PROTÉINES :
Méthodes d'exploration

Pr Jonathan LOPEZ

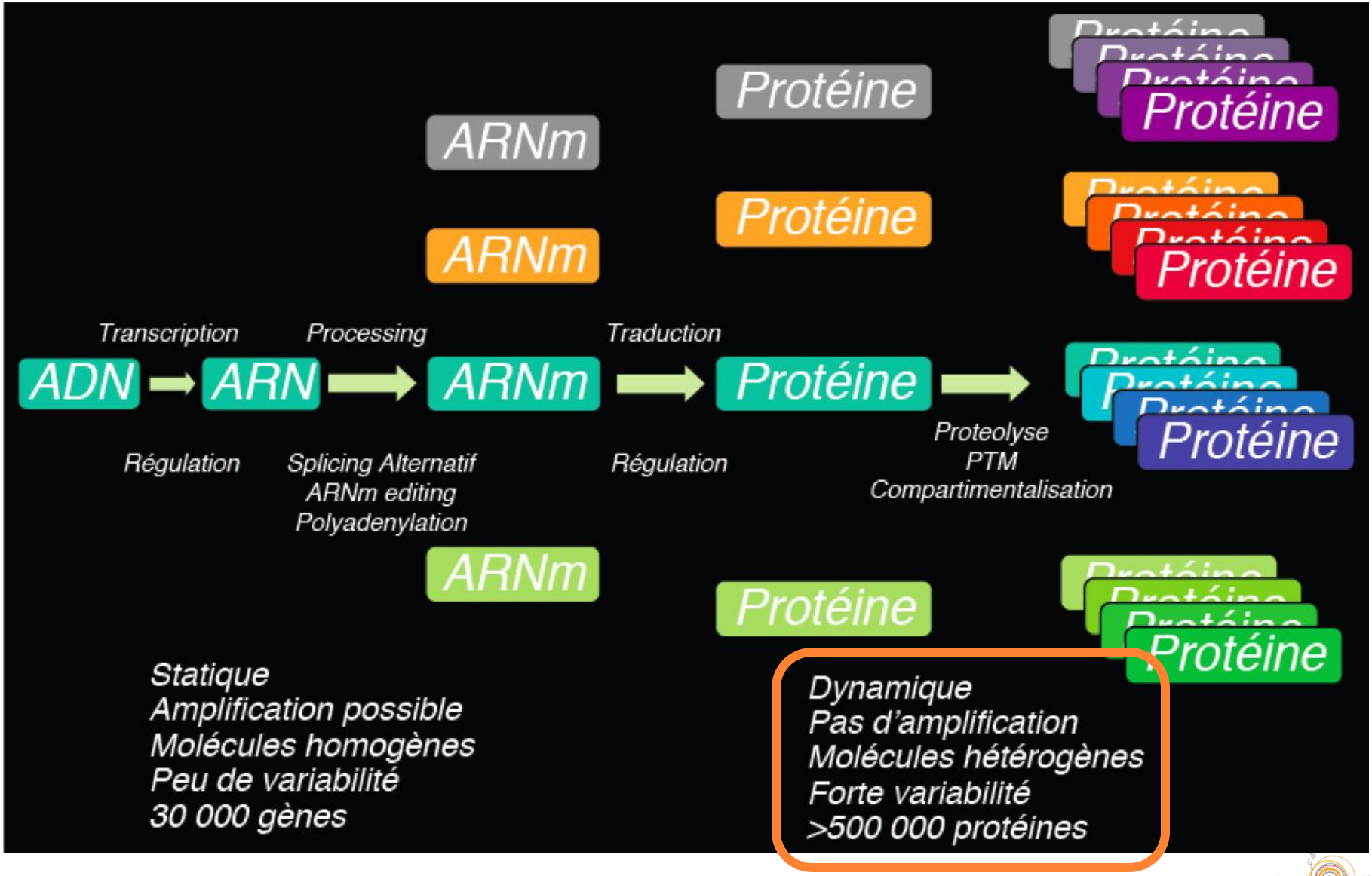
Posez vos questions pendant le cours

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
ARNm
Protéine
ARNm
Protéine
ARNm
Protéine
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

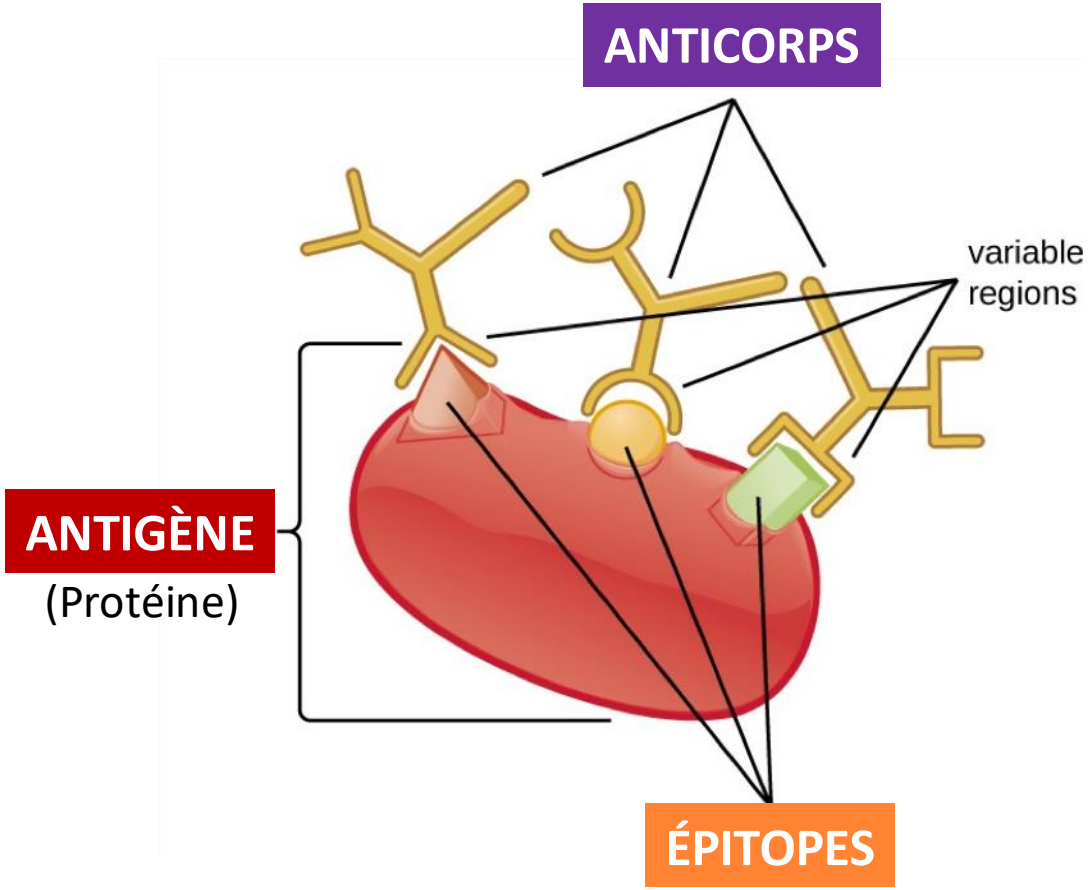
0 Plan

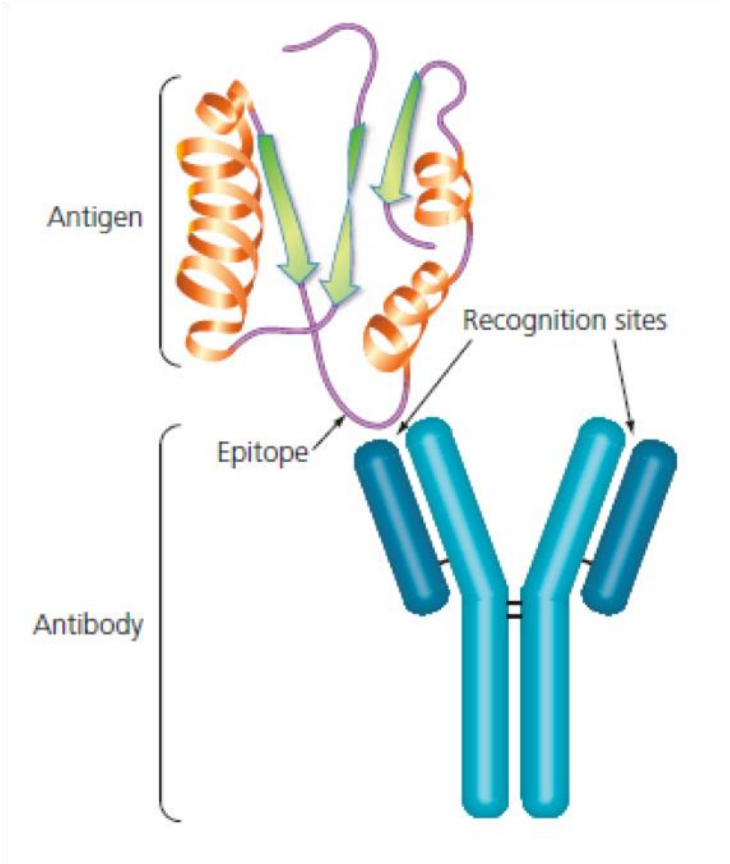
- **Analyses qualitatives**
  - **Western blot**
  - **Chromatographie**
  - **In situ (IHC, IF)**
- **Analyses quantitatives**

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Antigène, épitopes et anticorps

