

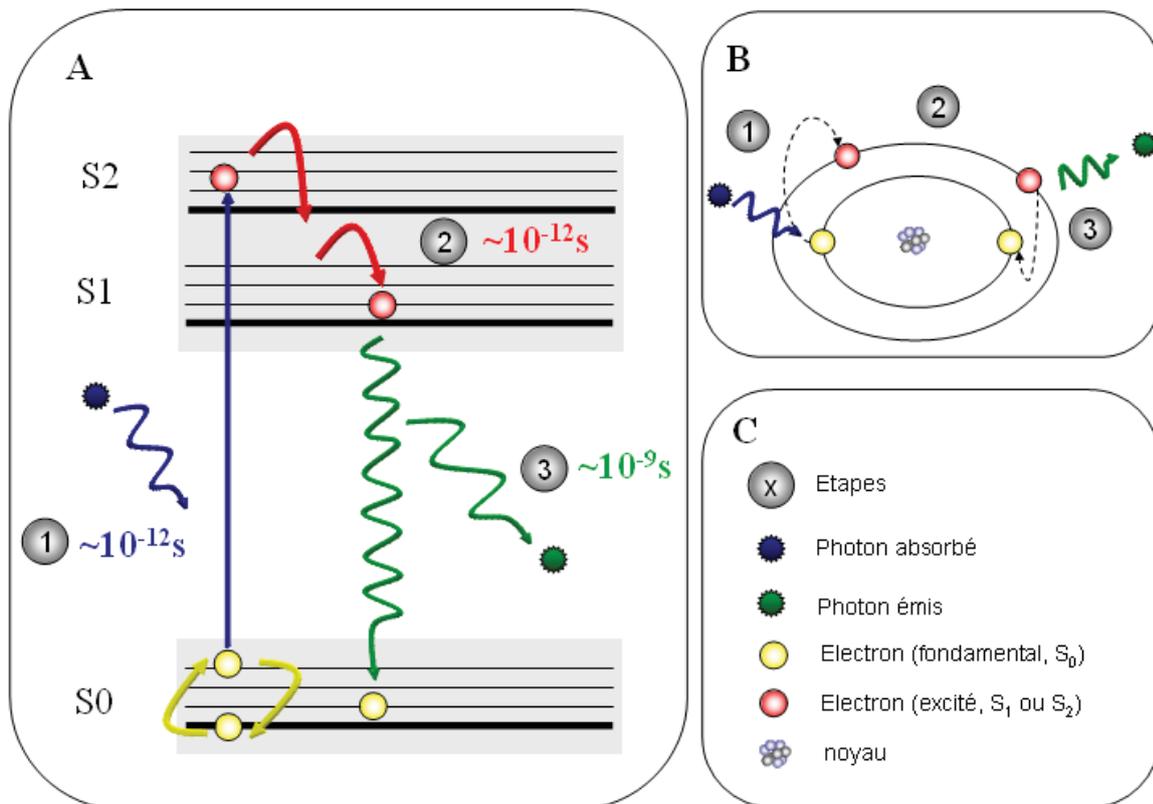
Section.2 *Etudes de la dynamique des interactions moléculaires.*

Différentes techniques existent pour étudier les interactions moléculaires, aussi bien in vitro qu'in vivo, par des techniques physico-chimiques ou microscopiques. L'émergence des protéines GFP, popularisées dans les années 1990 par Roger Tsien (5,44), a grandement participé à l'essor de ces dernières. Chacune ayant ses avantages et inconvénients, nous allons citer certaines de ces méthodes utilisées en microscopie afin d'expliquer pourquoi notre choix s'est porté sur les techniques de mesures de FRET par comptage de photons uniques corrélés dans le temps ou TCSPC.

a La fluorescence

i) Principe.

La fluorescence est un outil précieux pour l'étude du vivant de par la faible invasivité et la spécificité de marquage qu'elle permet d'obtenir. La première observation empirique de la fluorescence réalisée sur la quinine en 1845 par Sir John Frederick William Herschel (45) n'a pu être expliquée avec les connaissances scientifiques de l'époque. De nos jours, les phénomènes photophysiques à l'œuvre sont beaucoup mieux connus. Pour émettre de la fluorescence, une molécule doit posséder au moins un électron délocalisé. Lorsque cette molécule absorbe un photon, elle passe de l'état électronique fondamental à un état électronique excité. La fluorescence est un des modes permettant de revenir à l'état fondamental par l'émission d'un photon. Perrin et Jablonski ont proposé une représentation des différents niveaux énergétiques et des sauts entre ces niveaux associés aux phénomènes de fluorescence. Un diagramme de Perrin-Jablonski typique est présenté figure 5. Les sauts énergétiques entre les états singulets S_0 (l'état fondamental), S_1 et S_2 (états excités) sont



5: diagramme de Perrin-Jablonski représentant la phase d'excitation (1), de relaxation vibrationnelle (2) et de désexcitation accompagnée de l'émission d'un photon de fluorescence (3).

A : D'un point de vue énergétique

B : D'un point de vue électronique

C : Légende.

quantiques, mais il existe différents niveaux vibrationnels entre chacun de ces états. La fluorescence correspond à un saut énergétique de l'état S1 à un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental.

Il existe une grande diversité de molécules fluorescentes. Le choix d'une molécule pour une expérience donnée sera défini selon trois grands critères :

- Son efficacité en tant que molécule fluorescente
- Les propriétés de la fluorescence émise
- Sa sensibilité quant à son environnement

Nous allons donc brièvement passer en revue ces différents critères.

(1) Efficacité des sondes fluorescentes

Le phénomène de fluorescence passe par l'absorption d'un ou plusieurs photons suivie de l'émission d'un photon d'énergie inférieure. La première caractéristique d'un fluorophore est donc sa capacité à absorber un photon. Elle est définie par le coefficient d'absorption molaire, ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$), qui relie, pour une longueur d'onde donnée, la quantité de lumière absorbée à la concentration de fluorophores en solution.

Une fois que la molécule a absorbé l'énergie d'un photon incident et quelle passe dans un état excité, différents modes de désexcitation sont possibles. Parmi ceux-ci, on peut citer une transformation photochimique, un changement de conformation, une conversion interne, l'émission d'un électron ou d'un proton, ou un transfert d'énergie qui pourra être radiatif ou non (46). Comme nous le voyons, le phénomène de fluorescence n'est qu'un des nombreux modes de désexcitation possible. Un fluorophore sera donc caractérisé par son rendement quantique qui définit l'efficacité relative de la fluorescence par rapport aux autres voies de désexcitation. Il est exprimé par Φ , le ratio entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

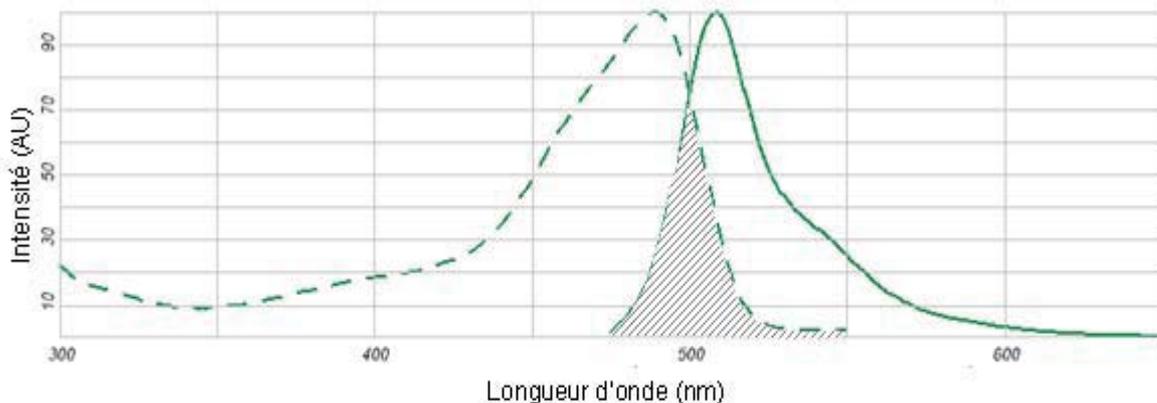
Enfin, parmi les modes de désexcitation possibles, nous avons mentionné la possibilité d'obtenir des réactions photochimiques. Parmi celles-ci, la réaction avec l'oxygène conduisant à la formation de radicaux libres fera perdre au fluorophore sa capacité à émettre des photons. Au fur et à mesure de l'excitation d'un ensemble de fluorophores, une proportion de plus en plus grande sera photoblanchie et ne sera donc plus observable.

Un fluorophore idéal aura donc une forte capacité à absorber puis à réémettre des photons tout en restant stable au cours du temps.

(2) Propriété de la fluorescence émise

Deux grandes caractéristiques de la fluorescence peuvent être déduites du diagramme de Perrin-Jablonski et pourront être utilisées pour observer de façon spécifique un fluorophore :

- Une partie de l'énergie reçue par le fluorophore sera dissipée dans les états vibrationnels intermédiaires de l'état excité. la longueur d'onde étant inversement proportionnelle à l'énergie, le spectre d'émission aura toujours une longueur d'onde supérieure au spectre d'excitation. Ce décalage entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum d'émission est appelé décalage de Stokes. En regardant précisément les spectres de fluorophores (figure 6), on remarque cependant un chevauchement entre les spectres d'excitation et d'émission de la majorité des fluorophores. La différence d'énergie provient de la chaleur ambiante qui permet à une molécule dans l'état S_0 d'être dans un état vibrationnel excité. L'énergie nécessaire pour passer à l'état excité sera donc plus faible, ce qui explique ce



6: spectre d'absorption (pointillé) et d'émission (trait plein) de la E-GFP. La zone de chevauchement entre les deux spectres est hachurée (modifié de <http://probes.invitrogen.com/>)

