



PROTÉINES :
Méthodes d'exploration

Pr Jonathan LOPEZ

1

Posez vos questions pendant le cours



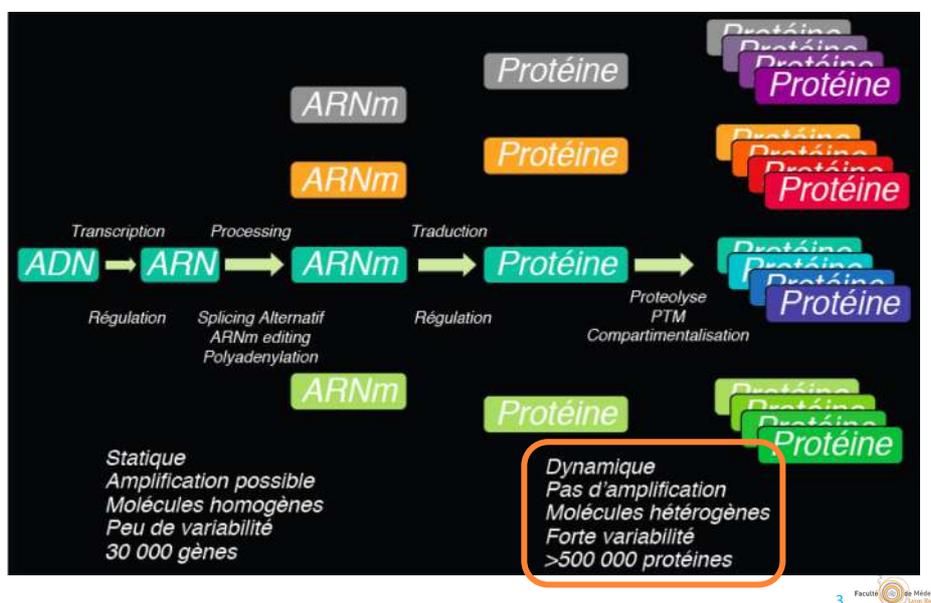
- 1 Allez sur wooclap.com
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement
GBRATU



