

Contexte

La **protéine RNF167** est essentielle dans divers processus cellulaires et joue un rôle déterminant dans le maintien de la **santé humaine**. Comprendre son routage intracellulaire est indispensable pour élucider ses **fonctions** et son implication dans certaines **pathologies**. Il est donc primordial de développer des outils innovants pour étudier cette protéine encore **peu caractérisée**.

En exploitant la puissance du plus petit fragment d'anticorps fonctionnel connu, le **nanocorps (VHH)**, il serait possible de cibler avec une précision inégalée la protéine RNF167 [2, 4]. De même, grâce à leur petite taille et leur haute spécificité, les VHHs se présentent comme des **outils prometteurs pour l'étude en microscopie** [1].

Hypothèse

Le **nanocorps RNF167-A5** peut être utilisé comme nouvel outils innovant pour étudier le trafic intracellulaire de la protéine RNF167 en microscopie.

Objectif

Développer l'utilisation d'un nanocorps (VHH) :

- Produire le nanocorps RNF167-A5
- Effectuer des essais de liaison in vitro
- Concevoir des variantes fluorescentes de VHH
- Développer l'utilisation du VHH-RNF167-A5 pour des essais en microscopie

Perspective

À court terme : Ce projet permettra de développer un outil spécifique pour l'étude de RNF167 en optimisant la production et la caractérisation du nanocorps RNF167-A5. En plus d'évaluer son potentiel pour la détection et la localisation de RNF167 en microscopie.

À long terme : Ce projet pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de RNF167 dans la dégradation des protéines, ainsi que ses interactions et ses mécanismes.

