



**PROTÉINES :**  
**Méthodes d'exploration**

Pr Jonathan LOPEZ

1

## Posez vos questions pendant le cours



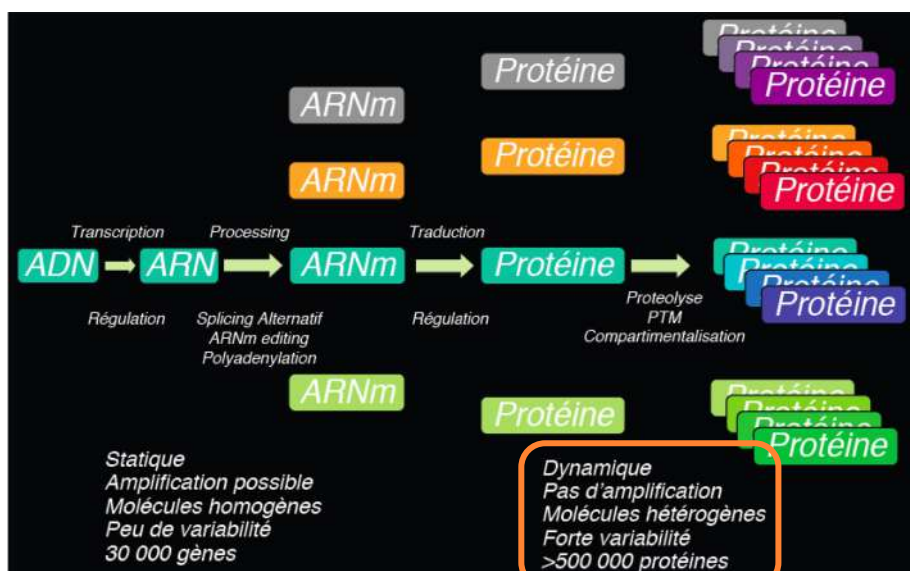
- 1 Allez sur [wooclap.com](https://wooclap.com)
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement  
**GBRATU**



2

## 0 Protéome



3

## 0 Protéome

### ■ Milieux biologiques analysés

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



4

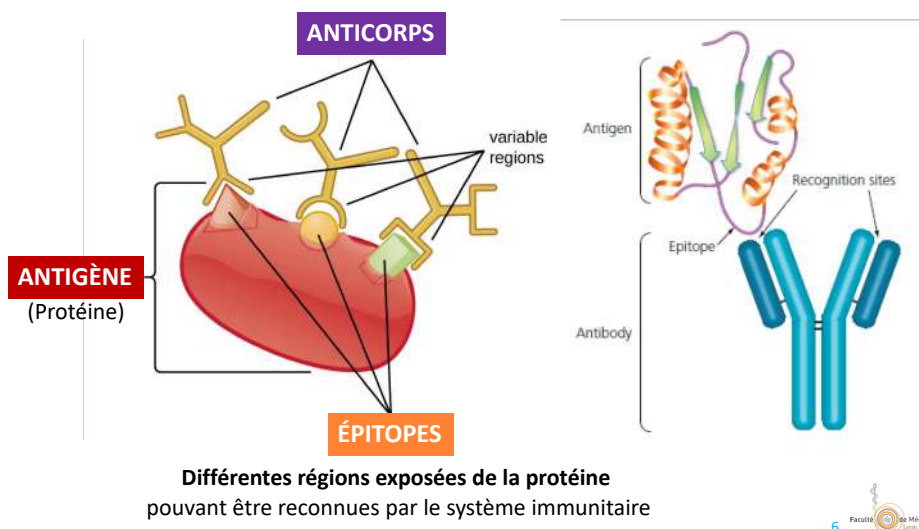
## 0 Plan

- Analyses qualitatives
  - Western blot
  - Chromatographie
  - In situ (IHC, IF)
- Analyses quantitatives

5

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- Antigène, épitopes et anticorps



6

**1 Qualitatives : WESTERN BLOT**

**■ Antigène, épitopes et anticorps**

— Light Chains  
— Heavy Chains

■ Variable Region  
■ F(ab)<sub>2</sub> Fragment  
■ F(ab) Fragment  
■ Fc Fragment