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

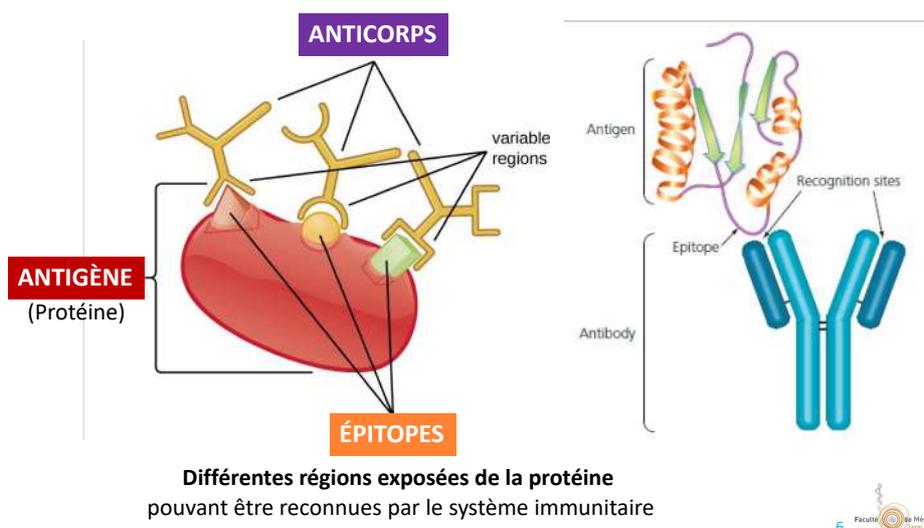
0 Plan

- 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

Antigen Binding Site

Antigen

Recognition sites

Epitope

Antibody

— Light Chains
— Heavy Chains

■ Variable Region
■ F(ab)₂ 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

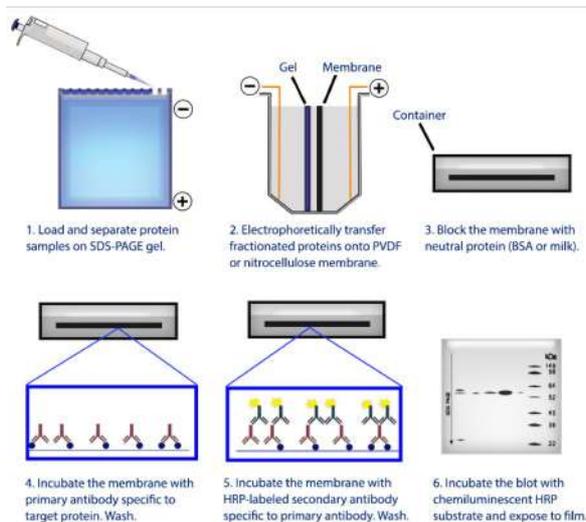
8 Faculté de Médecine Tunis

8

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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

- SDS-PAGE
- Transfert
- Révélation

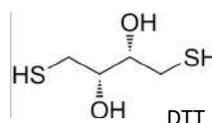
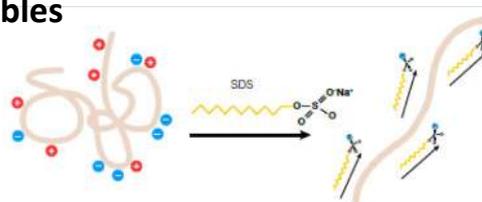


9

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)

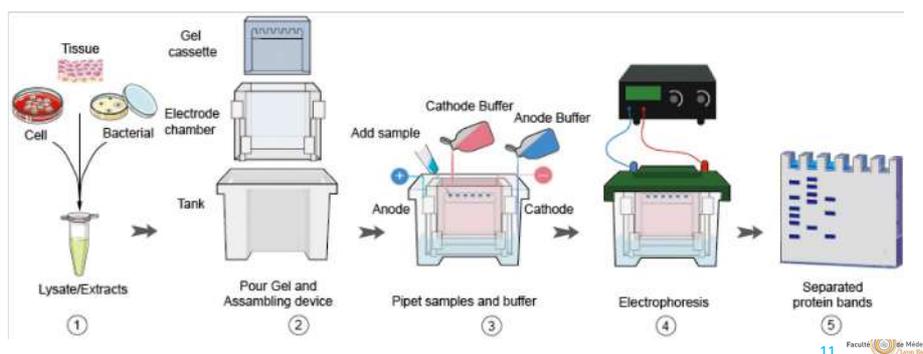
10

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)

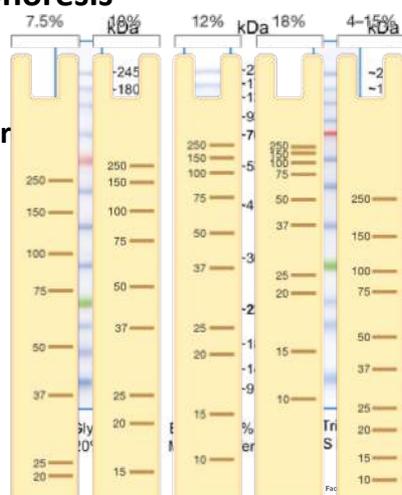
■ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

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

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

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

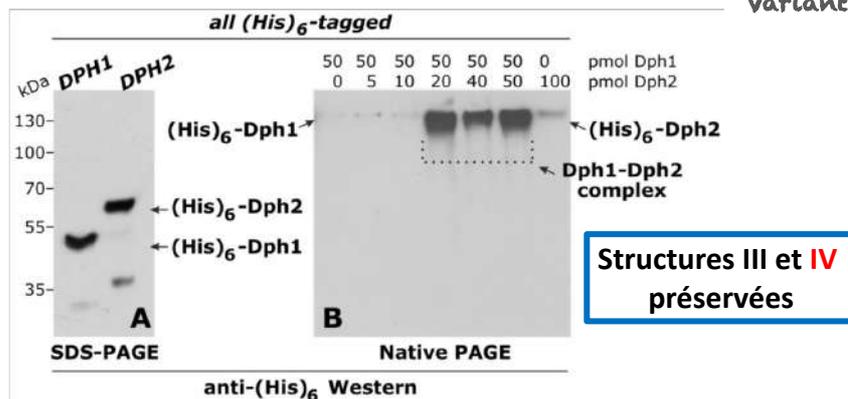
$$\Leftrightarrow 300 \text{ AA} \leftrightarrow 33\text{kDa} (=300*0,11)$$