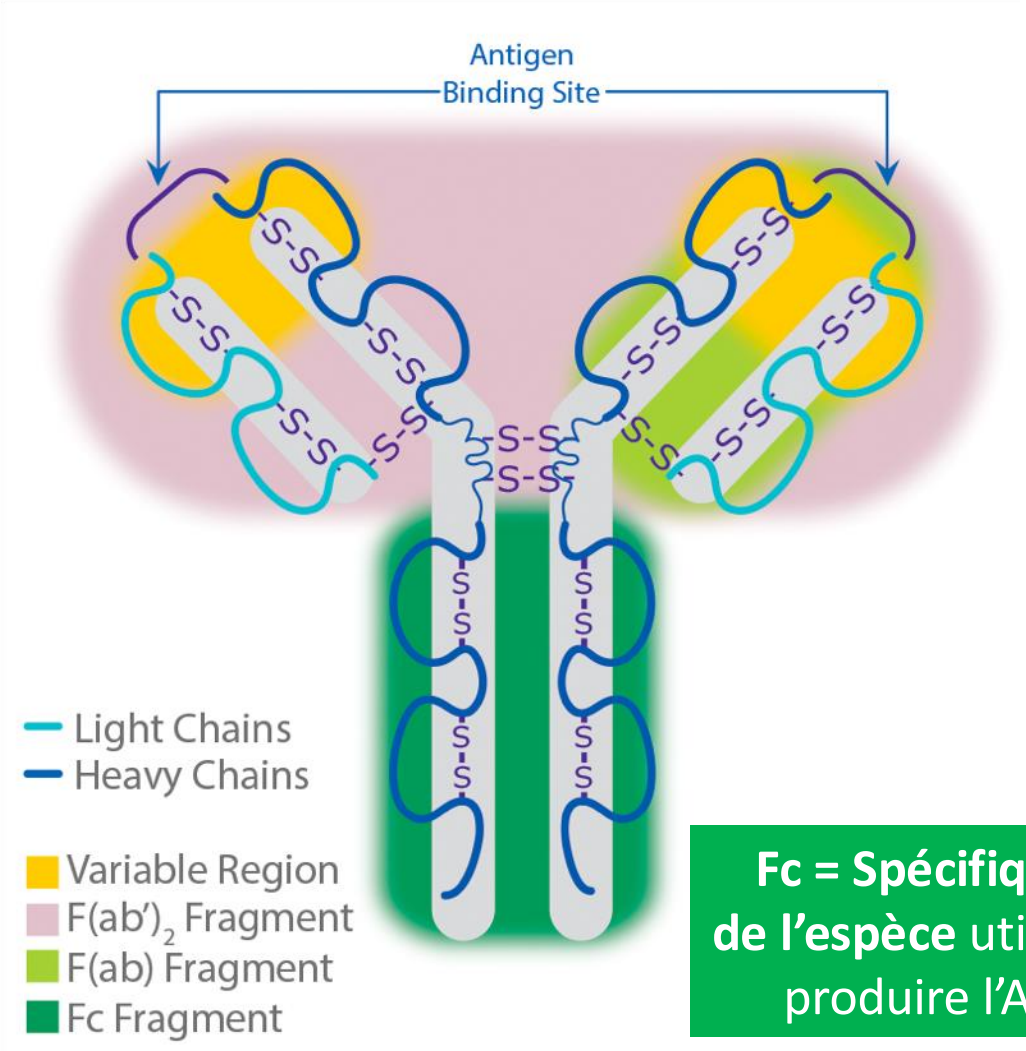


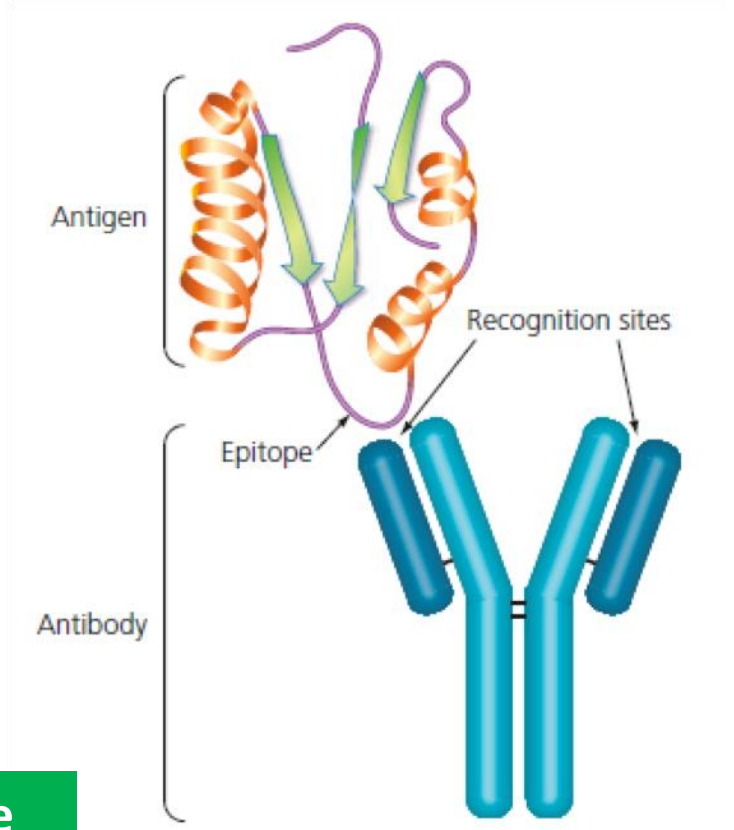


Différentes régions exposées de la protéine
pouvant être reconnues par le système immunitaire

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Antigène, épitopes et anticorps

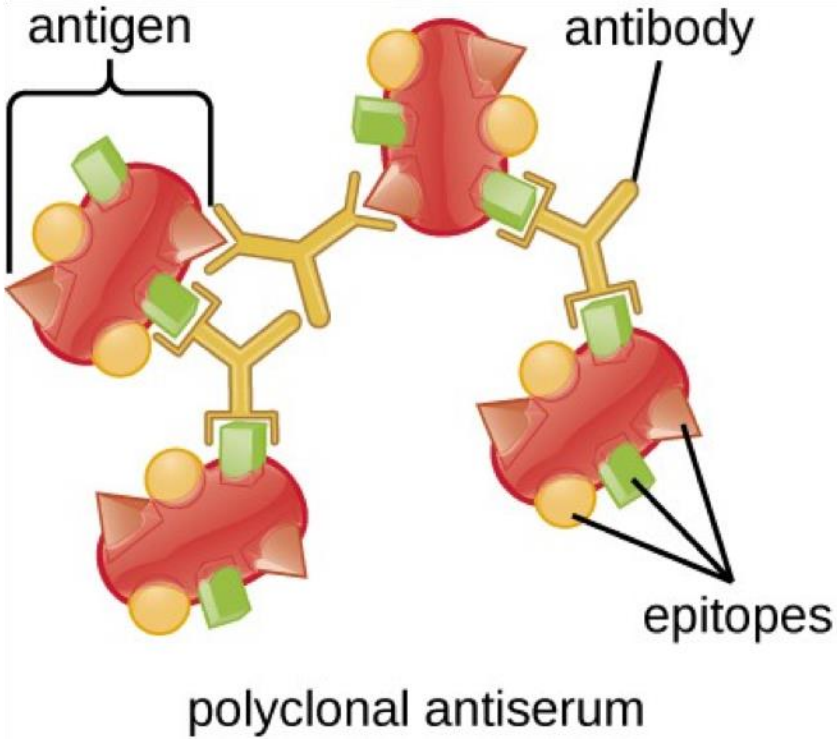


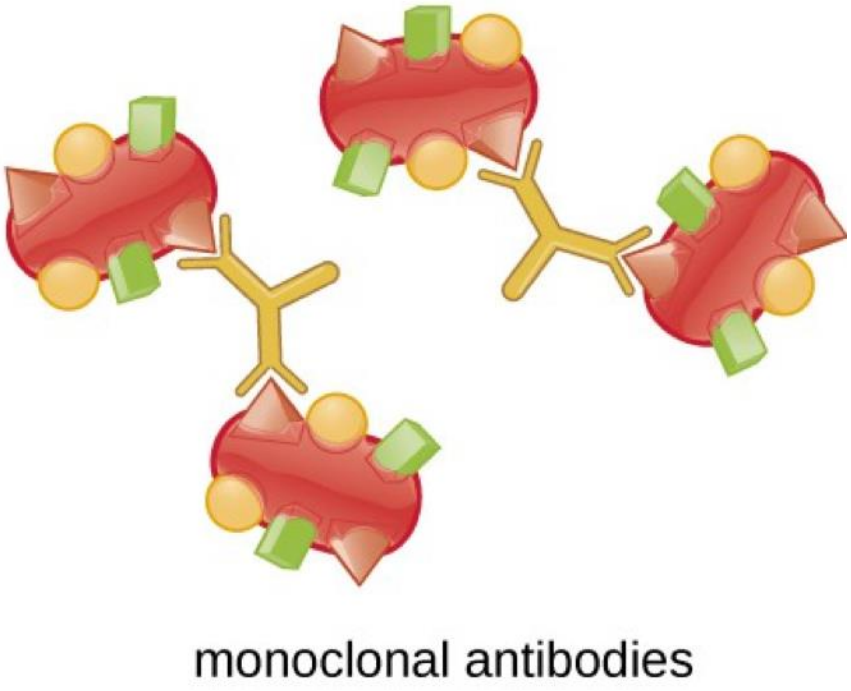


Fc = Spécifique de l'espèce utilisée produire l'Ac

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Anticorps polyclonaux vs monoclonaux





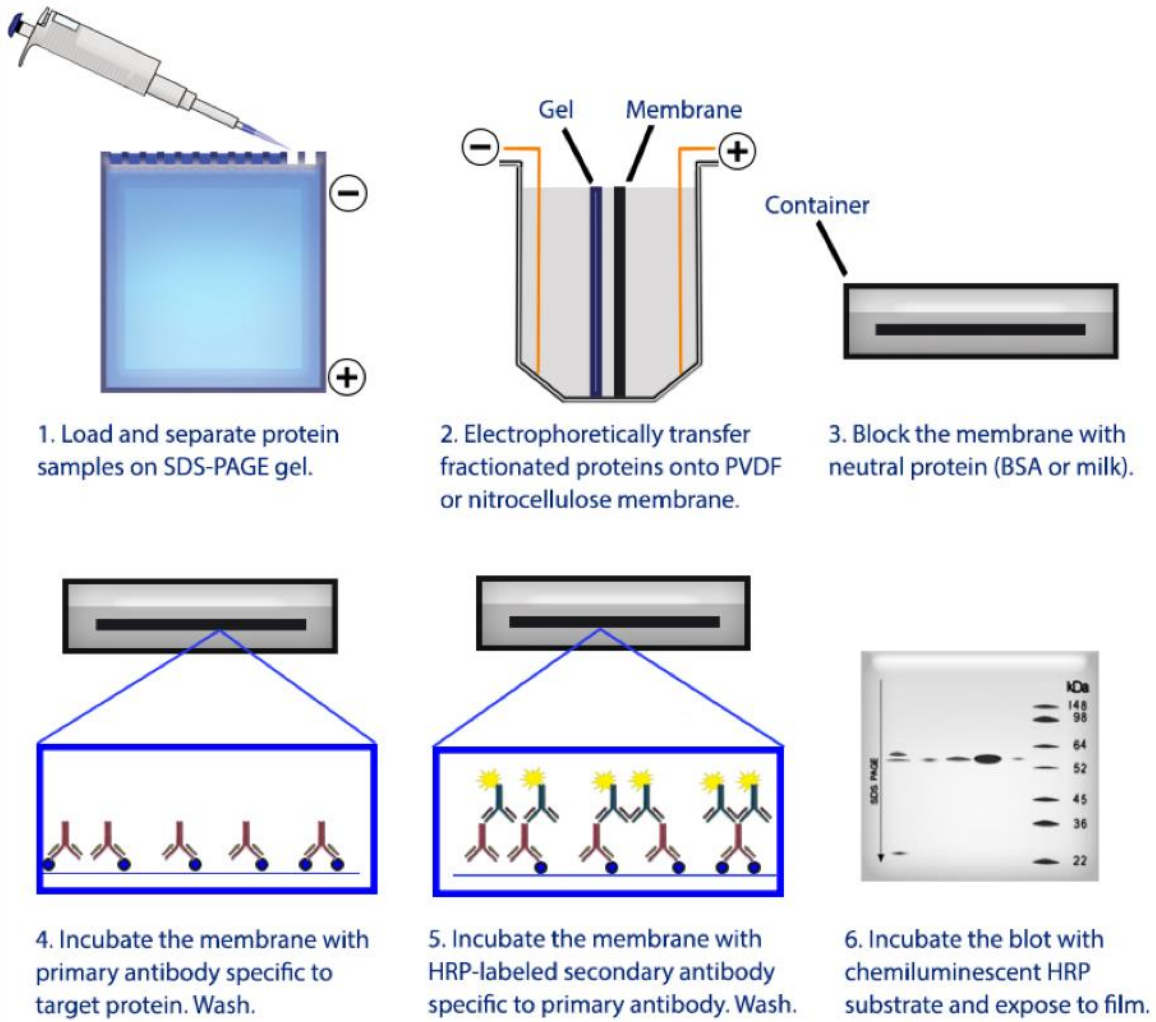
Mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes de la protéine

