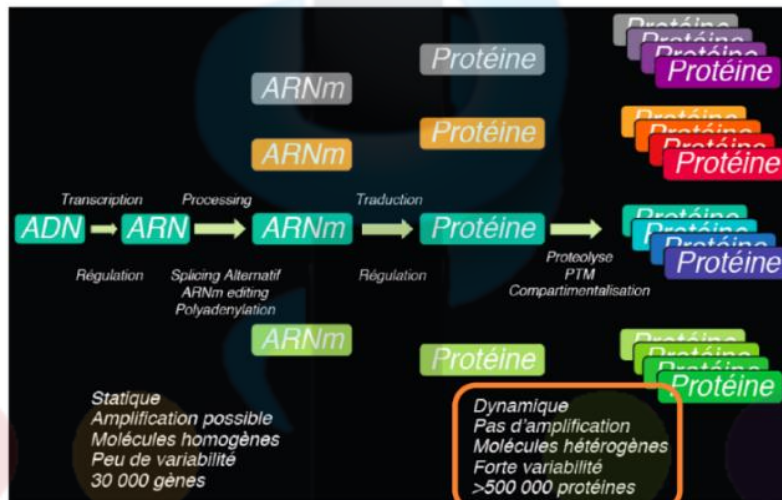


Résumé – Méthodes d'exploration des protéines

I. Protéome

A. Rappel

- **Génome** : ensemble de l'ADN nucléaire → 20k-30k gènes :
 - toutes les cellules de l'organisme ont le même génome mais tous les gènes ne sont pas exprimés de la même manière dans tous les tissus de l'organisme ;
- **Transcriptome** : ensemble des ARN messagers ;
- **Protéome** : les protéines = les **éléments fonctionnels** → 500k protéines différentes :
 - les protéines ne sont pas amplifiables.



Formation des protéines.

On ne peut pas étudier directement une protéine car on ne peut pas les amplifier, de plus ce sont des molécules très hétérogènes et enfin il faut prendre en compte leur dynamique. Il existe une forte variabilité d'expression d'un individu à l'autre et beaucoup de protéines différentes (environ 500 000).

B. Les milieux biologiques analysés

On peut étudier les protéines dans tout type de milieux biologiques comme :

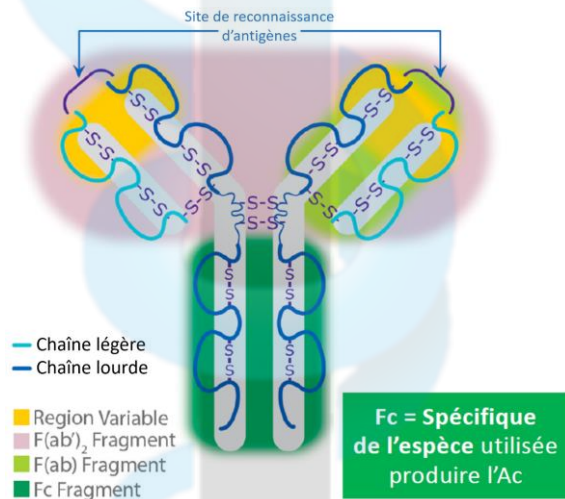
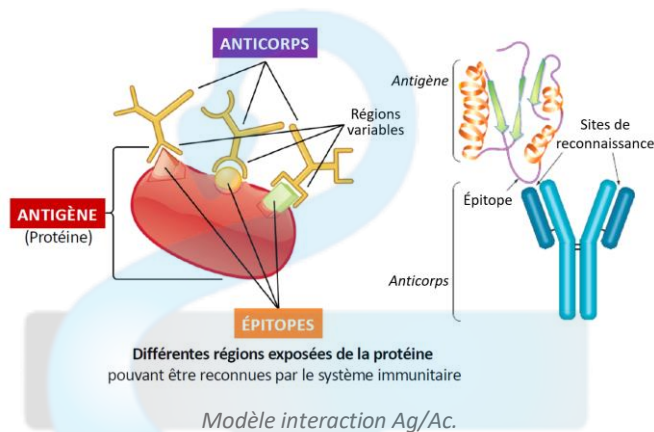
- Plasma / sérum ;
- Urines ;
- LCR ;
- Liquide d'épanchement ;
- Tissus, biopsies ;
- Cellules en culture ;
- Extraits bactériens ;
- Surnageants de culture cellulaire.