12

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

■ Electrophorèse non dénaturante = native



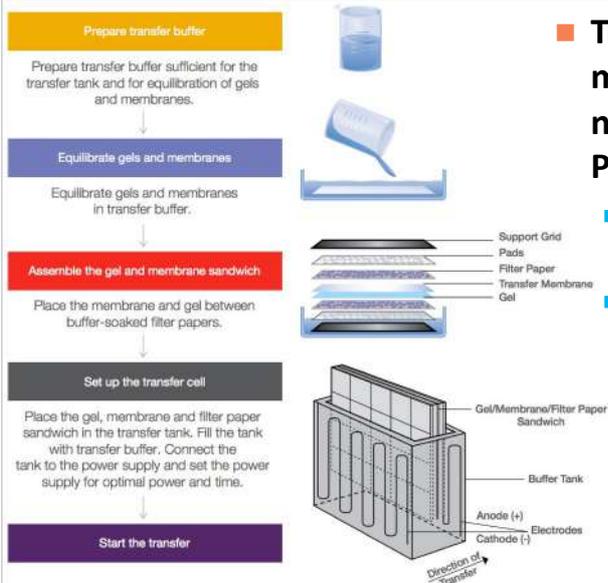
⇨ séparation = f(taille; charge; forme; etc)

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

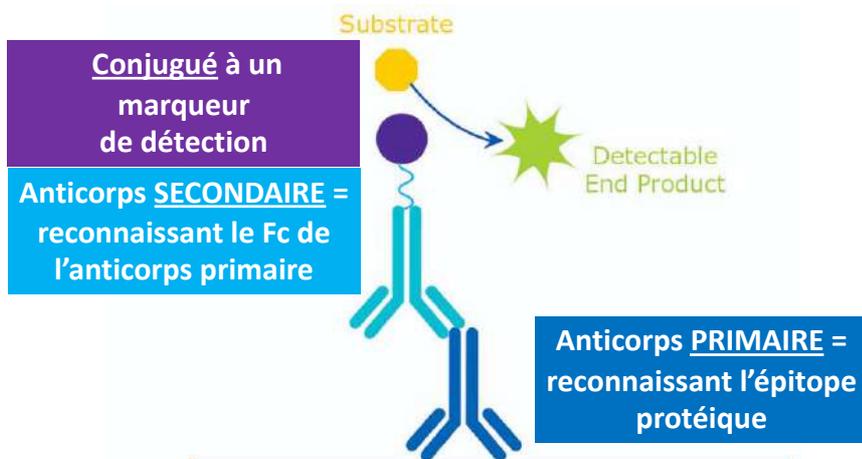
- Saturation des sites nons spécifiques par de la BSA ou du lait
- Incubation avec l'Ac I
- Lavages
- Incubation avec l'Ac II
- Lavages
- Révélation



15

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

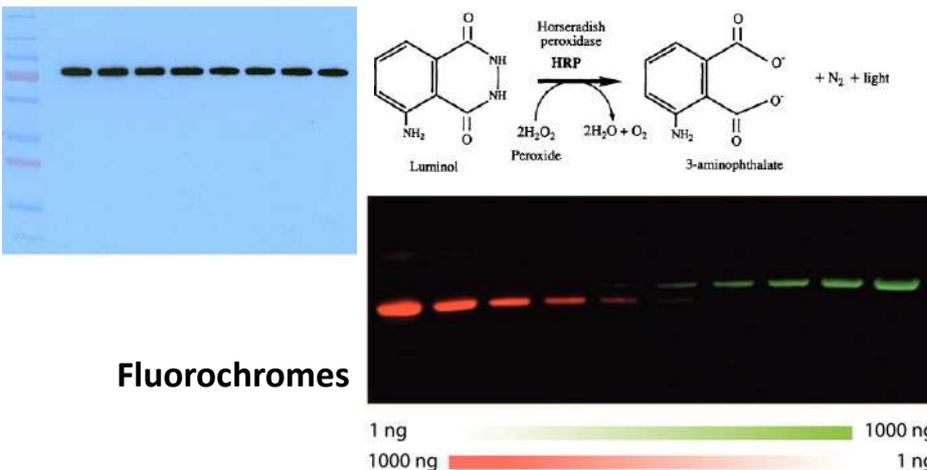
■ Détection d'une protéine immobilisée sur une membrane par un anticorps



