

Recherche d'interaction entre une protéine soluble et un ligand par mesure de polarisation de fluorescence

Introduction

La polarisation de fluorescence est une technique largement utilisée pour l'étude *in vitro* d'interactions moléculaires (ex: protéine-protéine ou protéine-ligand). C'est une technique robuste, très sensible, facilement miniaturisable et facile d'utilisation puisqu'elle ne nécessite qu'une simple lecture de fluorescence. C'est la raison pour laquelle la polarisation de fluorescence est utilisée pour la recherche de nouveaux ligands..

Principe

Le principe de la polarisation de fluorescence repose sur : 1- la capacité d'un fluorophore à être excité par une lumière polarisée 2- la capacité de rotation d'une petite molécule liée à ce fluorophore durant son état « excité ».

Le degré de polarisation de fluorescence, défini par le taux de polarisation (p) ou par l'anisotropie (r), permet de mesurer les changements d'orientation de l'émission de fluorescence après excitation du fluorophore par une lumière polarisée (fig.1).

Ainsi, si une petite molécule fluorescente est « libre », sa capacité de rotation dans le milieu sera grande, ce qui induira une dépolarisation de l'émission de fluorescence (= Taux de polarisation faible). En revanche, si elle est liée à une molécule de taille plus importante comme une protéine, sa capacité de rotation sera fortement réduite, et par conséquent ne modifiera pas la direction d'émission de fluorescence (= Taux de polarisation élevé).

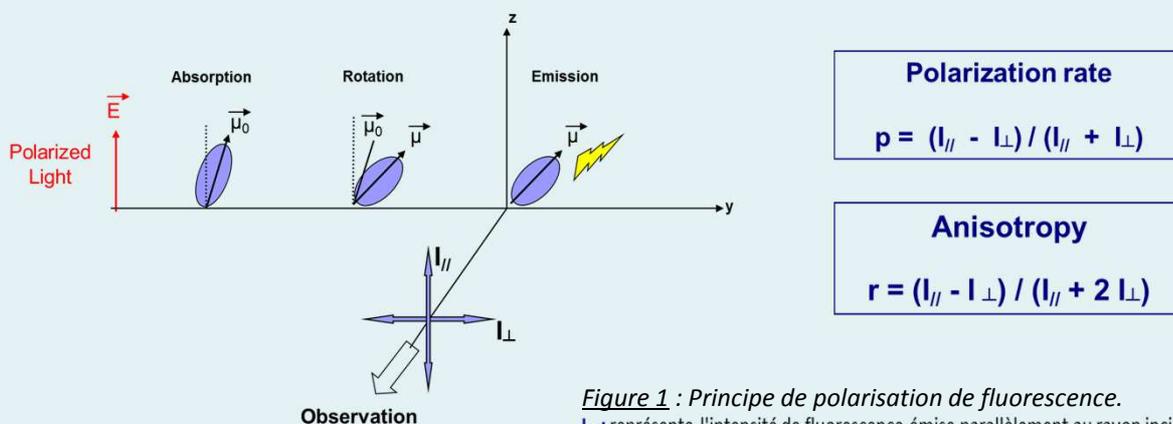


Figure 1 : Principe de polarisation de fluorescence.

$I_{//}$: représente l'intensité de fluorescence émise parallèlement au rayon incident

I_{\perp} : représente l'intensité de fluorescence émise perpendiculairement au rayon incident

Développement d'un essai de liaison

Deux approches sont possibles :

- si il existe un ligand connu de la protéine, il est possible de le coupler à un fluorophore.
- si aucun ligand n'est connu : PCBIS a accès à des collections de molécules fluorescentes qui pourront être criblées sur la cible (<http://medchem.unistra.fr/>).

La molécule fluorescente capable de se fixer sur la cible (fig.2) peut alors être utilisée comme sonde pour détecter la liaison de molécules non marquées sur la cible (fig. 3).

Format : 96 ou 384 puits

Figure 2 : Liaison d'une molécule fluorescente sur la Calmoduline (Dagher et al., 2006)

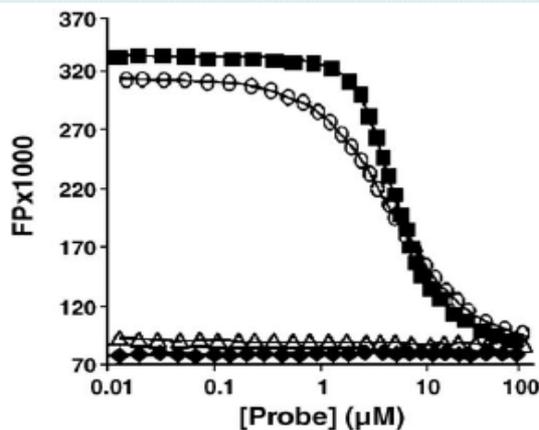


Figure 3 : Compétition pour la liaison à la Calmoduline (Dagher et al., 2006)