**Fc = Spécifique de l'espèce utilisée produire l'Ac**

7 Faculté de Médecine Tunis

7

**1 Qualitatives : WESTERN BLOT**

**■ Anticorps polyclonaux vs monoclonaux**

antigen antibody epitopes

polyclonal antiserum

monoclonal antibodies

**Mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes de la protéine**

**1 seul type d'anticorps dirigé contre 1 épitope unique**

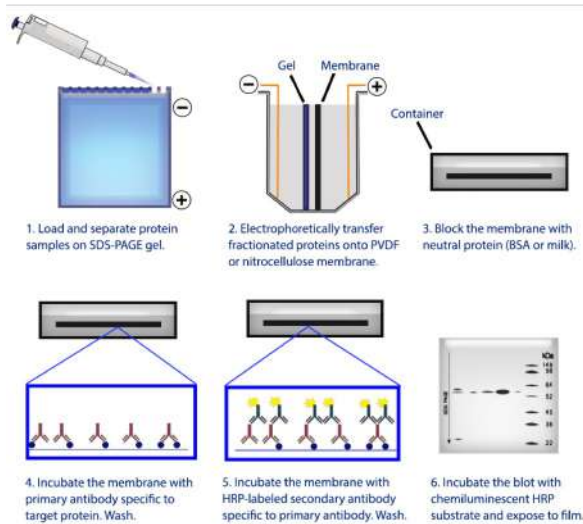
8 Faculté de Médecine Tunis

8

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Détection par un anticorps d'une protéine immobilisée sur une membrane

- SDS-PAGE
- Transfert
- Révélation

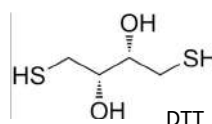
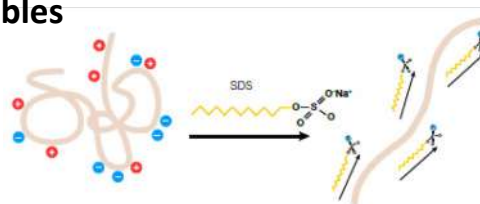


9

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)

- Sodium Dodecyl Sulfate  $\Rightarrow$  saturation en charges (-)  
 $\Rightarrow$  rupture liaisons faibles
- DTT = Dithiothreitol  
 $\Rightarrow$  agent réducteur  
 $\Rightarrow$  rupture des ponts S-S  
 $\Rightarrow$  séparation des monomères / chaînes peptidiques
- Chaleur



$\Rightarrow$  séparation = f(taille)

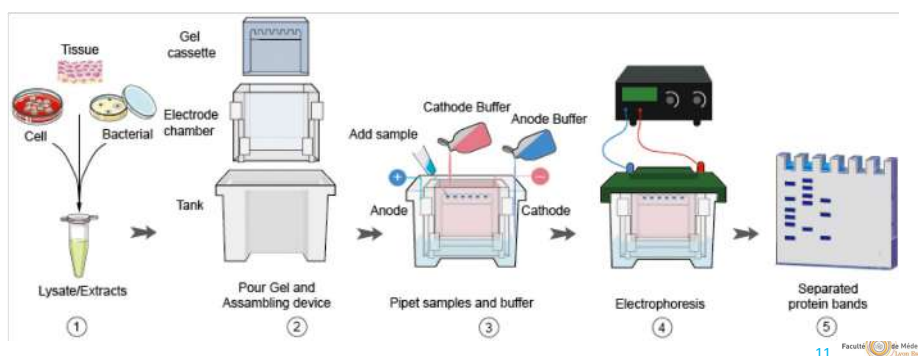
10

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)

#### ■ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

- Migration sous l'effet d'un courant (vers le +)
- « Filet » de polyacrylamide  $\Rightarrow$  les + petits migrent + facilement  $\Rightarrow$  en bas du gel



11

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)

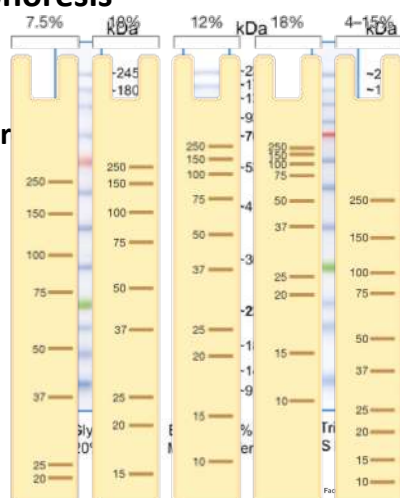
#### ■ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