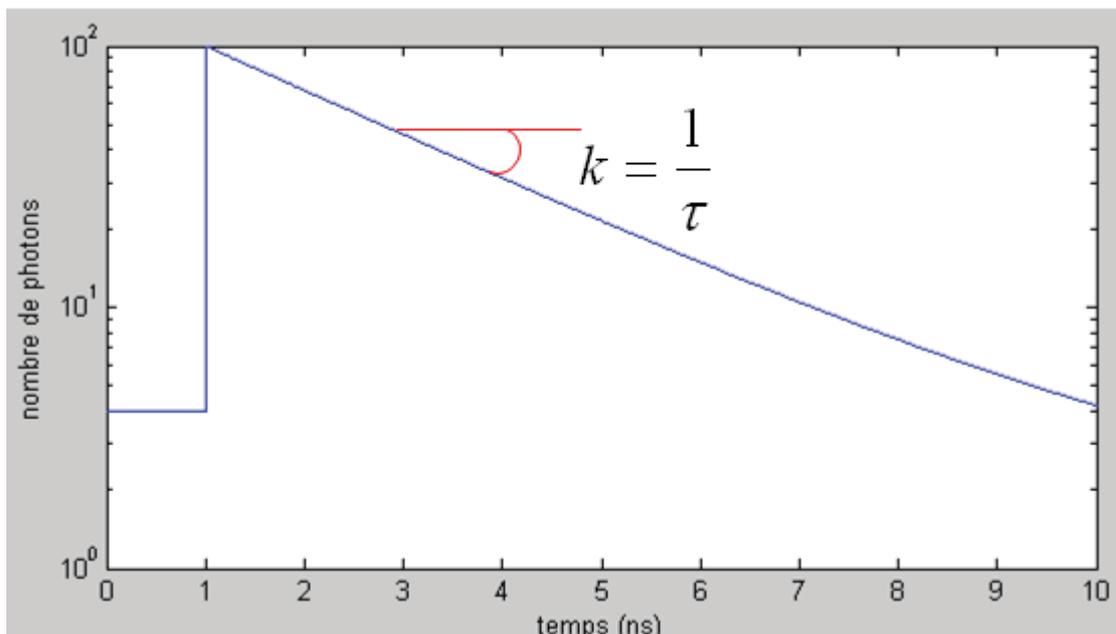
chevauchement(46). Il est à noter que l'énergie pour passer d'un état singulet à un autre est très supérieure à celle nécessaire à un changement d'état vibrationnel. La probabilité que l'échauffement de l'échantillon entraîne la molécule dans un état excité est donc pratiquement nulle. (Le calcul de ces probabilités de changement d'état peut être obtenu grâce à la loi de Boltzmann)

- Le temps entre l'excitation d'un fluorophore et l'émission d'un photon sera égal à la somme de trois temps :
- passage de S_0 à S_1 , de l'ordre de 10^{-12} s
 - temps de résidence dans les états excités, de l'ordre de 10^{-9} s
 - retour à l'état fondamental et émission d'un photon, de l'ordre de 10^{-12} s

Le processus complet d'émission d'un photon sera donc de l'ordre de la nanoseconde pour les fluorophores usuels. Après excitation, chaque photon aura un temps d'émission qui va suivre une loi de probabilité de type exponentielle. Après observation d'un grand nombre de temps d'émission de photons, on obtient une courbe de déclin de fluorescence correspondant à cette loi de probabilité d'émission. La pente de cette courbe est alors inversement proportionnelle à une autre propriété caractéristique d'un fluorophore : le temps de vie de fluorescence. Cette propriété peut être considérée comme indépendante de la concentration au regard des niveaux d'expression de fluorophores raisonnablement utilisables en cellule. Elle sera par contre influencée par l'environnement local et la température du fluorophore ainsi que par les modes de désexcitation dont il dispose. On aura alors

$$k = k_r + k_{nr} \quad \text{Eq. 1}$$

Avec k cinétique de déclin moyenne ; k_r la cinétique de déclin radiative (fluorescence), k_{nr} la cinétique de déclin non radiative (transfert d'énergie.)



7: représentation semi logarithmique d'une courbe typique de déclin de fluorescence pour une espèce mono-exponentielle. Le temps de vie de fluorescence (τ) peut être calculé à partir de la pente (k) de cette courbe.

Le temps de vie de fluorescence pourra être calculé en ajustant la courbe de déclin par la formule suivante :

$$I(t) = of + \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad \text{Eq. 2}$$

*Avec : **I** l'intensité ; **of** le niveau de bruit **t** le temps ; **n** le nombre d'espèces exponentielles ; **a** la proportion de l'espèce et **τ** le temps de vie de l'espèce.*

Chacune de ces propriétés est caractéristique du fluorophore étudié. Une molécule fluorescente pourra donc être identifiée en observant son spectre d'absorption ou d'émission. La cinétique d'émission des photons, dont le temps de vie de fluorescence est extrait, est une autre méthode d'identification de ces molécules.

(3) Sensibilité à l'environnement.

Les propriétés que nous avons passées en revue ne sont pas des propriétés absolues mais dépendent du milieu dans lequel les fluorophores sont observés et de la température à laquelle sont réalisées nos expériences. En particulier, certaines sondes sont particulièrement sensibles au pH ou à la présence d'ions comme le chlore ou le sodium ; ces propriétés d'émission permettent d'estimer l'environnement local.

Nos expériences se situant dans le contexte cellulaire et le plus souvent à 37°C, les fluorophores que nous allons utiliser doivent être stables à cette température. Leurs propriétés doivent également être indépendantes des différents environnements que la protéine risque de rencontrer en fonction de sa localisation dans la cellule.

ii) Les molécules fluorescentes endogènes

De nombreuses molécules fluorescentes sont présentes de façon endogène dans la majorité des cellules. Parmi celles-ci, les plus couramment rencontrées sont (47) :

- La famille des flavines, coenzymes dont le maximum d'émission (λ_m) se situe entre 530nm et 560 nm. Leur temps de vie moyen (τ_m) est situé entre 200 et 2885 ps(48,49)
- La nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) ou NAD(P)H, autre coenzyme dont la λ_m se situe entre 440nm et 460 nm et le τ_m entre 400 et 2800 ps. Dans les cellules, la fluorescence de ces dernières est 10 à 100 fois supérieure à celle des flavines.(49,50)
- Les lipofuscines, un pigment dont la quantité augmente avec l'âge et qui se trouve dans le cytoplasme des cellules post mitotiques. Sa λ_m est comprise entre 420 et 560 nm et son τ_m peut atteindre 12000 ps.(49,51)
- L'élastine et le collagène, protéines de structure présentant une fluorescence verte à jaune dont le τ_m est compris entre 1500 et 2500 ps(49,52)

Ces molécules peuvent donc être étudiées sans aucune modification de la biologie de la cellule. Cette autofluorescence devient par contre un handicap dans le cas d'étude de marquages exogènes. En effet, l'autofluorescence cellulaire couvre à la fois un large spectre et une vaste gamme de temps de vie de fluorescence. Un soin particulier devra donc être appliqué, sans quoi, elle entraînera un niveau de fluorescence difficile à séparer du marquage.

iii) Les molécules fluorescentes exogènes

L'autofluorescence cellulaire permet d'étudier un nombre restreint de protéines. L'utilisation d'un marquage exogène donne accès à des informations beaucoup plus variées. Différentes stratégies permettent de réaliser ce type de marquage.

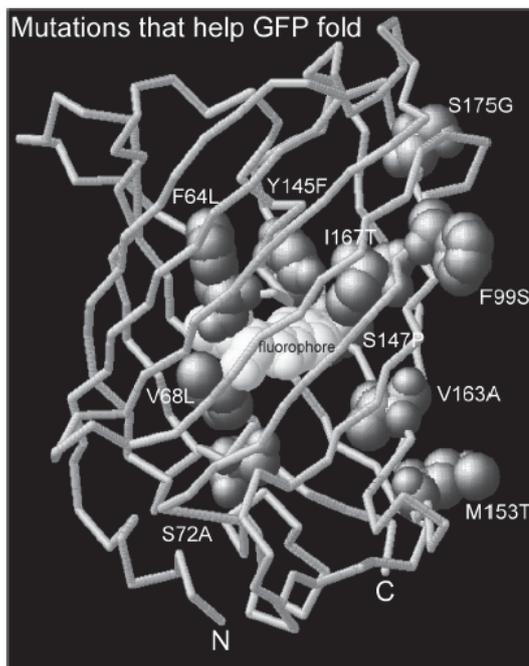
Certains fluorophores se dispersent dans la cellule ou se localisent naturellement dans des compartiments particuliers. C'est le cas du Hoechst 33342 qui marque spécifiquement les

séquences A-T de l'ADN. Une autre solution pour obtenir un marquage spécifique consiste à lier une molécule fluorescente à une protéine dont le comportement est connu. En particulier, l'utilisation d'anticorps marqués (ou d'un couple anticorps primaire, anticorps secondaire marqué) permet de localiser une protéine donnée de façon très spécifique.

Ces types de marquages offrent une grande spécificité de détection. Malheureusement, les protocoles permettant l'entrée de ces molécules dans la cellule sont le plus souvent très invasifs et sont donc rarement compatibles avec les études dans le vivant.

iv) Les protéines de la famille des GFP

La « Green Fluorescent Protein » ou GFP est une protéine fluorescente naturellement produite par la méduse *Aequoria Victoria*. Cette protéine peut donc être considérée comme endogène dans ce cas précis. Osamu Shimomura fut la première personne à isoler cette molécule et à déterminer de quelle partie de la GFP provenait la fluorescence.



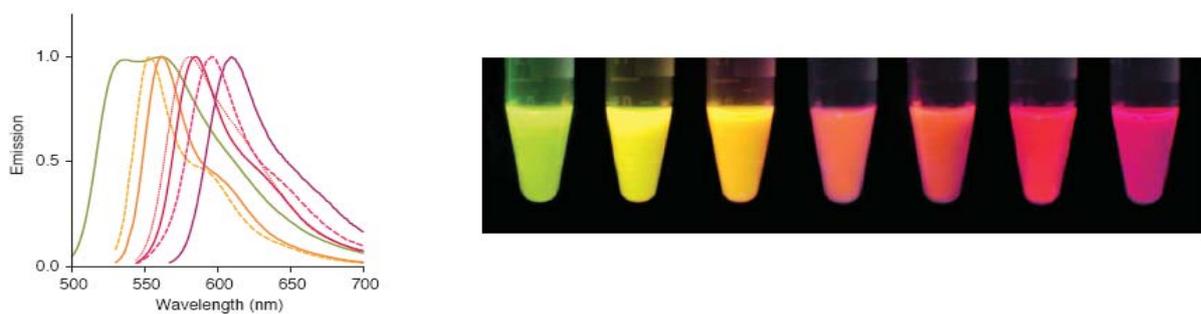
8: structure cristalline de la GFP sur laquelle sont représentés les sites les plus importants pour favoriser son bon repliement à 37°C. la lecture de cette information est de la forme AA sauvage – position –AA de remplacement. Cette figure est tirée du travail de l'équipe de Roger Tsien (4,5)

Actuellement, son utilisation principale consiste à lier l'ADN de la GFP à celui d'une protéine d'intérêt puis d'introduire par transfection le plasmide ainsi formé dans les cellules étudiées. La cellule va alors produire la protéine liée à la GFP. Le marquage ainsi obtenu est spécifique et peu invasif. Depuis l'apparition de cette technique, de nombreux variants de cette protéine ont été découverts, en particulier grâce au travail de Roger Tsien et de son équipe, et ont permis l'optimisation de ces protéines fluorescentes.

