PROTÉINES :
Méthodes d'exploration

Pr Jonathan LOPEZ

Posez vos questions pendant le cours

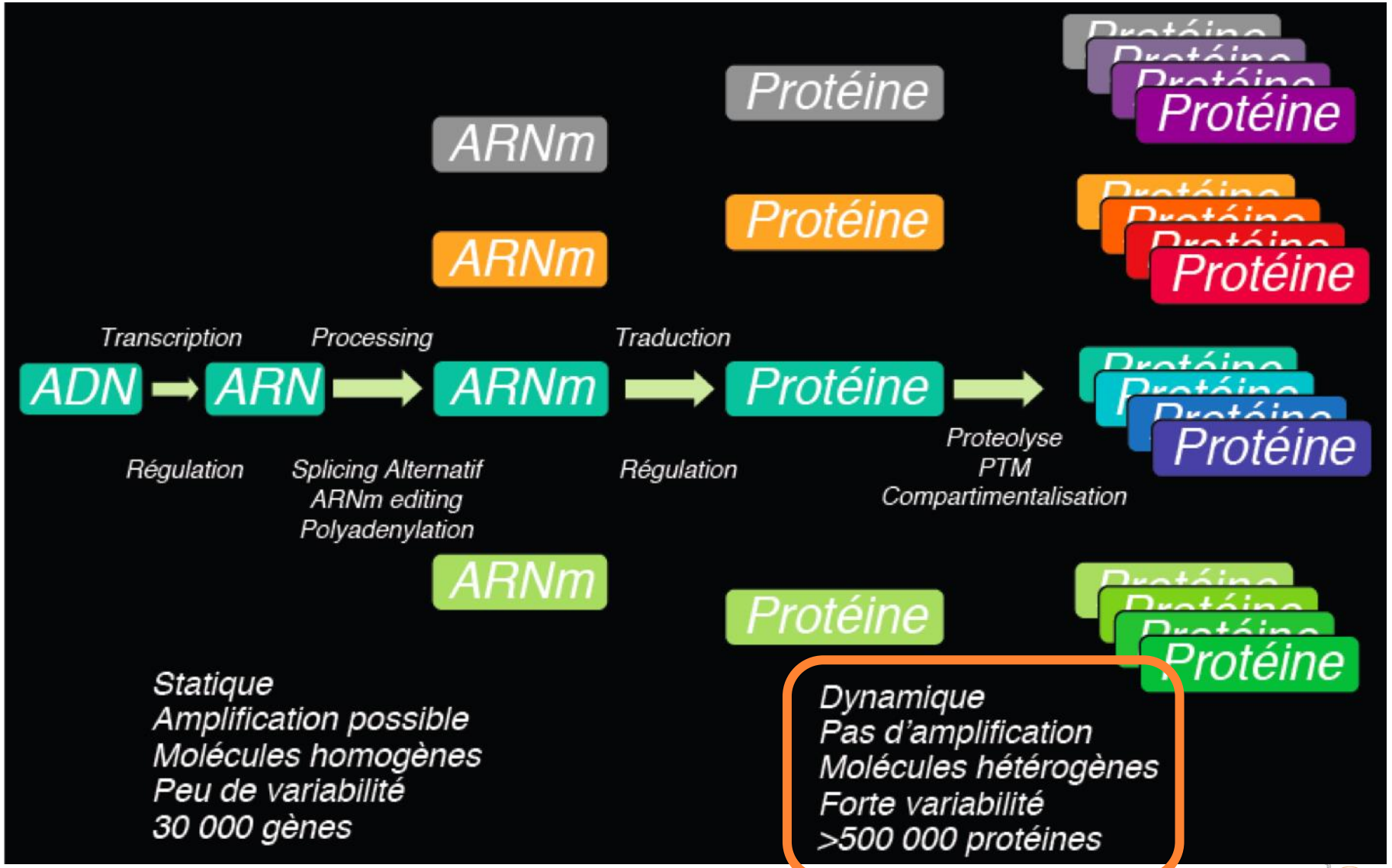


1. Allez sur wooclap.com
2. Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement

GBRATU

0 Protéome


Transcription
Processing
Traduction
ADN
ARN
ARNm
Protéine
Régulation
Splicing Alternatif
ARNm editing
Polyadenylation
Régulation
Proteolyse
PTM
Compartimentalisation
Statique
Amplification possible
Molécules homogènes
Peu de variabilité
30 000 gènes
Dynamique
Pas d'amplification
Molécules hétérogènes
Forte variabilité
>500 000 protéines

0 Protéome

- **Milieux biologiques analysés**
  - Plasma/Sérum
  - Urines
  - LCR
  - Liquides d'épanchement
  - Tissus, biopsies
  - Cellules en culture
  - Extraits bactériens
  - Surnageants de culture cellulaire
  - …








Faculté de Médecine Lyon Est

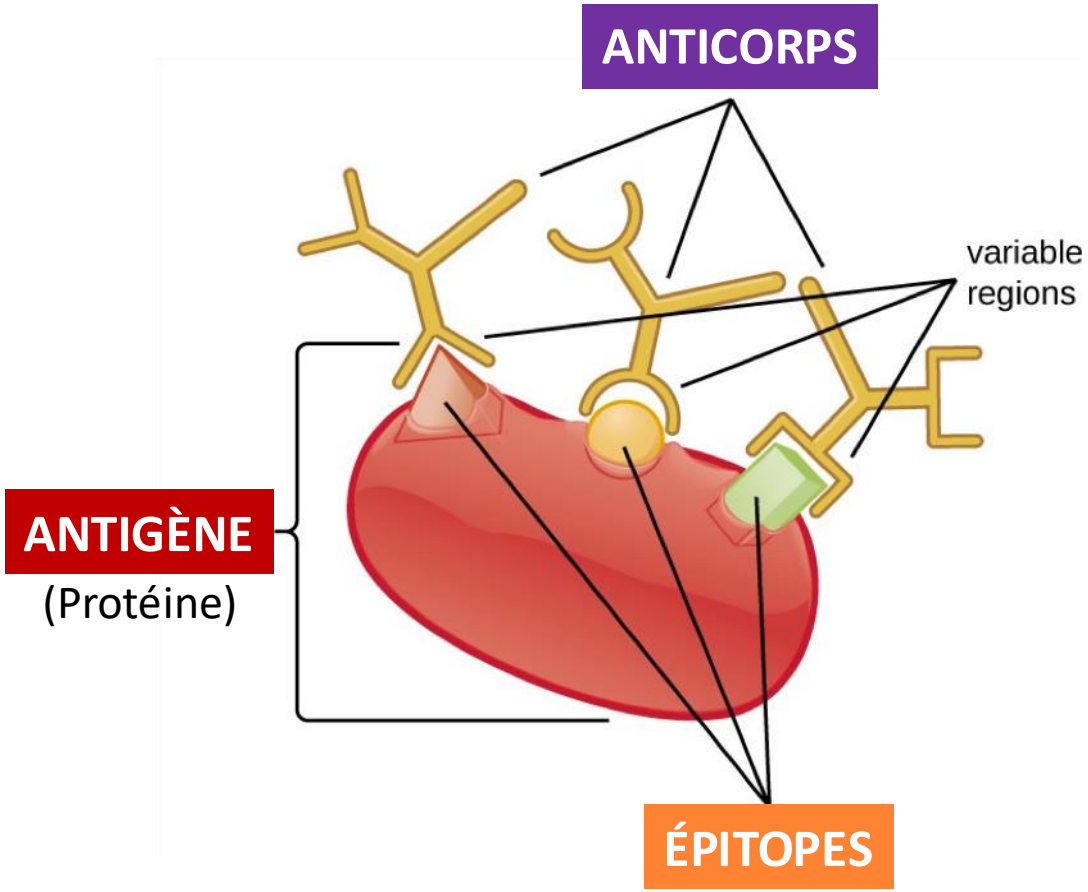
0 Plan

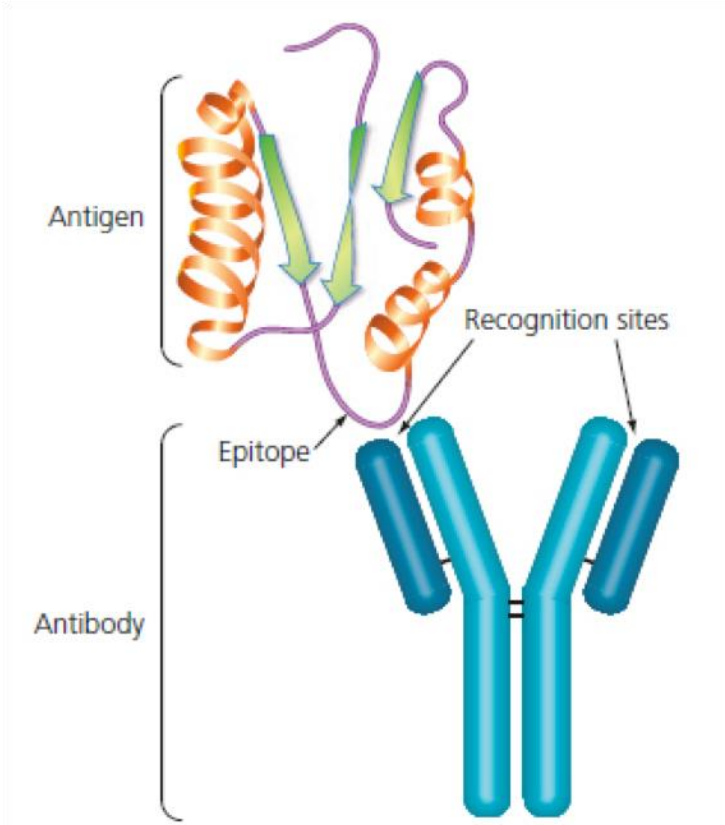
- **Analyses qualitatives**
  - **Western blot**
  - **Chromatographie**
  - **In situ (IHC, IF)**
- **Analyses quantitatives**

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Antigène, épitopes et anticorps

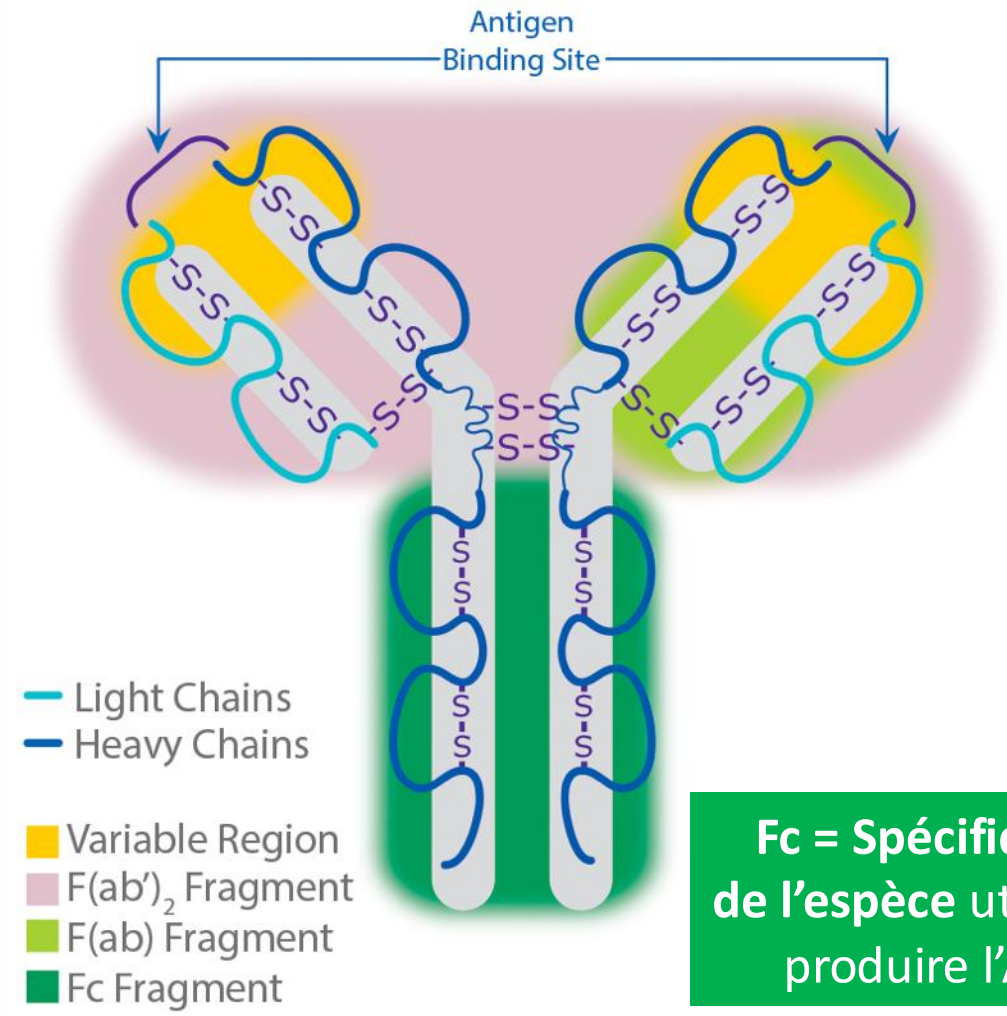


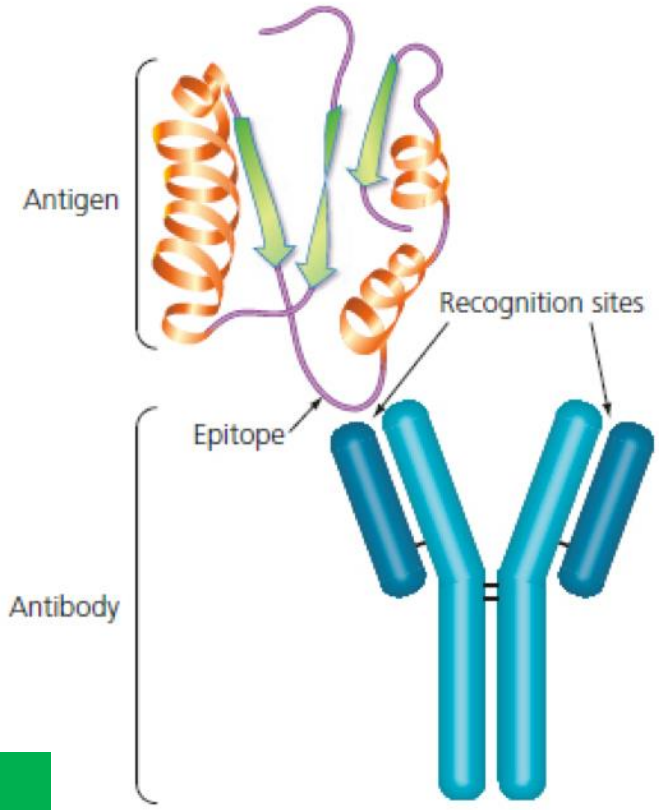


Différentes régions exposées de la protéine
pouvant être reconnues par le système immunitaire