II. Analyses ciblées : qualitatives

A. Western Blot

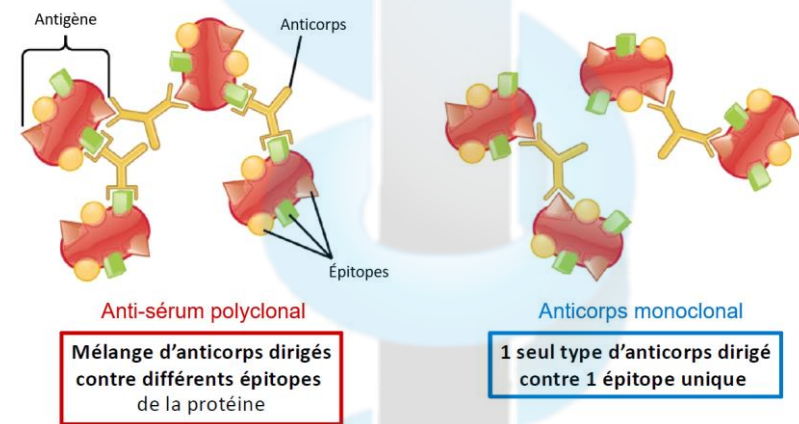
1. Anticorps, antigènes, épitopes

- Pour étudier les protéines :
 - utilisation des **anticorps** ;
- Protéines = **antigènes**, qui exposent des **épitopes** = régions immunogéniques :
 - capable d'être reconnu par SI.



- Extrémités de l'anticorps = régions **hypervariables** ;
- Région hypervariable de la chaîne lourde et de la chaîne légère = **spécificité** ;
- Région de reconnaissance très spécifique de la protéine : Deux sites de reconnaissance d'un antigène ;

- Fonction fragment Fc = fragment constant : transduire un signal :
 - a une **séquence dépendante de l'espèce**.
- 2. Anticorps polyclonaux vs monoclonaux
- **Anticorps primaire** : se fixe sur l'antigène, sur l'épitope de la protéine ;
- **Anticorps secondaire** :
 - pour détecter la fixation de l'anticorps primaire ;
 - reconnaît le fragment Fc de l'anticorps primaire : **spécifique de l'espèce** ;
 - couplé à un **marqueur de détection** = enzyme **peroxydase** ;
- La lumière va nous permettre de détecter le complexe antigène / anticorps.

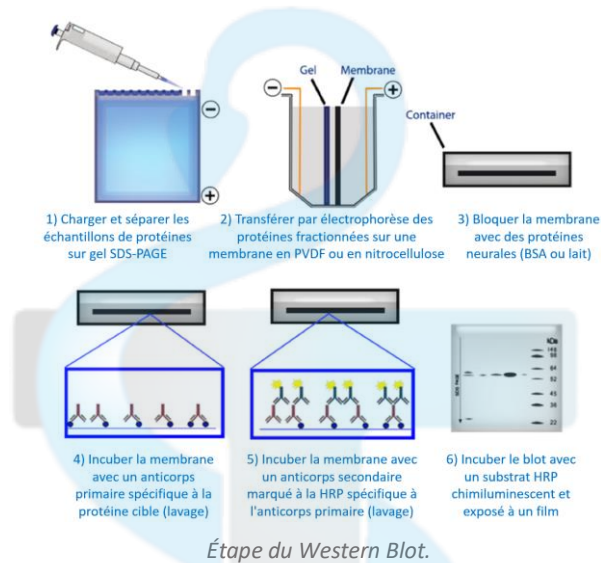


Différence entre les anticorps polyclonaux et monoclonaux.

3. Technique du Western Blot

Principe WB :

- Détecter par un anticorps, une protéine immobilisée sur une membrane ;
- Trois étapes : **SDS-PAGE, transfert sur une membrane, révélation**.



Électrophorèse dénaturante (SDS PAGE) :

- **SDS** :
 - charge négativement les protéines ;
 - casse les liaisons intra protéiques ;
 - protéines dépliées et séparées uniquement en fonction de leur taille ;
- **DTT** : agent réducteur qui va casser les ponts disulfures ;
- Chauffer pour finir de dénaturer la protéine ;
- **PAGE** : électrophorèse sur gel de poly-acrylamide :
 - filet plus ou moins serré qui permet de séparer les protéines selon leur taille ;
 - les plus petites migreront et passeront plus facilement : en bas du gel ;
 - les plus grosses en haut ;
- Séparation se fait en fonction de :
 - la taille ;

- le pourcentage de polyacrylamide ;
- le tampon ;
- **Marqueur de poids moléculaire.**

Électrophorèse non dénaturante = native :

- Structures tertiaires et quaternaires préservées.
- réalise ensuite des WB de chaque unité.
- Séparation selon :
 - la charge ;
 - la forme ;
 - la taille ;
- On souhaite identifier les complexes protéiques, le nombre de monomères associés ou le nombre de chaînes polypeptidiques.