Comme nous l'avons vu dans la figure précédente, des mutations ponctuelles permettent d'améliorer la stabilité de la protéine GFP sauvage (ou GFPwt) à 37°C, température la plus couramment utilisée en biologie. La GFPwt présente également une brillance assez faible, une vitesse de maturation lente et un niveau d'expression faible. Dans la eGFP (pour enhanced GFP), deux mutations ponctuelles de la GFPwt : S65T et F64L améliorent grandement ces caractéristiques et la eGFP a donc remplacé la GFPwt dans la majorité des applications actuelles.

La connaissance de la séquence ADN de la protéine GFPwt a également permis la création de nombreux variants spectraux. Le large choix de couleurs des variants GFP permet alors le marquage et l'observation simultanée de plusieurs protéines. Lors de nos études, nous utiliserons en particulier les variants CyanFP et YellowFP, qui présentent des caractéristiques spectrales compatibles avec les études de FRET. La protéine CFP présente un déclin de fluorescence multi-exponentiel, ce qui ajoute à la complexité de l'interprétation des mesures de FRET par les techniques de FLIM (chapitre I.2.c). Nous avons donc également utilisé un variant de la CFP, la CeruleanFP (53) qui présente un mode de déclin mono-exponentiel.

Plus récemment, une protéine extraite du corail *Discocoma*, la « red fluorescent protein » (RFP ou DsRed) et ses variants, a permis d'étendre le spectre d'observation des protéines transfectées. Ces dernières ayant une tendance naturelle à tétramériser, elle est le plus souvent remplacée par un de ces variants monomériques comme la mRFP1 ou la mCherry. Ces dernières sont utilisées comme accepteur lors d'expériences de FRET utilisant l'eGFP comme donneur.



9: spectre d'émission (gauche) et image de fluorescence (droite) de différents variants de la RFP. De gauche à droite mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, et mCherry (figure tirée de(7))

Enfin, certaines protéines GFP peuvent être utilisées en tant qu'outils pour les études de dynamiques et d'interactions moléculaires. Parmi celles-ci, on peut citer les protéines photoactivables ou photoconvertibles comme la PA-GFP (54) (pour photoactivable GFP). Ces dernières voient leurs spectres d'émission profondément modifiés après irradiation à une

longueur d'onde spécifique. Dans le cas de la PA-GFP, une irradiation à 400nm augmentera la fluorescence émise d'un facteur 100 lors d'une excitation réalisée à 504nm. Ce type de modification permet, après activation de la PA-GFP, d'observer les mouvements de la protéine marquée au sein de la cellule, et par là même de déduire les modes de déplacement impliqués (i.e. diffusion, transport actif, passif.)

D'autres variants GFP permettent le suivi d'interactions moléculaires grâce à la technique de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complémentation) Dans ce cas, chacune des protéines d'intérêt est fusionnée à une moitié d'un variant de la GFP. Ces deux moitiés ne pouvant émettre de la fluorescence qu'une fois réunies, l'apparition de fluorescence permettra de localiser les zones d'interactions entre les protéines d'intérêt. Cette technique présente l'avantage d'être utilisable avec un simple microscope à épifluorescence et de permettre l'observation simultanée de différents couples d'interactions. Son principal inconvénient tient au fait que la reformation de la protéine fluorescente est un processus irréversible qui stabilisera les protéines d'intérêt en interaction. Cette stabilisation exclut donc toute analyse dynamique des interactions et peut également provoquer un fort dérèglement de l'activité de la cellule et une forte invasivité. De plus, les deux parties d'une GFP présentent une affinité forte l'une pour l'autre une concentration trop importante de fluorophores pourra entraîner une reformation non spécifique de la protéine tronquée. L'utilisation des BiFC permet donc une étude préliminaire des interactions dans la cellule mais des études plus poussées nécessiteront des approches comme les études de FRET sur lesquelles nous reviendrons tout au long de ce manuscrit.

v) Les boîtes quantiques ou « quantum dots » (Qdots)

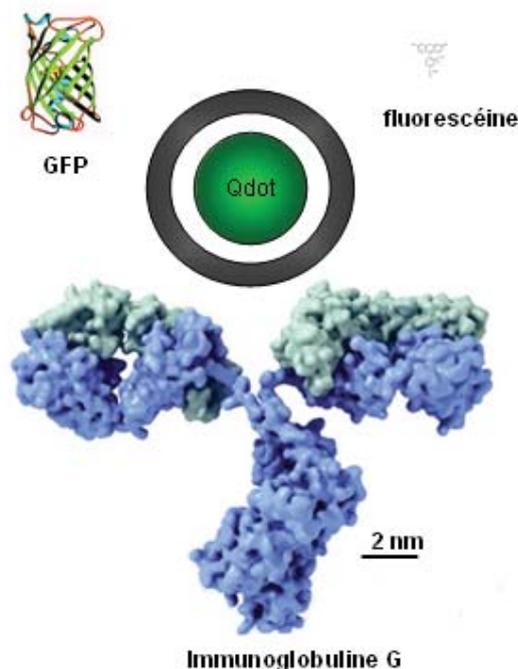
Les Qdots sont des nanocristaux semi-conducteurs d'une taille de 1 à 20 nm. Ils sont composés de quelques centaines à quelques dizaines de milliers d'atomes de matériel semi-conducteur ; classiquement un mélange de cadmium avec du sélénium ou du tellurium, forme le cœur du Qdot. Ce cœur est recouvert d'une enveloppe d'un autre semi-conducteur, comme le sulfide de zinc, qui permet d'améliorer les propriétés optiques du cœur. Cet ensemble est ensuite recouvert d'une couche de polymère, rendant la particule biocompatible et permettant la greffe de biomolécules à sa surface.

Les Qdot se comportent comme un puits de potentiel qui confine les électrons dans une région de l'ordre de la longueur d'onde des électrons. Ce confinement confère aux électrons du nanocristal des niveaux d'énergie discrets, de façon similaire à un atome. Ces

niveaux d'énergies sont contrôlés par les matériaux et par la taille du Qdot. Ces niveaux d'énergies variant comme le carré de la longueur de confinement, un petit nanocrystal entraînera une plus grande différence de niveau d'énergie, et donc, une plus grande énergie d'émission (entraînant une plus faible longueur d'onde)(55).

Ces fluorophores présentent de nombreux avantages par rapport aux fluorophores classiques. Leur rendement quantique très élevé et leur photostabilité remarquable permettent de suivre la même molécule fluorescente pendant plusieurs dizaines de minutes (un fluorophore classique sera photoblanchi après quelques secondes)(47). L'utilisation de Qdots de tailles différentes offre la possibilité d'obtenir des spectres d'émission distincts avec une seule source d'excitation. La largeur du spectre d'émission dépend directement de la dispersion de la taille des Qdots, et il est actuellement possible d'obtenir des spectres présentant une largeur à mi-hauteur de 20nm et un profil gaussien. Enfin, une propriété intéressante est le temps de vie de ces molécules qui est beaucoup plus long que celui des fluorophores classiques (plusieurs dizaines de nanosecondes pour les Qdots contre quelques nanosecondes pour les fluorophores usuels). Ces propriétés spectrales et de temps de vie font des Qdots un outil précieux permettant des marquages multiples dans différents espaces de visualisation de la fluorescence.

Le principal inconvénient de ces molécules est leur taille qui rend le protocole d'intégration dans les cellules assez complexe.



10: schéma d'échelle de différentes molécules. adapté de (6-8)

b La microscopie de fluorescence pour l'étude des interactions.

i) Microscopie à épifluorescence classique.

Le microscope dans sa forme la plus réduite est constitué d'un simple objectif et d'un oculaire, c'est-à-dire de deux lentilles convergentes.

Ces deux lentilles forment une image très agrandie de l'objet et permettent d'observer des détails fins dans l'échantillon.

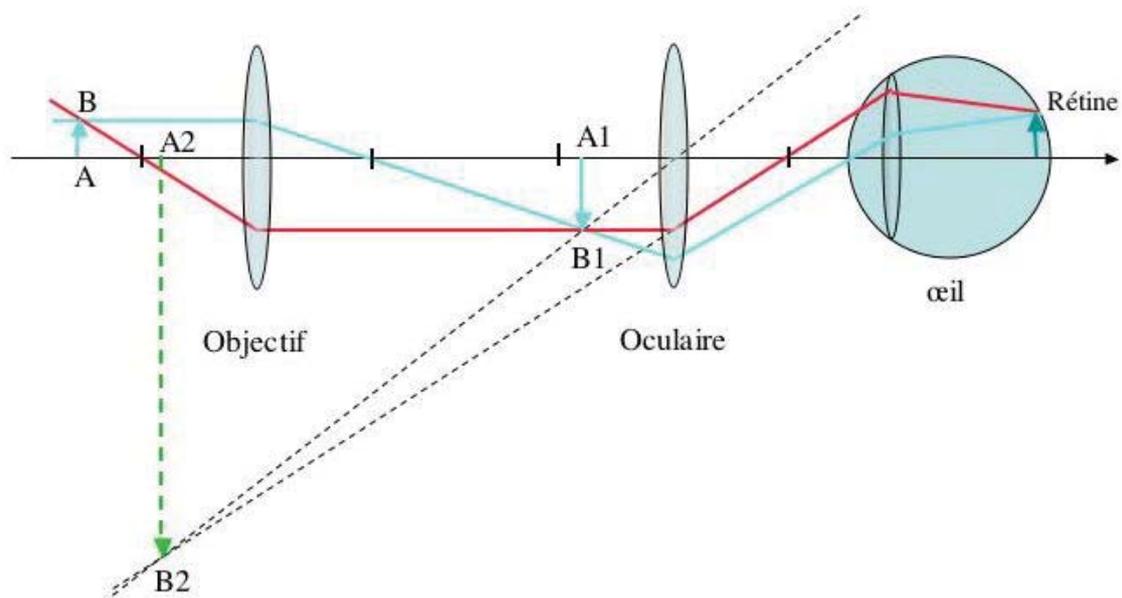


Figure 11: Principe optique du microscope (voir le texte pour plus de détails).

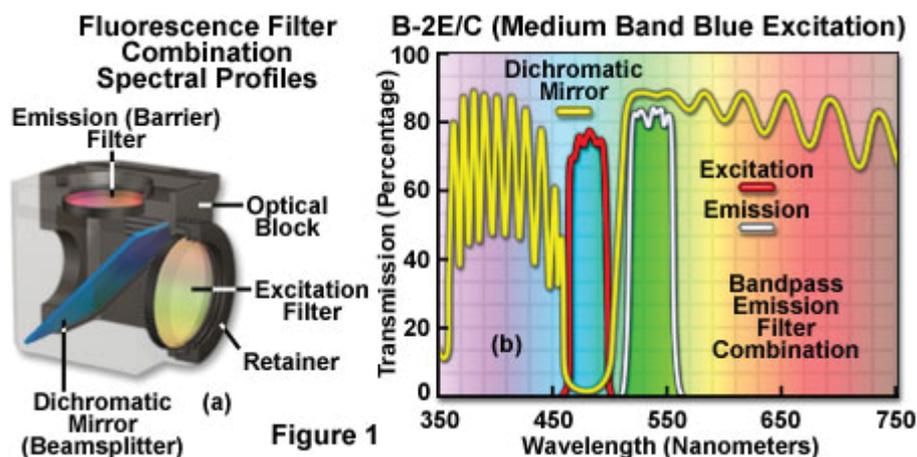
Dans ce schéma simplifié, l'objectif donne de l'objet AB observé une image réelle A1B1 renversée et très agrandie qui joue pour l'oculaire le rôle d'objet réel. L'oculaire donne de cet objet une image virtuelle A2B2 agrandie. Enfin, l'œil forme une image de l'objet A2B2 sur la rétine.