1 seul type d'anticorps dirigé contre 1 épitope unique

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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

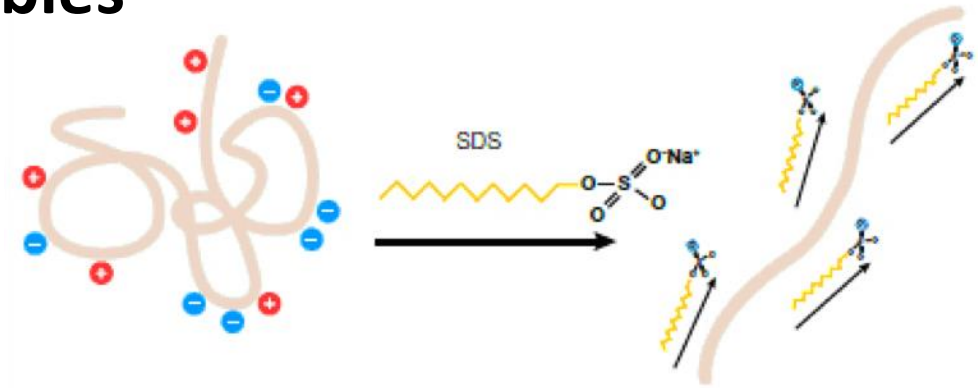


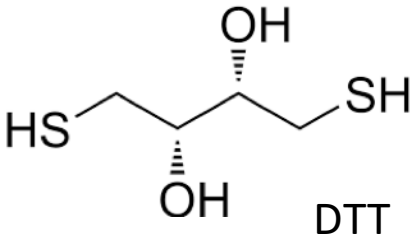
Faculté de Médecine Lyon Est

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**



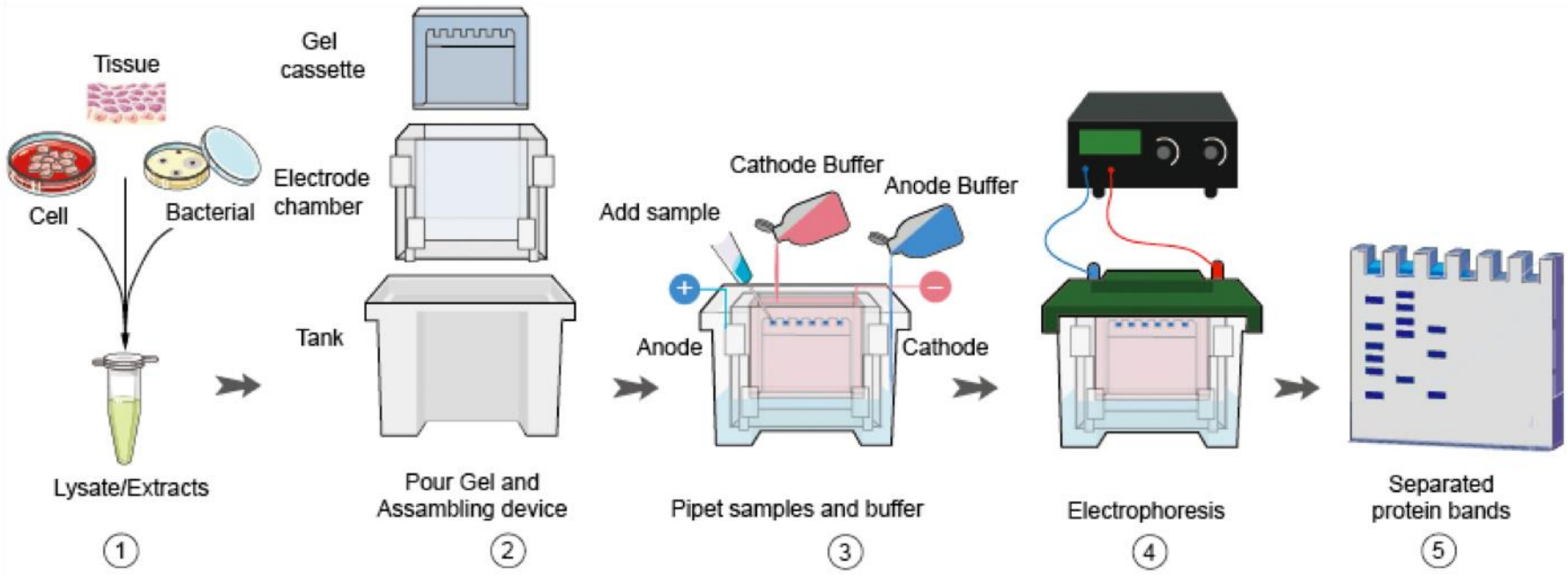


⇨ séparation = f(taille)

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

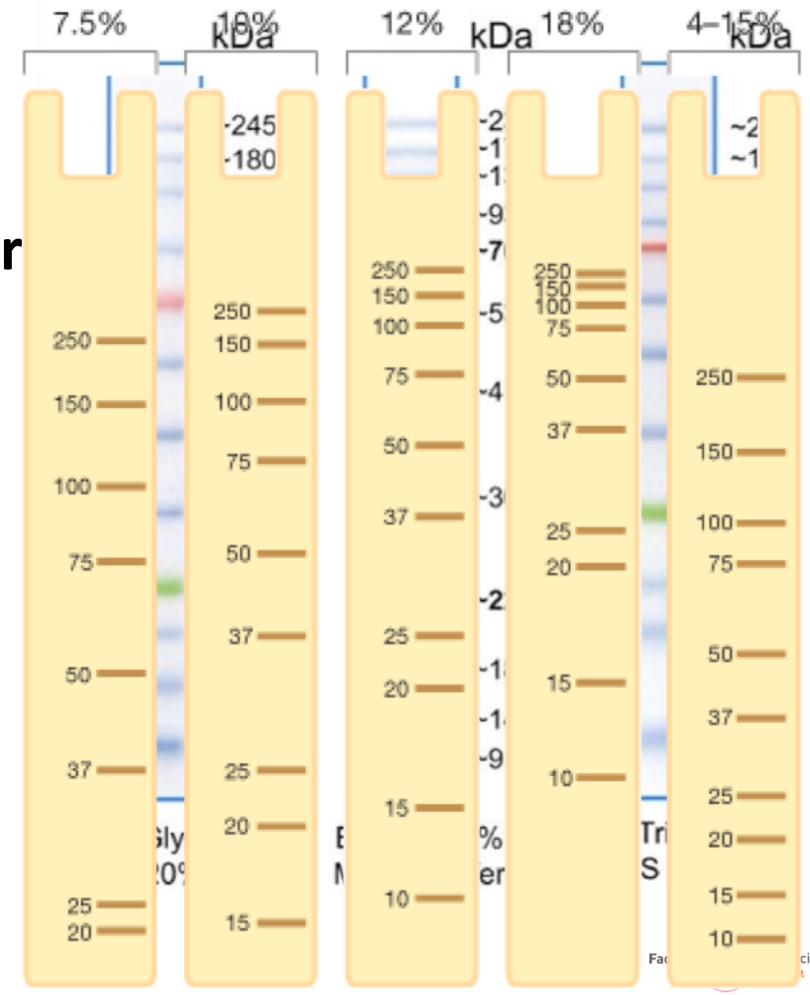
- **Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)**
  - **Polyacrylamide Gel Electrophoresis**
    - **Migration sous l'effet d'un courant (vers le +)**
    - « Filet » de polyacrylamide ⇨ **les + petits migrent + facilement** ⇨ en bas du gel



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

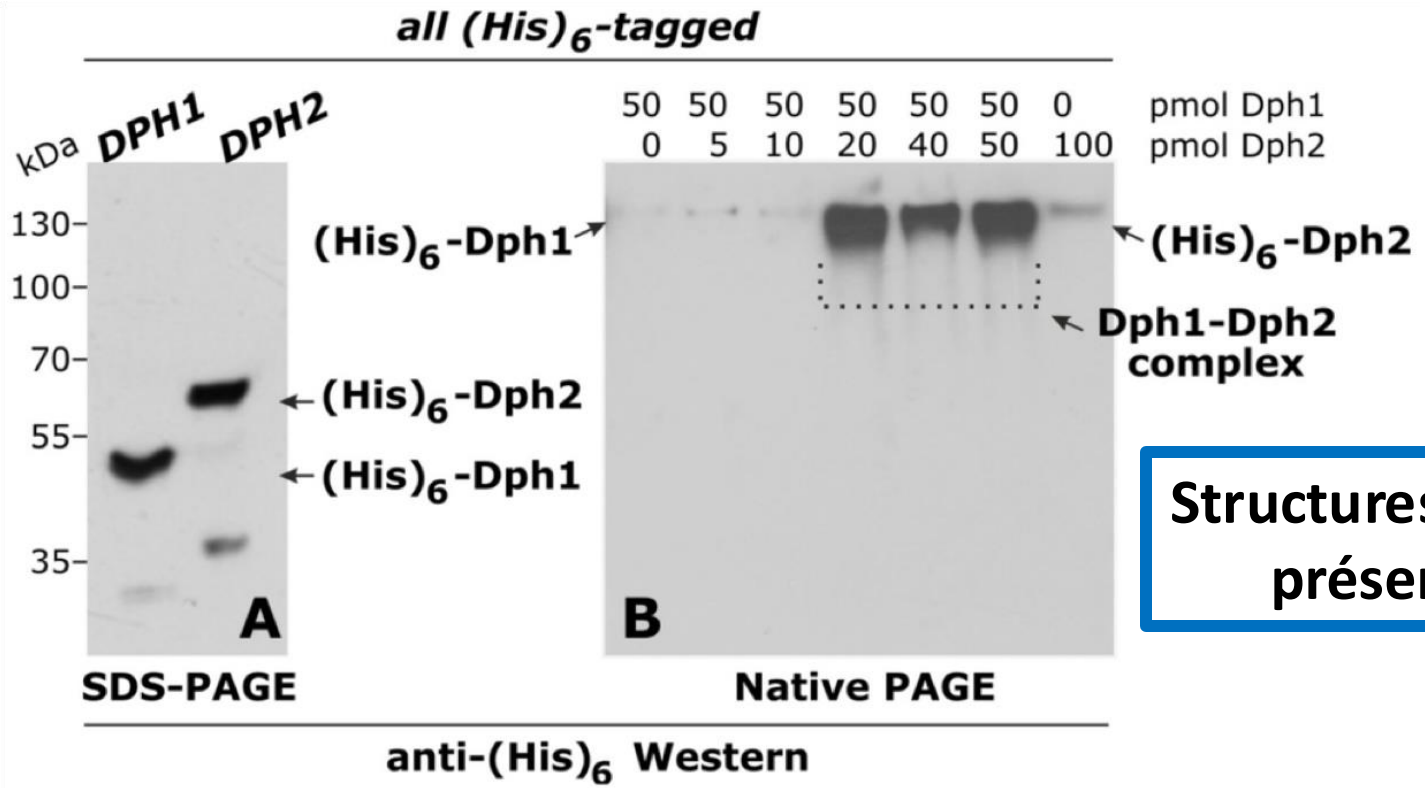
⇨ 22kDa ↔ 200 AA (=22/0,11)

