



## FRAP : faire réapparaître la fluorescence après photo-extinction

### Question

Bonjour,

Pouvez-vous me réexpliquer ce qu'est la technique de FRAP ? Merci.

### Réponse

La « FRAP », pour *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (redistribution de fluorescence après photoblanchiment) est une technique notamment utilisée dans la mise en évidence des mouvements latéraux des constituants des membranes et donc de la fluidité « horizontale » au sein de ses dernières.

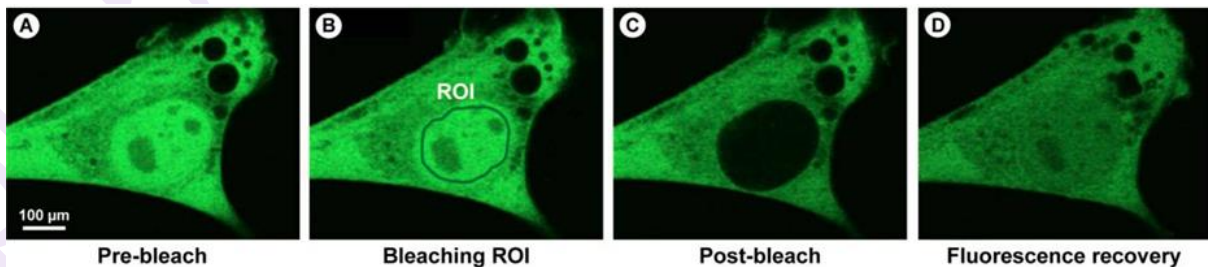
Pour cela, on marque à l'aide d'un fluorochrome, le composant (lipidique ou protéique) d'une membrane de cellule isolée (et vivante) ou d'un de ses organites. Ce composant peut alors être suivi à l'aide d'un microscope à fluorescence. Dans le cas d'une protéine membranaire, on utilise généralement un anticorps spécifique de cette dernière, anticorps sur lequel on a greffé le fluorochrome.

Dans un premier temps, le fluorochrome est excité à l'aide d'un faisceau laser (ce qui permet de le visualiser au sein du territoire membranaire). On envoie alors une lumière de forte intensité sur ce même territoire pour détruire le fluorochrome et supprimer la fluorescence (blanchiment). Celle-ci réapparaît au bout d'un certain temps (fluorescence des molécules situées en périphérie de la zone « brûlée »).

Si la fluorescence est totale (elle se réinstalle au niveau de la zone « brûlée »), c'est qu'il y a eu déplacement des molécules vers le territoire initialement blanchi. On peut ainsi, selon l'importance de la restitution de la fluorescence, établir le degré de fluidité de la membrane pour la molécule marquée.

⇒ La FRAP désigne donc le rétablissement de la fluorescence dans une région définie d'un échantillon après un processus de blanchiment. L'effet FRAP résulte du mouvement des fluorochrome non blanchis depuis la zone périphérique dans la région blanchie. D'où l'estimation de la dynamique de la mobilité moléculaire dans la diffusion, le transport ou tout autre sorte de mouvement des molécules marquées par fluorescence dans les membranes.

Ne pas confondre la FRAP avec la FLIP (*Fluorescence Loss in Photobleaching* : perte de fluorescence en photoblanchiment), qui est la diminution ou la disparition de la fluorescence dans une région définie, adjacente à une région blanchie de manière répétitive. Cette technique permet également d'évaluer la dynamique de la mobilité moléculaire dans les membranes.



### Exemple de FRAP en action dans une cellule *myo3* exprimant la GFP-myosine III.

A) La cellule « colorée » de manière homogène avant le blanchiment.

B) Le territoire d'intérêt (ROI), ici le noyau, est sélectionné.

C) Un laser de haute puissance blanchit le noyau et les fluorochromes de cette zone n'émettent plus de lumière.

D) La fluorescence dans le ROI se rétablit par diffusion de fluorophores non blanchis et la quantité totale de fluorescence diminue logiquement par rapport à A. © Ishikawa-Ankerhold et al.