Le grossissement commercial G_m du microscope, rapport du diamètre apparent de l'image définitive à celui de l'objet observé à l'œil nu à la distance conventionnelle de 250 mm est :

$$G_m = \text{grossissement (oculaire)} \times \text{grandissement (objectif)}$$

Ainsi la puissance et le grossissement du microscope sont égaux aux produits du grandissement de l'objectif et, respectivement, de la puissance et du grossissement de l'oculaire (grossissement final jusqu'à 2000x). Le grandissement de l'objectif et le grossissement de l'oculaire sont habituellement gravés sur les montures de ces éléments.

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission.



12 : illustration d'un jeu de filtre typiquement utilisé en fluorescence, avec à gauche, le schéma décrivant la position des filtres et à droite les spectres de transmission/réflexion associés. Illustration tirée du site web de la société Nikon (<http://www.microscopyu.com>)

La microscopie à épifluorescence utilise un système d'éclairage et de détection permettant de traiter l'échantillon en une seule fois et sans balayage. Elle conviendra donc parfaitement au suivi de phénomènes biologiques rapides comme les mouvements calciques. Elle entraînera par contre une altération plus rapide des fluorochromes par photoblanchiment ainsi que la libération de radicaux libres et donc des dégradations au niveau cellulaire.

La résolution d'un microscope est une des données les plus importantes. Elle nous permet de déterminer la distance minimale entre deux objets à laquelle il est encore possible de les distinguer. La résolution dépend du grandissement de notre système, mais elle est également limitée par la déformation que subit l'objet observé à travers un système optique.

En effet, comme l'illustre la figure 13, l'image obtenue est, au bruit près, le produit de convolution de l'objet observé par la fonction de propagation du point (PSF pour Point Spread Fonction) de notre système optique.

Cette PSF est définie de la façon suivante : imaginons un objet lumineux assimilé à une source ponctuelle qui soit observé en utilisant un système de lentilles. De par la nature ondulatoire de la lumière on peut dire que la source lumineuse ponctuelle va être dispersée par ce système de lentilles suivant une distribution dans les trois dimensions. La fonction qui décrit cette propagation est appelée PSF (56).

Des techniques de traitement d'image comme la déconvolution 3D permettent, après acquisition des informations des différents points de l'espace, de réaliser une transformation mathématique qui sera la réciproque de celle causée par nos optiques et induisant la déformation de nos images. Des modifications instrumentales, conduisant à la microscopie confocale ou à la microscopie bi-photonique, permettront également de limiter cette déformation.

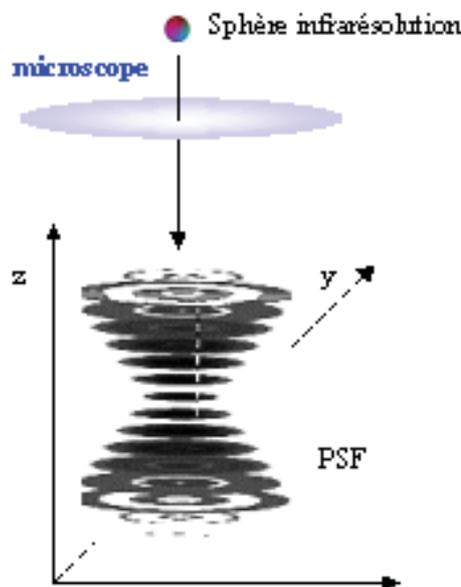


Figure 13: déformation subie par un objet ponctuel observé par un microscope : la PSF

ii) CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).

La microscopie confocale a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ, de l'ordre de 600nm. Le principe de ce microscope a été décrit par Marvin Minsky en 1953 mais sa réelle émergence a eu lieu dans les années 1980 avec l'apparition de systèmes commerciaux.

La microscopie confocale (57) suit le même principe que la microscopie à fluorescence précédemment présentée, avec quelques modifications permettant de limiter la taille de la PSF.

L'utilisation d'un sténopé (diaphragme de taille réglable) ou « *pinhole* » va nous permettre d'acquérir de façon sélective l'information provenant du plan de focalisation, c'est ce qui donne à ce type de microscopie son appellation de confocale. Pour simplifier, on peut considérer qu'on réglera le diamètre de ce trou pour qu'il soit égal au diamètre de la largeur à mi-hauteur de la tache de diffraction en x/y (δ_{xy}), soit la distance minimale entre deux points à laquelle on peut les distinguer l'un de l'autre. Cette distance peut être calculée de la façon suivante :

$$\delta_{xy} = \frac{0,61\lambda}{n \cdot \sin\theta} \quad \text{Eq.3}$$

$$\delta_z = \frac{2\lambda}{n \cdot (\sin\theta)^2} \quad \text{Eq.4}$$

λ : La longueur d'onde d'émission, n : l'indice de réfraction du milieu d'immersion, θ : l'angle du demi cône de lumière capté par l'objectif.

De véritables coupes optiques pourront être acquises. En effet, l'épaisseur de ces coupes est égale à δ_z correspondant à la résolution axiale optimale, obtenue lorsque le diamètre du *pinhole* est égal à δ_{xy} . Notre image ne contient alors plus que les informations provenant du plan de focalisation (figure 14). Il est alors possible, en réalisant des coupes optiques et de reconstruire notre objet en 3D grâce à des techniques d'interpolation. Le *pinhole* arrêtant l'information des plans non focalisés, le niveau de fluorescence observé sera plus faible. Les images auront donc un rapport signal sur bruit beaucoup plus faible (généralement compris entre 10 et 30 alors qu'il est classiquement supérieur à 40 en vidéomicroscopie)

Au niveau du système d'acquisition, deux éléments importants sont à noter : la source de lumière excitatrice sera constituée de lasers possédant des raies d'excitation compatibles avec les fluorophores. Des détecteurs de type PMT (Tube Photo-Multiplicateur) sont ajoutés, permettant de réaliser des acquisitions point par point en balayant l'image. Cette technique augmente considérablement le temps d'acquisition des images. En contrepartie, elle permet de n'éclairer que la zone choisie des échantillons ce qui, dans des conditions classiques, évite la destruction des molécules marquées sur une grande surface de l'échantillon. Le laser traversant entièrement les cellules, entraînera par contre une inactivation de la fluorescence des molécules marquées présentes au dessus et au dessous du plan de focalisation. La puissance des lasers étant modulable, il est également possible d'éclairer de façon très intense certaines zones d'intérêt pour photoblanchir spécifiquement les fluorophores présents. Cette technique est particulièrement utile dans les études de dynamique moléculaire qui pourront alors être réalisées par des techniques de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

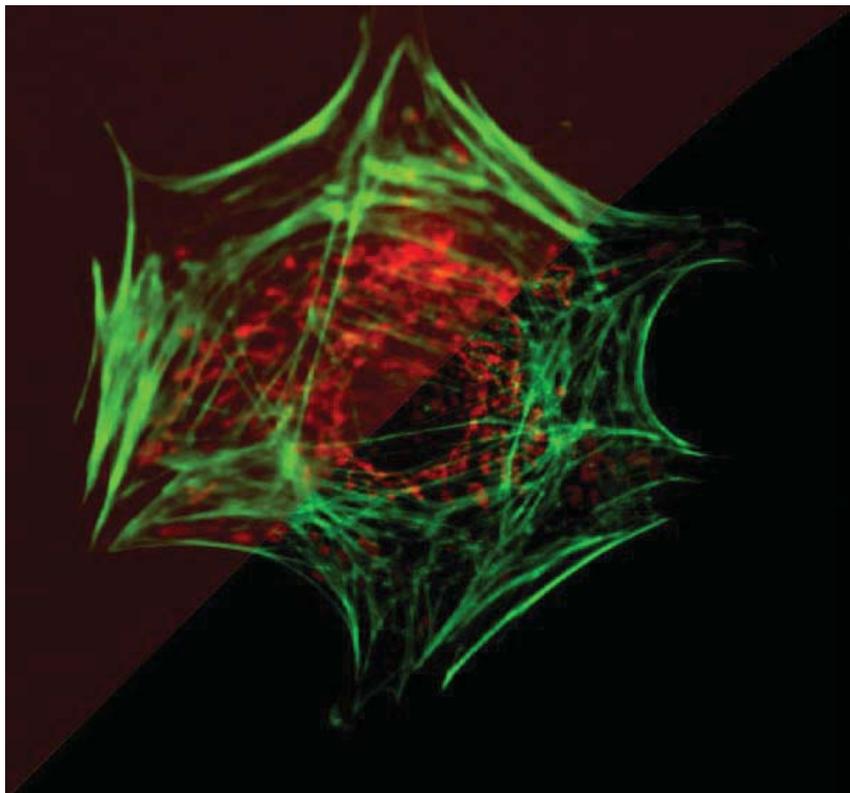
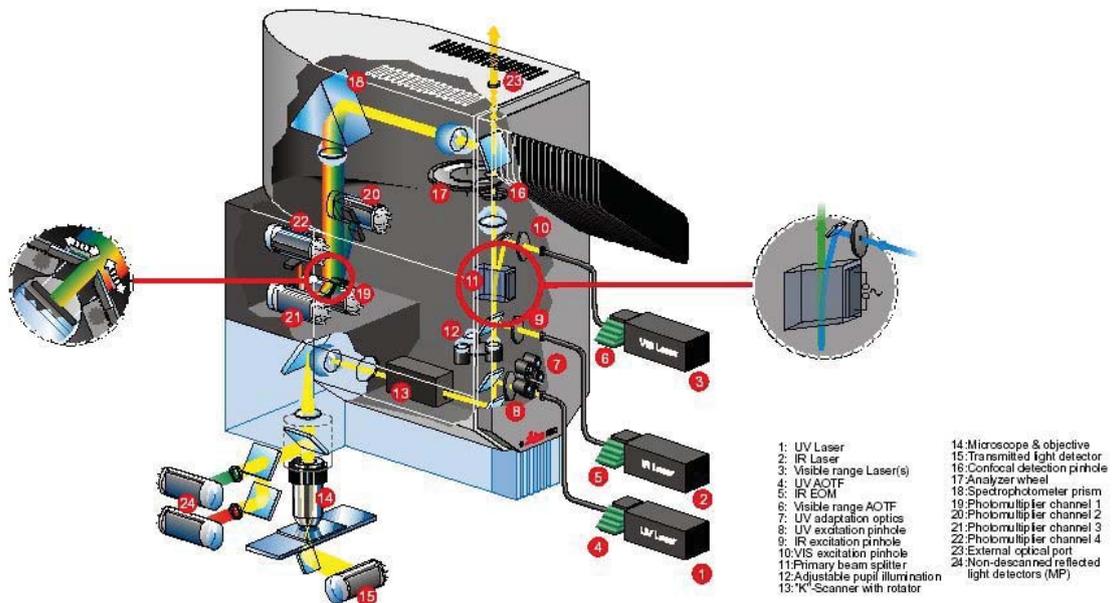


Figure 14: comparaison entre une image obtenue par microscopie classique (partie gauche) et par microscopie confocale (partie droite).