⇨ 300 AA ↔ 33kDa (=300*0,11)

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Variante

- **Electrophorèse non dénaturante = native**



Structures III et IV préservées

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

Faculté de Médecine Lyon Est

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.

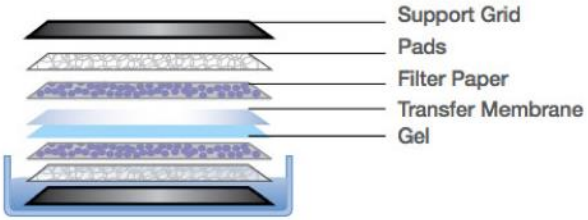
Assemble the gel and membrane sandwich

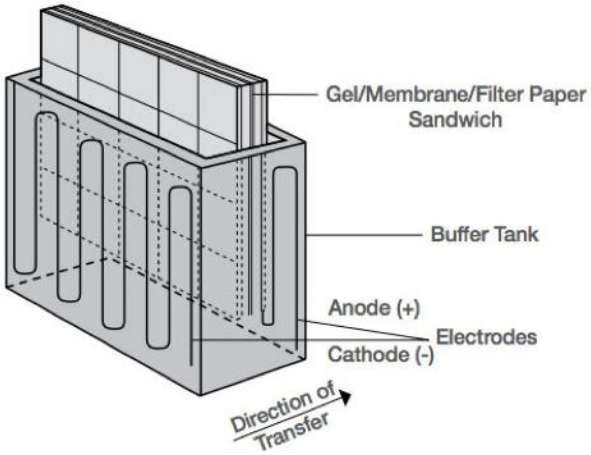
Place the membrane and gel between buffer-soaked filter papers.

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 (+)**

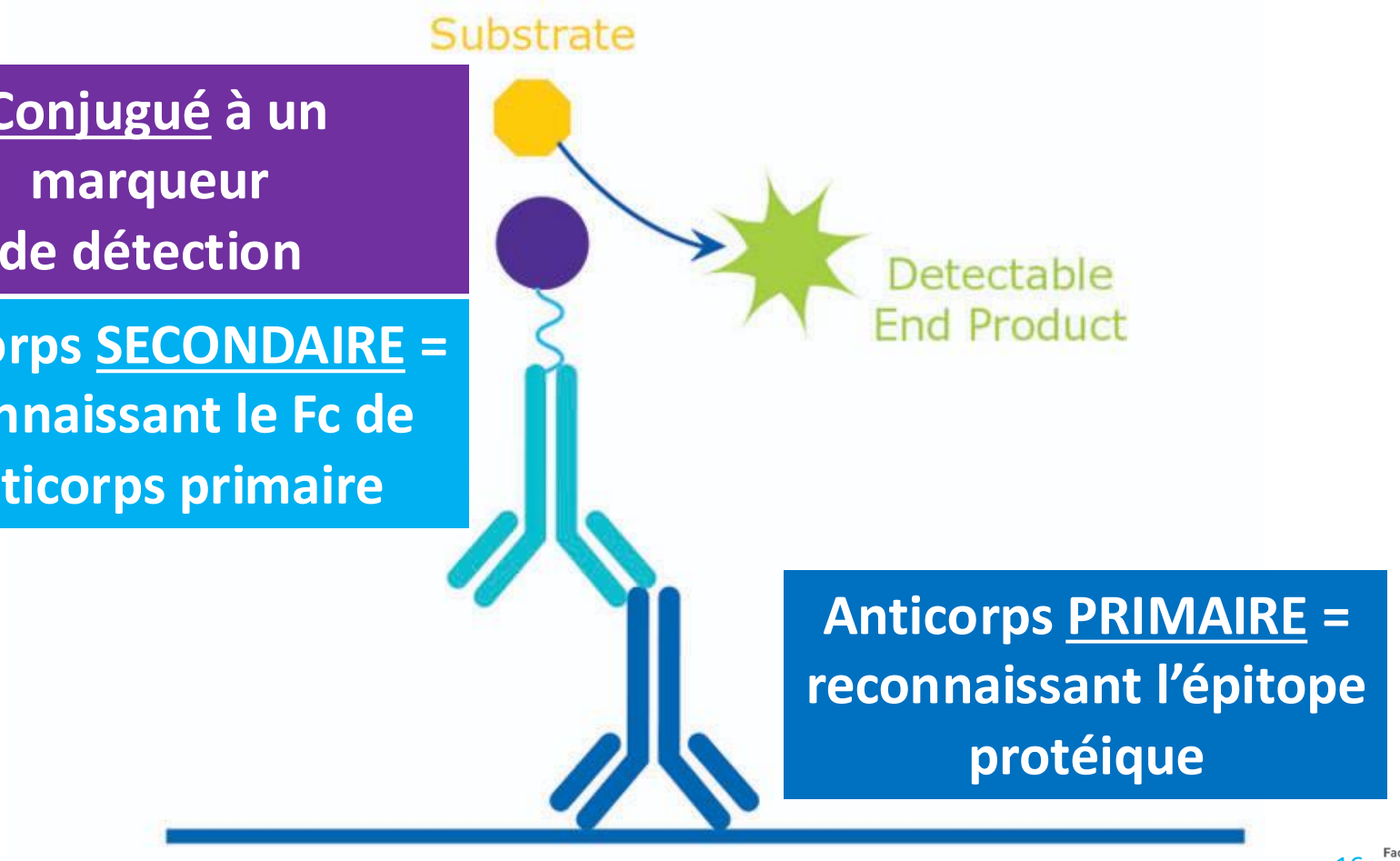
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

- **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**

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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



Conjugué à un marqueur de détection

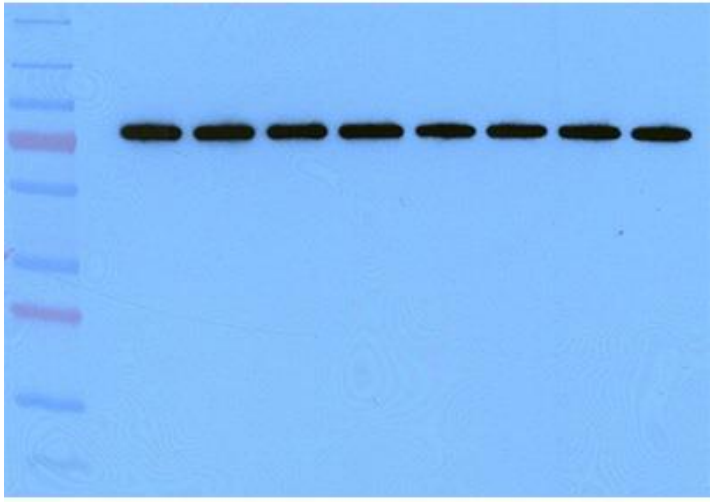
Anticorps SECONDAIRE = reconnaissant le Fc de l'anticorps primaire

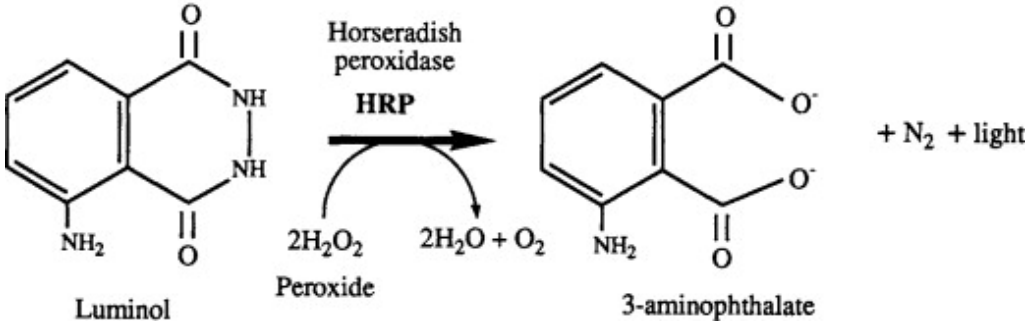
Anticorps PRIMAIRE = reconnaissant l'épitope protéique

Faculté de Médecine Lyon Est

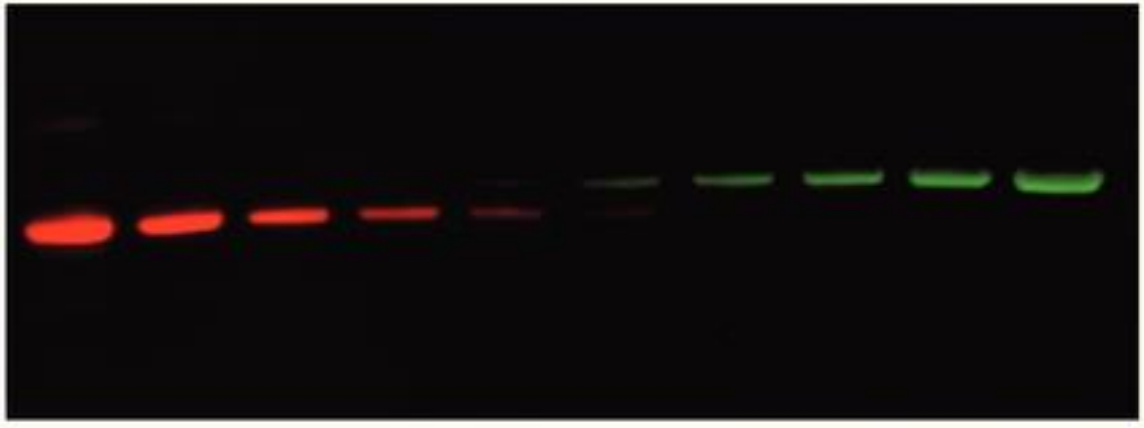
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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