16

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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



The diagram illustrates the detection of a protein immobilized on a membrane using an antibody. On the left, a Western blot shows a single band of protein. On the right, a chemical reaction shows the oxidation of luminol by horseradish peroxidase (HRP) in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), producing 3-aminophthalate, water, and oxygen. The reaction is: $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{HRP}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. The resulting 3-aminophthalate is then oxidized to 3-aminophthalate, which emits light (N₂ + light). Below the reaction, a color scale indicates the intensity of the signal, ranging from 1 ng (red) to 1000 ng (green).

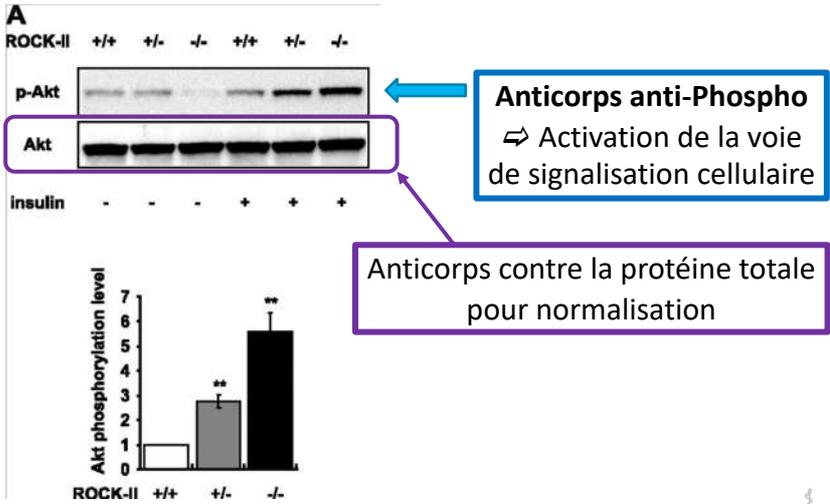
Fluorochromes

1 ng 1000 ng

17

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

■ **Détection de protéines modifiées**



The Western blot (A) shows the detection of p-Akt and total Akt in ROCK-II genotypes (+/+, +/-, -/-) with and without insulin treatment. The p-Akt band is highlighted with a blue box and labeled "Anticorps anti-Phospho" with the note "Activation de la voie de signalisation cellulaire". The total Akt band is highlighted with a purple box and labeled "Anticorps contre la protéine totale pour normalisation". The bar graph below shows the Akt phosphorylation level, which increases significantly in the -/- genotype with insulin treatment (p < 0.01).

