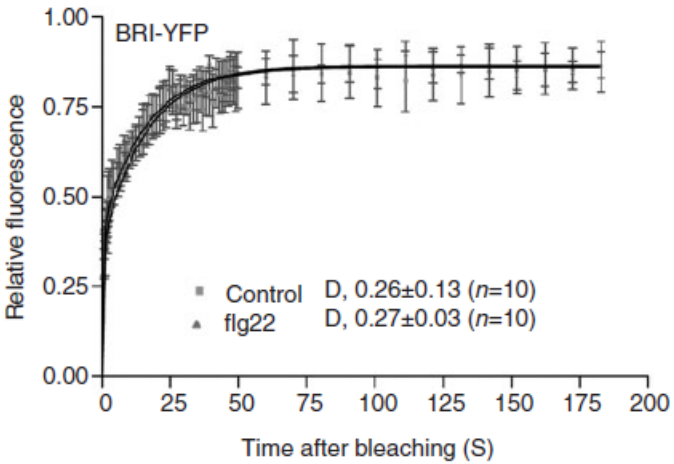
Ligand-Dependent Reduction in the Membrane Mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an Arabidopsis Receptor-Like Kinase - Plant Cell Physiol. 48 - 2007

Exemples d'application

FRAP : interactions entre protéines

Construction FLS2-YFP, microscopie confocale





- Sans flg22 : recouvrement de la fluorescence à 75%
- Avec flg22 : recouvrement de la fluorescence moins importante (62%)
  > Liaison du ligand flg22 avec le récepteur FLS2, diminution de la fraction mobile
- BRI : contrôle, pas de changement

Ligand-Dependent Reduction in the Membrane Mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an Arabidopsis Receptor-Like Kinase - Plant Cell Physiol. 48 - 2007

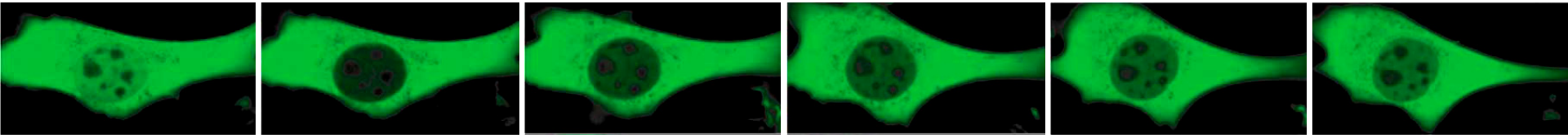
Exemples d'application

FRAP : importation

Construction STAT1-EGFP : facteur de transcription

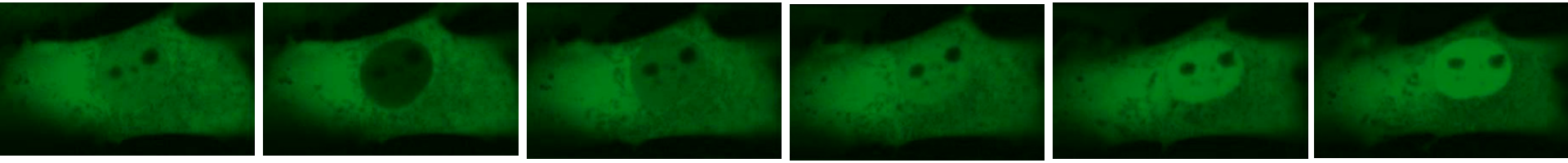
- Sans traitement

Pré-blanchiment **0mn** **10mn** **20mn** **30mn** **40mn**



- Après ajout de cytokines (IFN-γ)

Pré-blanchiment **0mn** **10mn** **20mn** **30mn** **40mn**



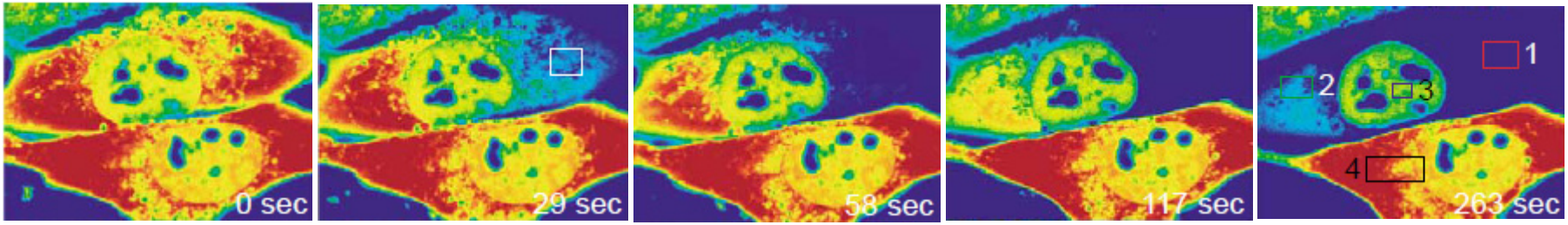
> Les cytokines stimulent l'importation de STAT1 au nucléole