Fluorochromes

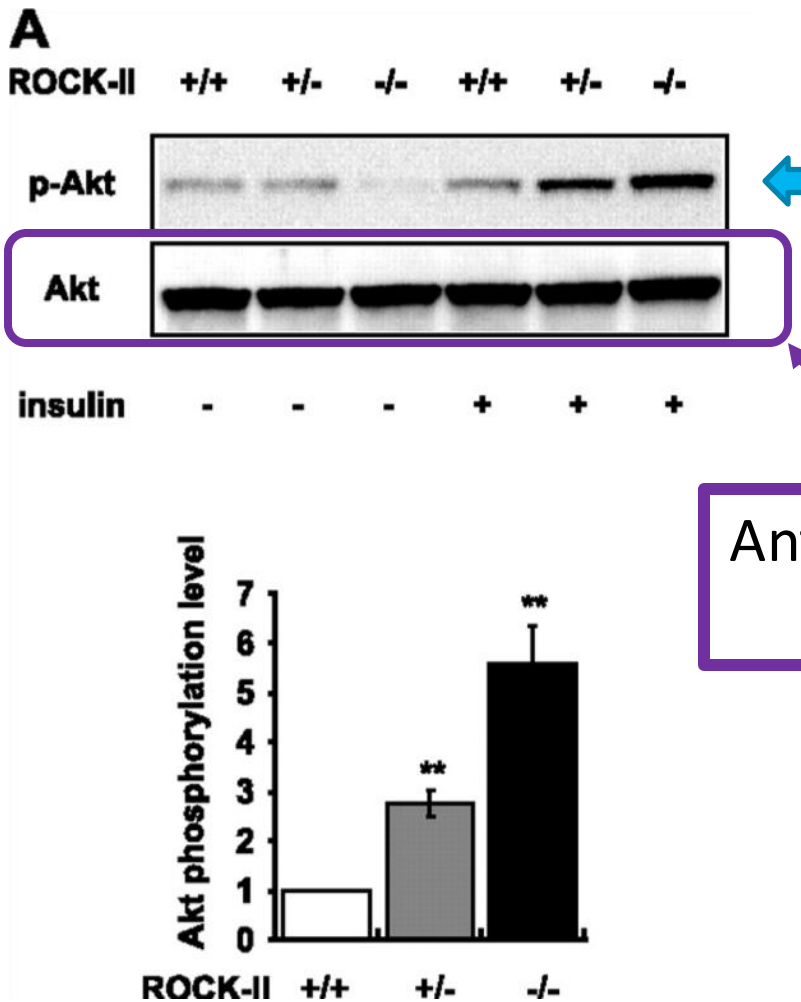


1 ng — 1000 ng

1000 ng — 1 ng

1 Qualitatives : WESTERN BLOT

Détection de protéines modifiées



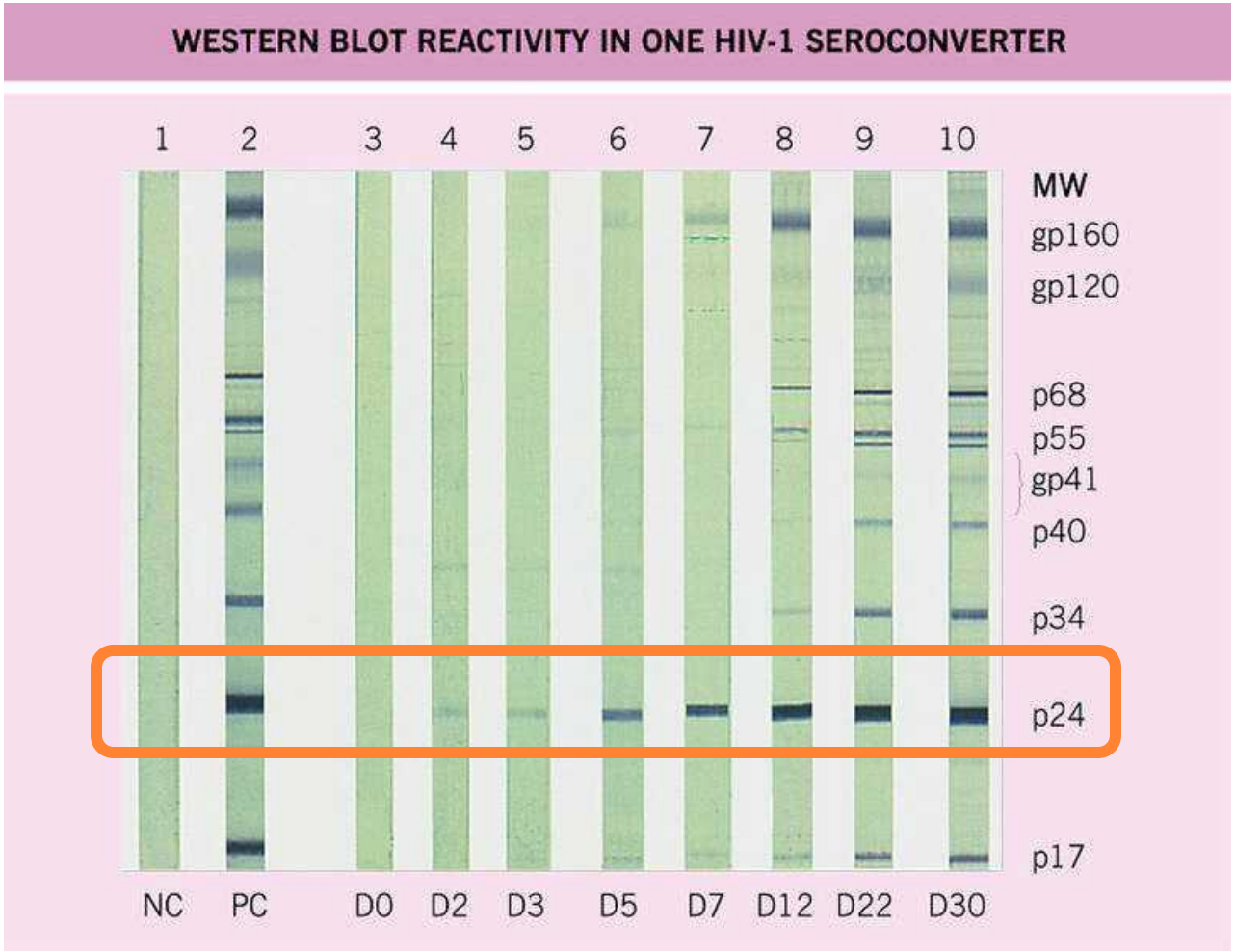
Anticorps anti-Phospho
⇨ Activation de la voie de signalisation cellulaire