Gel utilisé pour l'électrophorèse très fragile, on réalise un transfert sur une **membrane de nitrocellulose ou PVDF** :

- Les protéines étant chargées négativement vont migrer du moins vers le plus sous l'effet d'un courant électrique ;
- Plusieurs étapes :
 - 1^{ère} étape : **saturation** avec de l'albumine ou avec du lait ;
 - incubation avec notre **anticorps primaire** : reconnaît la protéine d'intérêt, l'épitope protéique ;
 - **lavages** pour éliminer les Ac ne s'étant pas fixés ;
 - incubation avec l'**anticorps secondaire** conjugué à un marqueur permettant sa détection : reconnaît le Fc de l'AC primaire ;
 - **lavages** ;
 - **révélation** grâce à :
 - la **peroxydase HRP** : capacité de transformer un substrat (le **luminol**) en présence d'**eau oxygénée** en lumière ;

→ aux fluorochromes (= molécule qu'on va exciter à une longueur d'onde et qui va réémettre de la lumière à une longueur d'onde supérieur) pour observer plusieurs protéines en même temps avec des anticorps primaires différents ;

WB est extrêmement utilisé en recherche mais peu utilisé en routine à l'hôpital car assez fastidieux :

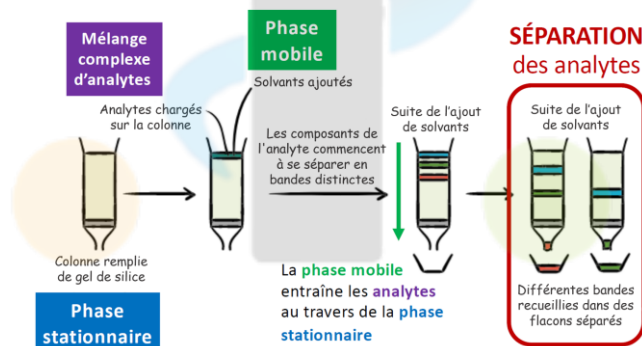
- pour les tests de **confirmation de séroconversion au HIV**.

4. L'électrophorèse bidimensionnelle

- **Techniques séparatives ;**
- Pour la séparation de deux protéines de même masse ;
- Séparation dans deux dimensions différentes :
 - l'**électrofocalisation** réalisée avec un gel de polyacrylamide. Les protéines soumises au champ électrique migrent et **s'arrêtent à leur pHi ;**
 - l'**électrophorèse SDS-PAGE ;**
- Augmentation de la **résolution ;**
- **Chaque spot correspond à une protéine ou à un monomère.**

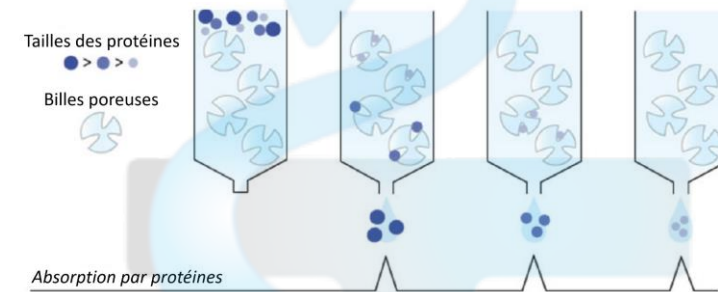
B. Chromatographie

- Méthode **séparative.**



1. Gel filtration

- Séparation **en fonction de leur taille ;**
- Phase stationnaire est composée de **billes poreuses**.



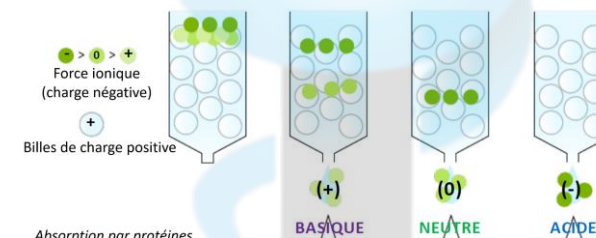
Les protéines les + grosses ne sont pas retenues ⇒ éluées en 1er

Ordre d'éluion : MW les + élevés vers MW les + faibles

Déroulé d'une chromatographie gel filtration.

