

Numéro d'anonymat :

I- Expliquer le principe de la chromatographie d'affinité en tandem (TAP-TAG) et l'intérêt de cette technique.

II- Mesure d'un stress mécanique sur une protéine par FRET (d'après Meng et al. FEBS J. 2008, 275, 3072-87)

Les auteurs ont construit une protéine de fusion contenant une hélice alpha (100 aa) présentant à l'extrémité N-terminale le variant Venus (CFP) de la GFP (green fluorescent protein) et à l'extrémité C-terminale le variant Cerulean (YFP) de la GFP (Figure 1).

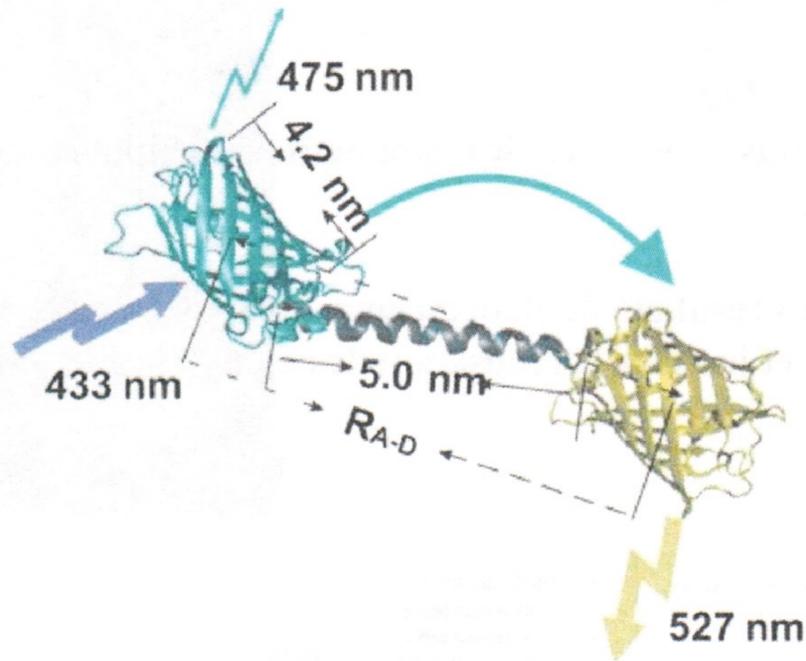


Figure 1

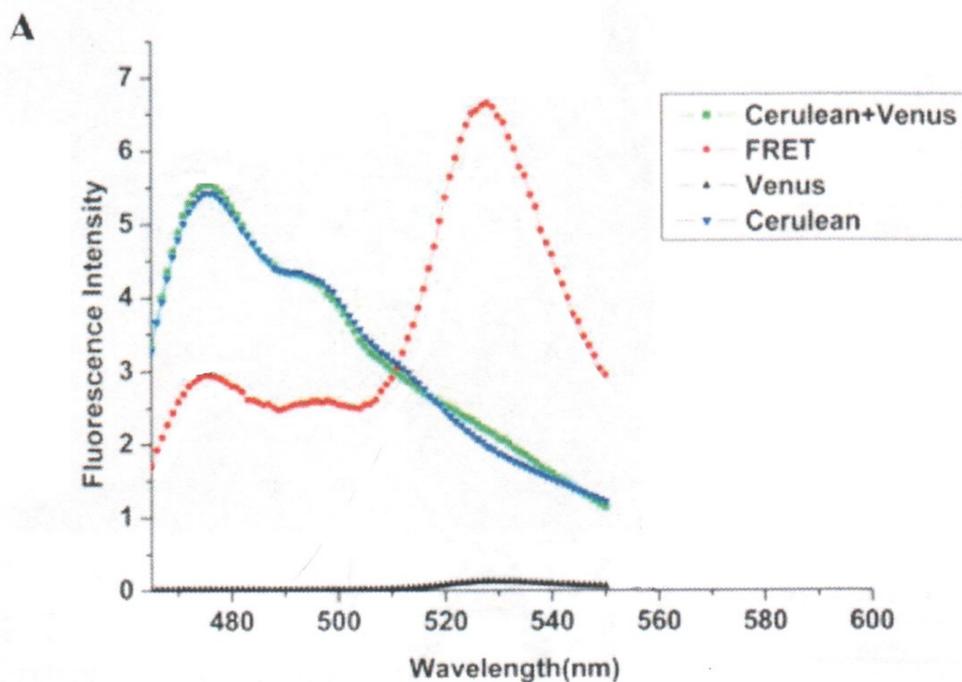


Figure 2

Commenter et interpréter les spectres obtenus. Donner une estimation de l'efficacité de transfert (E_{FRET}) de fluorescence dans la protéine de fusion.

a) La figure 2 représente les résultats de mesure de fluorescence de ce système (courbe rouge) après excitation à 433 nm. Les courbes verte, noire et bleu, correspondent respectivement à des expériences témoin dans lesquelles la YFP et la CFP sont ajoutées en mélange 1/1, seule la CFP est présente ou seule la YFP est présente.

b) La figure 3 représente les résultats de FRET obtenus pour différentes constructions :