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Antigène, épitopes et anticorps

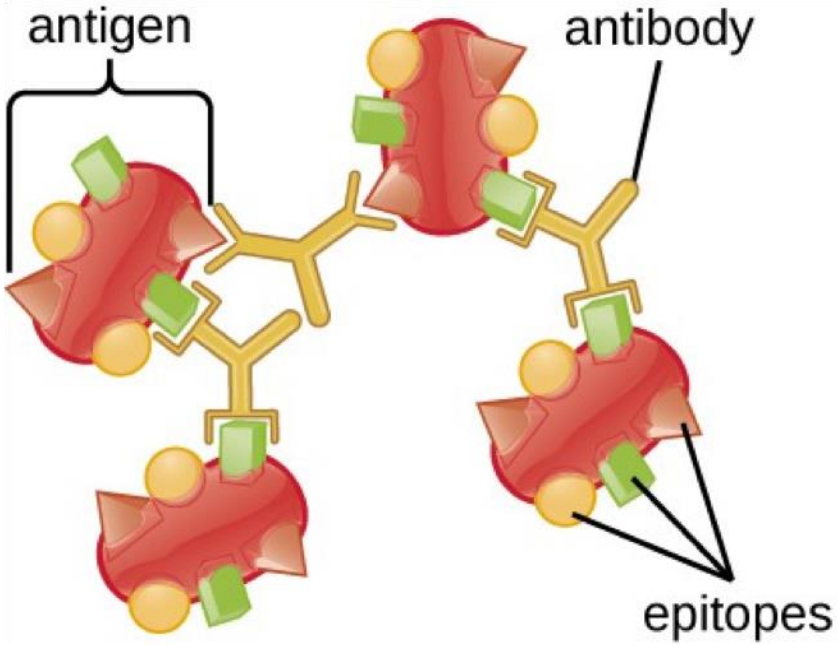




Fc = Spécifique de l'espèce utilisée produire l'Ac

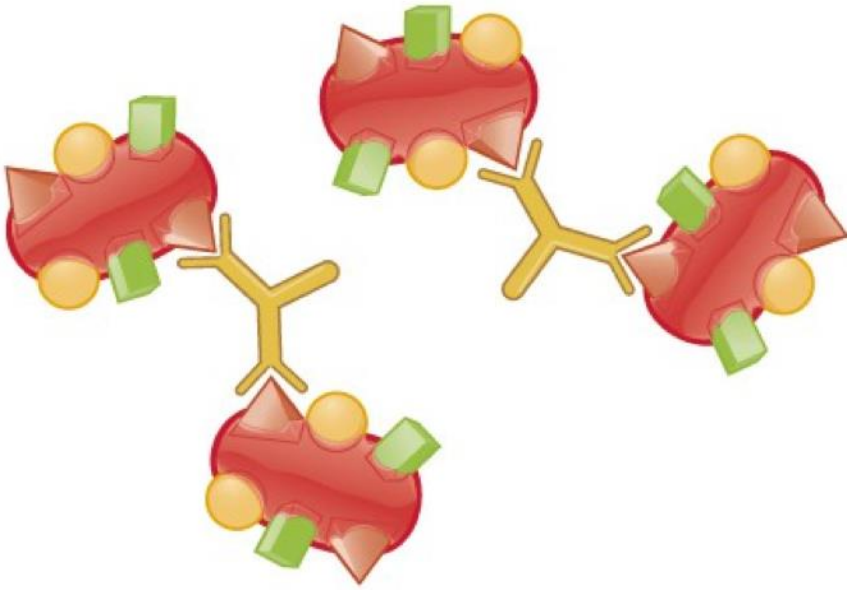
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Anticorps polyclonaux vs monoclonaux



polyclonal antiserum

Mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes de la protéine

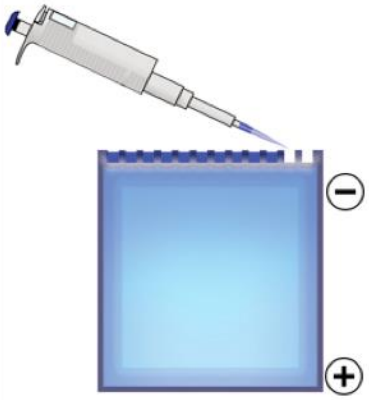


monoclonal antibodies

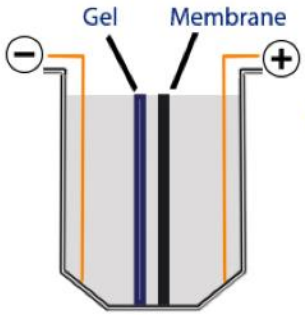
1 seul type d'anticorps dirigé contre 1 épitope unique

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **Détection par un anticorps d'une protéine immobilisée sur une membrane**
  - **SDS-PAGE**
  - **Transfert**
  - **Révélation**



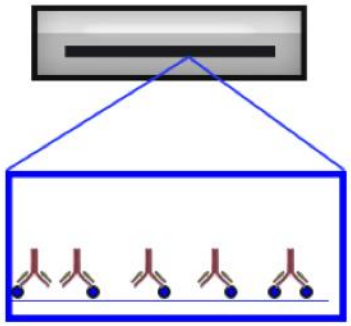
1. Load and separate protein samples on SDS-PAGE gel.



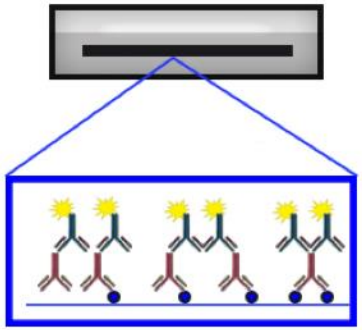
2. Electrophoretically transfer fractionated proteins onto PVDF or nitrocellulose membrane.



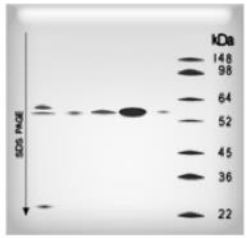
3. Block the membrane with neutral protein (BSA or milk).



4. Incubate the membrane with primary antibody specific to target protein. Wash.



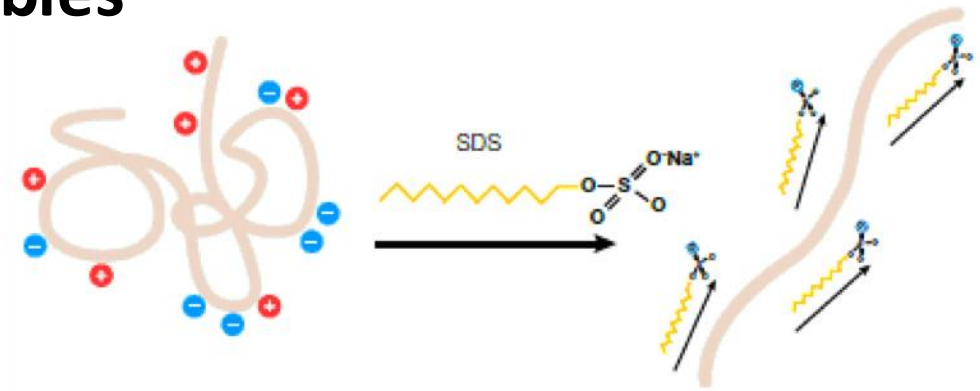
5. Incubate the membrane with HRP-labeled secondary antibody specific to primary antibody. Wash.

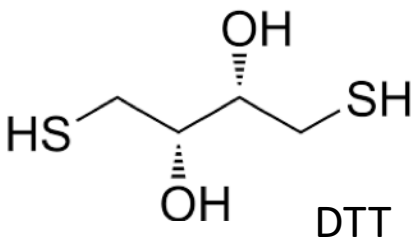


6. Incubate the blot with chemiluminescent HRP substrate and expose to film.

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)**
  - **Sodium Dodecyl Sulfate** ⇨ saturation en charges (-) ⇨ **rupture liaisons faibles**
  - **DTT = Dithiothreitol** ⇨ agent **réducteur** ⇨ **rupture des ponts S-S** ⇨ **séparation des monomères / chaines peptidiques**
  - **Chaleur**

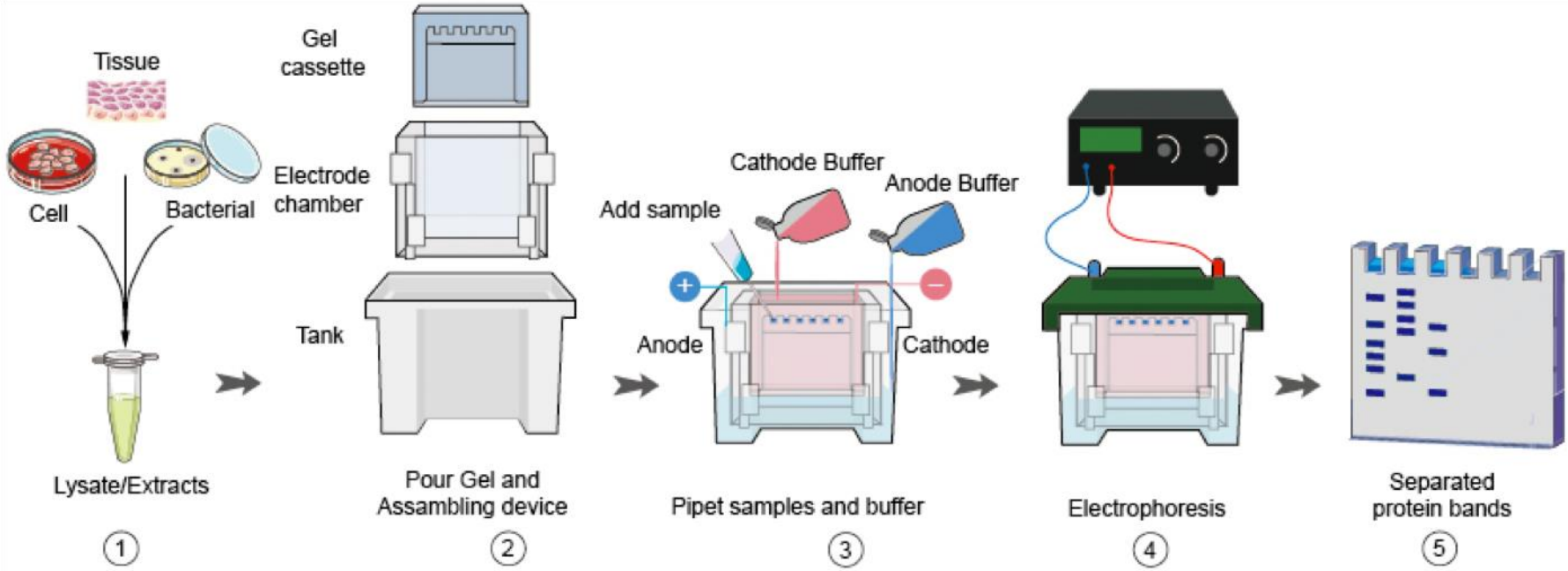




⇨ séparation = f(taille)