- Séparation = f(% acrylamide)
- Séparation = f(tampon)
- Marqueur de Poids moléculaire  
unité = kiloDalton (kDa)

$$1 \text{ AA} \approx 110\text{Da} = 0,11\text{kDa}$$

$$\Leftrightarrow 22\text{kDa} \leftrightarrow 200 \text{ AA} (=22/0,11)$$

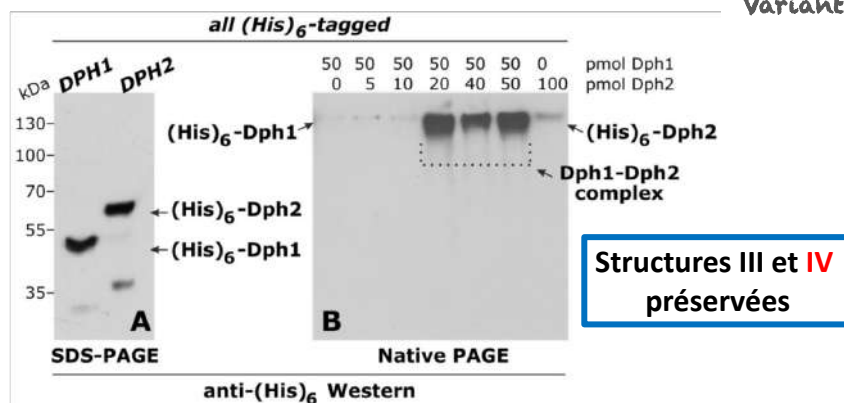
$$\Leftrightarrow 300 \text{ AA} \leftrightarrow 33\text{kDa} (=300*0,11)$$



12

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Electrophorèse non dénaturante = native



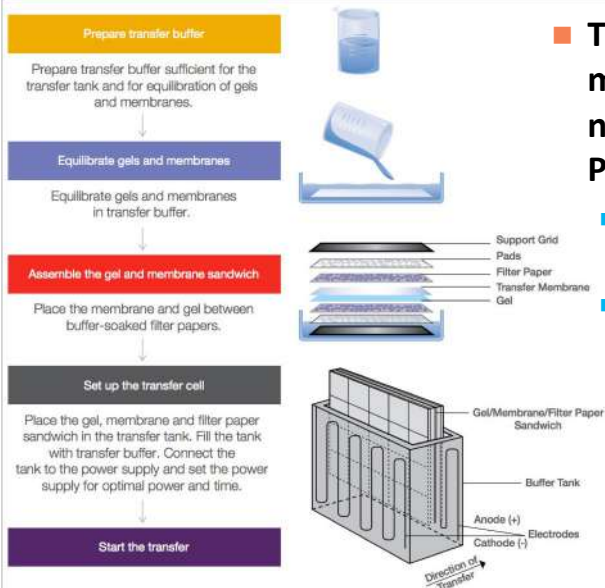
⇒ séparation = f(taille; charge; forme; etc)

13

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Transfert sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF

- Sous l'effet d'un courant
- Du (-) vers le (+)



14

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Détection d'une protéine immobilisée sur une membrane par un anticorps

- Saturation des sites nons spécifiques par de la BSA ou du lait
- Incubation avec l'Ac I
- Lavages
- Incubation avec l'Ac II
- Lavages
- Révélation

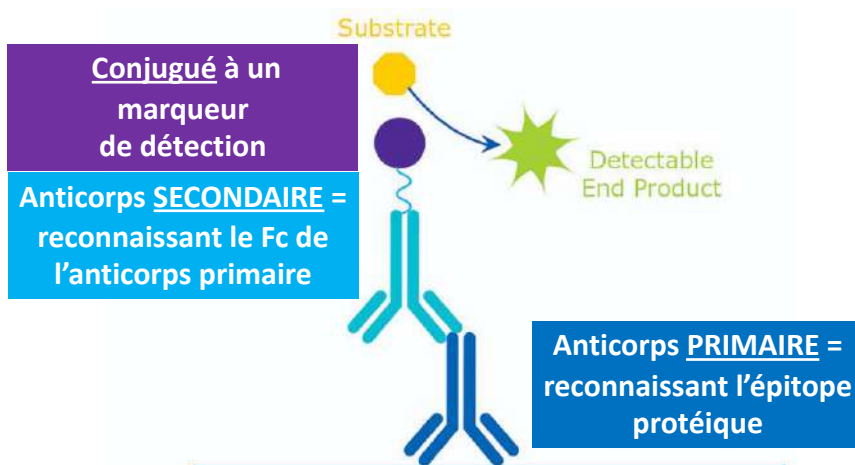


15 Faculté de Médecine  
Tunis

15

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### ■ Détection d'une protéine immobilisée sur une membrane par un anticorps



16 Faculté de Médecine  
Tunis

16



**1 Qualitatives : WESTERN BLOT**

■ **Détection d'une protéine immobilisée sur une membrane par un anticorps**

The diagram shows the chemical reaction where Luminol reacts with Peroxide (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the presence of Horseradish peroxidase (HRP) to form 3-aminophthalate, releasing 2H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>. The reaction is noted as producing + N<sub>2</sub> + light. Below this, a Western blot shows a series of bands of increasing intensity from left to right, corresponding to concentrations of 1 ng and 1000 ng. A color scale at the bottom indicates fluorescence intensity from 1000 ng (red) to 1 ng (green).