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

Akt phosphorylation level

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

18

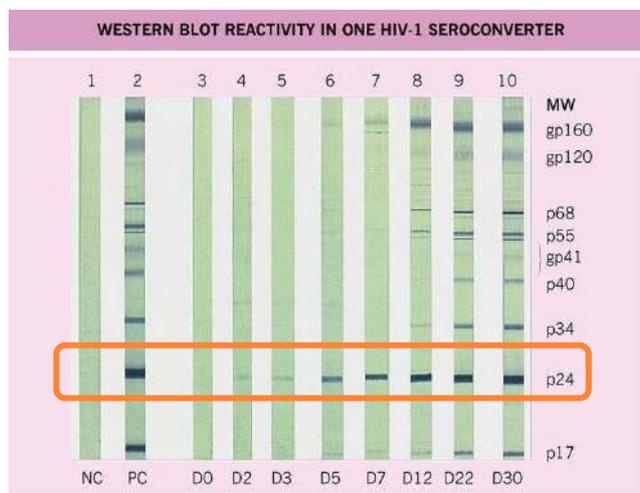
Noquchi et al. JBC. 2007

18 Faculté de Médecine Université de Moncton

18

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

■ Application clinique : séroconversion HIV



19

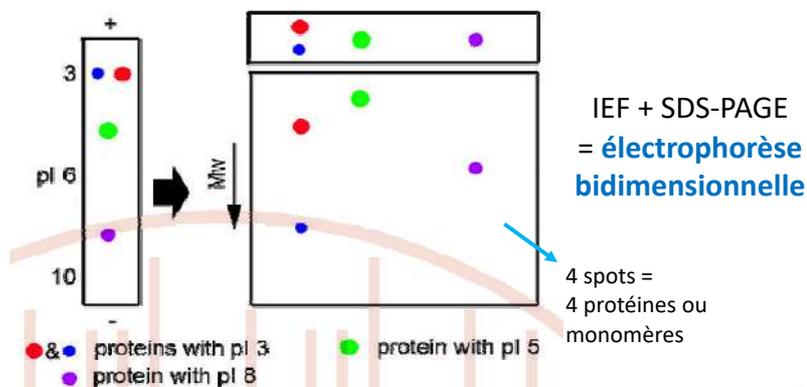
2 Qualitatives : Electrophorèse 2D



- 1^{ère} dim. ⇨ focalisation isoélectrique = f(charge)
- 2^{de} dim. ⇨ SDS-PAGE = f(masse)

(1) IEF using IPG strip

(2) SDS-PAGE



20

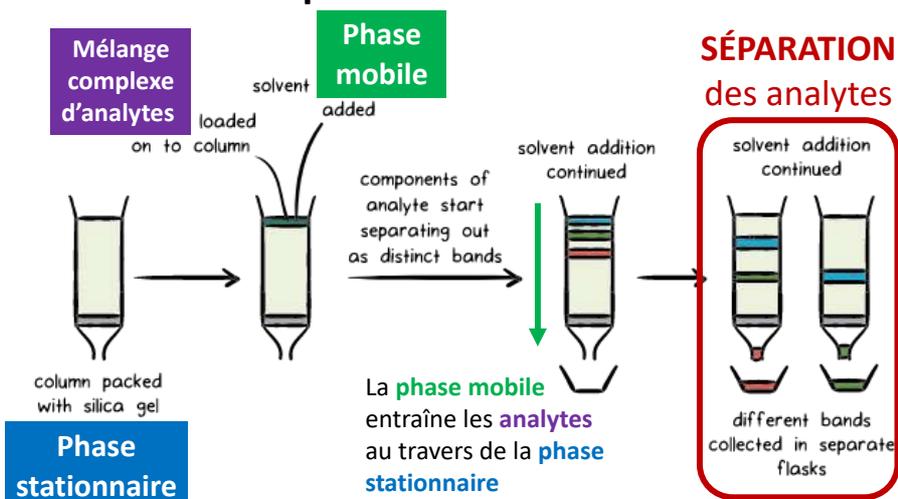
0 Plan

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

21

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

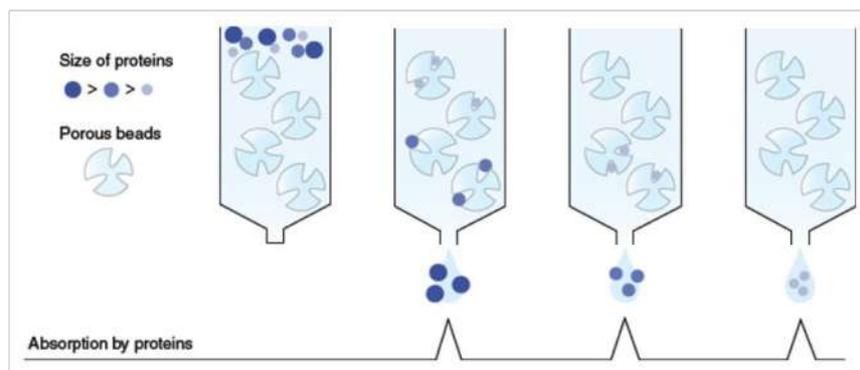
■ Méthode séparative



22

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

■ Gel filtration \Leftrightarrow f(taille)