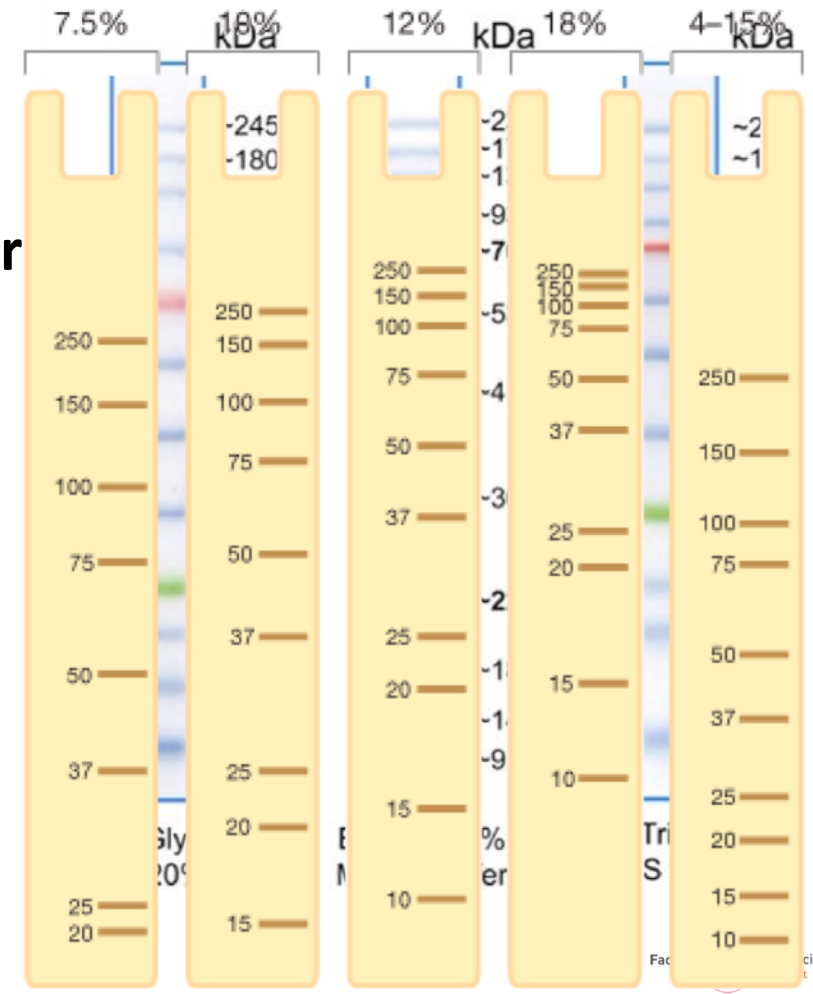
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)**
  - **Polyacrylamide Gel Electrophoresis**
    - **Migration sous l'effet d'un courant (vers le +)**
    - « Filet » de polyacrylamide ⇨ **les + petits migrent + facilement** ⇨ en bas du gel



1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)**
  - **Polyacrylamide Gel Electrophoresis**
    - **Séparation = f(% acrylamide)**
    - **Séparation = f(tampon)**
    - **Marqueur de Poids moléculair unité = kiloDalton (kDa)**



1 AA ≈ 110Da = 0,11kDa

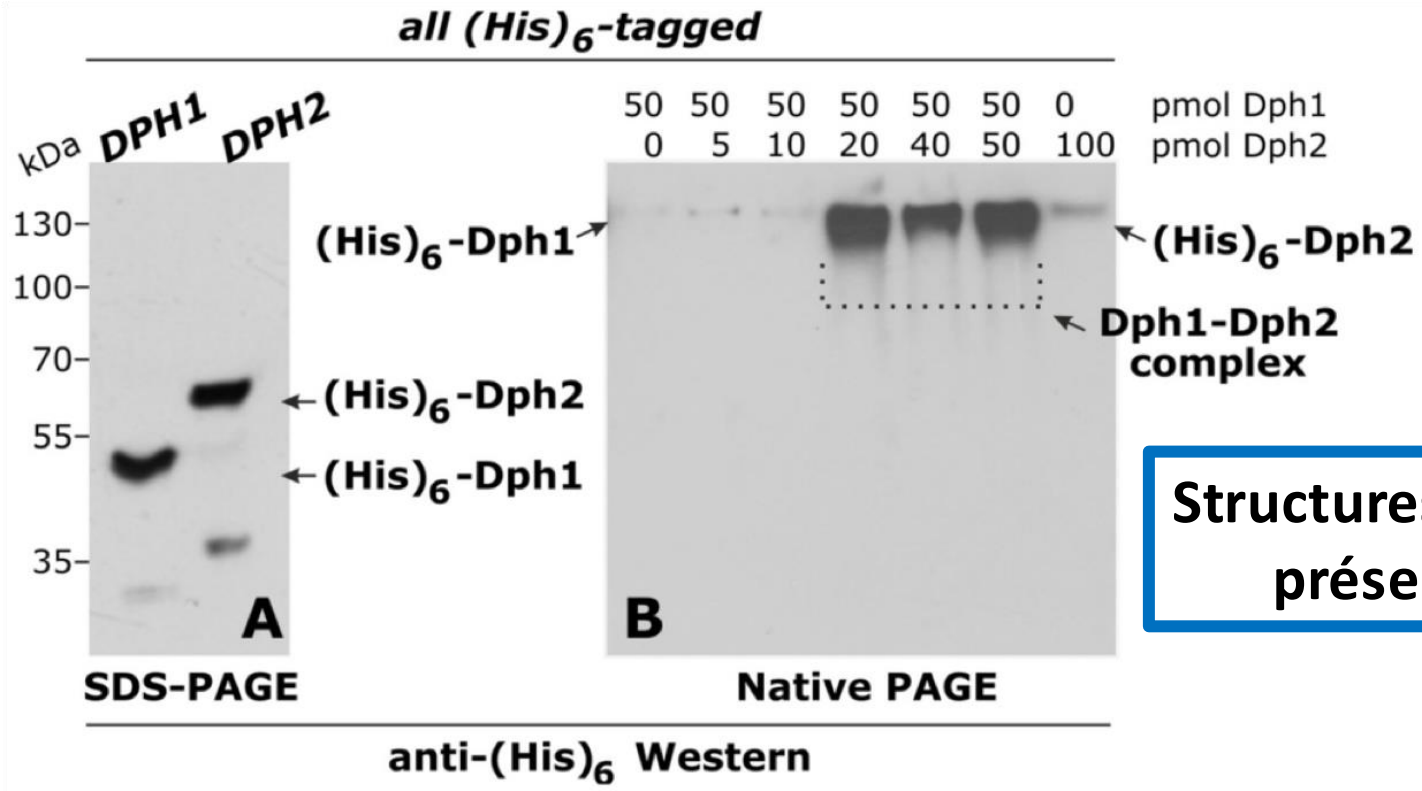
⇨ 22kDa ↔ 200 AA (=22/0,11)

⇨ 300 AA ↔ 33kDa (=300*0,11)

1 Qualitatives : WESTERN BLOT



- **Electrophorèse non dénaturante = native**



Structures III et IV préservées

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

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Prepare transfer buffer

Prepare transfer buffer sufficient for the transfer tank and for equilibration of gels and membranes.

Equilibrate gels and membranes

Equilibrate gels and membranes in transfer buffer.

Assemble the gel and membrane sandwich

Place the membrane and gel between buffer-soaked filter papers.

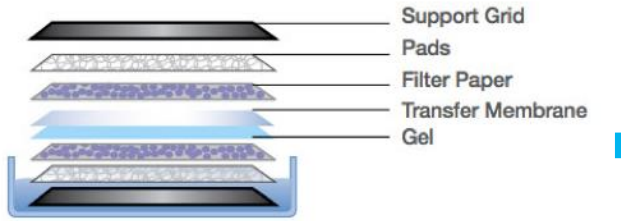
Set up the transfer cell

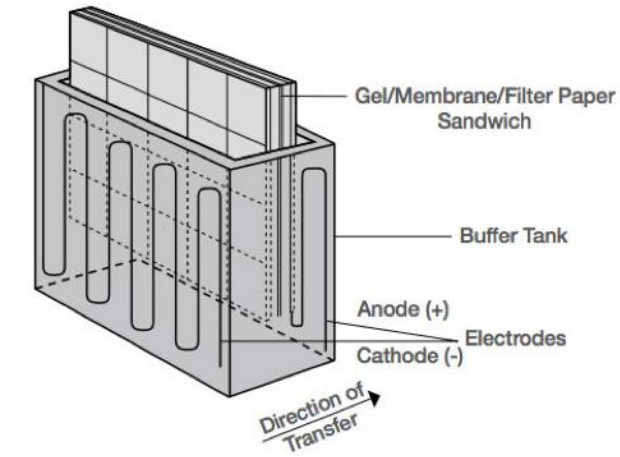
Place the gel, membrane and filter paper sandwich in the transfer tank. Fill the tank with transfer buffer. Connect the tank to the power supply and set the power supply for optimal power and time.

Start the transfer









- **Transfert sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF**
  - **Sous l'effet d'un courant**
  - **Du (-) vers le (+)**

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**

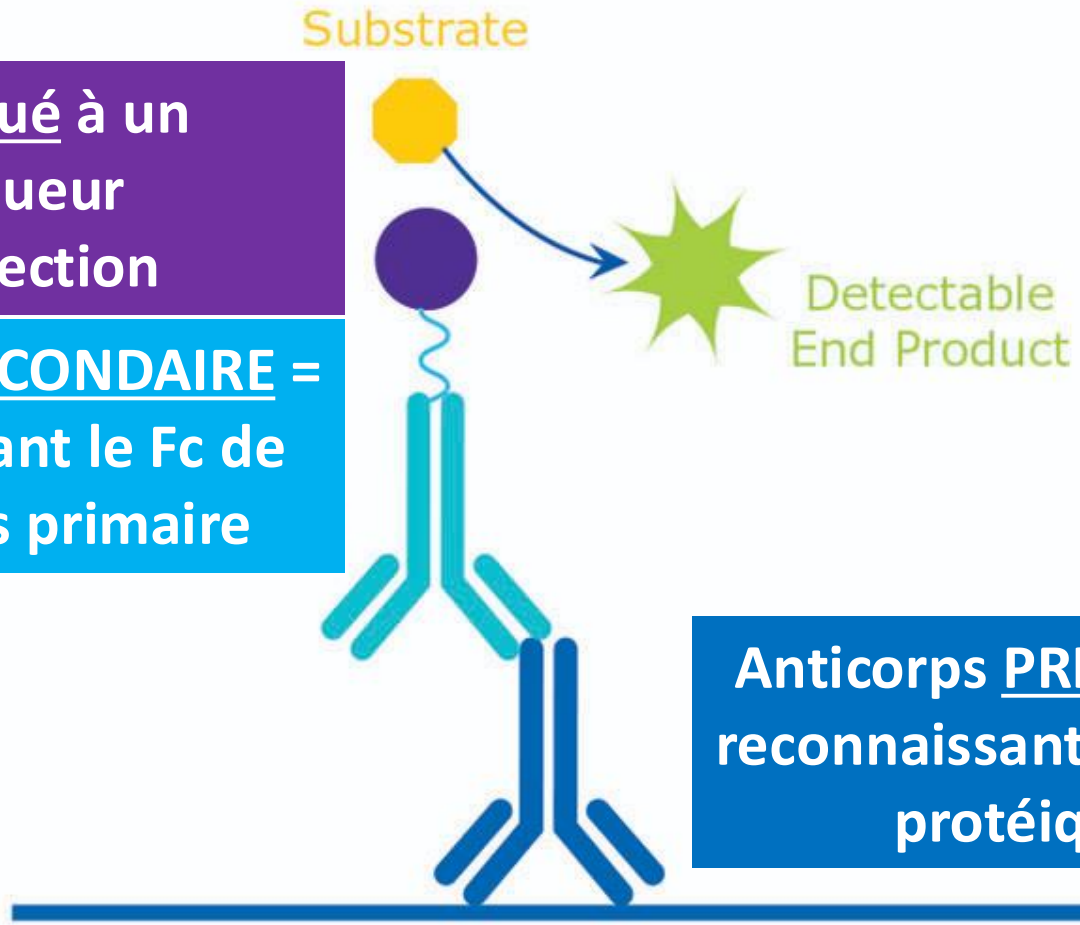


1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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

Conjugué à un marqueur de détection

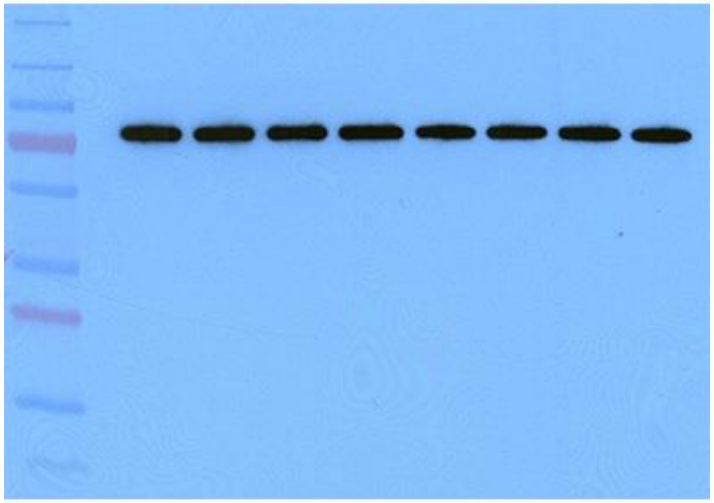
Anticorps SECONDAIRE = reconnaissant le Fc de l'anticorps primaire