**Fluorochromes**

1 ng 1000 ng 1000 ng 1 ng

17

**1 Qualitatives : WESTERN BLOT**

■ **Détection de protéines modifiées**

The Western blot (A) shows p-Akt and total Akt levels across different ROCK-II genotypes (+/+ and +/-) with and without insulin treatment. A blue box highlights the p-Akt bands, labeled 'Anticorps anti-Phospho' with the note '⇒ Activation de la voie de signalisation cellulaire'. A purple box highlights the total Akt bands, labeled 'Anticorps contre la protéine totale pour normalisation'. Below the blot is a bar graph showing Akt phosphorylation levels for ROCK-II +/+, +/-, and -/- genotypes. The levels increase significantly from +/+ to -/-. Statistical significance is indicated by \*\*.

ROCK-II	Insulin	Akt phosphorylation level
+/+	-	~1.0
+/+	+	~2.8
+/-	-	~1.0
+/-	+	~2.8
-/-	-	~1.0
-/-	+	~5.5

**Akt phosphorylation level**

ROCK-II +/+ +/- -/-

Anticorps anti-Phospho  
⇒ Activation de la voie de signalisation cellulaire

Anticorps contre la protéine totale pour normalisation

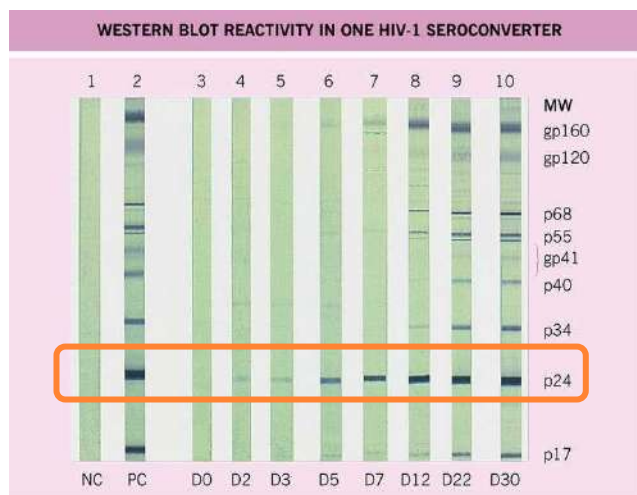
Noquchi et al. JBC. 2007

18 Faculté de Médecine

18

## 1 Qualitatives : WESTERN BLOT

### Application clinique : séroconversion HIV



19

## 2 Qualitatives : Electrophorèse 2D

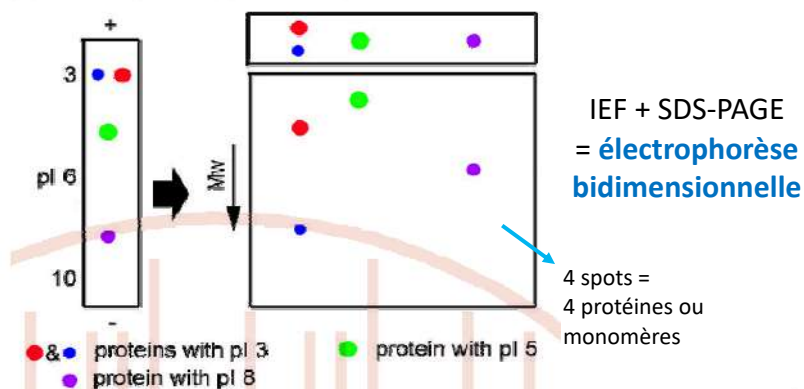


1<sup>ère</sup> dim.  $\Leftrightarrow$  focalisation isoélectrique =  $f(\text{charge})$