Méthode / Résultats

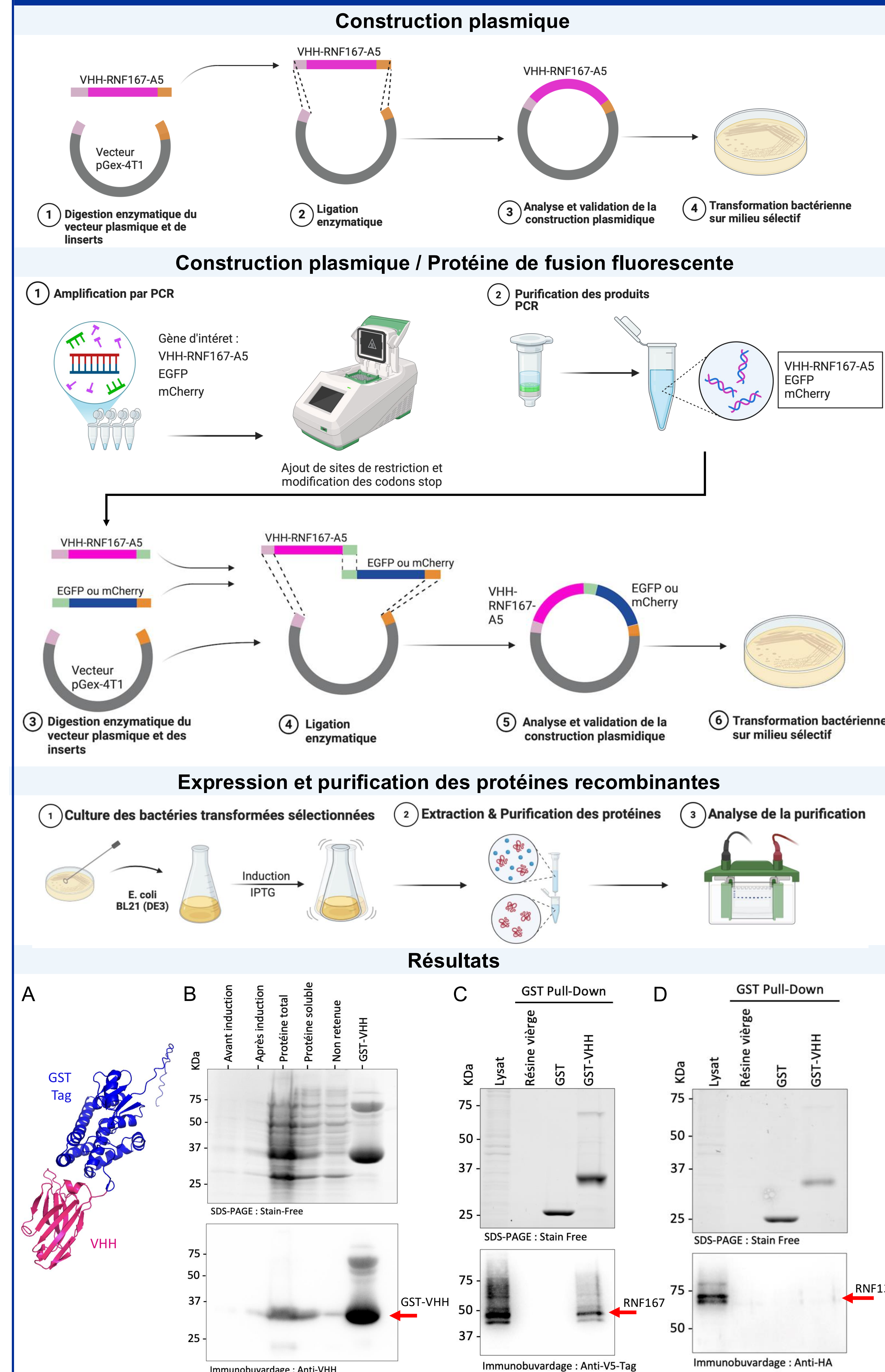


Figure 1. Modélisation structurale de la protéine recombinante GST-VHH-RNF167-A5 [3,5] (A) Évaluation de l'expression et de la purification du VHH-RNF167-A5 (B). Essais de liaison in vitro : test d'affinité du VHH-RNF167-A5 pour la protéine RNF167 (C) et test de spécificité envers une autre E3 ligase à domaine RING, la RNF13 (D).

Méthode / Résultats

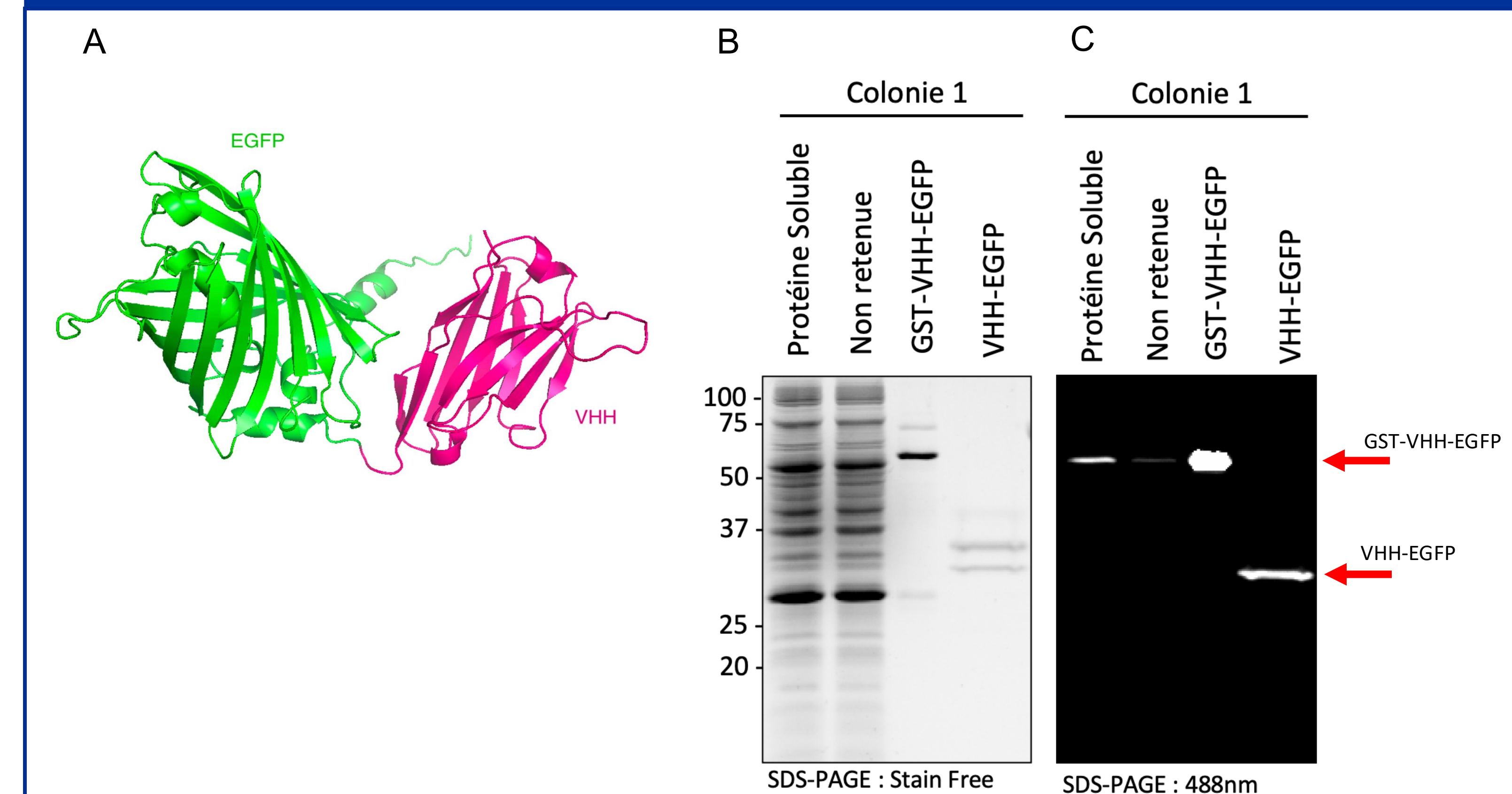


Figure 2. Modélisation structurale de la protéine recombinante VHH-RNF167-A5-EGFP [3,5] (A) Démonstration de la production du VHH-RNF167-A5-EGFP après sélection bactérienne. Démonstration de l'expression, de la purification et du retrait de l'étiquette d'affinité, la GST, par clivage enzymatique par thrombine, visualisée en Stain-Free (B) et par fluorescence à 488 nm (C).