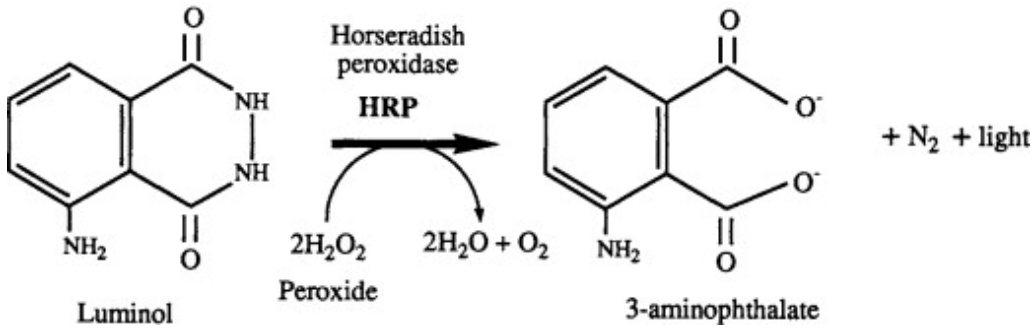


Anticorps PRIMAIRE = reconnaissant l'épitope protéique

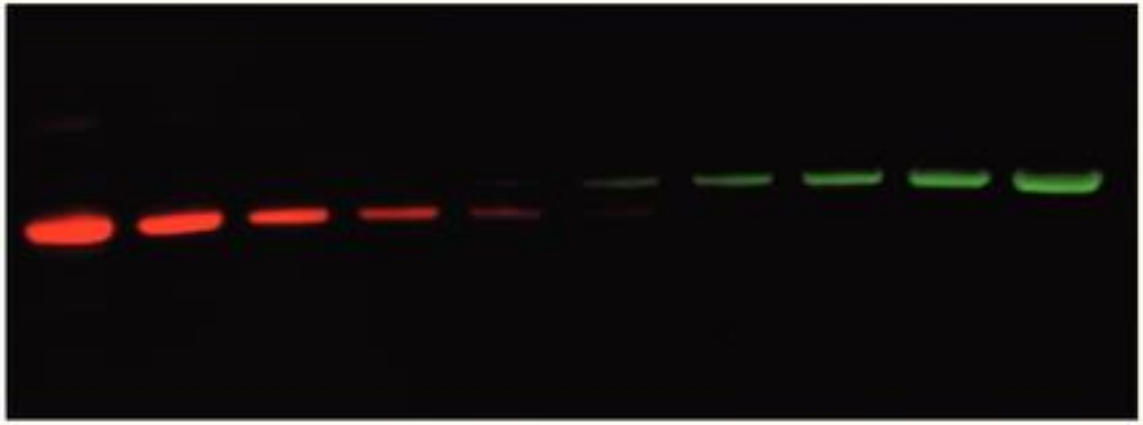
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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



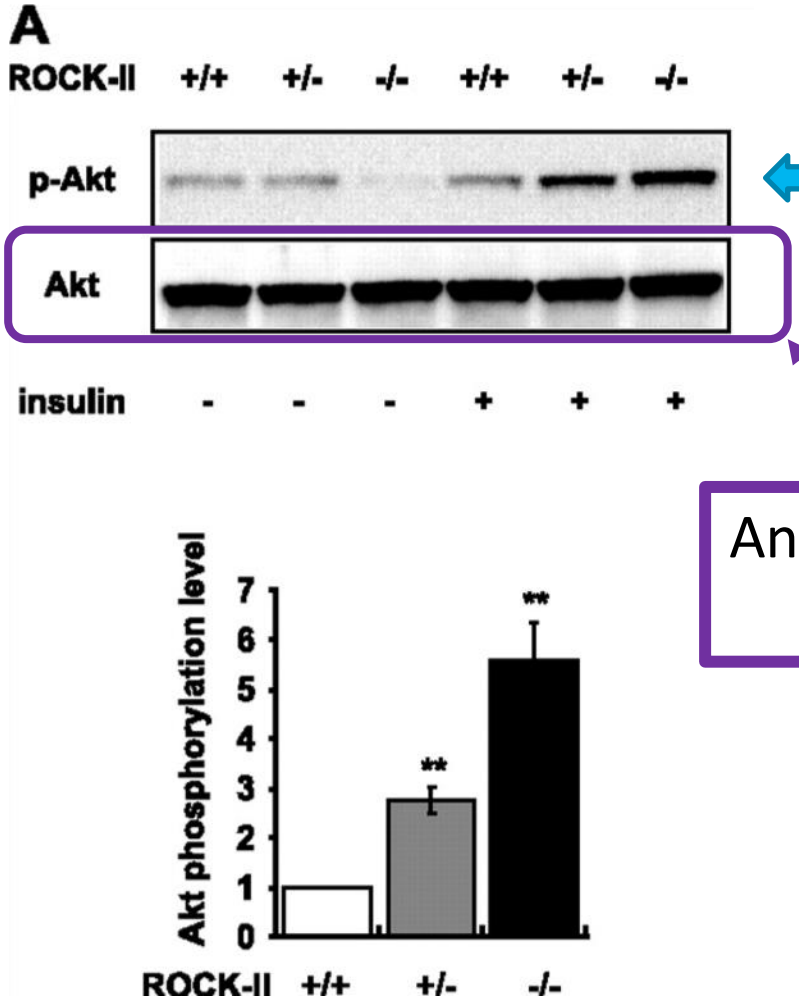


Fluorochromes



1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Détection de protéines modifiées



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

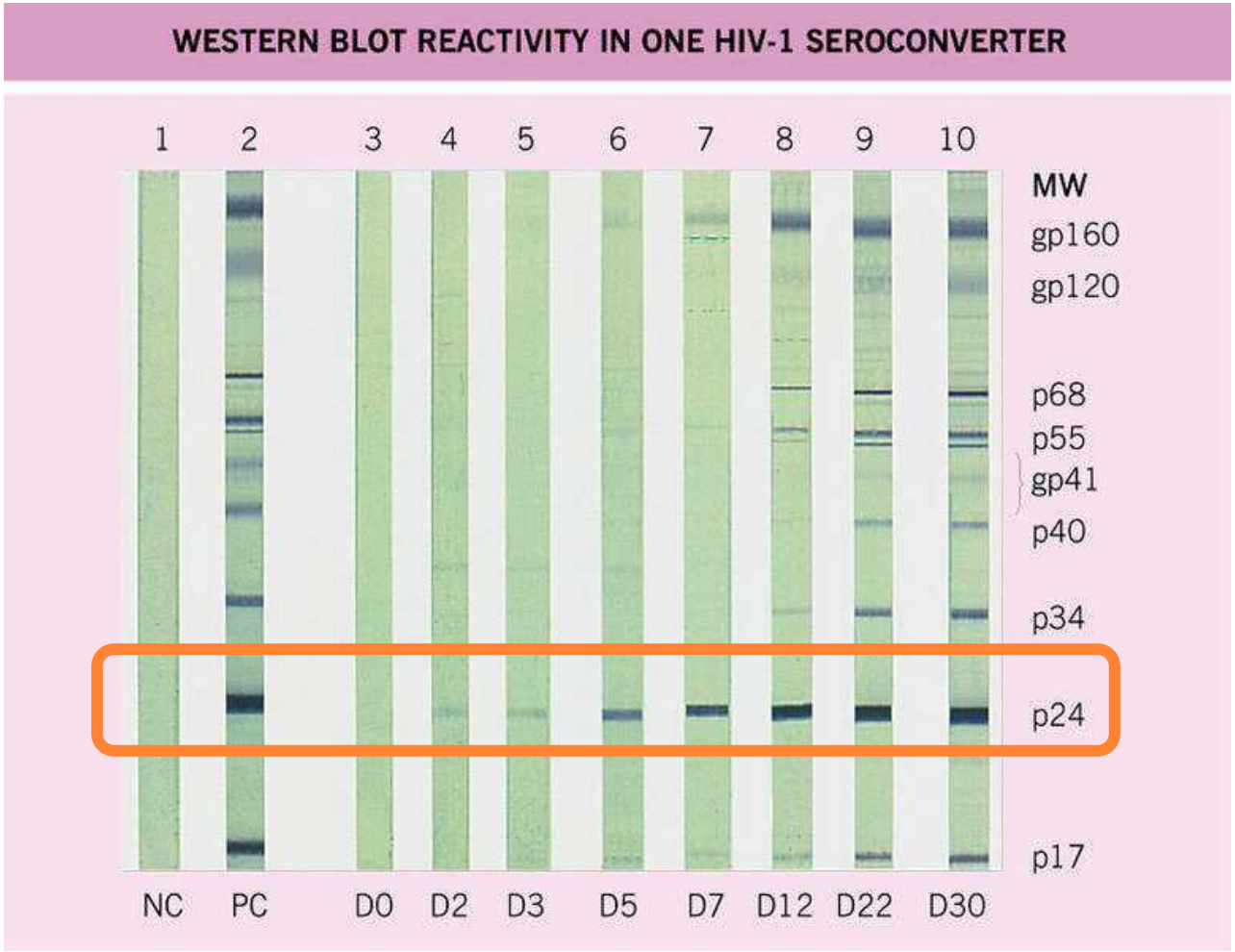
Anticorps contre la protéine totale pour normalisation

Noquchi et al. JBC. 2007

Faculté de Médecine Lyon Est

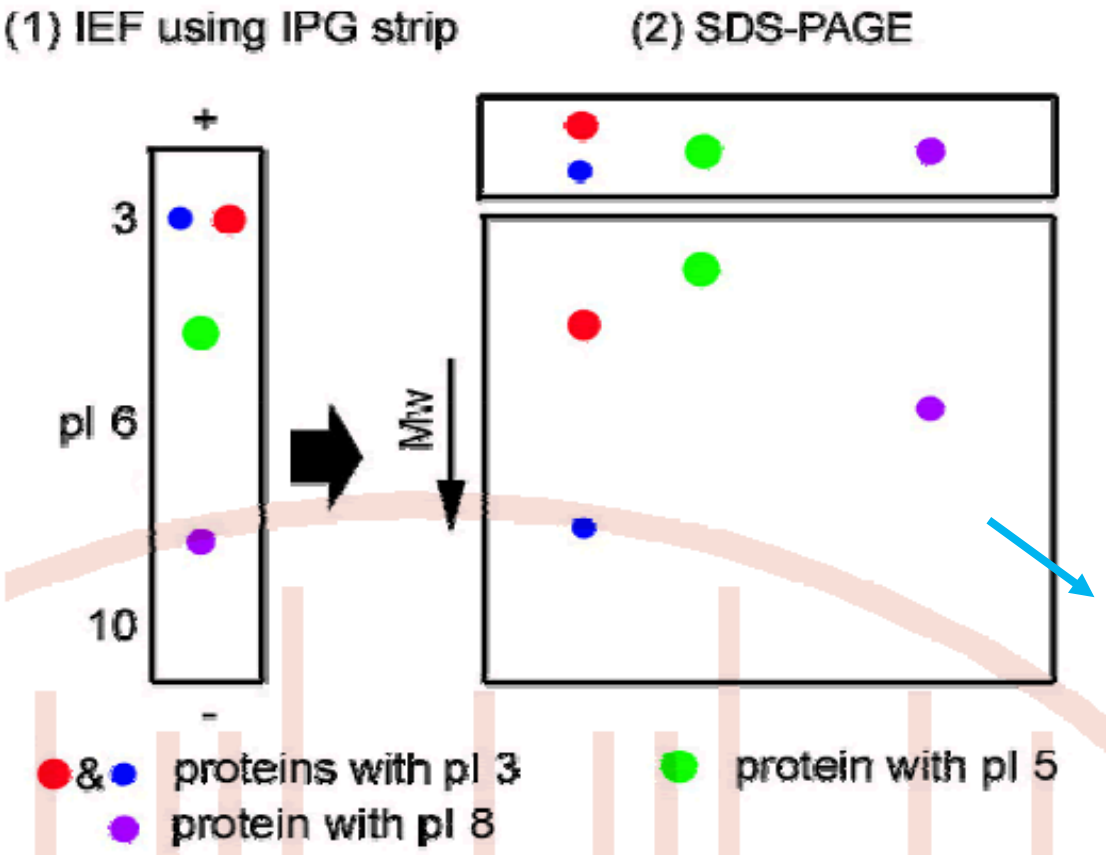
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **Application clinique : séroconversion HIV**



2 Qualitatives : Electrophorèse 2D

- 1ère dim. ⇨ focalisation isoélectrique = f(charge)
- 2nde dim. ⇨ SDS-PAGE = f(masse)