2<sup>nd</sup>e dim.  $\Leftrightarrow$  SDS-PAGE =  $f(\text{masse})$

(1) IEF using IPG strip

(2) SDS-PAGE



20

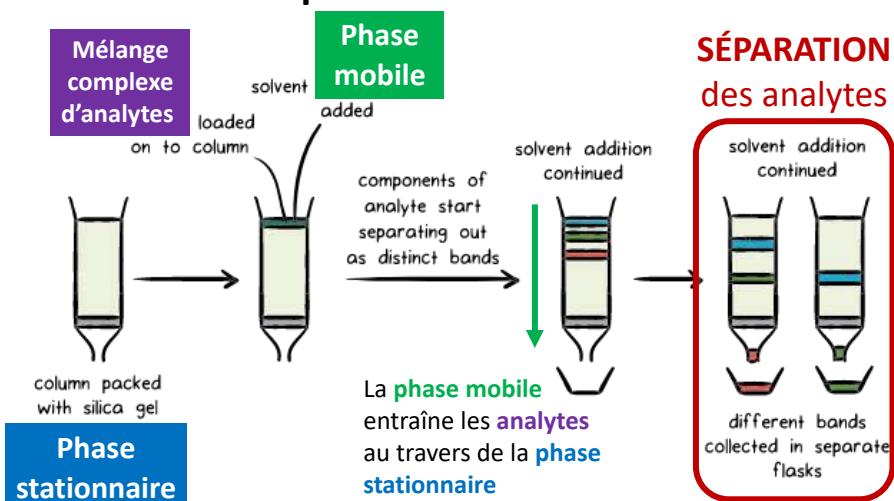
## 0 Plan

- Analyses qualitatives
  - Western blot
  - Chromatographie
  - In situ (IHC, IF)
- Analyses quantitatives

21

## 1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

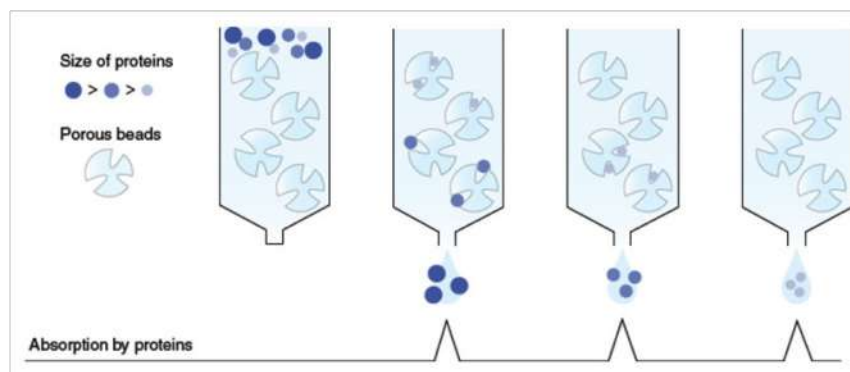
### ■ Méthode séparative



22

## 1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

### ■ Gel filtration $\Leftrightarrow$ f(taille)



Les protéines les + grosses ne sont pas retenues  $\Leftrightarrow$  éluées en 1er

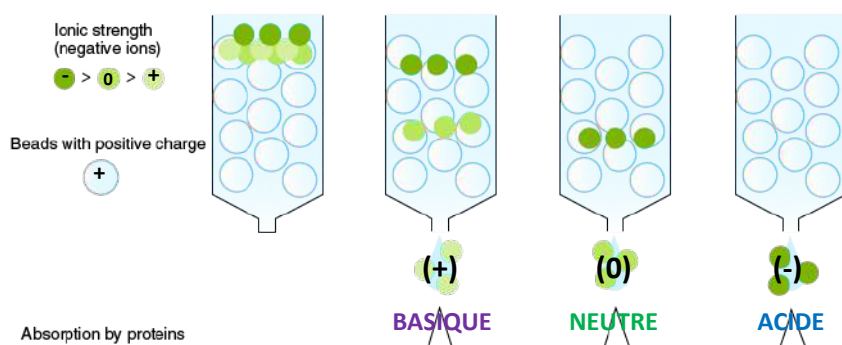
**Ordre d'éluion : MW les + élevés vers MW les + faibles**

23 Faculté de Médecine  
Tunis

23

## 1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

### ■ Echangeur d'anions $\Leftrightarrow$ phase stationnaire (+)



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

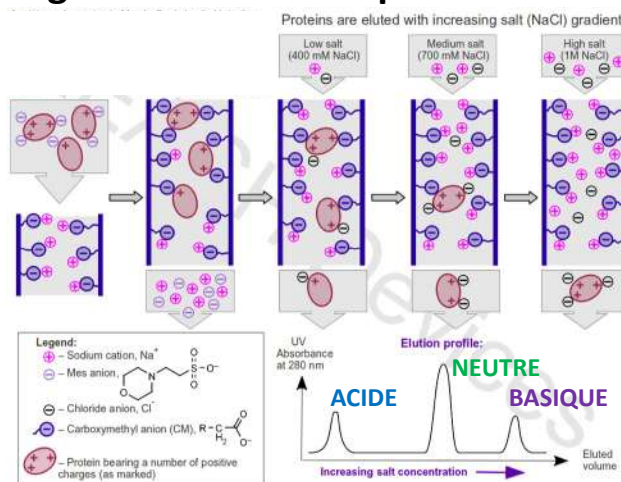
**Ordre d'éluion : pHi les + élevés vers pHi les + faibles**