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

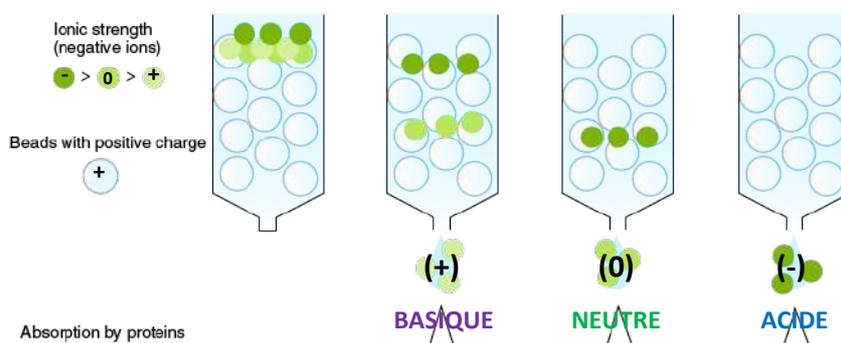
Ordre d'éluion : MW les + élevés vers MW les + faibles

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

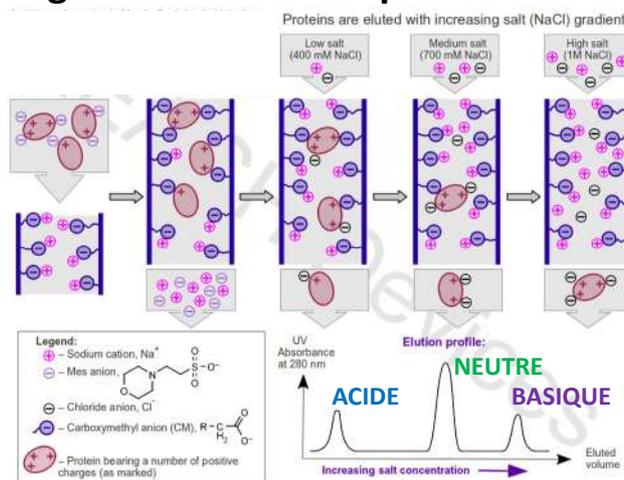
Ordre d'éluion : pHi les + élevés vers pHi les + faibles

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

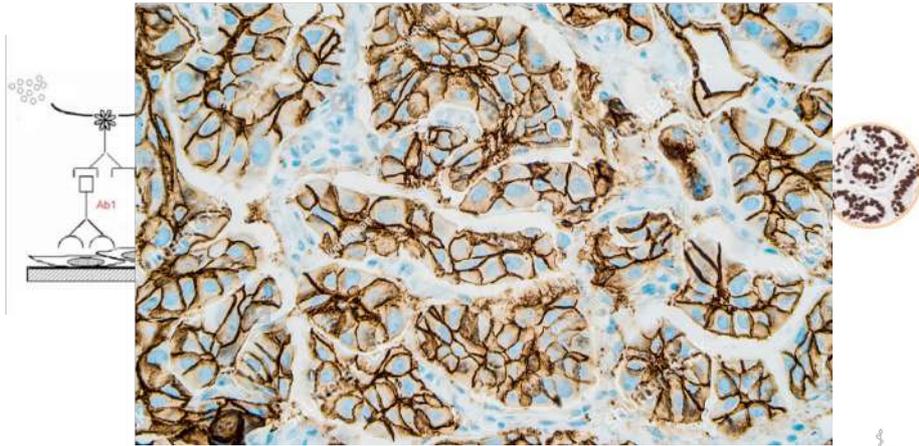
- Analyses qualitatives
 - Western blot
 - Chromatographie
 - In situ (IHC, IF)
- Analyses quantitatives