2. Échangeur d'anions

- Séparation en fonction de la **charge.**
- Phase stationnaire : chargée **positivement.**



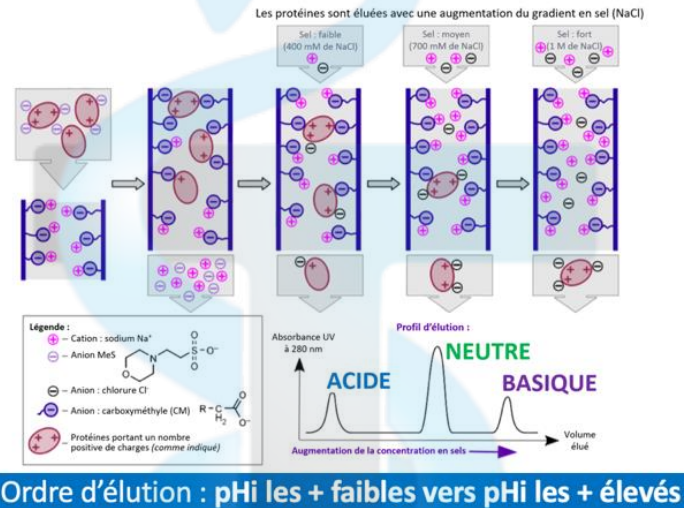
Les protéines chargées positivement (=basiques) ne sont pas retenues ⇒ éluées en 1er

Ordre d'éluion : pHi les + élevés vers pHi les + faibles

Chromatographie échangeuse d'anions.

3. Échangeur de cations

- Séparation en fonction de la **charge** ;
- Phase stationnaire : chargée **négativement**.



Chromatographie échangeuse de cations.

C. Détection *in situ*

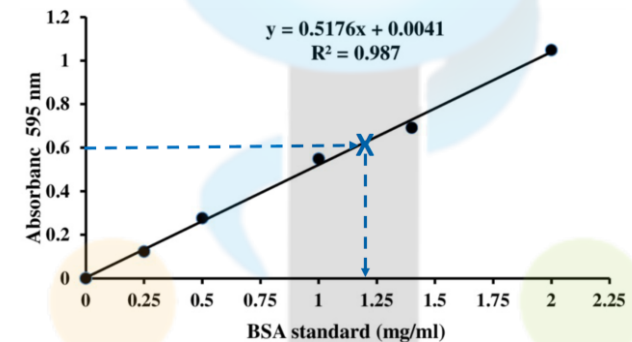
- Détection des protéines **directement sur les tissus** ;
- **Localisation exacte de la protéine** ;
- Technique utilisée : l'**immunohistochimie** :
 - biopsie ;
 - lame très fine à partir de la biopsie ;
 - **perméabilisation** ;
 - **démasquage antigénique** ;
- **Immunofluorescence** : des **anticorps couplés à des fluorochromes** excités à différentes longueurs d'ondes :
 - immunofluorescence multiplex.

III. Analyses ciblées : quantitatives

A. Dosage des protéines totales

1. Réaction de Bradford

- Méthode basée sur la formation d'un complexe protéique coloré en présence de la liaison peptidique ;
- Colorant ou **chromogène** utilisé : **bleu de Coomassie** ;
- Mesurer à **595 nm** l'absorbance maximale des protéines ;
- **Coloration directement corrélée à la concentration de protéines dans la solution** ;
- **Réaction très sensible** ;
- Réalisation d'une **courbe d'étalonnage** :
 - nous allons pour cela prendre un **étalon** : l'albumine dont on **connait la concentration**.
 - réalisation plusieurs dilutions et à chaque concentration, on va avoir une absorbance donnée.
 - tracer une **droite de calibration** qui est **l'absorbance en fonction de la concentration**.



Courbe d'étalonnage.

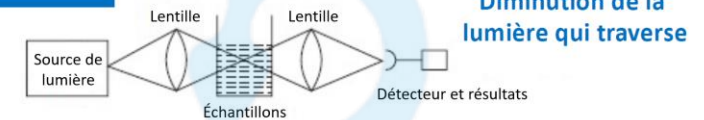
2. Réaction de Biuret

- Utilisée pour doser les protéines qui circulent dans le sang ;
- Formation d'un complexe coloré entre les liaisons peptidiques et le **cuivre en milieu alcalin** ;
- Mesurer à **540 nm** ;
- coloration violette ;
- Observation d'une **proportionnalité** : plus il y a de protéines, plus l'intensité de la coloration sera importante ;
- Réalisation d'une **courbe d'étalonnage**.