IEF + SDS-PAGE
= **électrophorèse bidimensionnelle**

4 spots =
4 protéines ou monomères

0 Plan

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

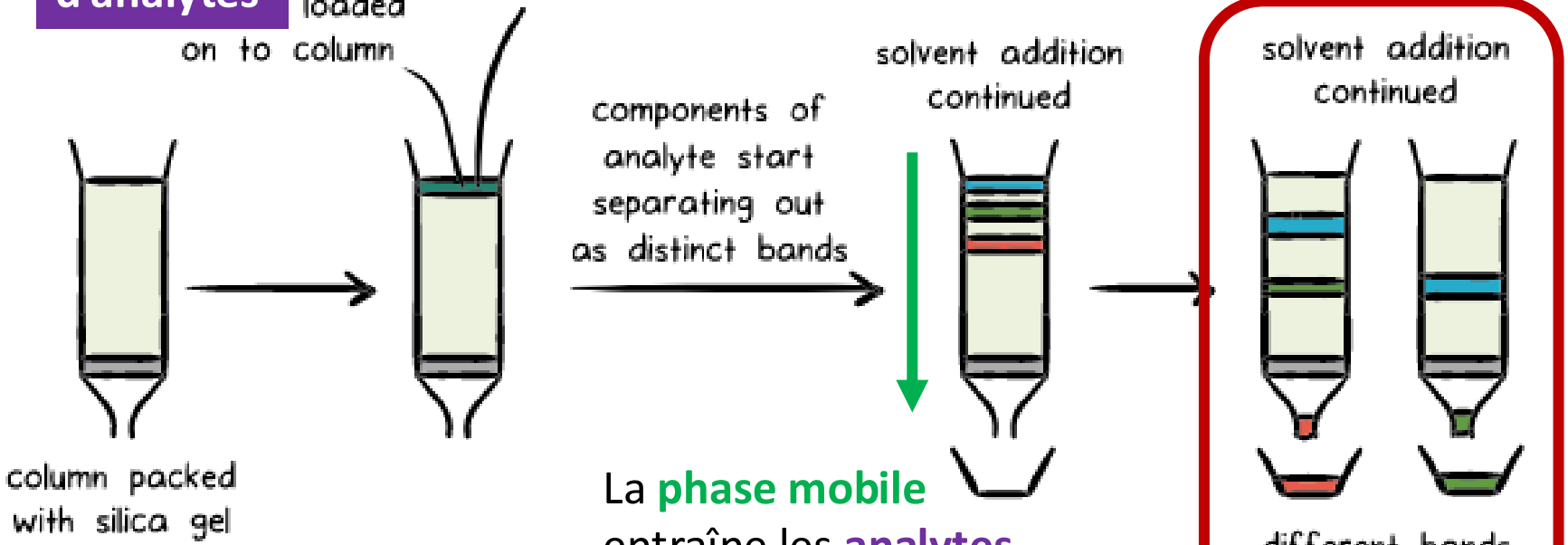
Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

Méthode séparative

Mélange complexe d'analytes

Phase mobile



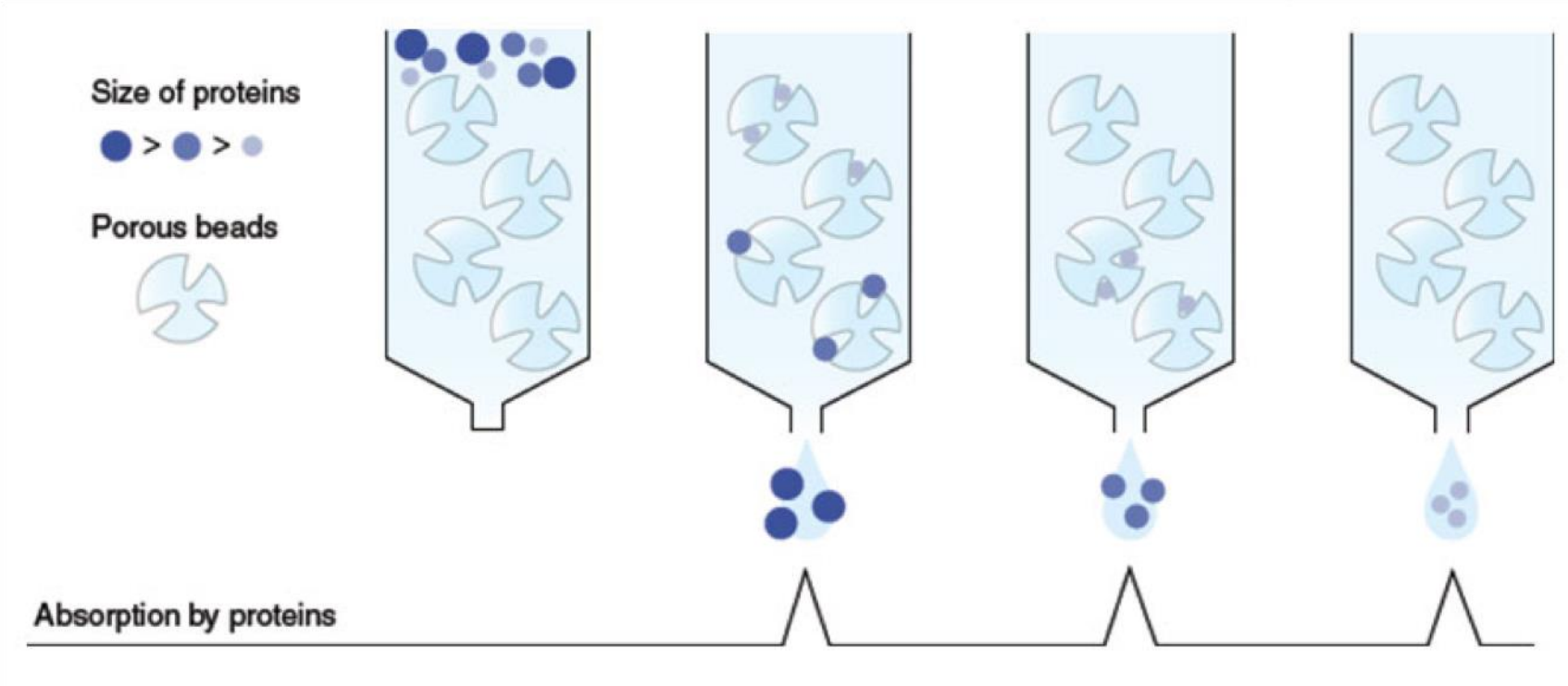
Phase stationnaire

La **phase mobile** entraîne les **analytes** au travers de la **phase stationnaire**

SÉPARATION des analytes

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

- **Gel filtration ⇨ f(taille)**



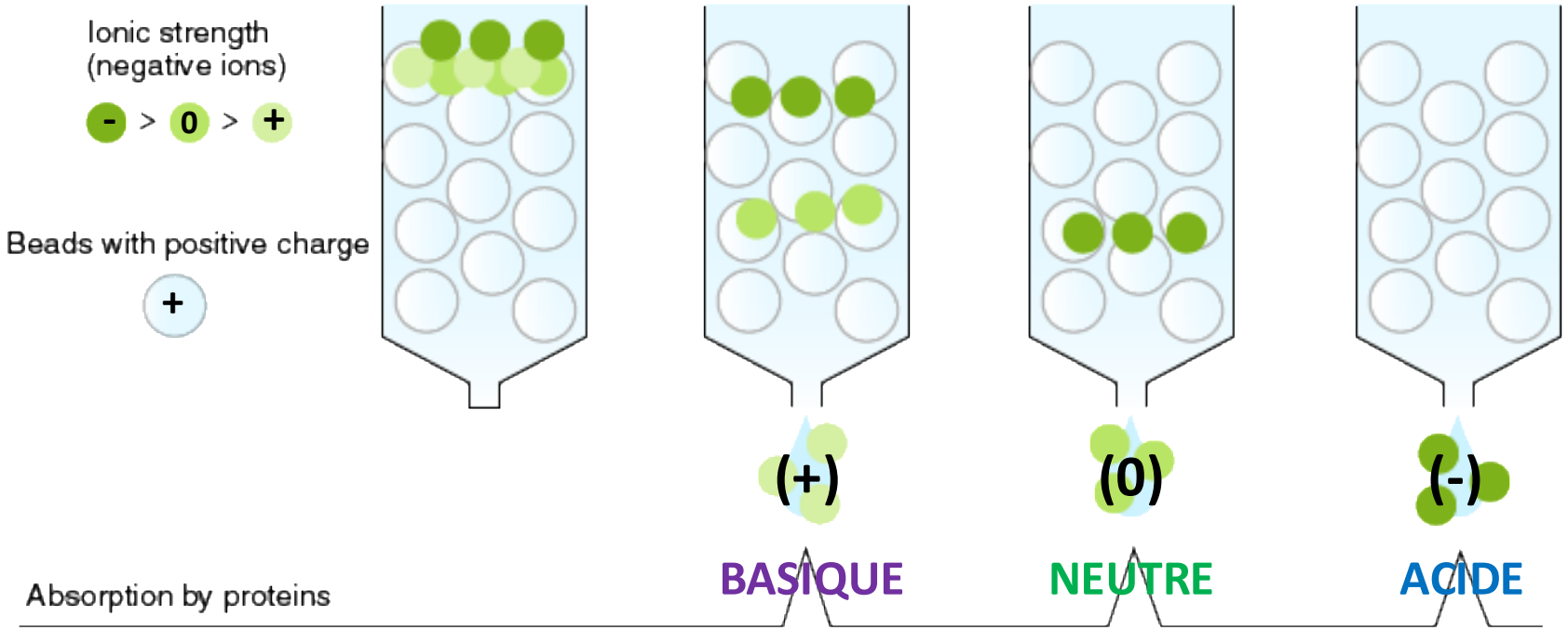
Les protéines les + grosses ne sont pas retenues ⇨ éluées en 1er

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

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

- **Echangeur d'anions ⇨ phase stationnaire (+)**

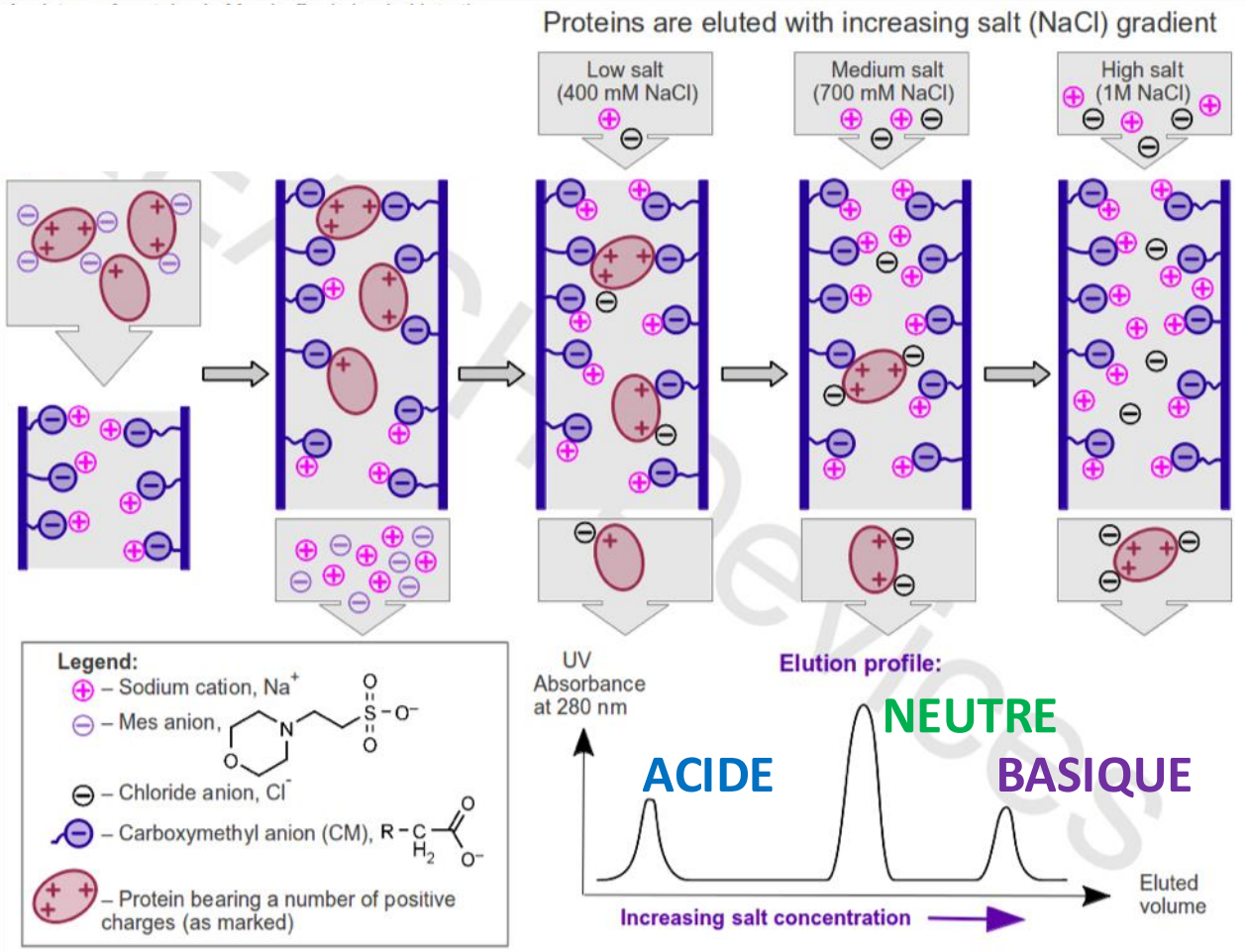


Les protéines chargées positivement (=basiques) ne sont pas retenues ⇨ éluées en 1er