26

1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- Directement sur le tissu après perméabilisation et démasquage antigénique



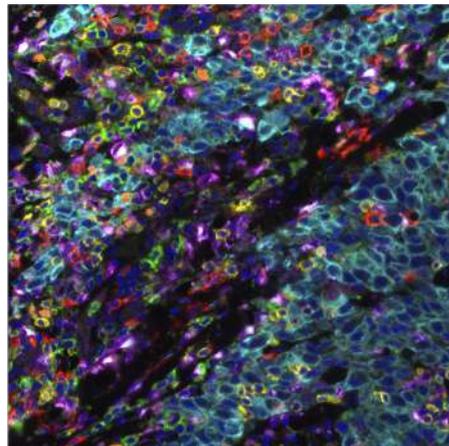
27 Faculté de Médecine
Université de Moncton

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), CD8α (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
- 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

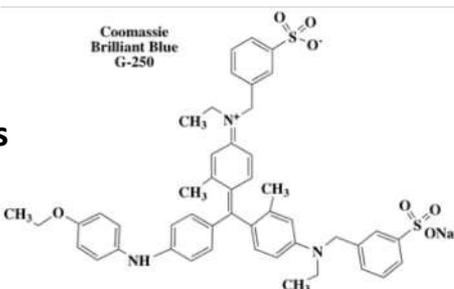
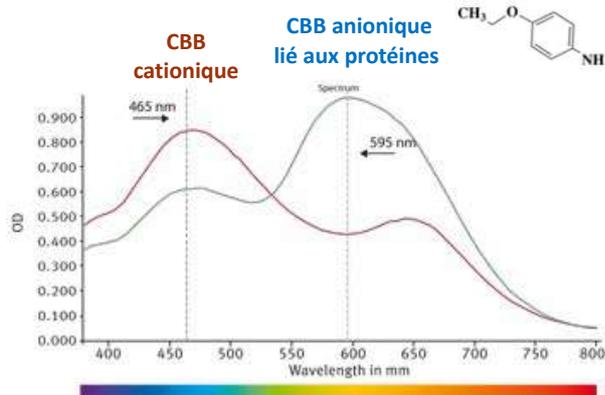
30 