Anticorps contre la protéine totale pour normalisation

Noguchi et al. JBC. 2007

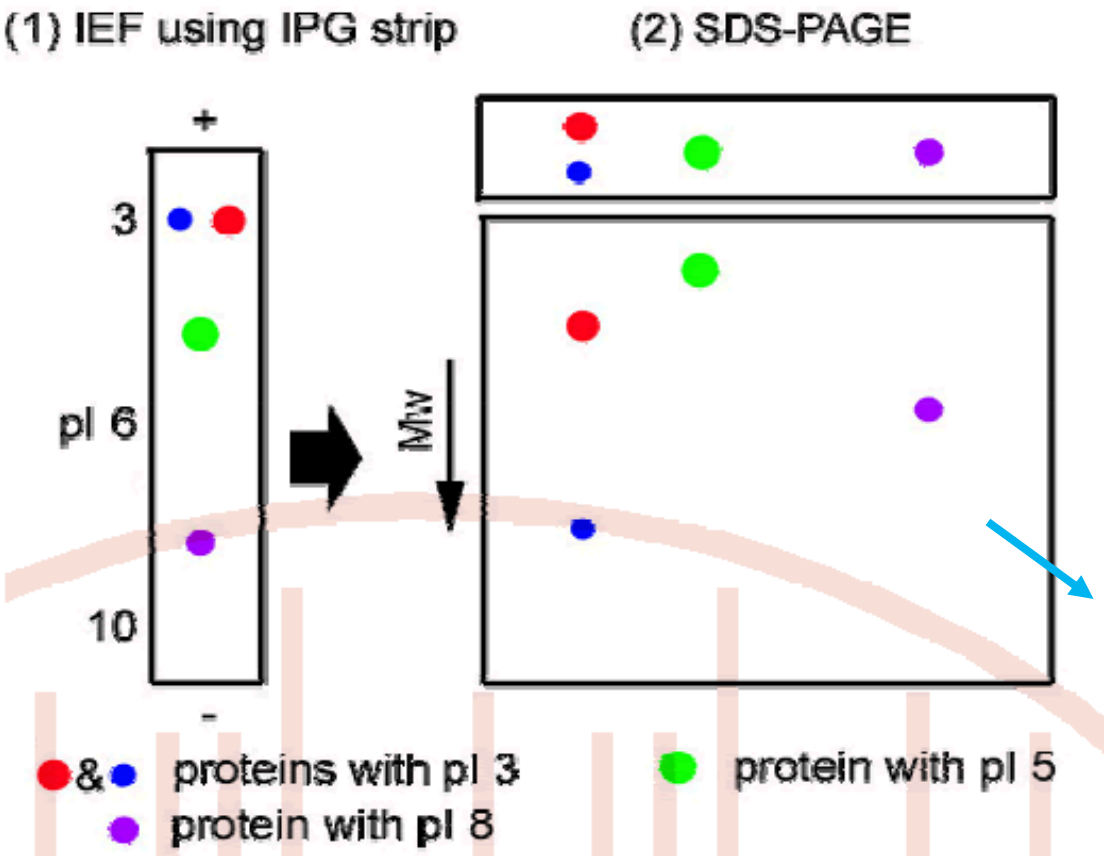
1 Qualitatives : WESTERN BLOT

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

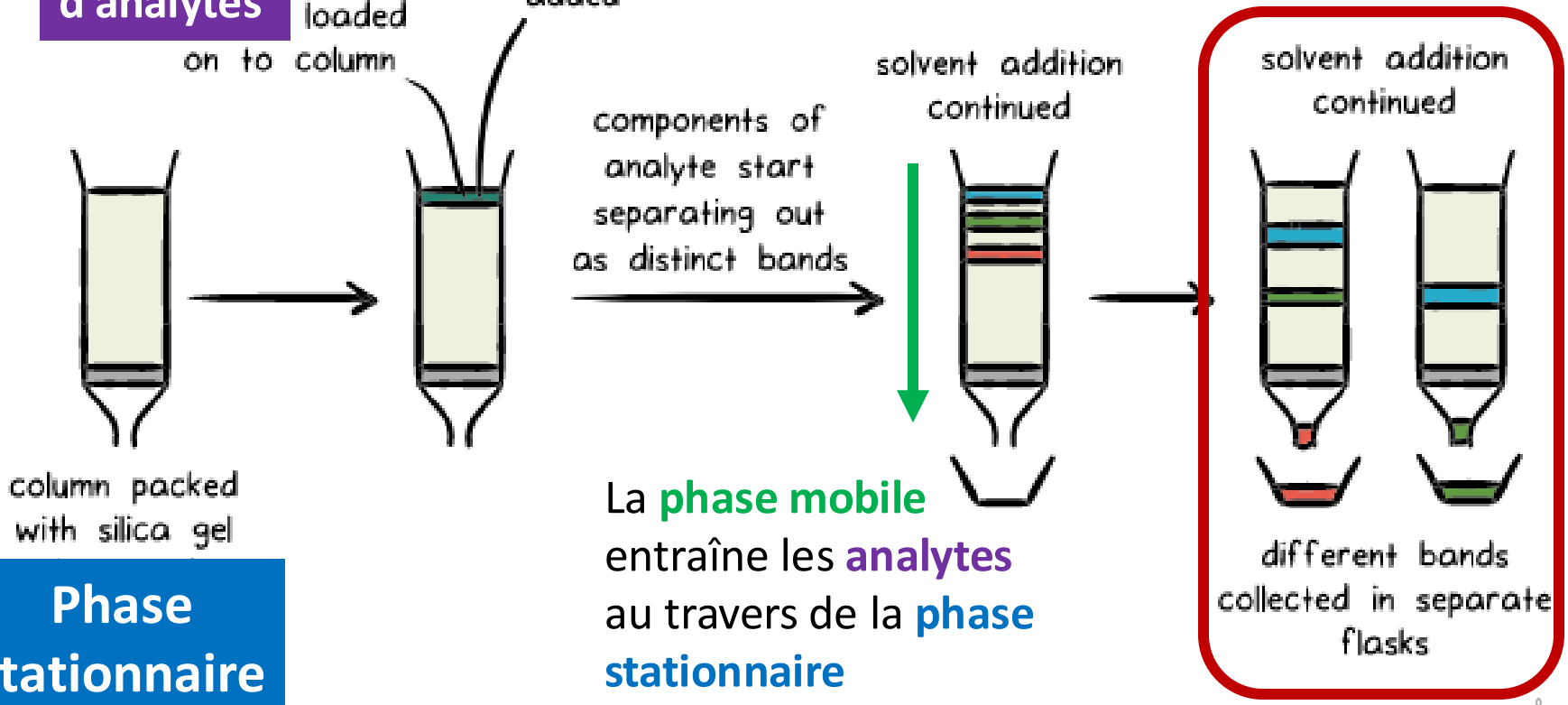
1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

Méthode séparative

Mélange complexe d'analytes

Phase mobile

SÉPARATION des analytes

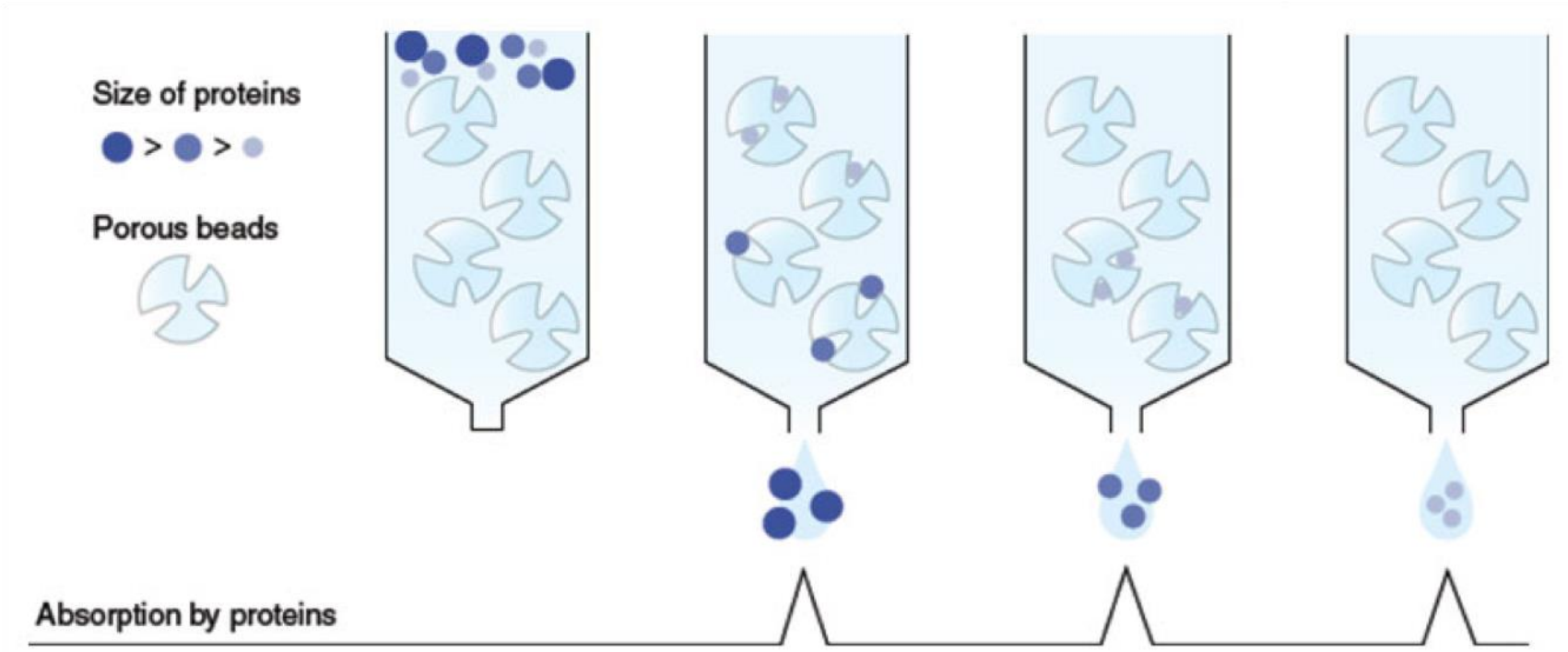


Phase stationnaire

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

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

Gel filtration ⇨ f(taille)



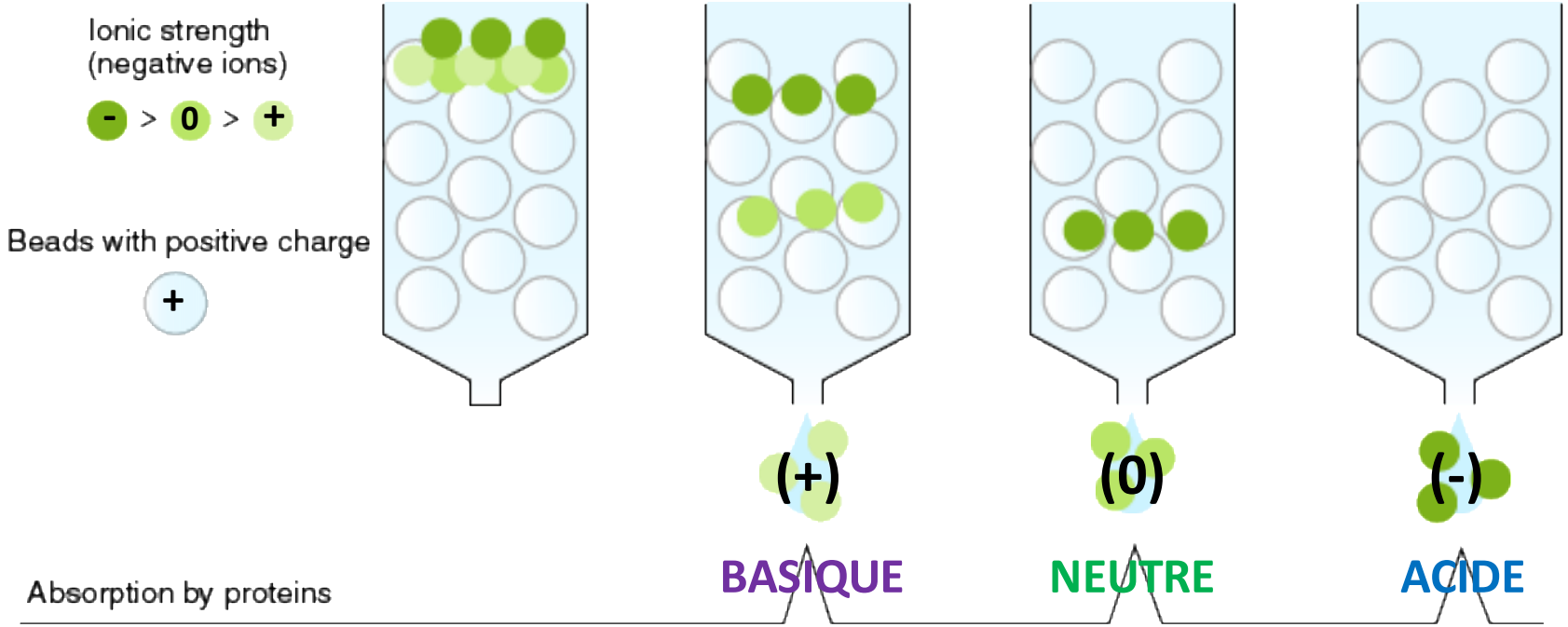
Les protéines les + grosses ne sont pas retenues ⇨ éluées en 1er

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

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : CHROMATOGRAPHIE

Echangeur d'anions ⇨ phase stationnaire (+)