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

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

- **Echangeur de cations ⇨ phase stationnaire (-)**



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

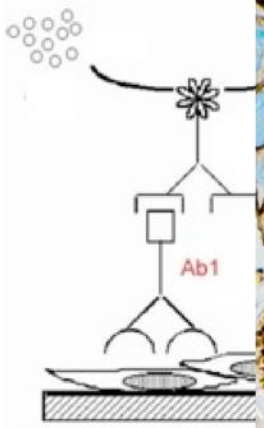
Faculté de Médecine Lyon Est

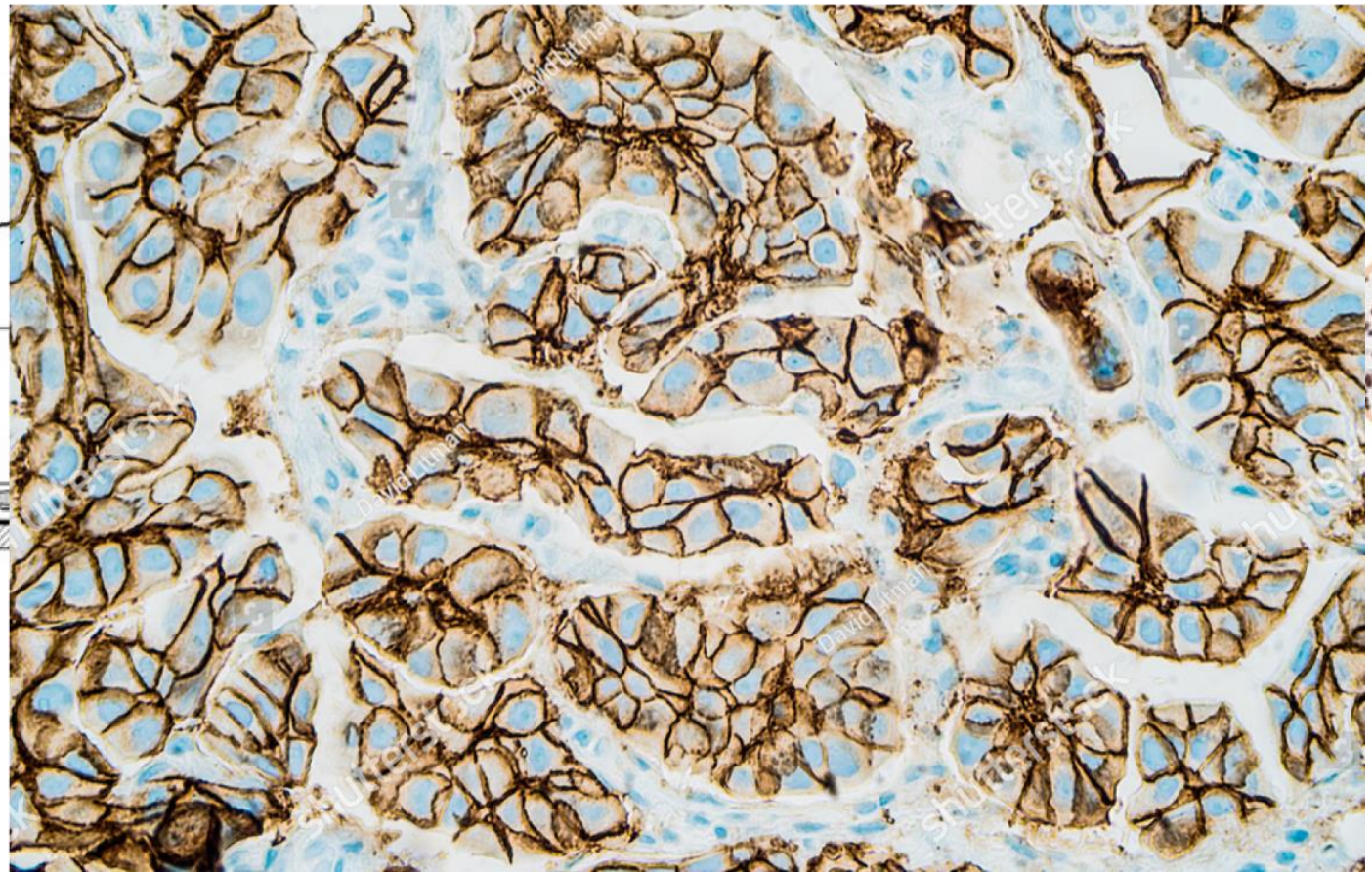
0 Plan

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

1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- **Directement sur le tissu après perméabilisation et démasquage antigénique**



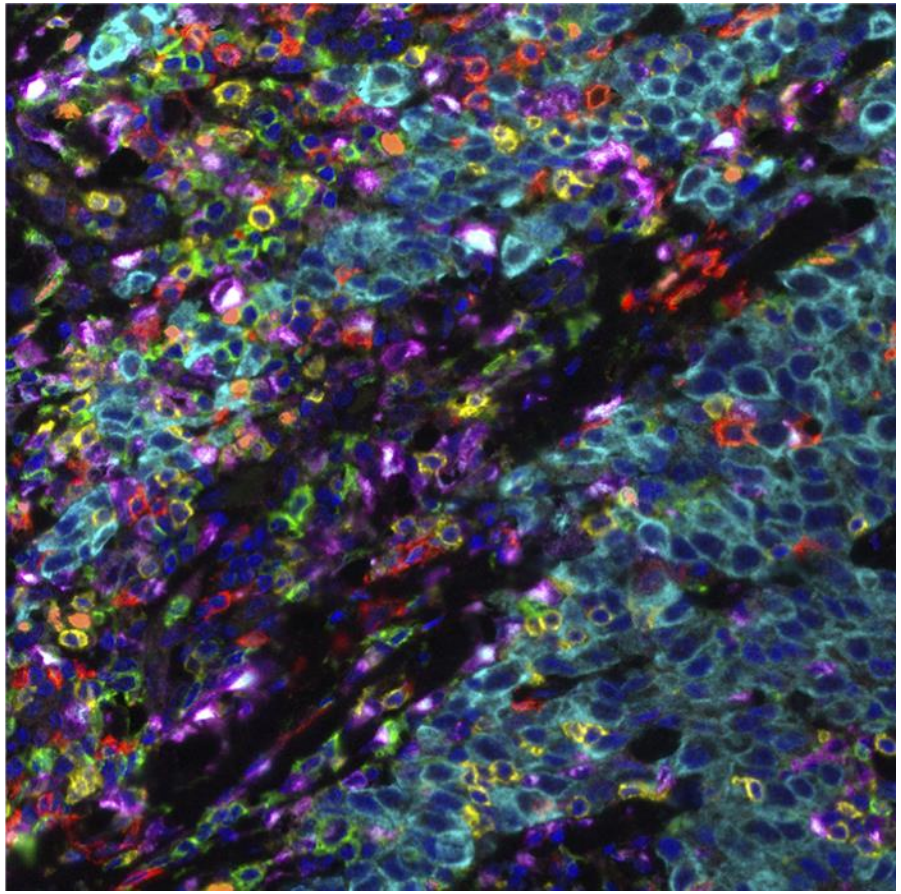




1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- **ImmunoFluorescence (IF) ⇨ plusieurs protéines sur la même lame**

PD-L2 (orange), PD-L1 (E1L3N®) (red), CD68 (green), PD-1 (yellow), CD8α (magenta) and Pan-Keratin (cyan) on FFPE tonsil.



Posez vos questions pendant le cours



1. Allez sur wooclap.com
2. Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement

GBRATU

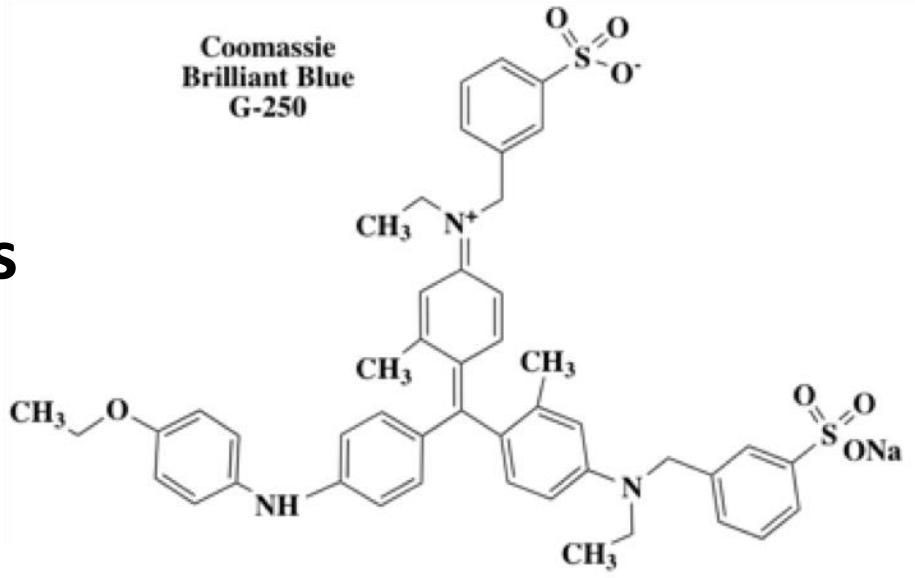
0 Plan

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

Faculté de Médecine Lyon Est

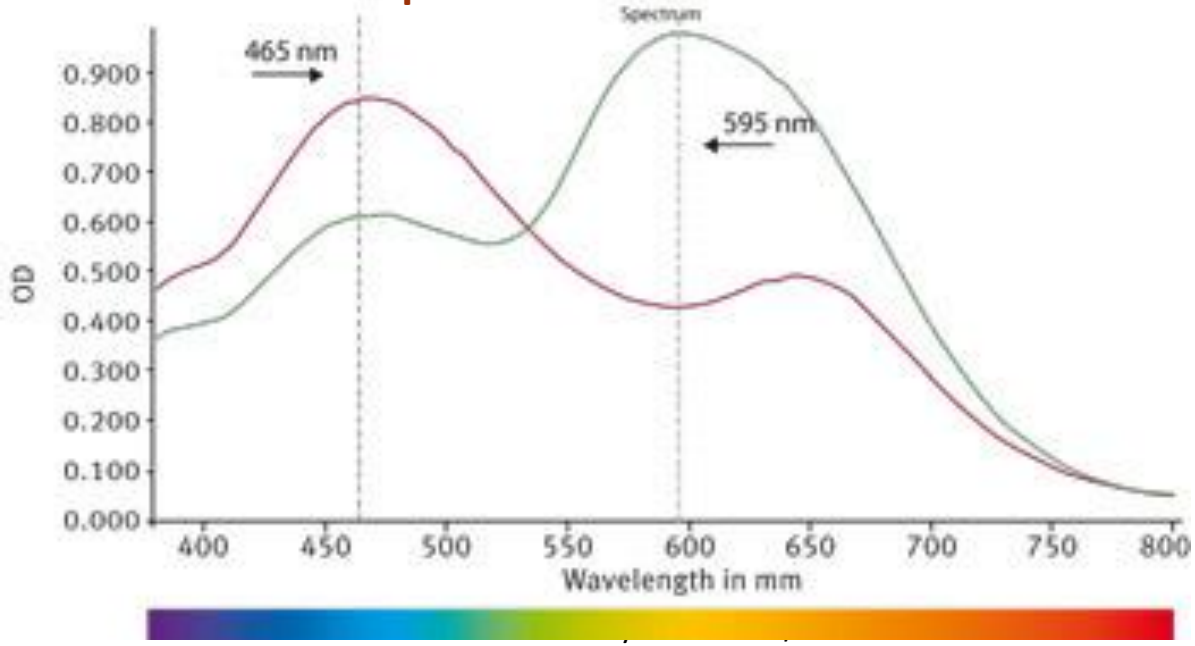
2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

- **Réaction de Bradford**
  - **Complexe coloré en présence de protéines**
    ⇨ absorbe à 595nm