Résultats / Microscopie

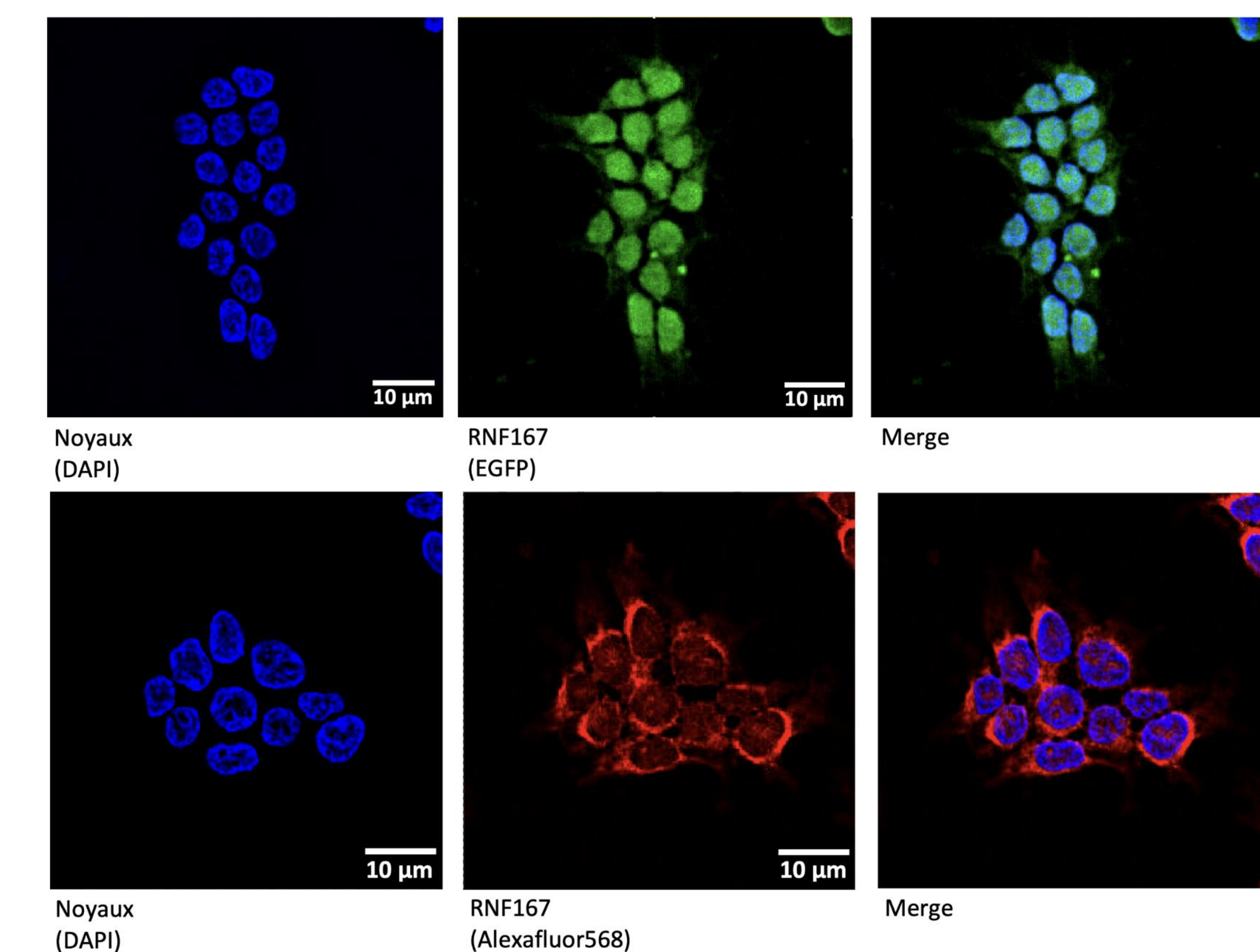


Figure 3. Immunofluorescence de la détection de RNF167 dans des cellules HEK293T/17. Le noyau est marqué au DAPI (bleu). RNF167 est détectée soit par un VHH fusionné à EGFP, visualisé en vert, soit par un VHH non marqué détecté à l'aide d'un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 568 (rouge). Barre d'échelle = 10 μm (identique pour toutes les images).

Référence

- [1] Maria E. I. et al., 2018, (*Front. Immunol.*, 9: 273). [2] Mitchell LS, and al., 2018 (*Proteins*, 86: 697–706). [3] Modélisation structurale avec AlphaFold, Jumper et al., 2021, (*Nature*, 596: 583–589). [4] Siepe D. H. et al., 2023. (*ACS Synth. Biol.*, 12(4) :1081–1093). [5] Visualisation des structure 3D avec PYMOL (Schrodinger, L., & DeLano, W., 2020).