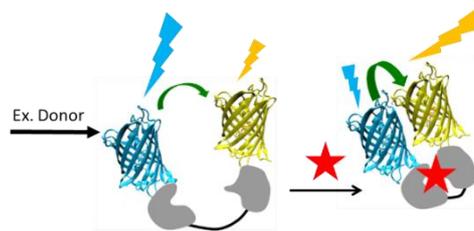


# Etude d'un modèle de FRET par spectro-microscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps.

## Introduction

Le phénomène photophysique de FRET est utilisé pour construire un grand nombre de biosenseurs codés génétiquement qui permettent de suivre en temps réel le fonctionnement cellulaire. Leurs applications sont maintenant très nombreuses depuis la recherche fondamentale jusqu'aux premières applications en thérapies pour proposer aux patients des traitements individualisés.



**Schéma du principe de fonctionnement d'un biosenseur.** Le donneur et l'accepteur sont ici des protéines fluorescentes de la famille de la GFP. Elles prennent en sandwich le module senseur. Quand le module senseur réagit avec un paramètre chimique ou biochimique de son environnement, il change de structure. Cela module le FRET entre le donneur et l'accepteur.

L'objectif du TP est d'étudier un système modèle de FRET constitué d'un donneur et d'un accepteur liés entre eux. Le donneur et l'accepteur sont des protéines fluorescentes ; elles sont liées par un peptide de 27 acides aminés.

Le FRET peut être observé de 3 façons différentes sous microscope et en cellules vivantes:

- FRET spectral : on réalise le spectre des cellules après excitation du donneur
- FRET ratiométrique : on mesure les intensités de fluorescence du donneur (ex. du donneur) et de l'accepteur excité via le FRET (ex. du donneur)
- FRET-FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) : on mesure la durée de vie du donneur en présence ou non d'accepteur.

Nous pouvons aussi étudier comment la sensibilité au pH du donneur et de l'accepteur modulent l'observation du FRET.

Ce TP s'inspire du travail réalisé par DB Betolngar pendant sa thèse publiée dans *Betolngar et al Analytical et Bioanalytical Chemistry* **2015**.

## En pratique :

### Préparation des cellules 24h avant le TP.

2 jours avant le TPs, il faut repiquer les cellules. La veille du TP, il faut les transfecter avec l'ADN qui code pour la protéine que l'on veut étudier.

Pour cela on va introduire le plasmide qui code pour la protéine à exprimer dans les cellules en utilisant un agent de transfection (X-tremeGeneHP). La documentation de l'agent de transfection est donnée en annexe.



Schéma du principe de la transfection des cellules eucaryotes.

Les plasmides utilisés codent pour les protéines suivantes :

- Aquamarine (P19)
- tandem Aquamarine-Citrine
- tandem Aquamarine-YFP
- tandem Aquamarine-SuperYFP

Performances des protéines : <https://www.fpbases.org/>

Proteine	Epsilon (M-1cm-1)	QY	Lifetime (ns)	pK1/2
Aquamarine	30 000	0,9	4,12 ns	3,3
YFP	80 000			Voir papier
Citrine = YFP Q69M	80 000			Voir papier
SuperYFP	130 000			< 4

Le pK1/2 est la valeur du pH pour laquelle une protéine fluorescente a perdu la moitié de sa fluorescence.

Vérifier que les tandems sont composés de bons couples de FRET. Quelles sont les longueurs d'onde à utiliser pour observer le FRET ?

## **Partie 1 Observation du FRET avec les 3 techniques sur les cellules « Aqua » et « Aqua-Citrine » à pH 7,4**

### **Plein Champ (position 2 sur le microscope)**

Cubes de fluorescence disponibles pour la détection plein champ:

- CFP : Ex 440±10 nm Em 480±15nm
- YFP : Ex 500±12 nm Em >530 nm
- FRET : Ex 440±10 nm Em >530 nm

Acquisition des données avec Micromanager (ImageJ).

Camera 1 pix = 6,45 µm, objectif x60 immersion à eau NA 1,2

Excitation atténuée avec ND13, 500ms exposition

*Traitement des données avec Image J. Préparer des figures représentatives, avec des couleurs et un contraste adapté. Faire une analyse ratiométriques analogue à celle de la figure 4 de l'article.*

### **Fluorescence Lifetime Imaging (position 5 sur le microscope)**

Pulsed laser diode (un pulse toutes les 50 ns):  $\lambda_{ex}=440\text{nm}$  + dichroïque sous l'objectif + sélection émission 480±15nm

Lancement du scanner avec EZC1 (field of view µm à définir, 256 pixel, pixel dwell 61,44µs) et acquisition des données avec Symphotime.

*Faire des images de durées de vie du donneur seul et du tandem. Analyse des données dans Symphotime et export des déclin d'émission de fluorescence en ascii pour un traitement ultérieur avec Igor.*

### **Analyse spectrale (position 4 sur le microscope) (si possible)**

Utiliser le laser fibré et le cube FRET SANS filtre à l'émission (regarder la couleur des cellules avec ce filtre)

*Faire des spectres et les exporter dans des fichiers textes pour analyse ultérieure avec xls.*

## **Partie 2 Quantification du FRET en FLIM en fonction du pH**

*Définir un protocole en utilisant l'article joint (il faut vous concentrer sur le paragraphe « pH responses of cytosolic FRET tandems »).*

Les tampons dont vous aurez besoin ont été préparés à l'avance.

Les déclin d'émission de fluorescence seront réalisés comme dans la partie 1 à 2 ou 3 pHs en fonction du temps et exportés pour un traitement ultérieur dans Igor.

Les durées de vie en fonction du pH seront compilées dans xls et comparées aux données de l'article.