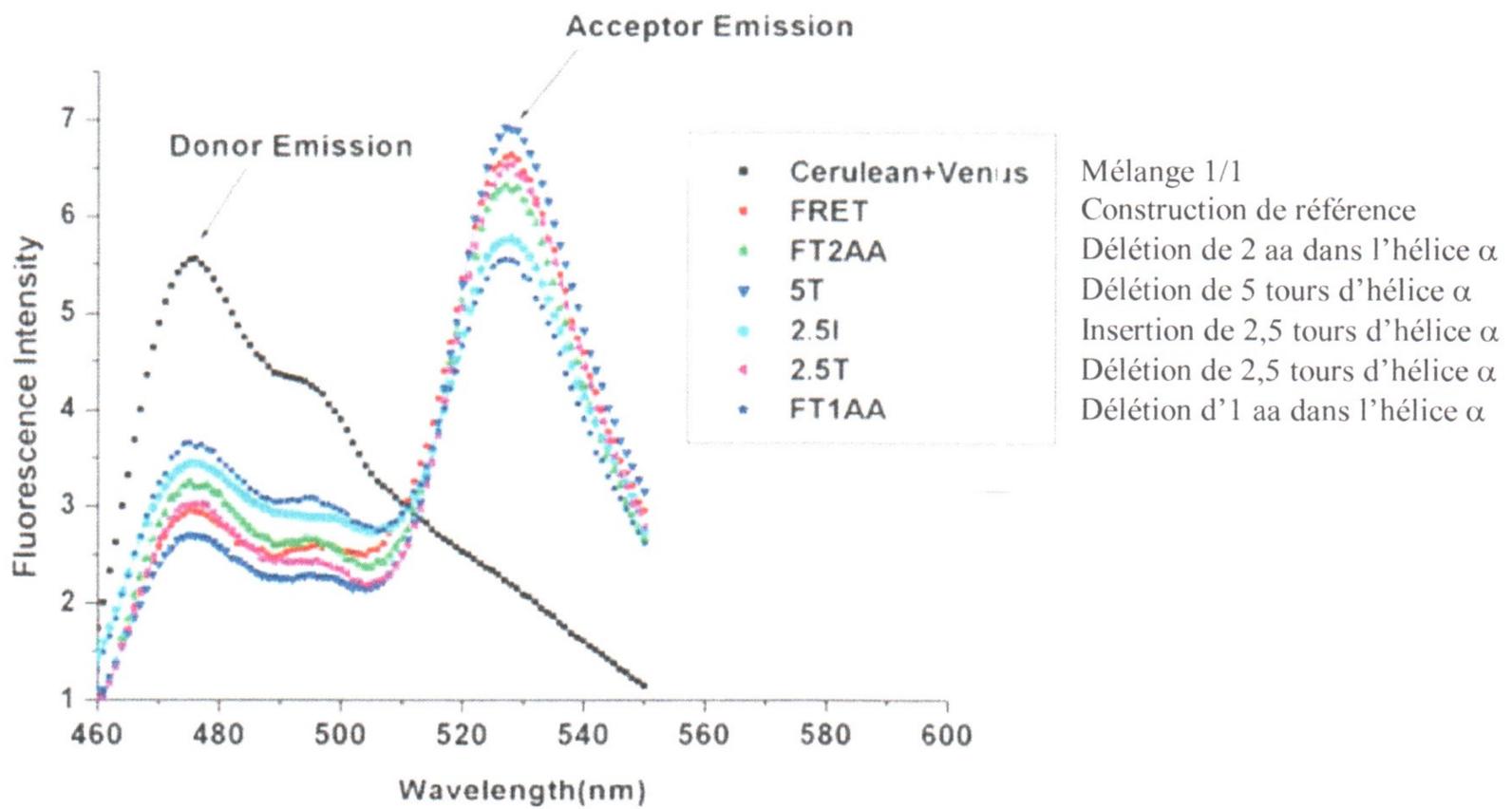