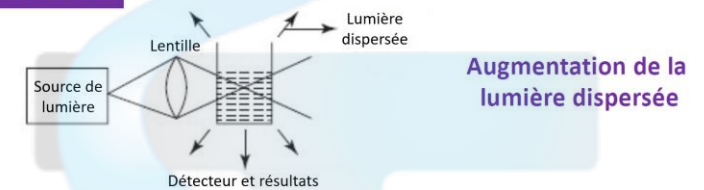
B. Immunodosage

- Pour doser des **protéines spécifiques**.
 1. Immunodosage en phase liquide
 - Epitopes à la surface de la protéine reconnus par des anticorps en solution capables de faire un **pont entre deux protéines** ;
 - Complexes antigènes-anticorps vont créer un **trouble** dans la solution en **fonction de la concentration**. Plus il y a de protéines, plus il y aura ce réseau qui va se créer et plus il y aura un trouble fort qui sera fonction de la concentration ;
 - Deux méthodes différentes pour l'analyse :
 - **turbidimétrie** : Mesure la **lumière qui traverse**. Diminution de la lumière qui traverse, **inversement proportionnel à la concentration en protéine** ;
 - **néphélémétrie** : Méthode **plus sensible**. Mesure la **lumière dispersée**. Plus le trouble est important, plus la lumière dispersée va être importante et donc le **signal obtenu est proportionnel à la concentration de la solution**.

TURBIDIMETRIE



NEPHELEMETRIE



Turbidimétrie & Néphélémétrie.

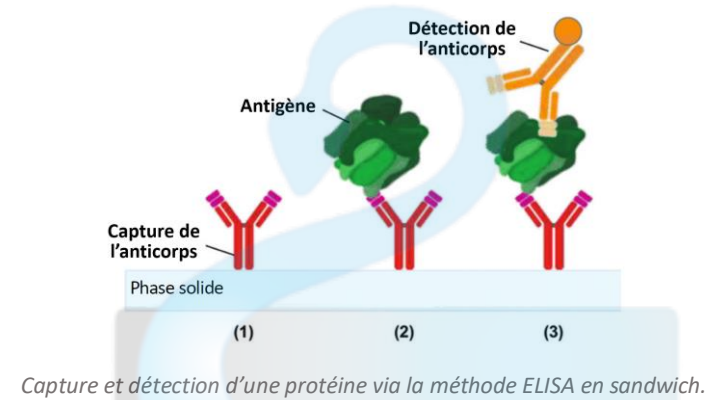
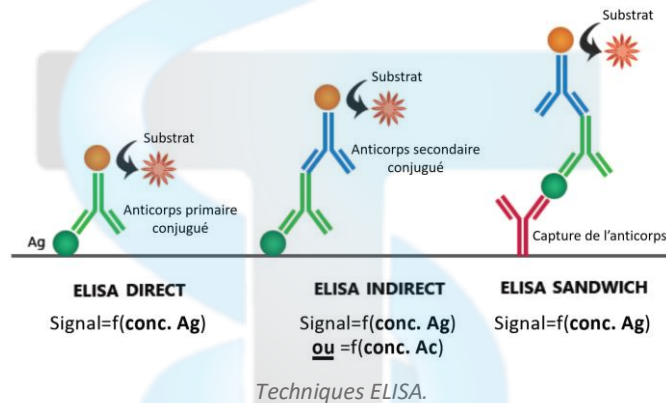
2. Immunodosage en phase solide : techniques ELISA

Immobilisation sur une **phase solide** : plaque ou billes.

Trois types de techniques ELISA :

- **ELISA direct** : **quantifier notre antigène** ;
 - immobilisation de notre Ag au fond du puits ;
 - on apporte un anticorps qui va le reconnaître ;
 - plus il y aura d'antigènes immobilisés, plus il y aura d'anticorps qui vont venir se fixer et donc plus on aura de signal ;
- **ELISA indirect** : même méthode que le ELISA direct mais on va utiliser un **anticorps secondaire** qui reconnaît l'anticorps primaire :
 - soit le signal est également fonction de la concentration en antigène ;
 - soit ce qui nous intéresse est l'**anticorps** qui vient se fixer ;
 - attraper l'anticorps avec un antigène immobilisé et on va venir le quantifier avec un anticorps secondaire ;
- **ELISA sandwich** (la + utilisée) :
 - pour les **grosses protéines** qui ont plusieurs épitopes :

- épitope qui permet la **capture** ;
- épitope qui permet la **révélation** ;
- signal proportionnel à la concentration en antigène ;
- deux anticorps primaires :
 - anticorps de capture ;
 - anticorps de révélation.



3. Immunodosage en phase solide : immunométrie sandwich

- Autre type d'ELISA utilisée pour la détection de protéines ;
- = ELISA sandwich : les protéines révélées par cette méthode sont prises entre deux anticorps avec un rôle différent :
 - anticorps de capture via un épitope de capture ;
 - anticorps de détection ;
- Pour grosses protéines possédant plusieurs épitopes ;
- Méthode utilisée pour doser HCG, LH et FSH ;