30

2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

■ Réaction de Bradford

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



E. Jaspard (2012)



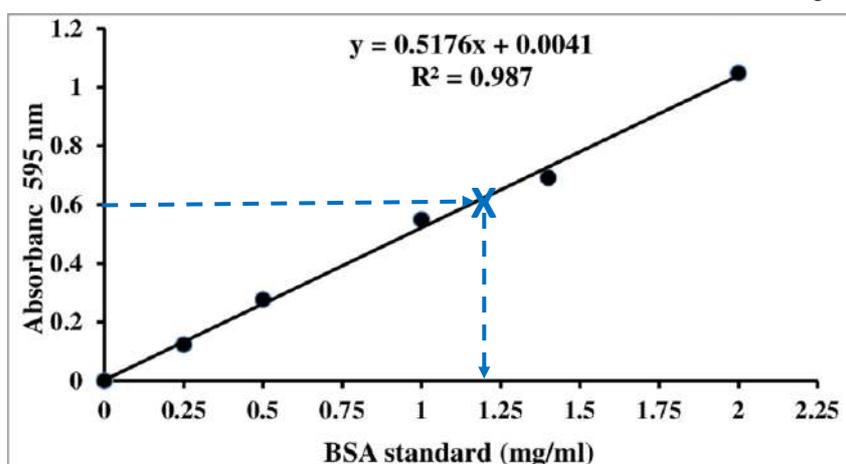
31 Faculté de Médecine

31

2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

■ Réaction de Bradford

Courbe d'étalonnage



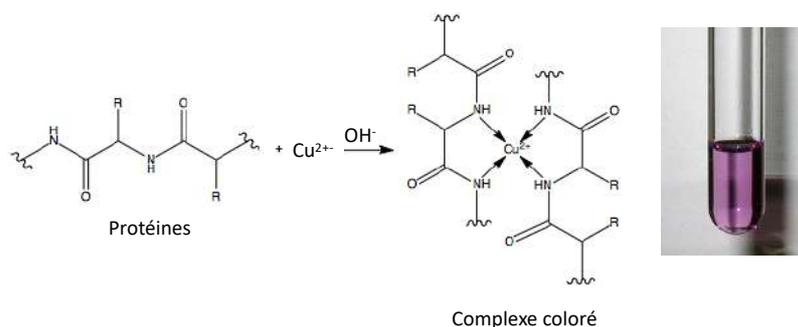
32 Faculté de Médecine

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

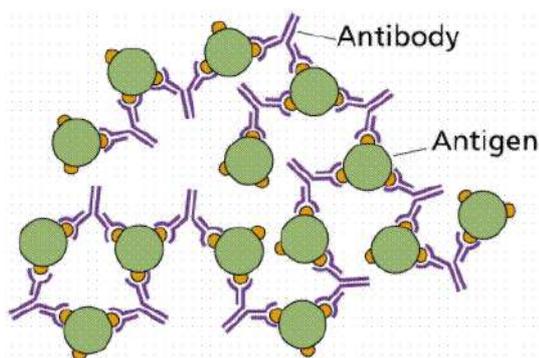
- Analyses qualitatives
- Analyses quantitatives
 - Dosage des protéines totales
 - Immunodosages

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

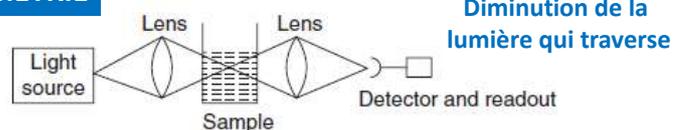
35

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

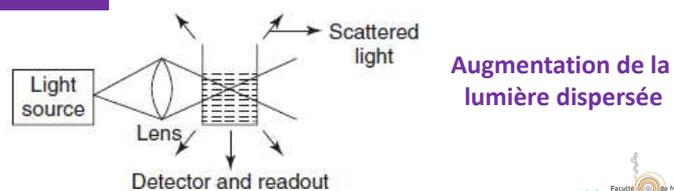
■ Dosage de protéines spécifiques en solution

- 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)

DIRECT ELISA
Signal=f(conc. Ag)

INDIRECT ELISA
Signal=f(conc. Ag)
ou =f(conc. Ac)

SANDWICH ELISA
Signal=f(conc. Ag)

37 Faculté de Médecine

37

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

■ Ex: Allergies

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

38 Faculté de Médecine

38

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

■ Immunométrie sandwich
 ⇒ reconnaissance de 2 épitopes

The diagram illustrates the sandwich assay process in three steps: (1) A Y-shaped red antibody (Capture Antibody) is immobilized on a light blue 'Phase solide' (solid phase). (2) A green, multi-lobed 'Antigen' binds to the Y-shaped antibody. (3) An orange Y-shaped antibody (Detection Antibody) 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 β libre (cancer)

The diagram compares the structure of three glycoprotein hormones: FSH, LH, and hCG. Each hormone consists of two α subunits (light blue) and one β subunit (red for FSH, purple for LH and hCG). The hCG subunit is further divided into β CHO1 and β CHO2. Labels include 'FSH', 'LH', 'hCG', ' α Subunit', ' β Subunit', ' α CHO2', ' β CHO2', ' β CHO1', 'Receptor binding sites', 'C-terminal tail', and 'O-linked CHO'. A blue star highlights the 'Même Ac de détection' (same detection antibody) site on the β subunit. Text annotations include: 'Epitope masqué dans le dimère ⇒ chaîne β libre' (masked epitope in the dimer ⇒ free β chain) and 'Epitope exposé dans le dimère α - β ⇒ HCG totale' (exposed epitope in the α - β dimer ⇒ total HCG). A blue box highlights the β subunit of hCG with the text 'Chaîne β spécifique' (specific β chain).

40 Faculté de Médecine

40

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

41 

41

Evaluez-vous !



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

Code d'événement
GBRATU

42 

42