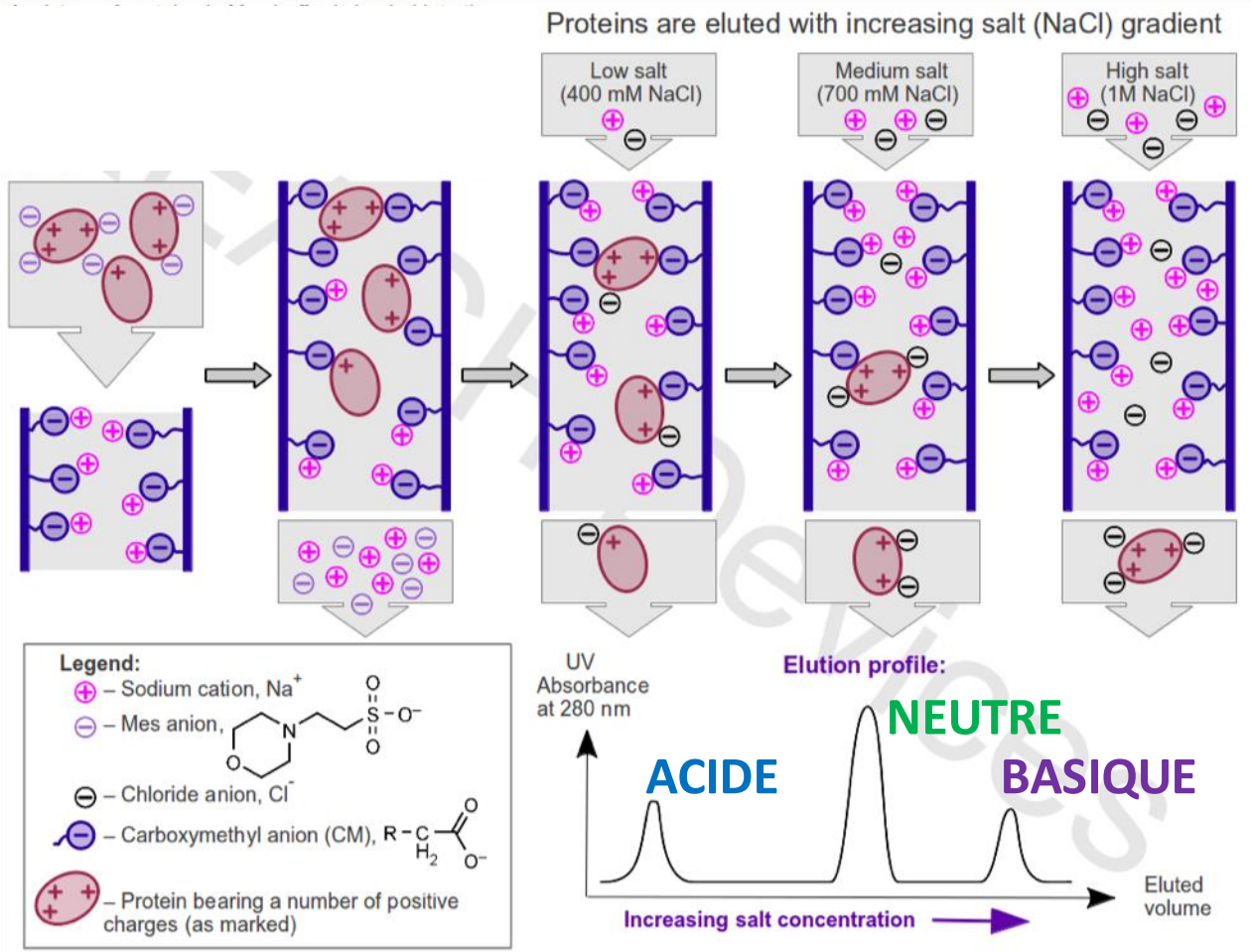


Les protéines chargées positivement (=basiques) ne sont pas retenues ⇨ éluées en 1er

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

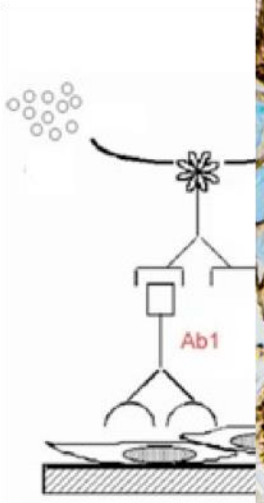
0 Plan

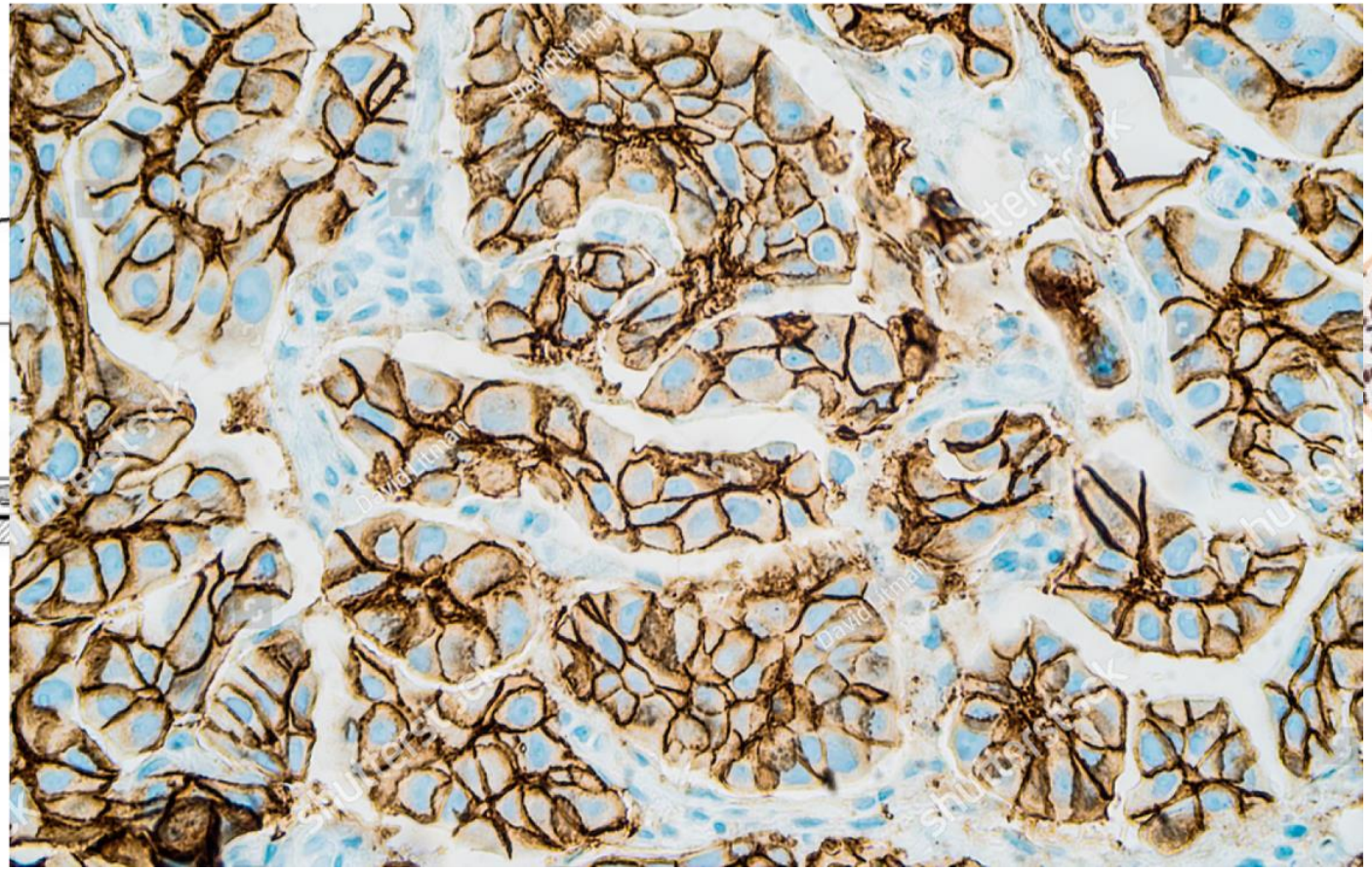
- **Analyses qualitatives**
  - Western blot
  - Chromatographie
  - **In situ (IHC, IF)**
- Analyses quantitatives

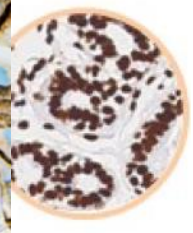
Faculté de Médecine Lyon Est

1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

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



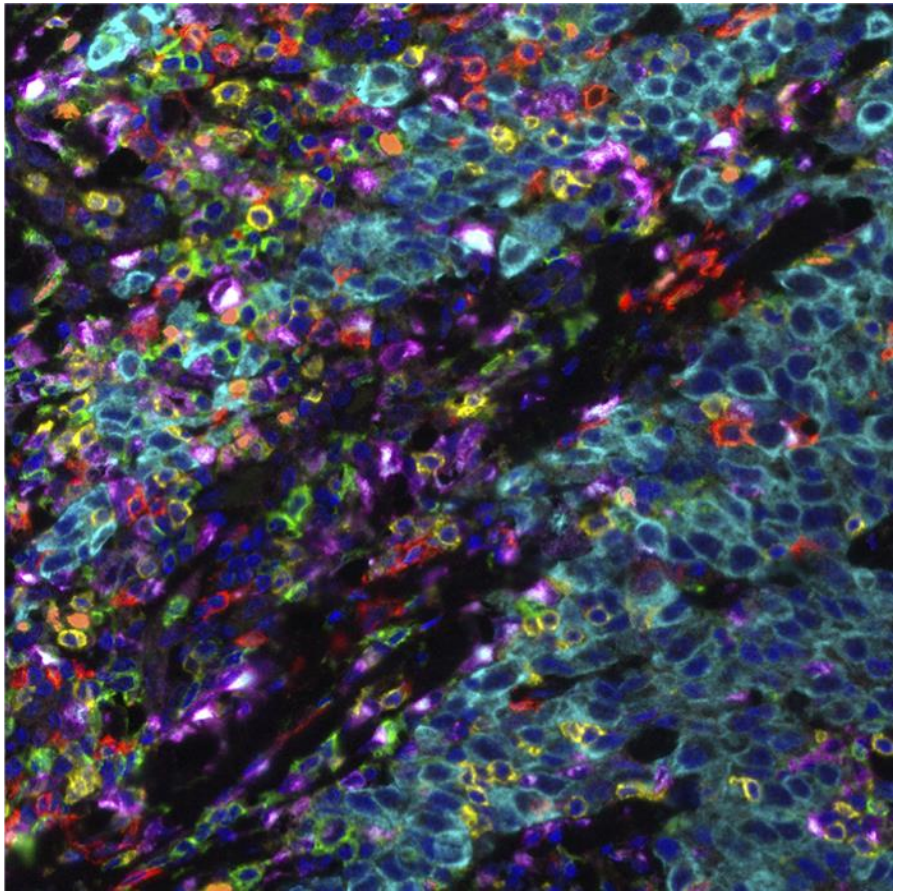




1 Qualitatives : Détection *IN SITU*

- **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.