Le schéma optique complet du système d'excitation et de balayage d'un microscope confocal de type CLSM, le Leica SP2, est présenté figure suivante :

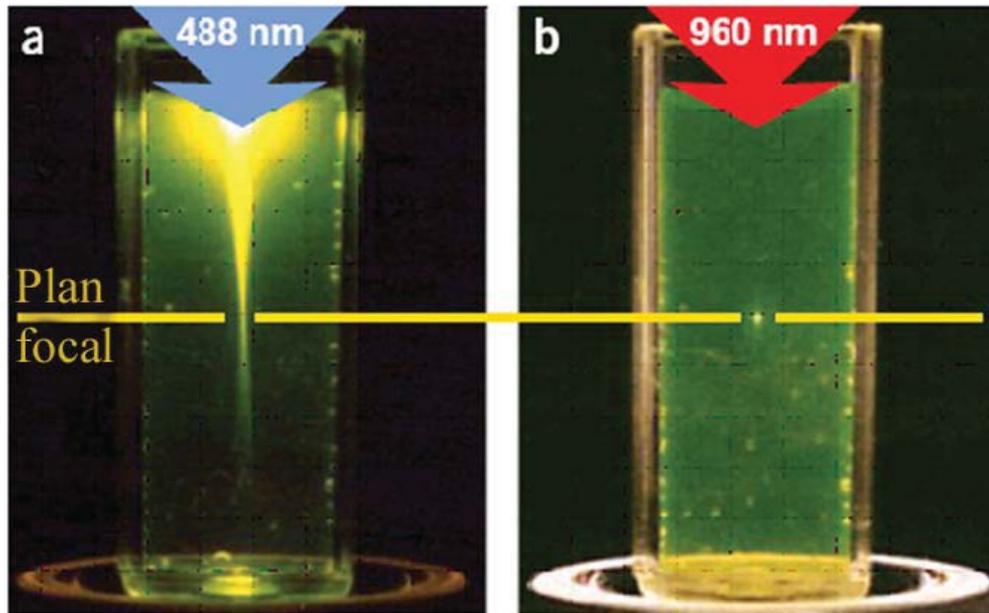


15: schéma détaillé de la tête de balayage du microscope Leica SP2 (tirée de la documentation de ce même microscope)

iii) L'excitation à deux photons.

Maria Goeppert-Mayer, prix Nobel de physique en 1963, a démontré au cours de sa thèse que si un photon ne possède pas une énergie suffisante pour induire une transition électronique de l'état S_0 à un état excité S_1 ou S_2 , l'arrivée d'un autre photon possédant l'énergie manquante dans un intervalle spatio-temporel très court, permettra d'amener la molécule fluorescente dans son état excité.

Cette propriété est la base d'une autre technique pour réaliser des coupes optiques qui utilise un système relativement similaire au dispositif précédent mais qui remplace la source laser classique par un laser pulsé, de préférence ajustable en longueur d'onde. Pour les fluorophores que nous allons étudier, les spectres d'excitation se situant entre 400 et 500 nm, en utilisant une source pulsée ajustable entre 750 nm et 1050 nm, un fluorophore ne recevra assez d'énergie pour passer à l'état excité que s'il reçoit deux photons dans un intervalle de temps équivalent à celui des fluctuations d'énergie moléculaire à l'échelle des énergies de photon, comme défini par le principe d'incertitude d'Heisenberg, i.e. 10^{-16} s (58). La probabilité d'un tel événement, dans le cas d'un laser femtoseconde comme le nôtre, est globalement très faible, cette dernière requérant une densité de flux de photon de l'ordre de 10^{31} photons.cm⁻².s⁻¹. Cette probabilité augmente énormément dans les zones à forte concentration de photons, c'est à dire au niveau du point de focalisation. On obtiendra donc une excitation exclusive du point de focalisation (figure 16) tout en collectant la totalité des photons émis par le fluorophore, grâce à l'absence de *pinhole*. Cette technique présente donc l'avantage de n'exciter que la zone d'intérêt dans les trois dimensions, limitant ainsi le photoblanchiment quand celui-ci n'est pas souhaité. Le laser étant pulsé, il sera également possible d'accéder à d'autres propriétés des fluorophores comme la durée de vie, valeur extraite du temps moyen que met un photon à être émis après excitation du fluorophore. Cette valeur est caractéristique des fluorophores étudiés. N'étant pas dépendante de la concentration, elle permettra de visualiser simultanément deux molécules marquées dont les concentrations sont très différentes. L'environnement local faisant varier cette durée de vie, on pourra déduire des éléments comme le pH d'un compartiment cellulaire ou la présence d'autres molécules marquées dans un environnement très proche, de l'ordre d'une quarantaine d'Angström.

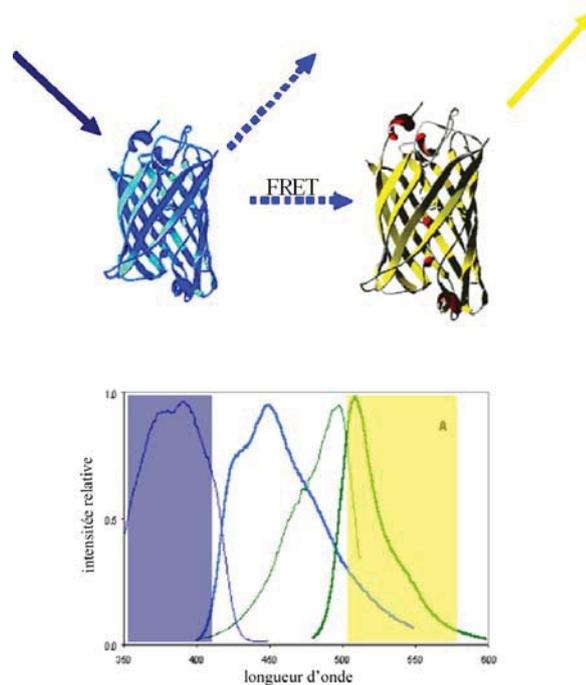


*Figure 16 : Localisations de la fluorescence émise après excitation à un ou deux photons.
a, excitation à un photon de la fluorescéine obtenue par la focalisation d'une source à 488 nm par un objectif d'ouverture numérique (0.16)
b, le même dispositif a été utilisé mais la source est un laser femtoseconde à 960nm induisant une excitation biphotonique de la fluorescéine.
Cette figure est tirée des travaux de W.W.Web (2)*

c Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

i) Théorie

Comme nous l'avons vu au chapitre I.2.a, chaque fluorophore est caractérisé par un spectre d'excitation et par un spectre d'émission. Si on a recouvrement entre le spectre d'émission d'un fluorophore appelé donneur et celui d'excitation d'un autre appelé accepteur on pourra avoir un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur ou FRET (figure 17)



17: représentation schématique du processus de FRET et spectre de fluorescence associés pour le couple CFP/YFP

L'efficacité de ce transfert est définie par l'équation suivante :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Eq. 5}$$

Avec E l'efficacité de FRET ; F l'intensité et τ le temps de vie de la fluorescence du donneur respectivement en présence (DA) ou absence (D) de l'accepteur ; r la distance entre les deux fluorochromes ; R_0 la distance de demi transfert qui est caractéristique d'un couple de fluorophores donné et dont l'expression est:

$$R_0 = \left\{ \frac{9000 (\ln 10) K^2 Q_d J}{128 \pi^5 n^4 N_{av}} \right\}^{1/6} \quad \text{Eq.6}$$

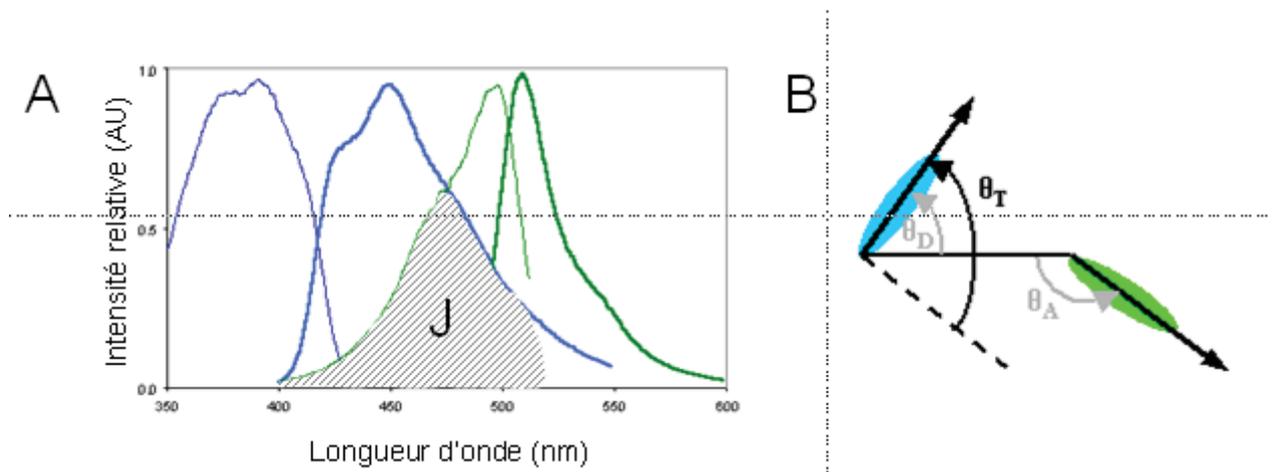
Q_d : le rendement quantique du donneur ; n : l'indice de réfraction du milieu (considéré comme étant de 1.4 pour les protéines) ; N_{av} : le nombre d'Avogadro ($N_{av} = 6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) ; J : la fonction intégrale exprimant le taux de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur et K : le facteur d'orientation.

Dans le cas de deux molécules ayant une liberté de mouvement équivalente dans toutes les directions, le facteur d'orientation est défini par l'équation suivante :

$$K^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A)^2 \quad \text{Eq. 7}$$

θ_T : l'angle entre le moment de transition d'émission du donneur et le moment de transition d'absorption de l'accepteur ; θ_D et θ_A : les angles entre les lignes de connections donneur/accepteur et les moments de transitions respectivement d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

La figure suivante donne une explication schématique des facteurs J et K de l'équation.