24 Faculté de Médecine  
Tunis

24

## 1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

### ■ Echangeur de cations ⇔ phase stationnaire (-)



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



25

## 0 Plan

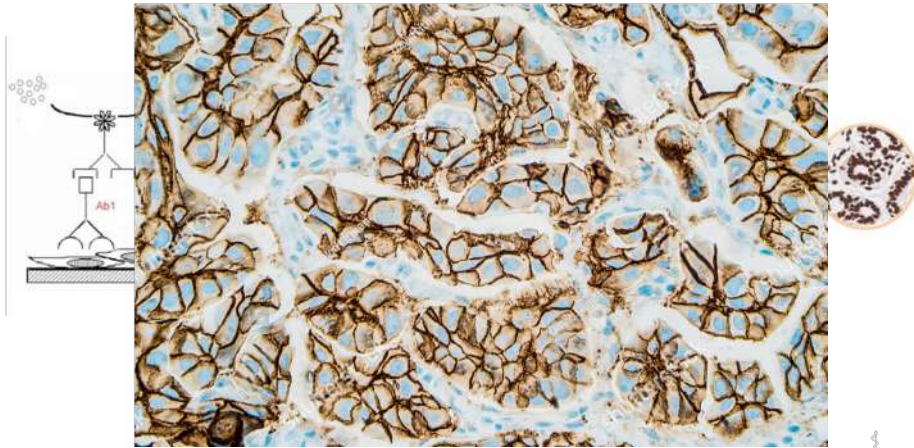
- Analyses qualitatives
  - Western blot
  - Chromatographie
  - In situ (IHC, IF)
- Analyses quantitatives



26

## 1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- Directement sur le tissu après perméabilisation et démasquage antigénique



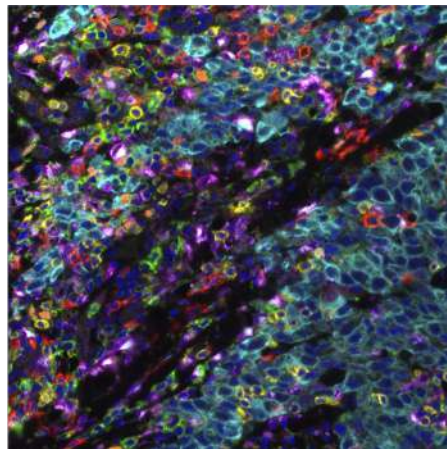
27 Faculté de Médecine  
Université de Moncton

27

## 1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- ImmunoFluorescence (IF) ⇔ plusieurs protéines sur la même lame

PD-L2 (orange), PD-L1 (E1L3N®) (red), CD68 (green), PD-1 (yellow), CD8 $\alpha$  (magenta) and Pan-Keratin (cyan) on FFPE tonsil.



28 Faculté de Médecine  
Université de Moncton

28

## Posez vos questions pendant le cours



- 1 Allez sur [wooclap.com](https://wooclap.com)
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur


Code d'événement  
**GBRATU**

29 

29

## 0 Plan

- Analyses qualitatives
- Analyses quantitatives
  - Dosage des protéines totales
  - Immunodosages

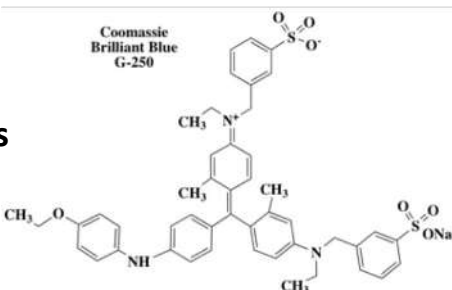
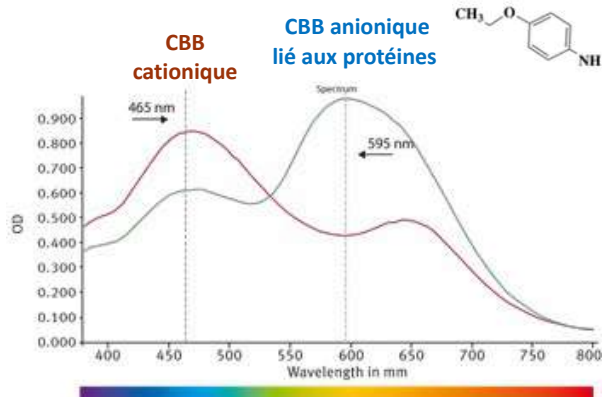
30 