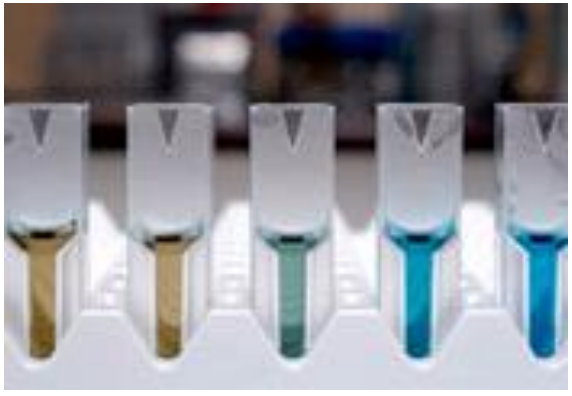


CBB cationique

CBB anionique lié aux protéines



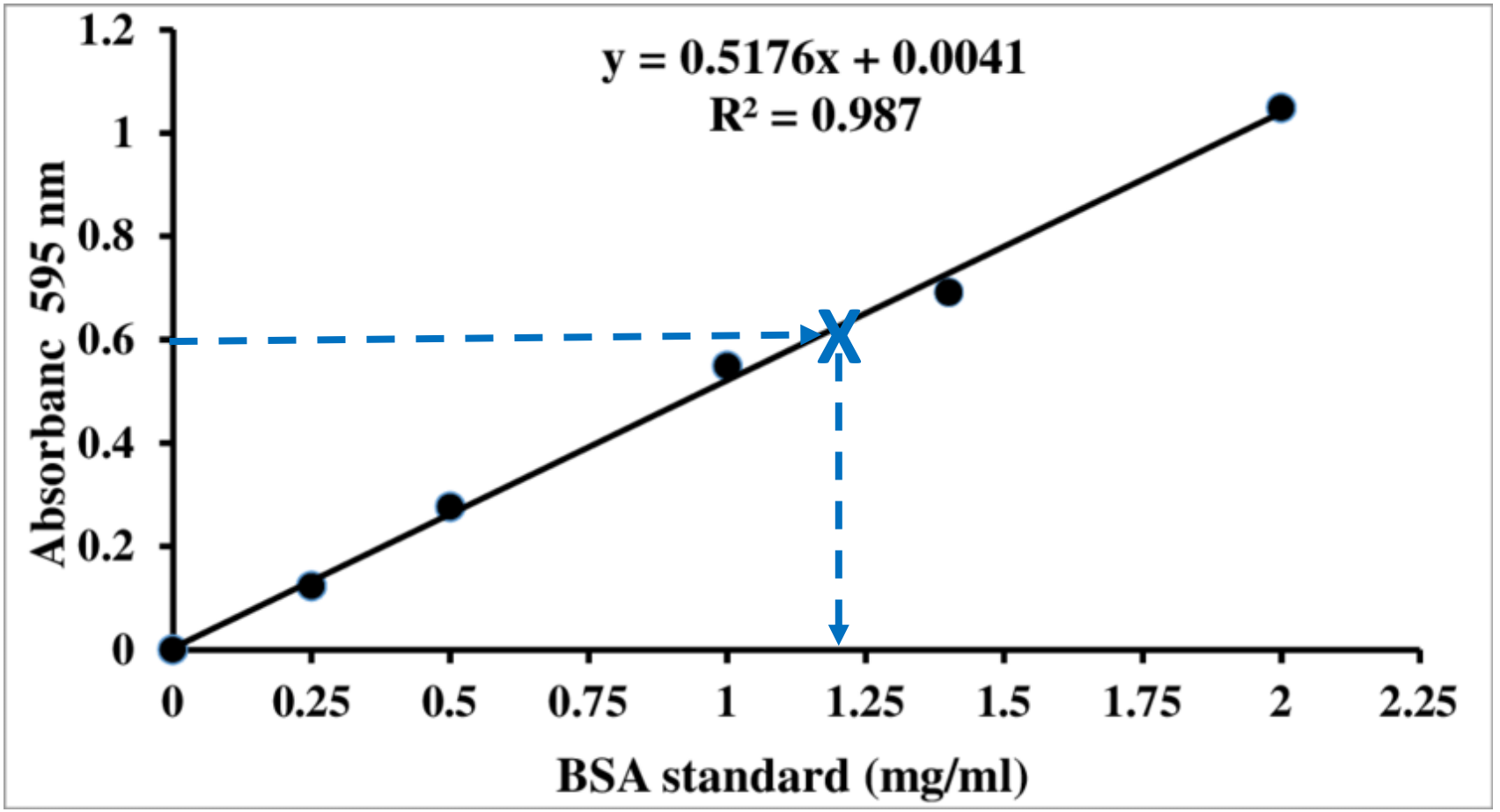
E. Jaspard (2012)



2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

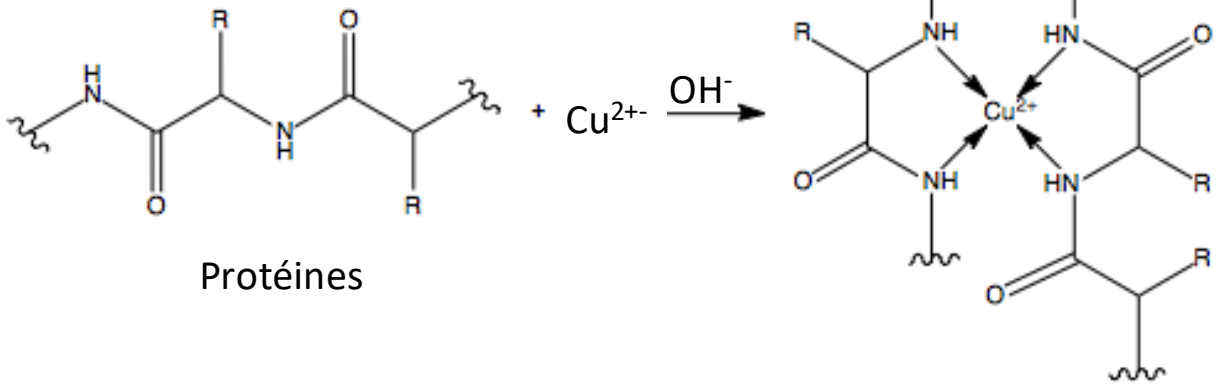
Réaction de Bradford

Courbe d'étalonnage



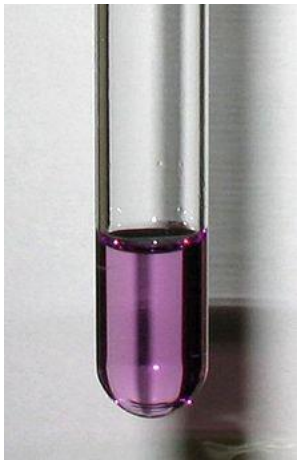
2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

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



Protéines

Complexe coloré



Faculté de Médecine Lyon Est

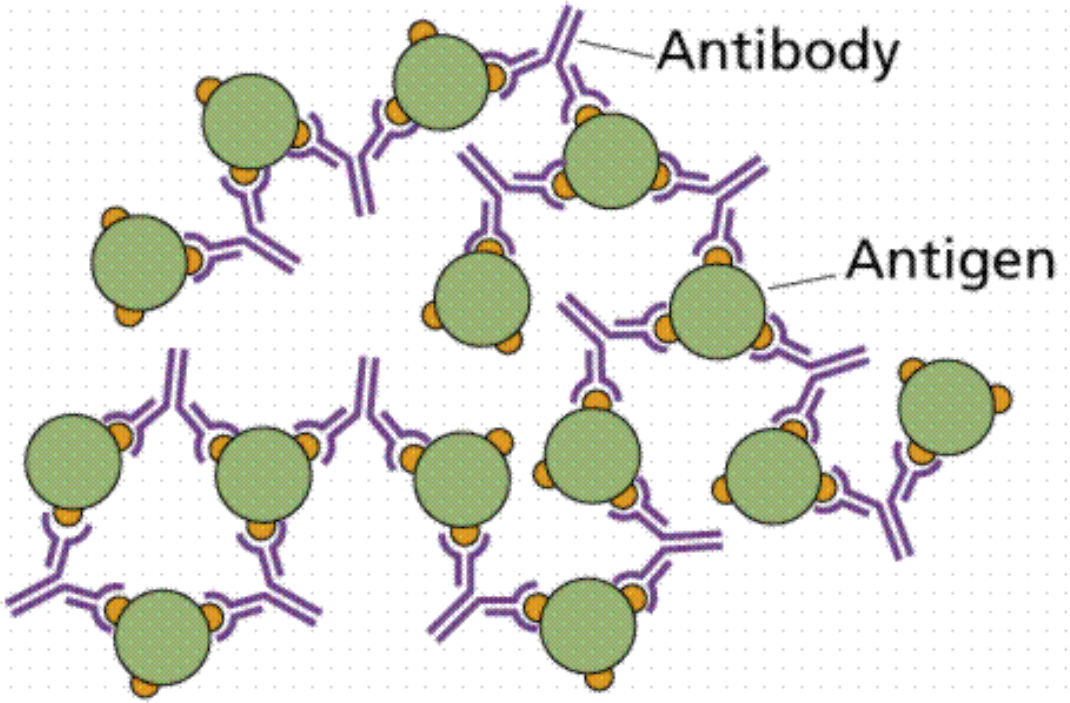
0 Plan

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

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **Dosage de protéines spécifiques en solution**
  - Formation de **complexes antigène-anticorps**
    ⇨ **trouble = f(conc. en Ag)**



2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

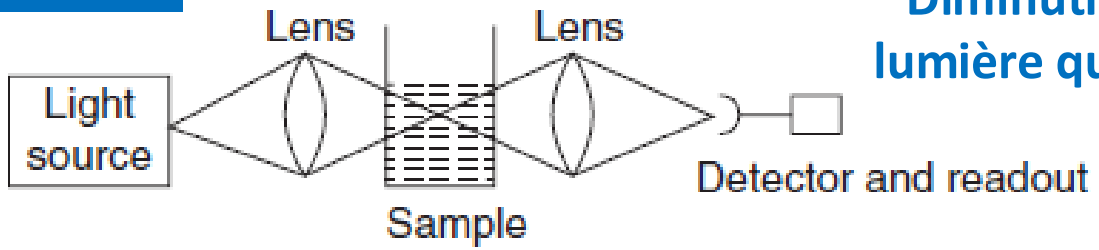
Dosage de protéines spécifiques en solution

- Formation de **complexes antigène-anticorps**

  ⇨ **trouble = f(conc. en Ag)**

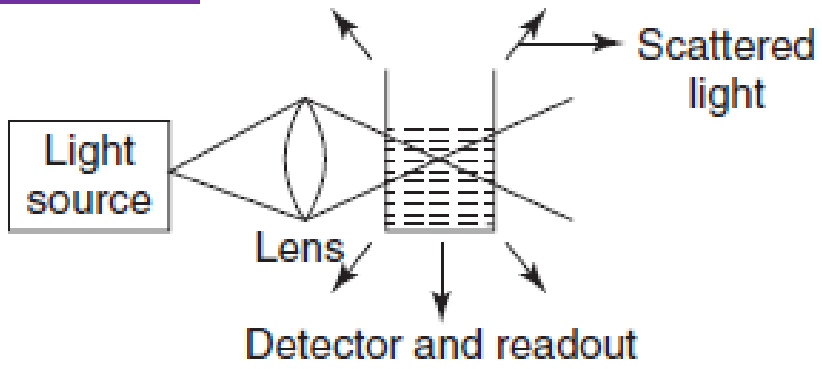
Ex: albumine, T3, CRP, …

TURBIDIMETRIE



Diminution de la lumière qui traverse

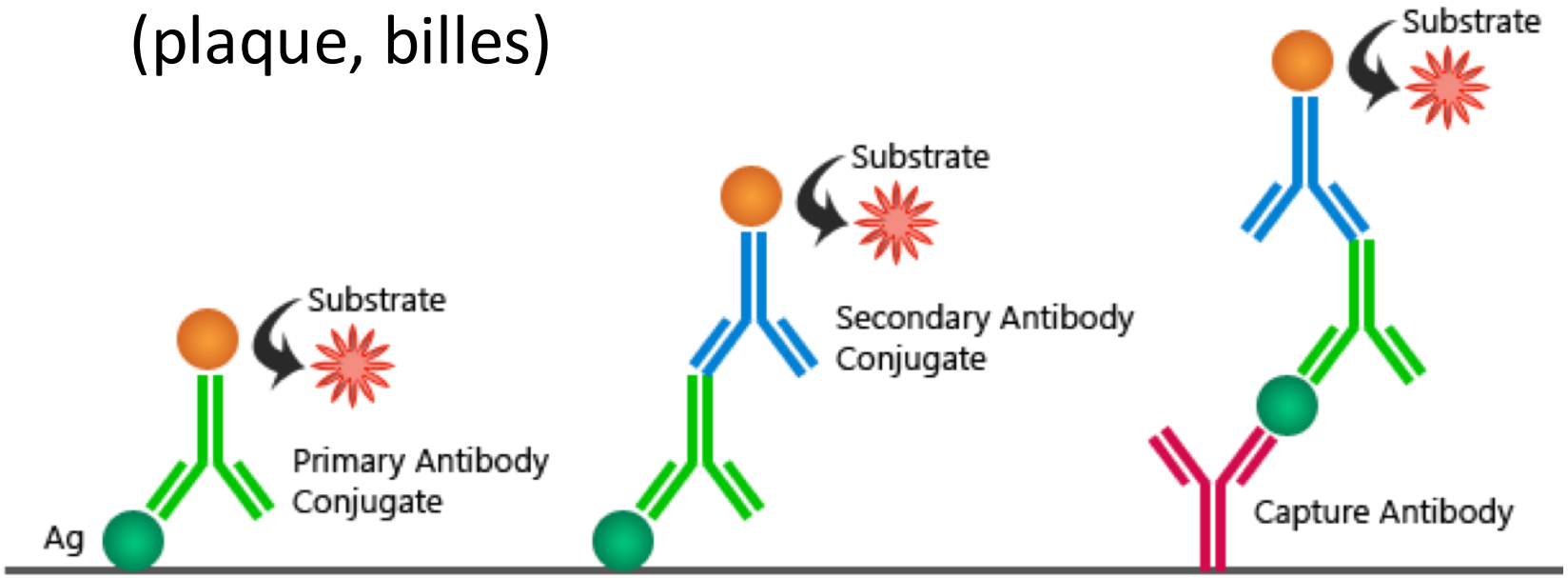
NEPHELEMETRIE



Augmentation de la lumière dispersée

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **ELISA** (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
  - Immobilisation sur une **phase solide** (plaque, billes)