18: facteur entrant en jeu dans le calcul de l'efficacité de FRET.

A : spectre d'excitation et d'émission d'un couple de FRET. La zone marquée J représente le taux de recouvrement de l'équation 6.

B : représentation schématique des angles de l'équation 7.

Le bleu représente le donneur et le vert, l'accepteur

Un événement de FRET va se traduire par des modifications des caractéristiques de la fluorescence émise par les différents fluorophores présents:

- Les propriétés spectrales du mélange de fluorophores seront altérées de par la diminution de l'émission du donneur et l'augmentation de celle de l'accepteur.
- Ce transfert constitue également un mode de désexcitation supplémentaire pour le donneur. Cela implique l'apparition d'un nouveau facteur k de l'équation 1 et donc une diminution globale du temps de vie moyen.

Il en découle deux grandes catégories de techniques de mesure de FRET : les premières, basées sur des mesures d'intensité demandent des temps d'acquisition assez courts (quelques dizaines de millisecondes) et sont principalement qualitatives, alors que les mesures de temps de vie de fluorescence, bien que plus précises, nécessiteront des temps d'acquisition beaucoup plus longs (quelques secondes à quelques minutes).

ii) Exemples de méthodes de mesure basées sur l'intensité de fluorescence

De nombreuses méthodes existent pour tirer partie des modifications d'intensité de fluorescence dans le cas du FRET. L'article de revue de Elisabeth A Jares-Erijman et Thomas M Jovin (59) offre une très bonne vue d'ensemble de ces techniques. Nous allons ici présenter deux de ces techniques que nous avons testées au laboratoire.

- FRET par mesure des variations d'intensité de fluorescence de l'accepteur

Une des solutions les plus intuitives pour mesurer le FRET est de calculer le rapport entre les intensités de fluorescence de l'accepteur lorsqu'il est excité à la longueur d'onde d'excitation du donneur et lorsqu'il est excité à sa propre longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'excitation étant relativement larges pour les fluorophores adaptés à la biologie, l'accepteur pourra être excité, même sur la raie d'excitation du donneur, mais à un niveau assez faible. La présence d'un fluorophore donneur augmentera cette intensité de façon significative. L'intensité étant proportionnelle à la quantité de fluorophores dans le milieu, on devra s'en affranchir en calculant le rapport précédemment décrit. S'il donne une valeur supérieure à celle de l'accepteur seul, on pourra conclure à un probable transfert d'énergie.

- FRET par photoblanchiment de l'accepteur

Une propriété intéressante des fluorophores qui va être exploitée ici est le photoblanchiment. En effet, quand on expose un fluorophore à une grande quantité d'énergie, il perd ses propriétés de fluorescence. De plus, il est possible de photoblanchir sélectivement l'un des deux fluorophores, si leurs spectres d'excitation sont bien séparés.

Lors de phénomènes de FRET, le donneur va transférer une partie de son énergie pour exciter l'accepteur de façon non radiative. En détruisant sélectivement cet accepteur, on aura donc augmentation de l'intensité du donneur et diminution de l'intensité de l'accepteur. Dans cette technique dite de pB-FRET, la mesure de l'intensité d'émission du donneur avant et après photoblanchiment de l'accepteur nous donnera une estimation de ce transfert d'énergie.

iii) Méthode de mesure basée sur la polarisation de fluorescence : déclin d'anisotropie de fluorescence :

En utilisant une lumière d'excitation polarisée, tel un laser, on excitera spécifiquement les chromophores dont le moment de transition d'absorption est parallèle à la direction du champ électrique de la lumière incidente. La lumière de fluorescence est alors polarisée selon la direction du moment de transition de l'émission. La mesure de la dépolarisation de fluorescence au cours du temps nous renseigne sur la vitesse de rotation de la molécule. En effet, si un photon est émis immédiatement après excitation, la réorientation de la molécule sera nulle et aucune dépolarisation ne sera observée. Ce niveau de dépolarisation augmentera en fonction de la relation entre le temps d'émission des photons et la vitesse de rotation de la molécule observée (60). Un phénomène de FRET induira une dépolarisation accélérée de la lumière lors d'un transfert entre deux fluorophores d'orientation isotrope et non corrélée ; la lumière émise par le second fluorophore n'étant plus corrélée avec l'orientation de la lumière excitatrice (61).

Après avoir réalisé des mesures de la dépolarisation rotationnelle du fluorophore en fonction du temps, il est possible de mesurer une efficacité de FRET par comparaison de cette dépolarisation intrinsèque et de celle mesurée après ajout du deuxième partenaire d'interaction (62). L'étude de cette accélération de dépolarisation présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour étudier deux fluorophores identiques, on parle alors d'homo-FRET. Une présentation très complète de cette technique est donnée par Marc Tramier dans son manuscrit de thèse (63).

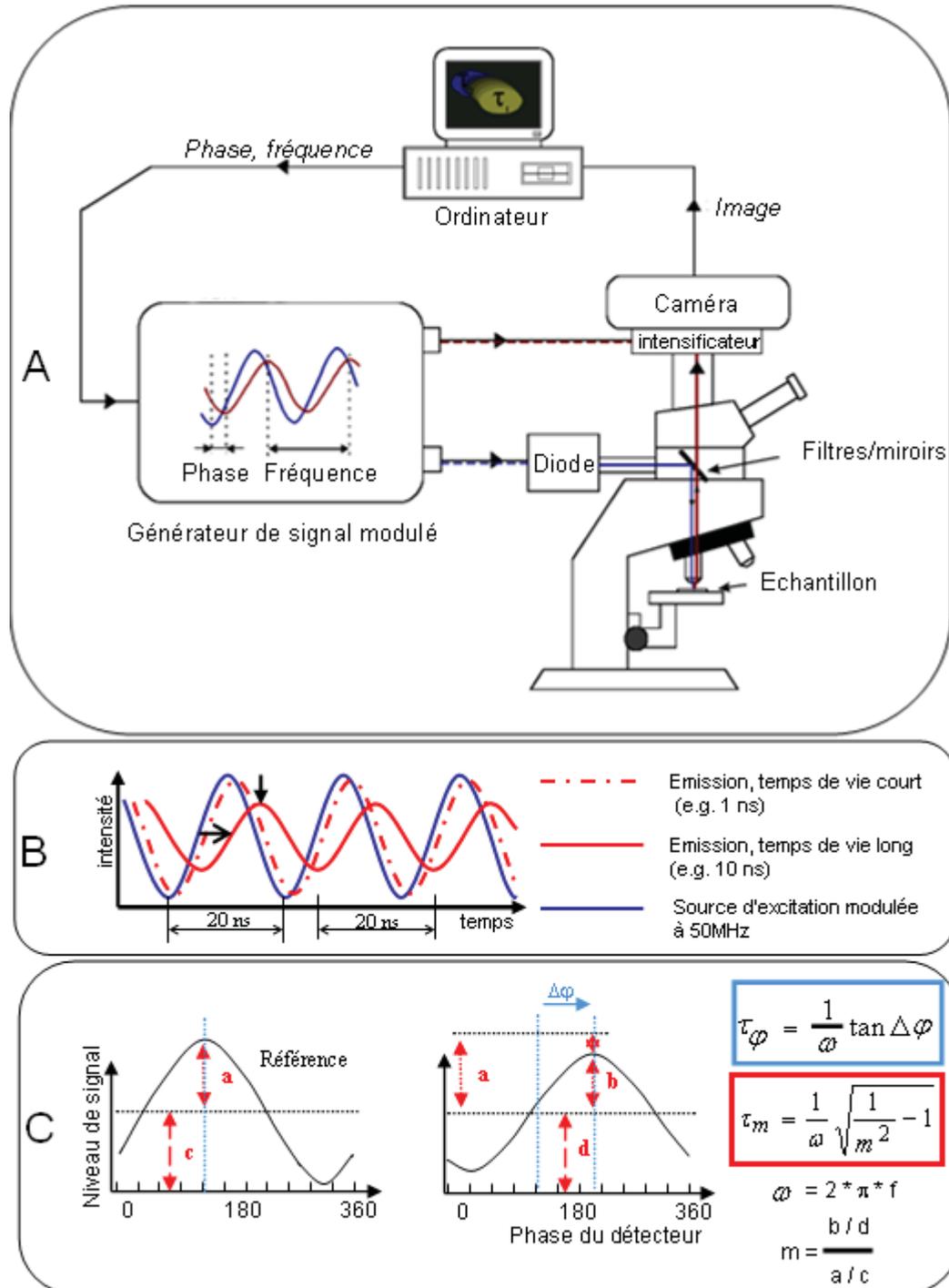
iv) Méthode de mesure du temps de vie de fluorescence.

Les mesures de temps de vie de fluorescence (cf. chapitre précédent) sont classées en deux grandes familles. La première s'effectue dans l'espace des fréquences alors que la deuxième utilise l'espace temps. Nous allons donc passer en revue ces différentes techniques, ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs.

(1) Dans l'espace des fréquences.

Ce type de mesure nécessite une source d'excitation modulée en intensité à une fréquence de 10 à 100MHz et un intensificateur d'image modulé couplé à une caméra CCD. Lorsque le temps de vie d'un fluorophore est long (par exemple 10ns), le fluorophore continue à émettre de la fluorescence au moment où l'excitation est à son minimum. Lorsque le temps de vie est plus court (par exemple 1ns), l'émission de fluorescence apportera une contribution au signal pendant une période très courte après excitation du fluorophore. De ces remarques, on peut déduire qu'un signal d'émission présentant un temps de vie long entraînera une forte diminution de la modulation du signal alors qu'un échantillon à temps de vie court n'entraînera qu'une légère modification de la modulation par rapport à celle du signal d'excitation. De plus, plus le temps de vie sera long, plus on observera un décalage de phase entre la source d'excitation et la lumière émise.

Ces deux paramètres, i.e. la différence de modulation et de phase entre le signal d'excitation et d'émission, sont liés au temps de vie de fluorescence de l'échantillon. Ils peuvent donc l'un et l'autre être utilisés pour effectuer des mesures de temps de vie en comparant ces variations à celles obtenues par des mesures effectuées sur un échantillon référence. La figure suivante présente de façon schématique un tel système d'acquisition (A) ainsi que la représentation d'acquisition de fluorophores de temps de vie courts et longs (B) et la façon dont le temps de vie de fluorescence est extrait de ces données de mesures de phase et modulation (C).