30

## 2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

### ■ Réaction de Bradford

- Complexe coloré en présence de protéines
- ⇒ absorbe à 595nm



E. Jaspard (2012)



31

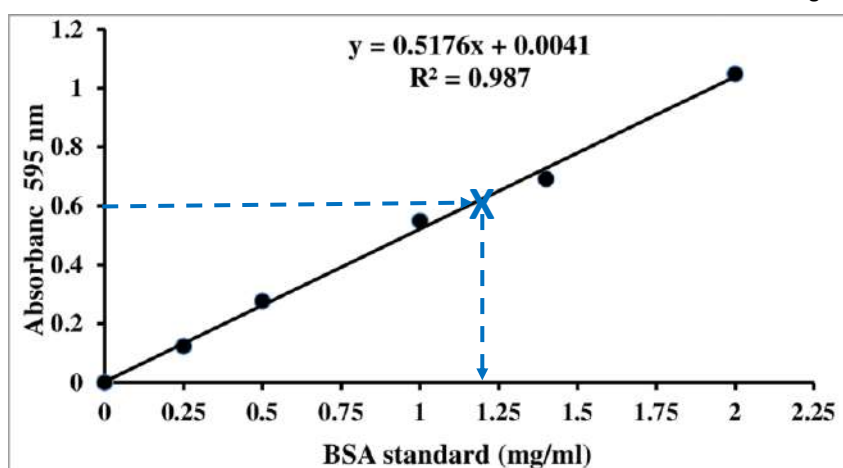


31

## 2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

### ■ Réaction de Bradford

Courbe d'étalonnage



32

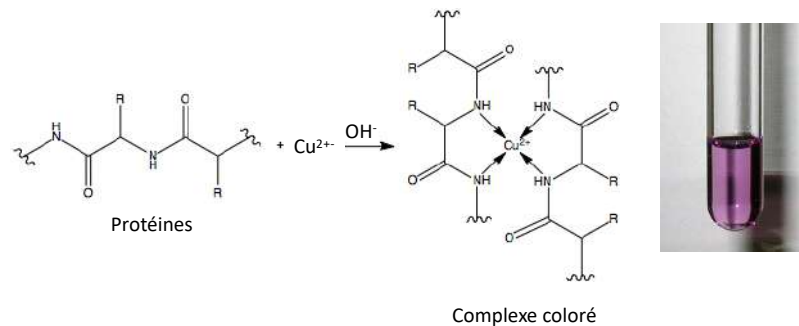


32



## 2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

- Réaction du Biuret  $\Rightarrow$  protéines plasmatiques
  - Complexe entre les liaisons peptidiques et le cuivre en milieu alcalin
  - $\Rightarrow$  coloration violette (540nm)



33

## 0 Plan

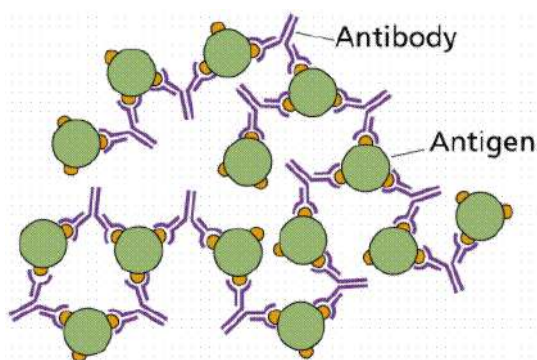
- Analyses qualitatives
- Analyses quantitatives
  - Dosage des protéines totales
  - Immunodosages

34

## 2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

### ■ Dosage de protéines spécifiques en solution

- Formation de **complexes antigène-anticorps**  
 $\Rightarrow$  trouble = f(conc. en Ag)



35 Faculté de Médecine  
Université de Moncton

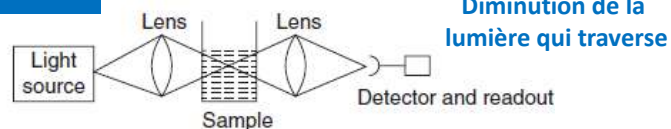
35

## 2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

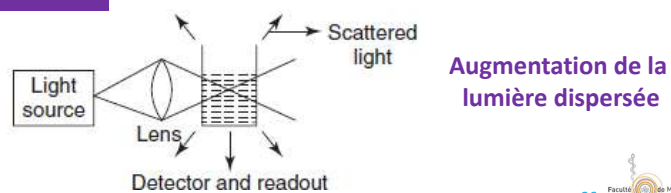
### ■ Dosage de protéines spécifiques en solution

- Formation de **complexes antigène-anticorps**  
 $\Rightarrow$  trouble = f(conc. en Ag) Ex: albumine, T3, CRP, ...