DIRECT ELISA

Signal=f(**conc. Ag**)

INDIRECT ELISA

Signal=f(**conc. Ag**)
ou =f(**conc. Ac**)

SANDWICH ELISA

Signal=f(**conc. Ag**)

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **Ex: Allergies**

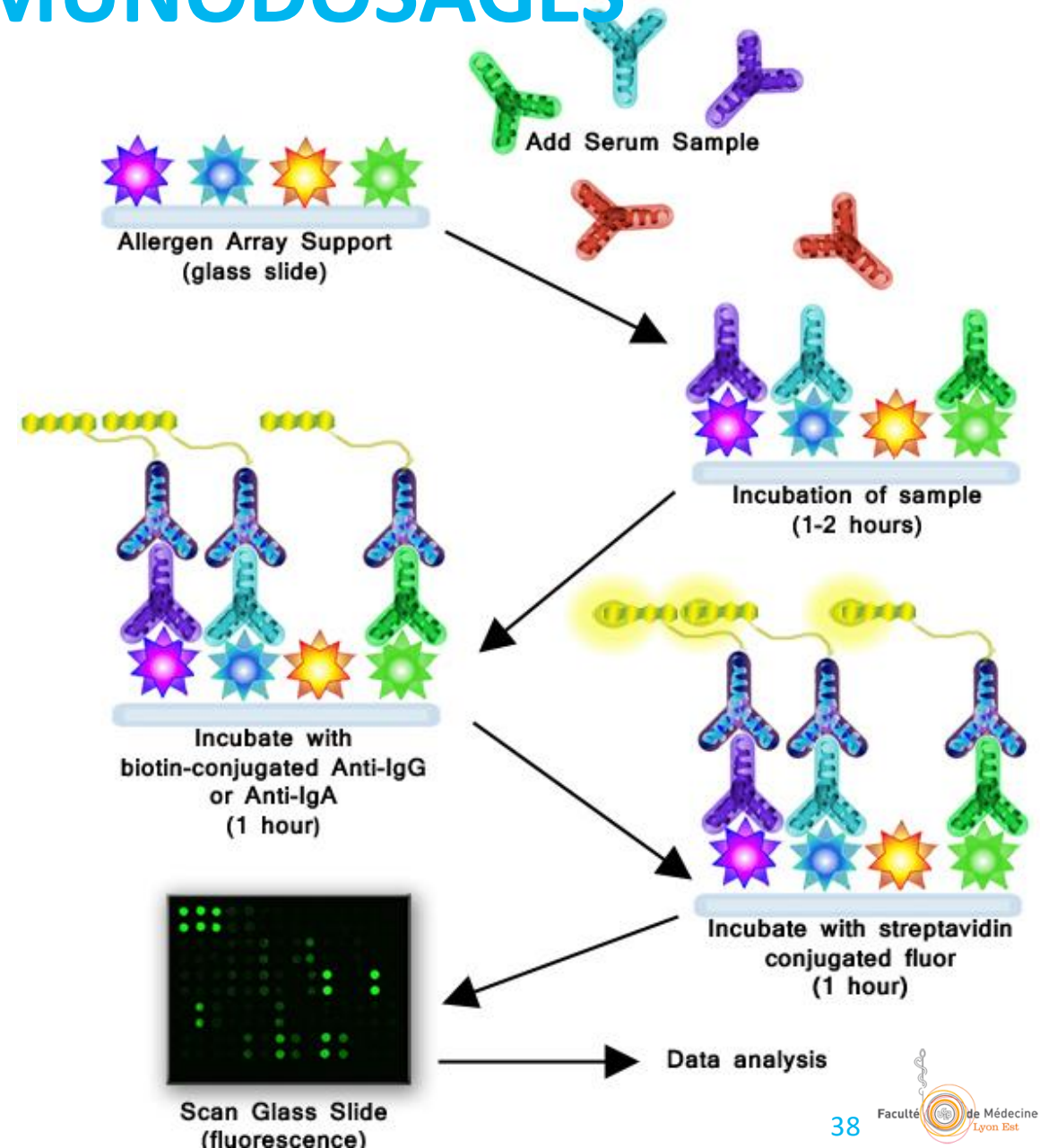
Si le patient est allergique

⇨ présence d'**Ac sériques**

⇨ capture

⇨ signal

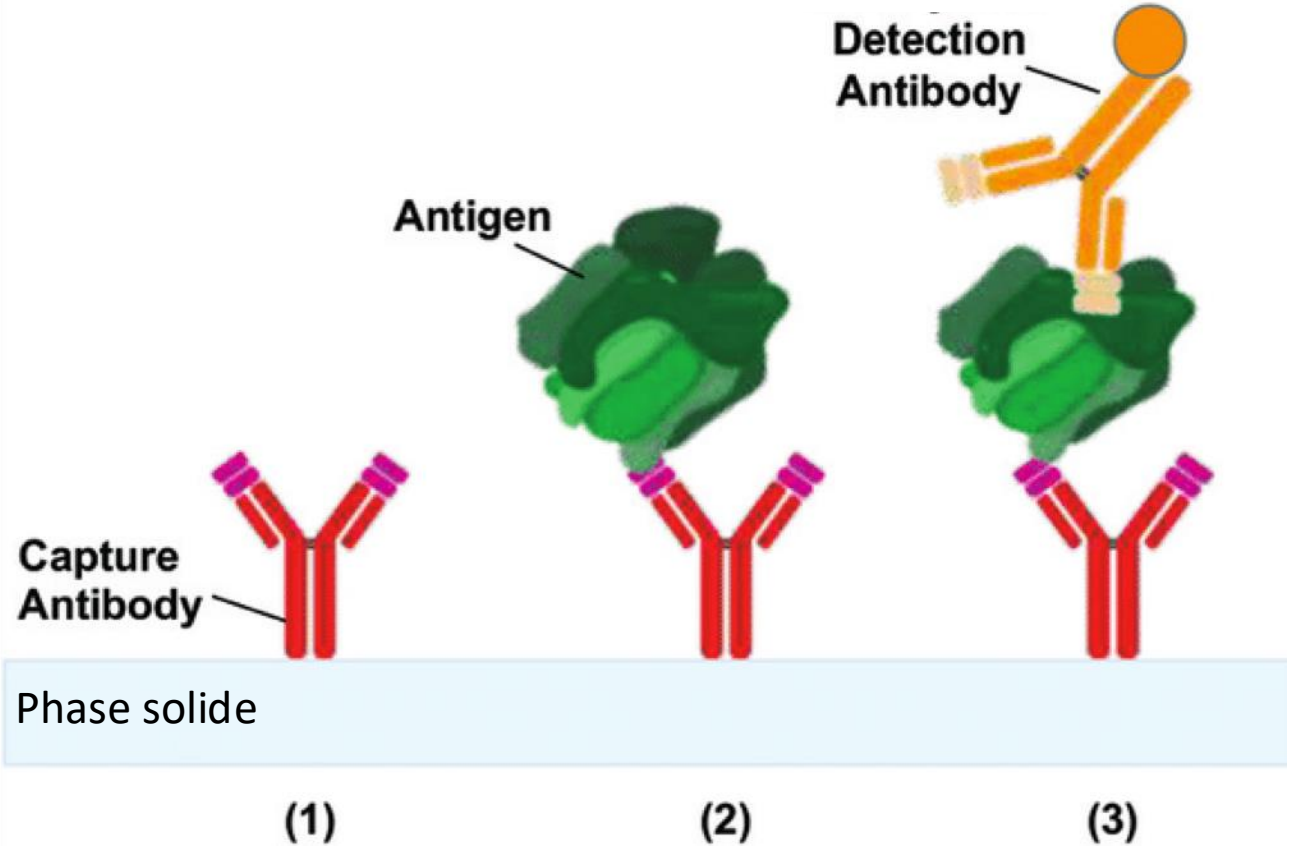
⇨ **Identification de/des l'allergène(s)**



2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **Immunométrie sandwich**

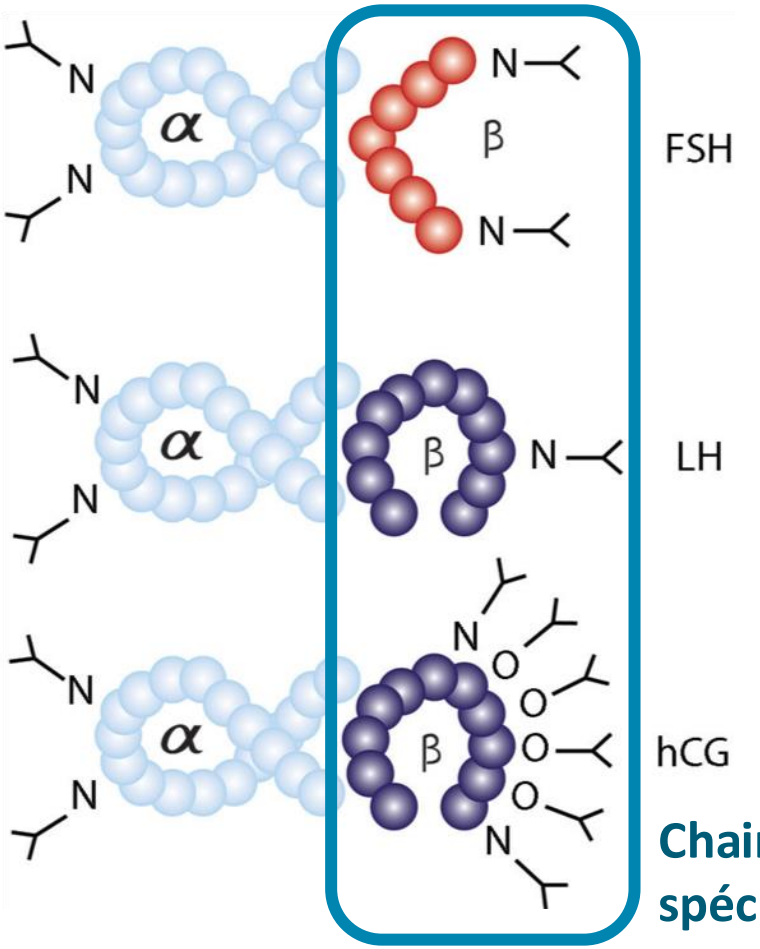
  ⇨ reconnaissance de 2 épitopes

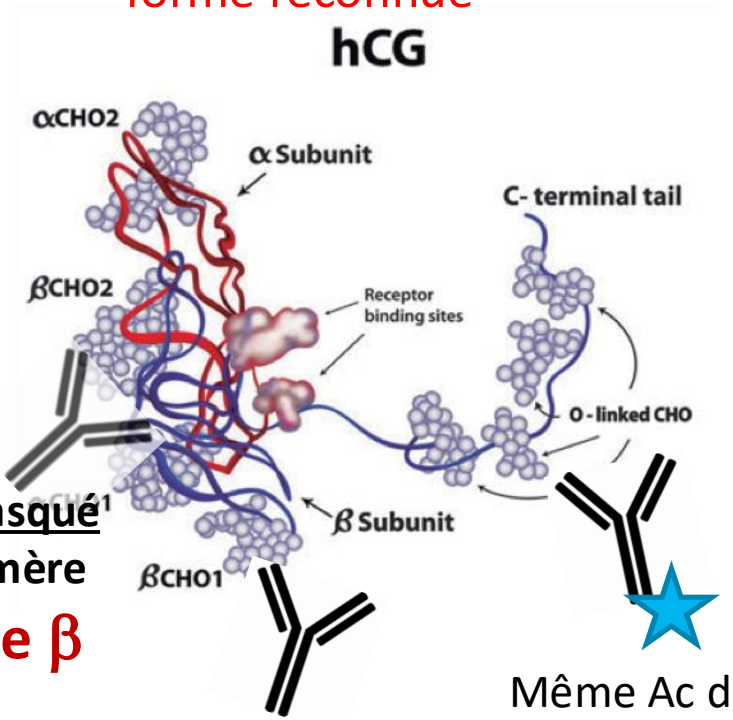


2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **Ex : dosage de l'HCG (grossesse) et de la chaine β libre (cancer)**

La spécificité de l'Ac de capture définit la forme reconnue





Epitope masqué dans le dimère

⇨ chaine β libre

Epitope exposé dans le dimère α-β

⇨ HCG totale

Même Ac de détection

Posez vos questions pendant le cours



1. Allez sur wooclap.com
2. Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement

GBRATU

Evaluez-vous !



1. Allez sur wooclap.com
2. Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement

GBRATU