

## FLIM par imagerie multifocale multiphoton

Marc Tramier<sup>\*</sup>, Nicolas Audugé, Sergi Padilla-Parra, Maité Coppey-Moisan

Laboratoire « Complexes macromoléculaires en cellules vivantes », Institut Jacques Monod, UMR7592 CNRS/université Paris6/université Paris7, 2 place Jussieu, 75251 Paris cedex 05

---

**Résumé** – Notre travail porte sur le développement de l'imagerie des durées de vie de fluorescence sous microscope (FLIM). Une excitation multifocale multiphoton (TriMscope, Lavisoin Biotech) et une CCD intensifiée à porte temporelle (Picostar, Lavisoin Biotech) ont été combinées pour l'acquisition rapide d'images 3D confocale de durées de vie de fluorescence. Un exemple de FRET en cellules vivantes mesurant l'interaction entre l'histone H4 et un domaine de reconnaissance à son acétylation illustre ce développement.

---

### 1. Introduction

Les avancées en imagerie et le développement de sondes fluorescentes appropriées permettent aujourd'hui de visualiser des protéines fluorescentes dans des cellules vivantes (et au sein d'organes ou d'embryons vivants) et de les étudier au cours du temps [1]. Grâce à ces nouvelles technologies, les interactions entre partenaires peuvent en principe être détectées en parallèle de la mesure de leur localisation subcellulaire, de leur abondance et de leur mobilité [2]. Pour ces analyses, la méthodologie repose sur la détection du transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET). Ce phénomène provient d'une interaction dipole-dipole entre un luminophore donneur et un chromophore accepteur. L'efficacité du transfert dépend de la distance entre donneur et accepteur. Cette distance (quelques dizaines d'Angströms) est du même ordre de grandeur que les distances d'interaction physique entre molécules. Couplée à la microscopie, cette méthodologie apporte une nouvelle dimension en biologie cellulaire. Encore faut-il qu'elle soit utilisée avec de grande précaution au niveau de l'expérimentation et de l'interprétation des résultats. L'imagerie des déclins de fluorescence présente divers avantages pour la mesure du FRET [3]: (i) d'être extrêmement sensible, ce qui permet une observation non-invasive des cellules vivantes et la détection de protéines fluorescentes sans sur-expression, (ii) de mesurer le signal de FRET indépendamment de variations de concentrations subcellulaires des fluorophores, (iii) d'être capable de discriminer entre l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur due au FRET et celle due à l'excitation directe de l'accepteur, (iv) de déterminer la proportion de donneur en interaction avec l'accepteur.

L'excitation moléculaire par absorption simultanée de deux photons a été introduite en microscopie confocale par W. Webb et son équipe [4]. Il existe trois avantages inhérents à l'application de cette méthodologie en microscopie : (i) la dépendance quadratique du processus physique de l'absorption bi-photonique en fonction de l'intensité d'excitation confine cette absorption à la région focale ne nécessitant pas de pinhole à l'émission, (ii) la profondeur de pénétration de l'excitation bi-photonique (proche infrarouge pour les fluorophores absorbant dans le visible) dans les milieux diffusants est d'environ 400  $\mu$ m et permet de travailler sur les embryons, les tissus et même sur animaux vivants, (iii) les processus photodynamiques tels que la destruction irréversible des molécules fluorescentes ou la production de radicaux libres ne se produisent qu'à la région focale, minimisant sensiblement l'invasivité de la microscopie bi-photonique comparativement à la microscopie confocale conventionnelle. La récente introduction de microscopes deux-photons commerciaux rend cette méthodologie accessible à un grand nombre de groupes de recherche. Néanmoins, la microscopie bi-photonique conventionnelle utilise le balayage galvanométrique d'un unique faisceau laser. Ce balayage peut être trop lent pour l'imagerie de fluorescence en biologie. Nous avons choisi au laboratoire d'utiliser une microscopie multifocale pour l'excitation multiphotonique, consistant à séparer le laser plusieurs fois par une lame semi-réfléchissante.

Le système présenté dans ce travail est une combinaison d'un système multifocale multiphoton (TriMscope, Lavisoin Biotech) et d'une détection pour le FLIM avec une CCD intensifiée à porte temporelle (Picostar, Lavisoin Biotech). Cet instrument nous permet une acquisition rapide d'images 3D confocale de durées de vie de fluorescence.

### 2. FRET en cellules vivantes

Comme exemple d'utilisation de ce système, les images de FLIM du donneur sont utilisées pour la mesure de FRET. L'acétylation des histones corrèle avec l'activation des gènes et peut être reconnue par des protéines associées à la chromatine et contenant des bromodomains. Le bromodomaine est un domaine conservé d'à peu près 110 acides aminés. TAF<sub>II</sub>250 est un composant du facteur de transcription TF<sub>II</sub>D, et son double bromodomaine (BD) se lie in vitro au peptide H4 acétylé [5-7] ainsi que in vivo comme montré par des expériences de FRET en cytométrie [8]. Néanmoins, ces méthodes ne donnent pas d'information quantitative sur la proportion des histones acétylés ni de leur distribution spatiale dans le noyau. Nous avons fusionné le double

---

\* Auteur à contacter : tramier@ijm.jussieu.fr – Tel : 01 44 27 82 93

bromodomaine de TAF<sub>II250</sub> avec la protéine fluorescente, mCherry, (mCherry-BD) et l'histone H4 avec la EGFP pour visualiser et quantifier l'acétylation des histones en cellules vivantes par FRET.

### **3. Conclusion**

Nous montrons les potentialités de cette méthode de FLIM par excitation multifocale multiphoton et CCD intensifiée à porte temporelle pour la quantification 3D de la mesure de FRET en cellules vivantes.

### **4. Références**

- [1] Roessel & Brand Nature Cell Biol. 4, E15-E20 (2001)
- [2] Lippincott-Schwartz, Snapp and Kenworthy Nature Cell Biol. 2, 444-456 (2001)
- [3] Tramier et al. Methods Enzymol 360, 580-597 (2003)
- [4] Denk et al., Science, 248, 73 (1990)
- [5] Dhalluin et al., Nature, 399, 491-496 (1999).
- [6] Jacobson et al., Science,. 288, 1422-1425 (2000).
- [7] Owen et al., EMBO Journal,. 19, 6141-6149 (2000).
- [8] Kanno et al., Molecular Cell,. 13, 33-43 (2004).