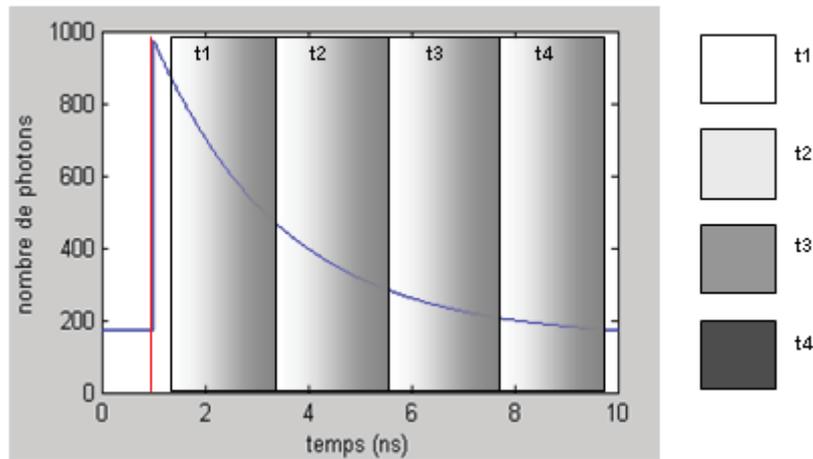
19:A, représentation schématique d'un système d'étude de temps de vie basée sur les mesures d'anisotropie de fluorescence, le LIFA (adapté de Ria Hut, Lambert Instrument. En particulier, le générateur de signal permet de moduler de façon synchrone la diode (excitation) et l'intensificateur (détection). Voir le texte pour plus de détails B, Profil d'intensité au cours du temps d'une source modulée (bleu) et de la fluorescence émise par un fluorophore à temps de vie court ou long (rouge). C, méthode d'extraction du temps de vie de fluorescence à partir de la variation de modulation τ_m et de phase τ_ϕ à partir d'un échantillon de temps de vie connu, par exemple, un miroir dont le temps de vie est de 0 ns, la réflexion étant un processus instantané.

(2) *Dans l'espace temps.*

C'est la mesure du temps entre l'excitation d'un fluorophore et la détection d'un photon émis qui est la caractéristique commune à ces différentes techniques. Cette mesure est réalisée de façon différente selon la vitesse d'acquisition et de la résolution temporelle recherchée. Les trois principales sont les suivantes.

- **Système utilisant des caméras à portes temporelles**

Après excitation de l'échantillon par une source pulsée, l'image de l'objet est projetée sur un GOI (Gated Optical Intensifier) dont le rôle est à la fois d'amplifier le signal mais également de ne mesurer les photons émis que pendant un bref intervalle de temps après chaque impulsion. En décalant la zone d'observation et en réalisant une série de 4 à 10 images plein champ (figure 20).

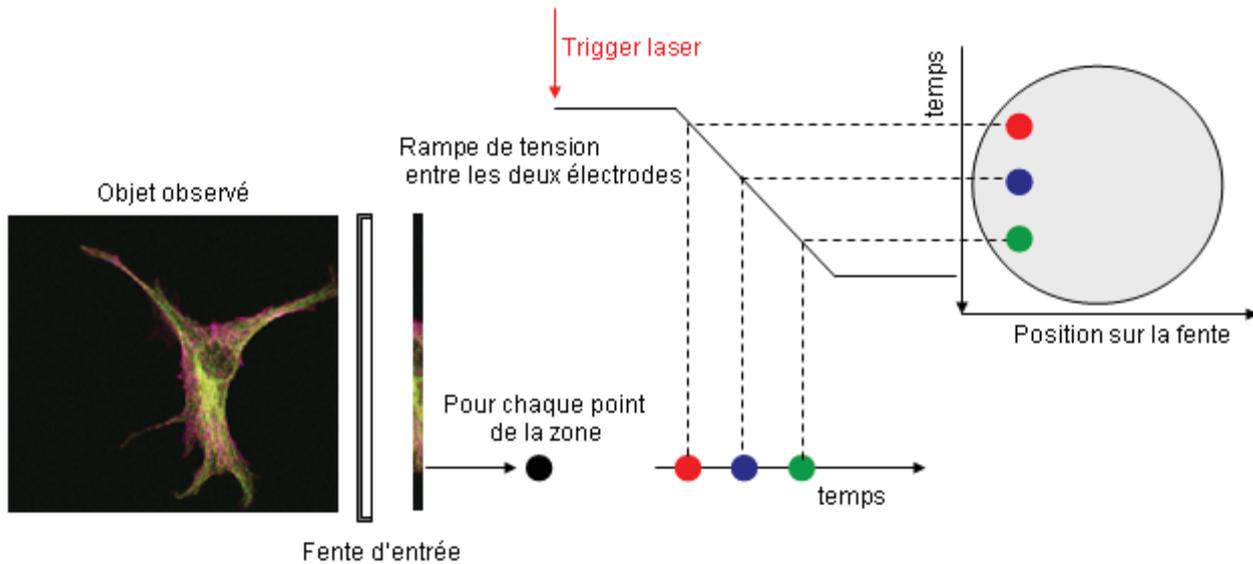


20: illustration du principe d'acquisition d'un système utilisant des portes temporelles avec en rouge, l'impulsion laser et en bleu, la courbe de déclin de fluorescence.

A : le GOI est configuré pour acquérir des images successives correspondant aux canaux temporels t1-t4 illustrés en B. il est alors possible de reconstituer une image de temps de vie à partir de ces 4 images d'intensité.

- **Systèmes utilisant une « streak » caméra**

Dans ce système, la lumière est projetée au travers d'une fente sur la photocathode d'un tube *streak* qui fonctionne de la façon suivante : Les photons reçus à travers la fente sont convertis en électrons. Dans un deuxième temps, ces électrons sont accélérés et passent entre deux électrodes, puis ils sont défléchis dans une direction perpendiculaire à la fente ; l'amplitude de cette déflexion est fonction de leurs temps d'émission (figure 21). Ils arrivent enfin sur une galette de micro canaux (MCP) qui amplifie le signal puis ils sont bombardés sur un écran à phosphore. Il en résulte une image avec en x, l'information relative à la position sur la fente et en y, l'information temporelle.



21 : représentation schématique de la dispersion temporelle obtenue par un système streak

- **Système de mesures TCSPC.**

Ce système est basé sur une carte de comptage de photon TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Cette carte va permettre de mesurer le temps entre l'excitation d'un fluorophore et l'émission d'un photon. Les détecteurs utilisés étant généralement des photomultiplicateurs, l'acquisition se fera point par point. Une description plus exhaustive de cette technique sera faite dans le chapitre suivant.

(3) Bilan sur les techniques de mesure de temps de vie.

D'un point de vue plus pratique, le choix entre les techniques de mesure dépendra de la question posée et de l'échantillon observé. Les techniques de phase et modulation, de polarisation et de portes temporelles présentent l'avantage d'être rapides et permettent un suivi dynamique des variations du temps de vie. Cette vitesse est au détriment de la précision des mesures temporelles et ne permettra que rarement d'extraire différentes exponentielles d'une courbe de déclin. La méthode de TCSPC présente le compromis inverse, la résolution temporelle étant seulement limitée par les caractéristiques physiques des détecteurs et des cartes utilisés. Elle demande cependant un grand nombre de photons pour reconstituer une courbe complète et le débit de mesure de photons doit être maintenu relativement bas pour éviter des mesures artefactuelles (chap. II.1.b). L'acquisition étant réalisée point par point, l'obtention d'une image de temps de vie nécessitera un balayage de l'échantillon et un temps d'acquisition supplémentaire. Enfin, la caméra *streak* permet de conserver l'information spatiale dans une des dimensions avec une résolution temporelle très satisfaisante. Elle présente par contre des limites importantes quand à la fenêtre temporelle observée. Elle est très efficace et rapide pour les mesures de temps de vie court ($< 1\text{ns}$). Les acquisitions sont plus longues voir impossibles pour des temps de vie plus longs.

Le tableau suivant résume avantages et inconvénients des différents systèmes de mesure de temps de vie.

caractéristique	Phase/modulation	Caméra/GOI	Caméra <i>streak</i>	Système TCSPC
Précision de détermination de τ	+	+	+++	+++
Résolution (x,y,z)	+++	+++	+++	++
Capacité à distinguer plusieurs exponentielles	-	-	+++	+++
Vitesse d'acquisition	+++	+++	++	+/-
Efficacité de mesure pour des temps longs ($\sim >4\text{ns}$)	+++	++	-	++/+++
Efficacité de mesure pour des temps courts ($\sim <4\text{ns}$)	++	+	+++	+++

v) Complexité de l'interprétation des mesures de FRET.

Comme nous l'avons vu, de nombreuses méthodes existent pour réaliser des mesures de FRET, chacune utilisant différentes propriétés de la lumière. De par ces points de vue différents, elles présenteront des robustesses différentes vis-à-vis des échantillons observés. Les principaux problèmes rencontrés en cellules seront les concentrations variables en fluorophores, l'autofluorescence cellulaire, le chevauchement spectral mais également les niveaux d'interactions trop faibles et les mouvements des échantillons observés.

Au delà de ces problèmes liés à l'acquisition, l'interprétation des données demande une bonne compréhension des événements à l'œuvre pour éviter une sur interprétation, voire une interprétation erronée.

(I) Complexité liée à la mesure.

- L'autofluorescence cellulaire.

Les cellules peuvent présenter des niveaux d'autofluorescence variables. La fluorescence émise présente le plus souvent des spectres larges associés à des temps de vie courts. La présence d'autofluorescence est donc problématique dans les études basées sur l'intensité de fluorescence et nécessitera une attention particulière, comme l'utilisation d'une décomposition spectrale. Ce problème devient très complexe à résoudre dans les mesures de temps de vie. En effet, le temps de vie court ainsi obtenu pourra facilement être analysé comme du FRET. L'absence d'autofluorescence est donc un pré-requis à toute étude de FRET par mesure de FLIM. Dans le cas contraire, des procédures d'acquisition particulières devront être mises en place comme nous le verrons chapitre III

- Chevauchement spectral.

Les fluorophores utilisés pour les études de FRET présentent le plus souvent un chevauchement spectral entre les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur afin d'optimiser le facteur J de l'équation 6. Les mesures de FRET prenant en compte la fluorescence de l'accepteur doivent apporter des corrections pour éviter une surestimation de la contribution de ce dernier. Le même type de problème est induit par le chevauchement des spectres d'excitation des deux fluorophores,

entraînant une excitation non spécifique de l'accepteur. Les techniques prenant en compte uniquement la fluorescence émise par le donneur ne nécessitent pas ce type de correction à condition d'utiliser un filtre passe-bande spécifique du donneur.

La technique de Pb-FRET subira également de façon indirecte les problèmes liés à ce chevauchement. En effet, le photoblanchiment de l'accepteur peut entraîner une diminution de la fluorescence du donneur par excitation indirecte, conduisant ainsi à une sous estimation du processus de FRET.