#### TURBIDIMETRIE



#### NEPHELEMETRIE



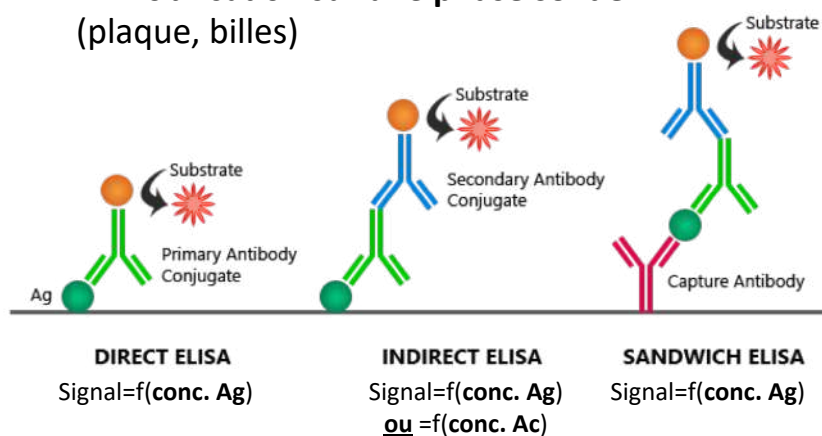
36 Faculté de Médecine  
Université de Moncton

36

## 2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

### ■ ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

- Immobilisation sur une **phase solide** (plaque, billes)

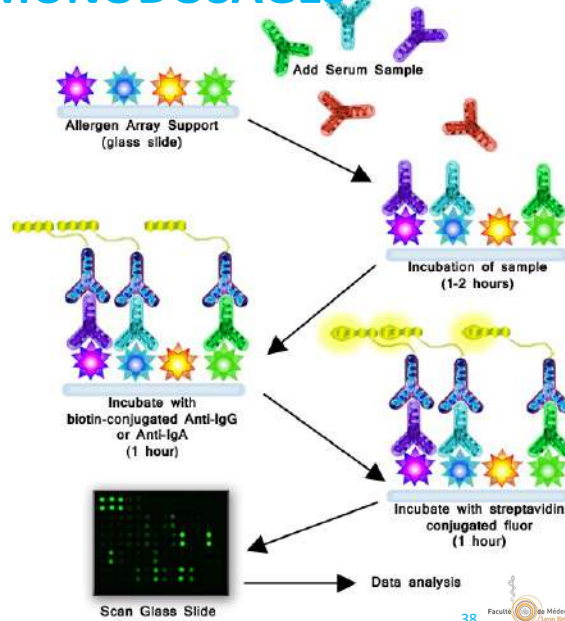


37

## 2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

### ■ Ex: Allergies

- Si le patient est allergique  
 ⇒ présence d'**Ac sériques**  
 ⇒ capture  
 ⇒ signal  
 ⇒ **Identification de/des allergène(s)**



38

**2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES**

■ Immunométrie sandwich  
 ⇒ reconnaissance de 2 épitopes

The diagram illustrates the sandwich immunoassay process in three steps: (1) A Y-shaped capture antibody is immobilized on a solid phase. (2) An antigen (green cluster) binds to the capture antibody. (3) A detection antibody (orange Y-shape) binds to the antigen, forming a sandwich structure. Labels include 'Capture Antibody', 'Antigen', 'Detection Antibody', and 'Phase solide'.

39 Faculté de Médecine

39

**2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES**

■ Ex : dosage de l'HCG (grossesse) et de la chaîne  $\beta$  libre (cancer)

The diagram compares the structure of FSH, LH, and hCG. It shows the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and their glycosylation patterns. A specific antibody is shown binding to the free  $\beta$  chain of hCG, which is an epitope exposed in the  $\alpha$ - $\beta$  dimer. Labels include 'FSH', 'LH', 'hCG', 'Chaine  $\beta$  spécifique', 'Epitope masqué dans le dimère', 'chaîne  $\beta$  libre', 'Epitope exposé dans le dimère  $\alpha$ - $\beta$ ', 'HCG totale', 'Même Ac de détection', and 'HCG'.

40 Faculté de Médecine

40

## Posez vos questions pendant le cours



- 1 Allez sur [wooclap.com](https://wooclap.com)
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement  
**GBRATU**

41 

41

## Evaluez-vous !



- 1 Allez sur [wooclap.com](https://wooclap.com)
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement  
**GBRATU**

42 

42