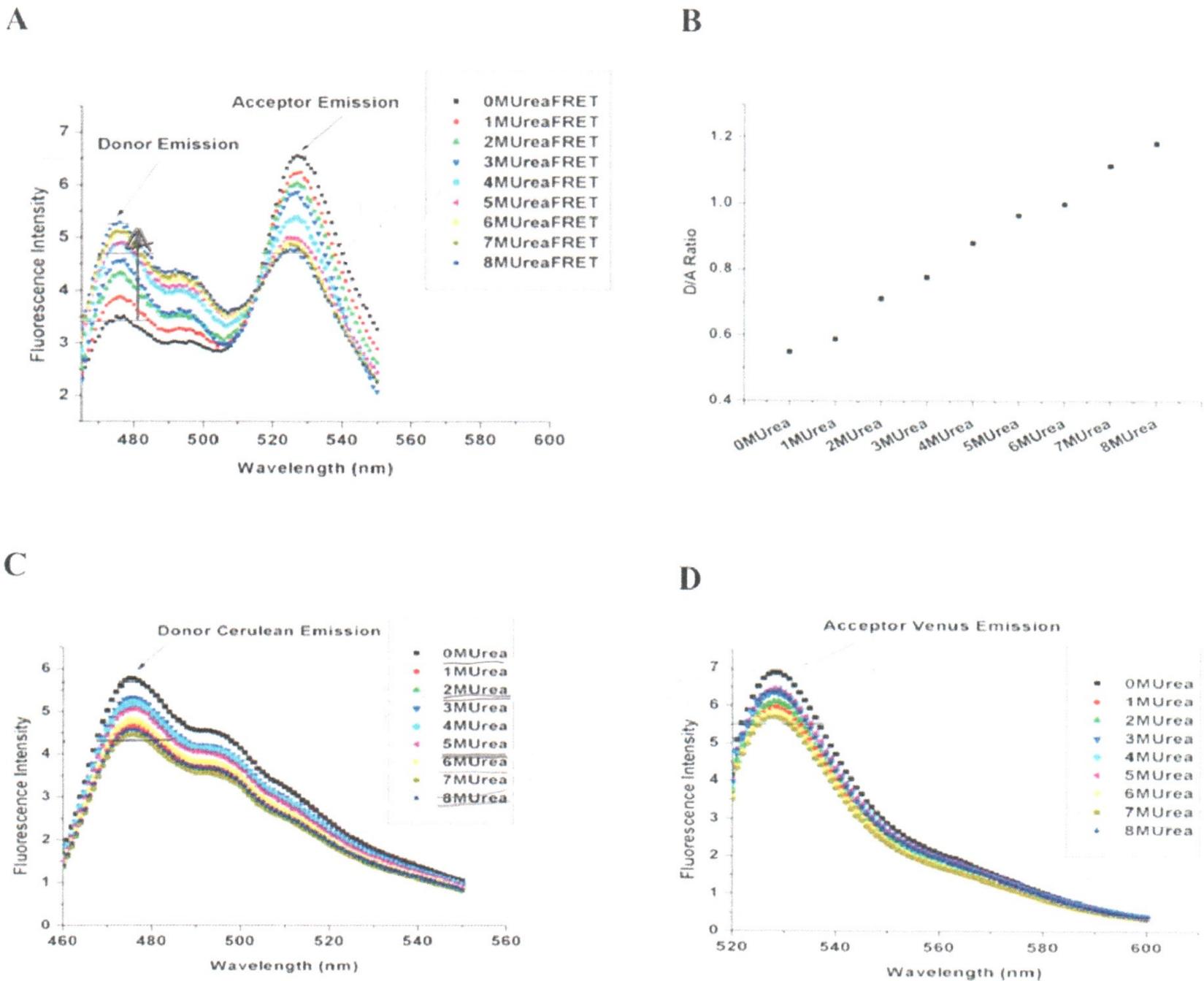