- ***Concentration variable de fluorophores.***

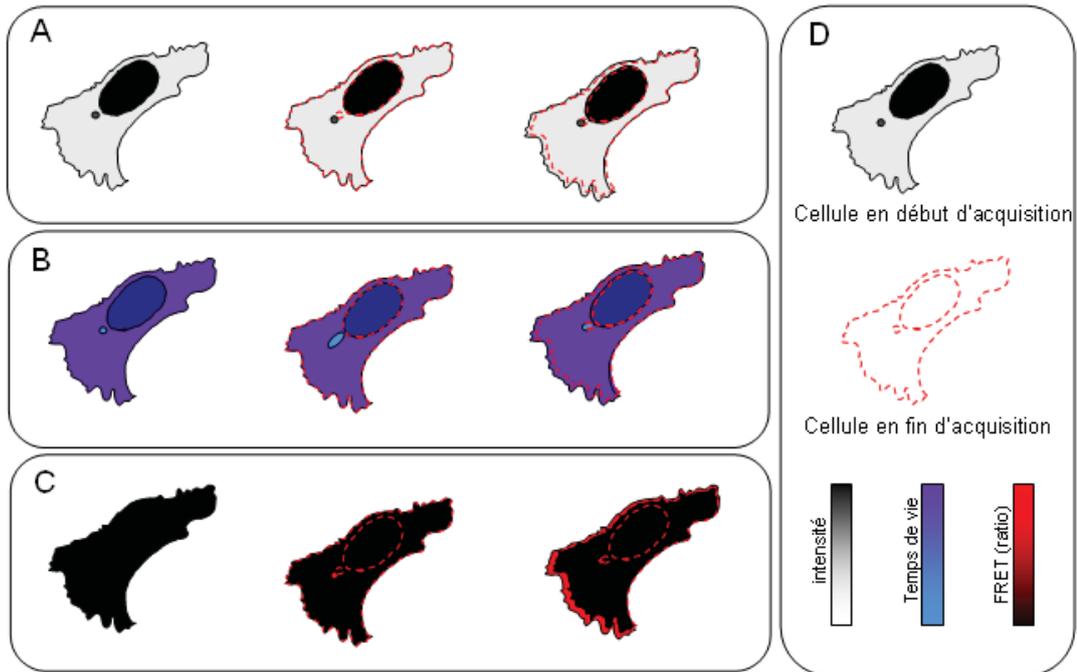
Le premier écueil rencontré pour des niveaux d'expression très différents sera de rendre le signal d'un des deux fluorophores trop faible pour réaliser des mesures. Ce problème devient particulièrement problématique de par le chevauchement spectral déjà mentionné. Les corrections deviennent alors très complexes à appliquer. Les mesures de FLIM ne seront pas affectées par ces problèmes de concentration, le temps de vie étant indépendant de cette dernière. Seule la proportion de l'espèce sera alors modifiée. Comme nous le verrons par la suite, des niveaux variables d'expression poseront également des problèmes pour l'interprétation des données.

- ***Travail en cellule vivante.***

Deux problèmes sont rencontrés dans l'étude du vivant. Le premier est lié à la dynamique des protéines. Il rend les techniques utilisant le photoblanchiment de fluorophores, tel le pbFRET, très complexes à mettre en œuvre. En effet, un recouvrement partiel de la zone photoblanchie entre le photoblanchiment et l'acquisition suivante sera observé pour toutes les protéines présentant un mouvement rapide de type diffusif. Ce type d'acquisition nécessite alors de blanchir la totalité de la cellule pour éviter ces recouvrements.

Un autre problème plus général provient du mouvement des cellules ou de l'organe étudié (figure 22). Ce problème entraînera un effet de flou lors des acquisitions de temps de vie (figure 22, B), réduisant la résolution spatiale. Ce problème devient beaucoup plus critique pour toutes les acquisitions utilisant des acquisitions séquentielles (acquisitions impliquant un changement de filtres ou acquisition spectrales séquentielles). Dans ce cas, un effet de bord important sera

observé, ce qui rend impossible l'analyse de ces zones (figure 22 C). Ce problème peut devenir crucial lors de l'étude de structures « rapides » telles certaines vésicules, ces dernières pouvant parcourir en moyenne 1 $\mu\text{m/s}$. Dans des conditions d'acquisition confocale classique, le temps d'acquisition est classiquement de 500ms par image pour une largeur de pixel de 0.3 μm . On aura alors un décalage de ~ 2 pixels entre deux images consécutives.



22: représentation schématique d'une situation rencontrée en cellule vivante: exemple d'une cellule exprimant un seul fluorophore (témoin négatif de FRET) présentant un temps de vie variable en fonction des compartiments cellulaires. La cellule de gauche représente le début de l'expérience, la cellule centrale montre l'effet d'un mouvement d'une vésicule et celle de droite d'un déplacement global de la cellule.

A : images d'intensité

B : mesure de FLIM

C : images de FRET utilisant un ratio d'intensité du donneur

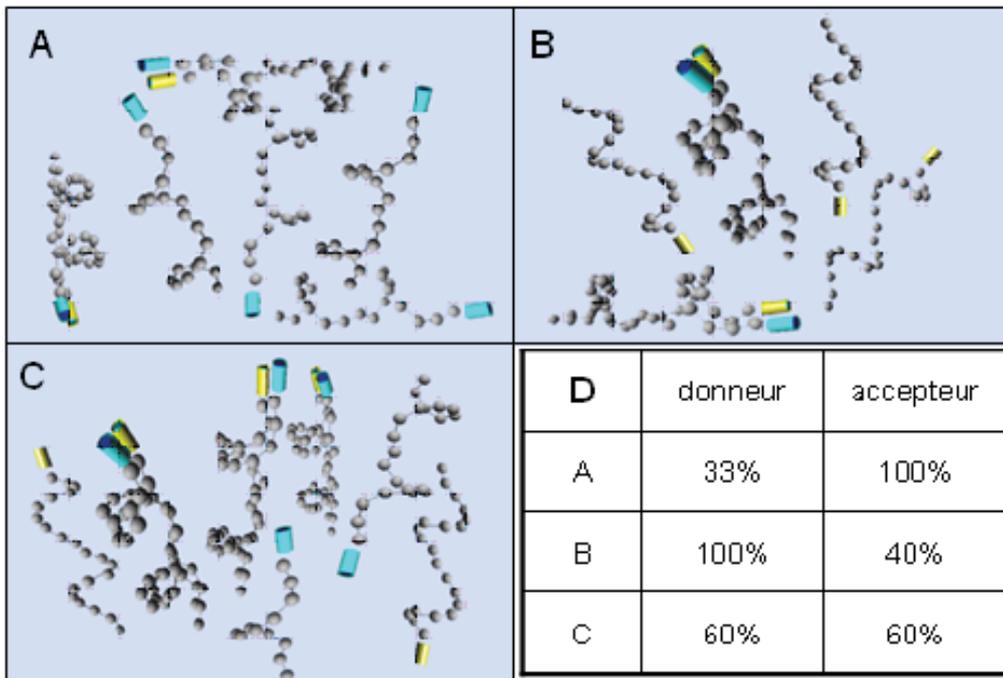
D : code couleur utilisé pour les éléments A-C

(2) *Interprétation des données.*

- *Corrélation des niveaux d'expression des fluorophores.*

Le niveau de FRET mesuré dépend de la proportion de molécules en interaction et de leur proximité. Pour comparer la proportion de molécules en interactions, il est important d'avoir des niveaux d'expression relatifs constants. En effet, si la proportion d'expression change, l'équilibre de la réaction va s'en trouver bouleversé ; la protéine la moins abondante aura plus de chance de trouver un partenaire si sa concentration augmente.

Un deuxième élément à prendre en compte est le fluorophore. Certaines techniques nous permettent d'étudier la proportion de donneur en interaction (exemple : Pb-FRET, FLIM), alors que d'autres s'intéressent à la proportion d'accepteur en interaction (exemple : rapport d'intensité de l'accepteur). Ces deux modes d'étude donneront des résultats très différents sauf dans le cas d'une équimolarité des deux partenaires (Figure 23).



23: A-C, représentation schématique de trois événements de FRET avec en gris, les protéines marquées; en bleu le donneur et en jaune l'accepteur.
D, proportion de donneurs et d'accepteurs en interaction pour les cas A-C. seul le cas équimolaire (C) nous donne les mêmes résultats dans les deux cas

La meilleure solution pour simplifier ces problèmes d'interprétation consiste donc à faire des expériences avec des concentrations comparables pour les deux fluorophores étudiés. Cette solution est facile à mettre en œuvre pour les études en

solution mais elle devient plus complexe à contrôler dans des cellules, en particulier pour des fluorophores ayant des rendements quantiques différents.

- **Limites des équations.**

Un élément fondamental à prendre en compte lors de l'utilisation d'une équation est les présupposés qu'elle implique. En particulier, les équations 5 et 6 (résumées par l'équation 5'), qui relient l'efficacité de FRET à la distance entre les molécules présentent deux limitations importantes (45).

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{\left\{ \frac{9000 (\ln 10) K^2 Qd J}{128 \pi^5 n^4 N_{av}} \right\}^{1/6}} \right)^6} \quad \text{Eq. 5'}$$

Par définition, cette équation est applicable uniquement si le donneur et l'accepteur sont séparés d'une distance fixe. Ce cas de figure est courant dans le cas de FRET intramoléculaire où seules deux configurations de la molécule existent, dont une donnera lieu à un phénomène de FRET. La majorité des interactions intermoléculaires donneront lieu à de nombreux états transitoires. La valeur mesurée correspond donc à la distance moyenne entre les deux molécules.

Le calcul de la distance, r , dépend alors de E et de R_0 . La détermination de R_0 doit donc être la plus précise possible. Comme décrit dans l'équation 4, R_0 dépend notamment du facteur d'orientation k . L'assimilation à une rotation libre permet de fixer $k=2/3$. Dans le cas d'orientations préférentielles des protéines étudiées, il est pratiquement impossible de déterminer ce facteur k avec précision. Les mesures de distances entre fluorophores nécessitent donc de poser comme hypothèse de départ une orientation aléatoire.

Une limite supplémentaire est spécifique des mesures de temps de vie. En effet, de nombreux fluorophores comme la CFP, donneur de FRET populaire en biologie, présentent des déclins multi-exponentiels (pour la CFP de 2 à 5 espèces, présentant

chacune une décroissance exponentielle, ont été mesurées en solution). Le déclin de fluorescence d'un échantillon présentant une interaction partielle comportera donc de 4 à 10 espèces exponentielles dans la zone d'émission de la CFP seule. Au regard du nombre de photons constituant des courbes de déclin de fluorescence en microscopie, l'ajustement par ce type de modèle est impossible et nécessite l'approximation de ces déclins aux temps de vie moyens des deux espèces de donneurs. Une analyse précise du facteur E nécessite donc de choisir des fluorophores mono-exponentiels comme donneurs de FRET. Les deux principaux fluorophores utilisés actuellement sont la GFP et la Cerulean FP(53)