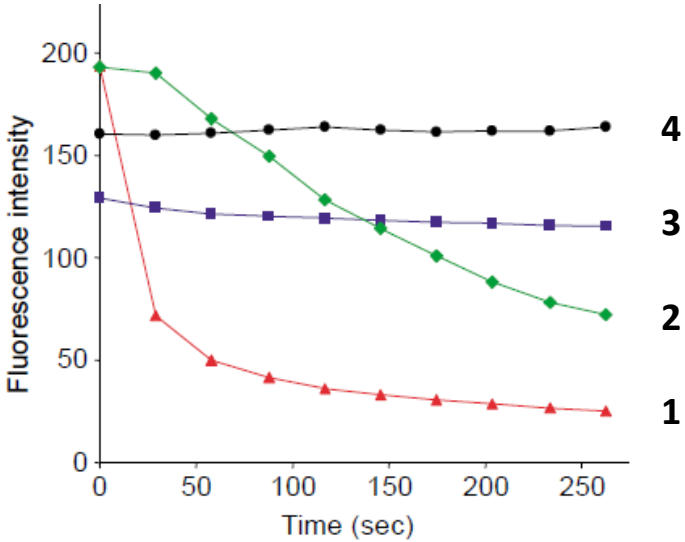
Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP Technologies, Current Opinion in Biotechnology 2005

Exemples d'application

FLIP : importation

Construction STAT1-EGFP : facteur de transcription





4 → Permet de corriger la perte de fluorescence non-spécifique

3

2

1

Pas de perte de fluorescence dans le noyau

> Très faible exportation depuis le nucléole

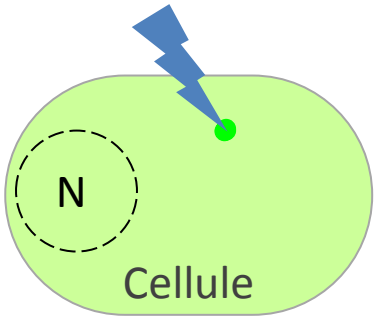
Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP Technologies, Current Opinion in Biotechnology 2005

Alternatives

Photoactivation

- PA-GFP (*PhotoActivatable GFP*)
  > Excitation 489nm ; émission 508nm
  > Augmentation de l'intensité d'émission après une courte irradiation (flash) à 405nm

- Protéines localement activées
  > Suivi en temps réel de la diffusion et de la localité des protéines



http://cochin.inserm.fr/la_recherche/plates-formes-technologiques/microscopie_confocale/microscopie-photonique/plate-forme-dimagerie-cellulaire-applications-1/photoactivation

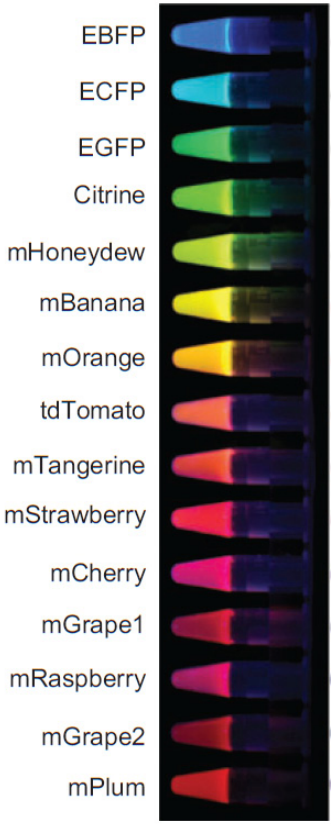
Conclusion et perspectives

- Les techniques FRAP et FLIP permettent de mener des études moléculaires quantitatives et fonctionnelles *in vivo*

- Très utilisées dans la biologie cellulaire

- Souvent associées à d'autres techniques
Ex : FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

- Beaucoup de fluorochromes existent
  > Suivi de plusieurs molécules, interactions entre protéines



Bibliographie

- *FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know?*
Current Opinion in Cell Biology - 2010

- *FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM… De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur !*
Medecine/sciences - 2004

- Fluorescence Proteins, live-Cell Imaging, and mechanobiology: Seeing is Believing
Annual Review of Biomedical Engineering - 2008