Figure 3

En fonction de ce que vous connaissez des paramètres qui influent sur l'efficacité de transfert, interpréter ces résultats.

c) La figure 4 représente les résultats de fluorescence obtenus à des concentrations croissantes d'urée. Interpréter ces résultats et justifier la réalisation des expériences rapportées sur les figures 4C et 4D.



d) La construction FRET a été ensuite insérée dans l'actinine de cellules de fibroblastes par transfection. Des images des fibroblastes en migration ont été prises au microscope confocal 48h après la transfection.

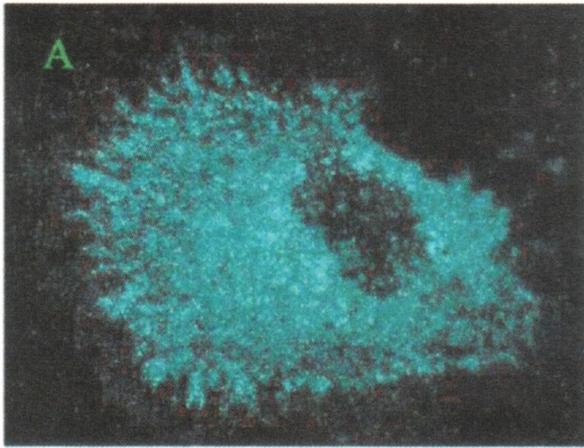


Image sur le canal CFP

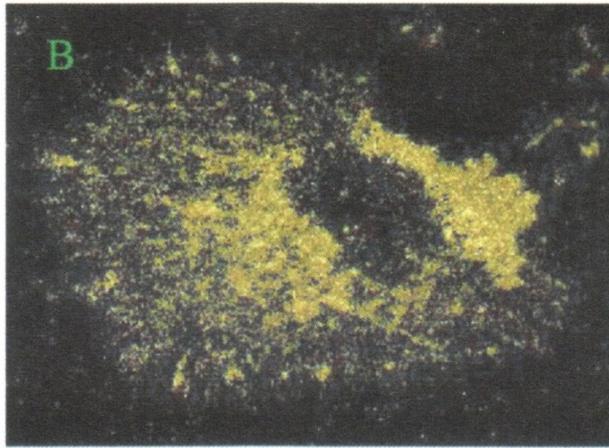


Image sur le canal FRET

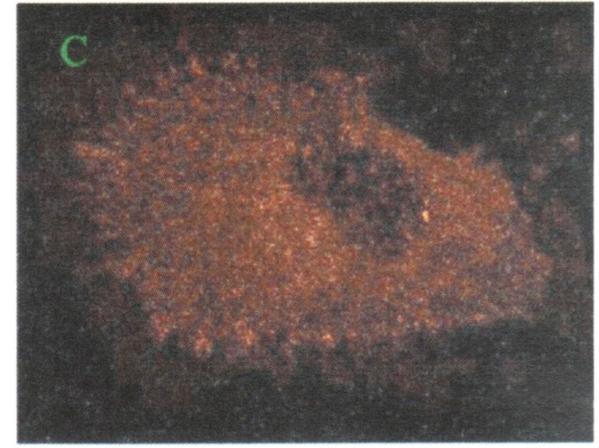


Image sur le canal YFP

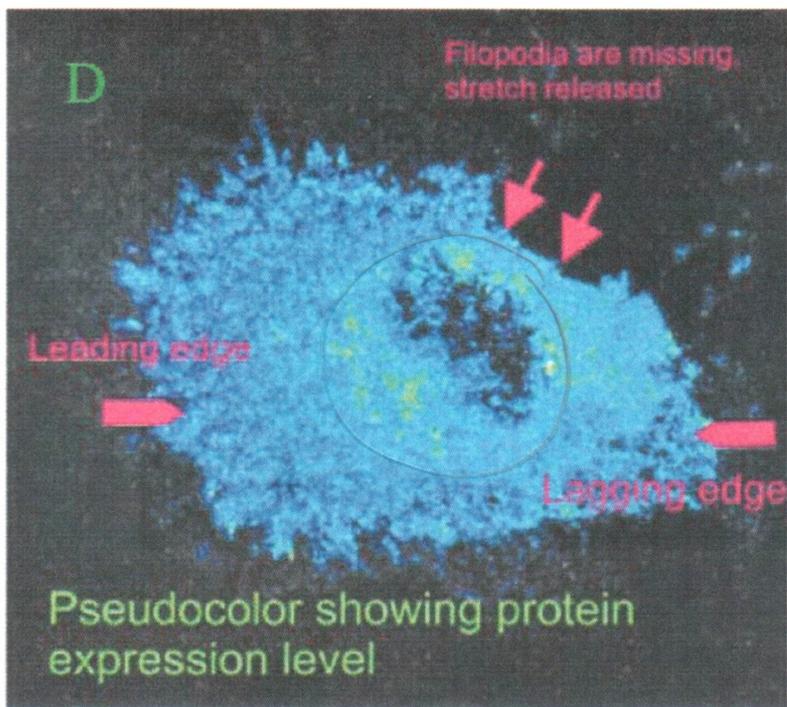
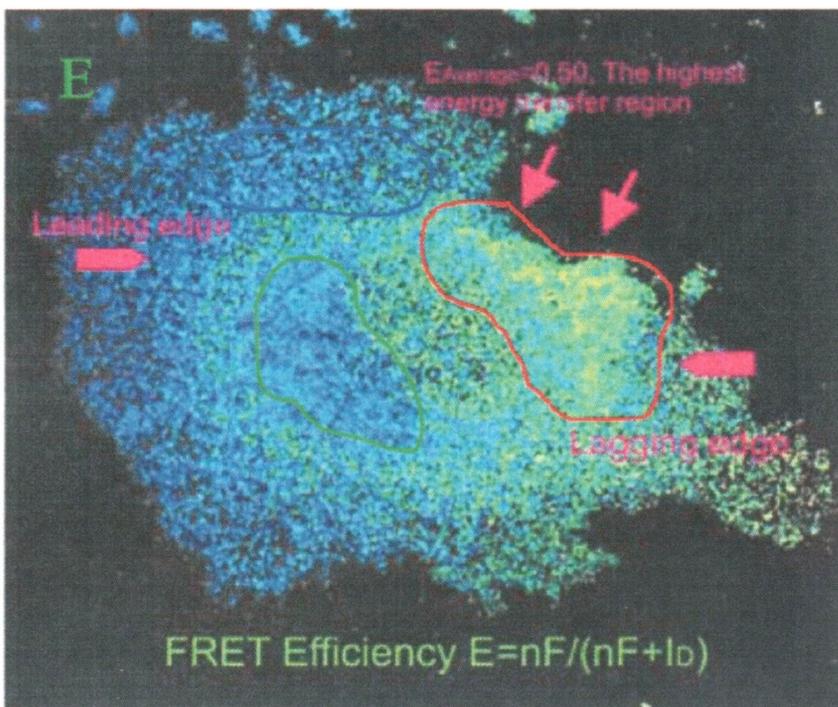


Image reconstruite à partir de l'image du canal YFP indiquant la répartition de l'expression de la protéine actinine ayant inséré la construction FRET.



(D).Image de l'efficacité FRET $E = nF / (nF + I_D)$ où nF est l'intensité FRET obtenue à partir du canal FRET et I_D l'intensité du canal donneur

Interpréter ces images.