Faculté de Médecine Lyon Est

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

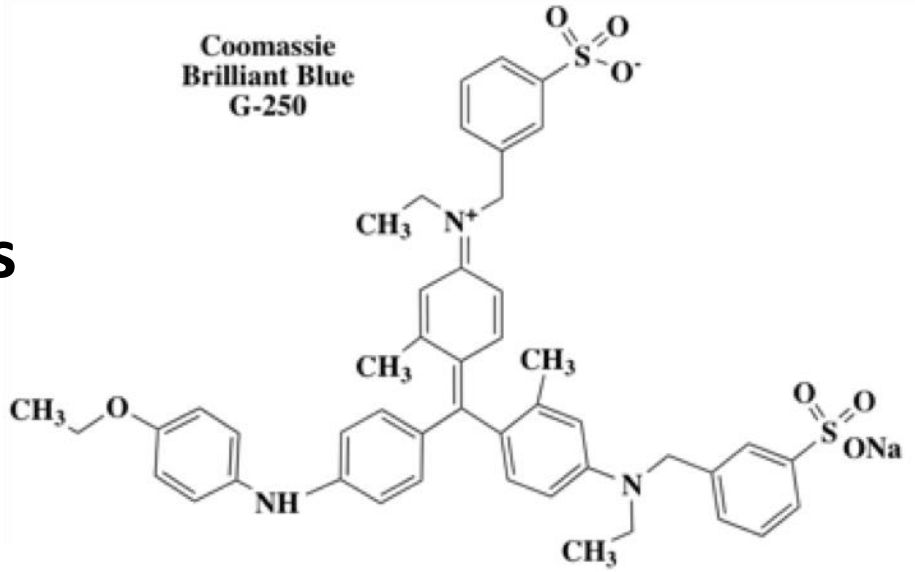
0 Plan

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

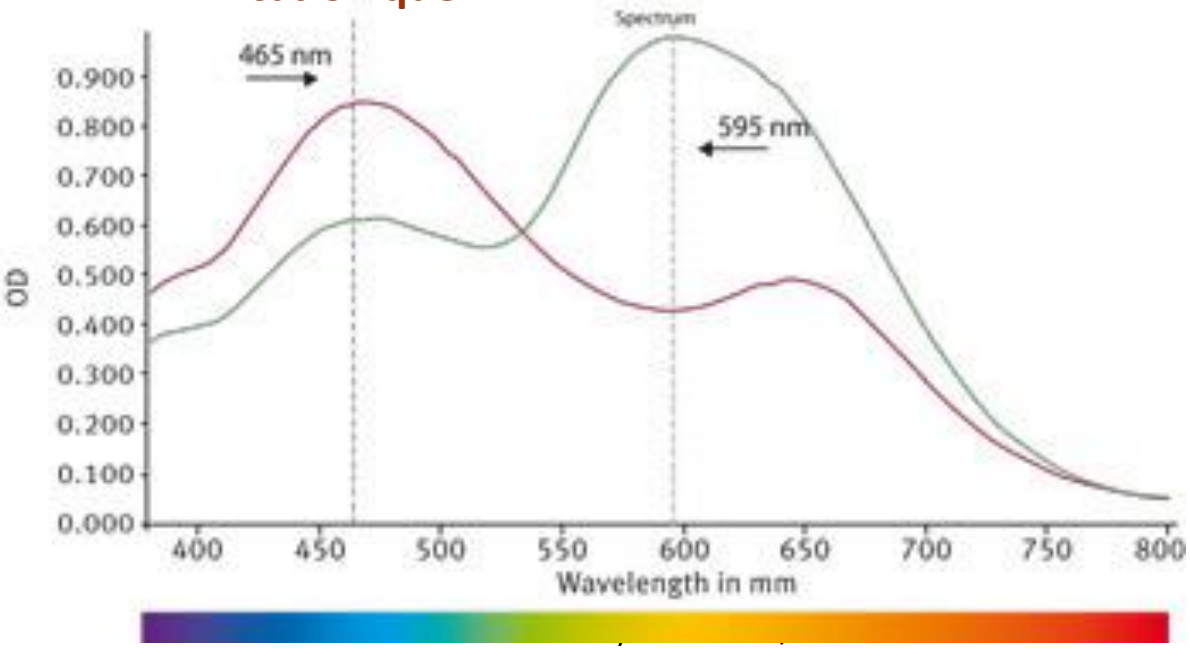
Faculté de Médecine Lyon Est

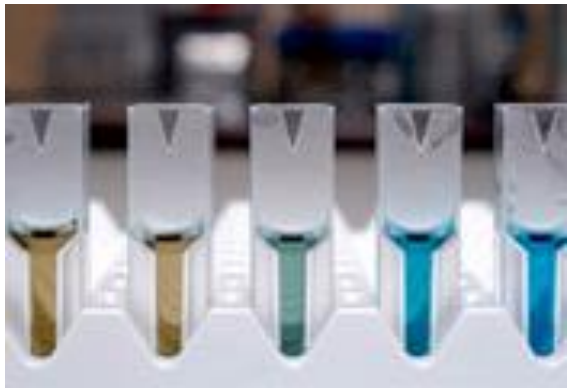
2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

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



E. Jaspard (2012)

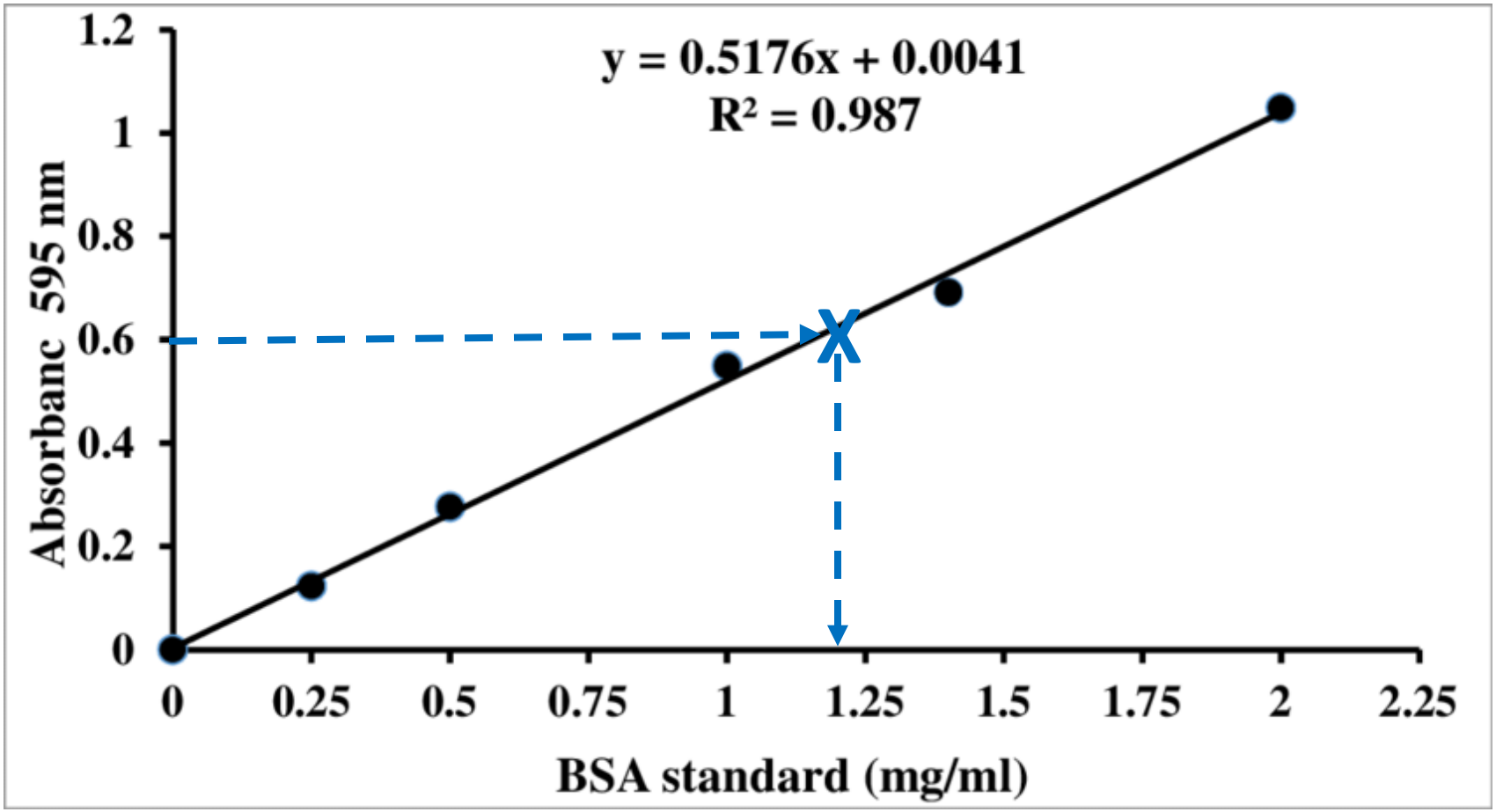




2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

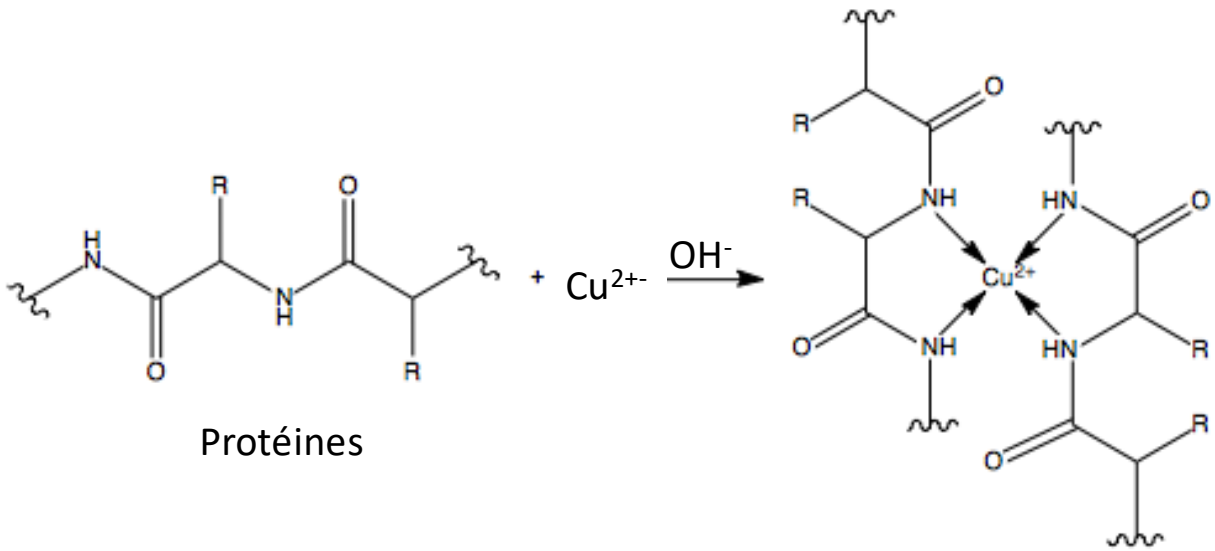
Réaction de Bradford

Courbe d'étalonnage



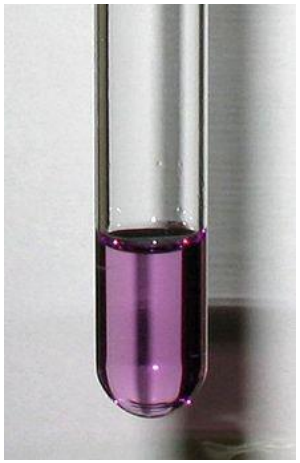
2 Quantitatives : DOSAGE des protéines TOTALES

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



Protéines

Complexe coloré



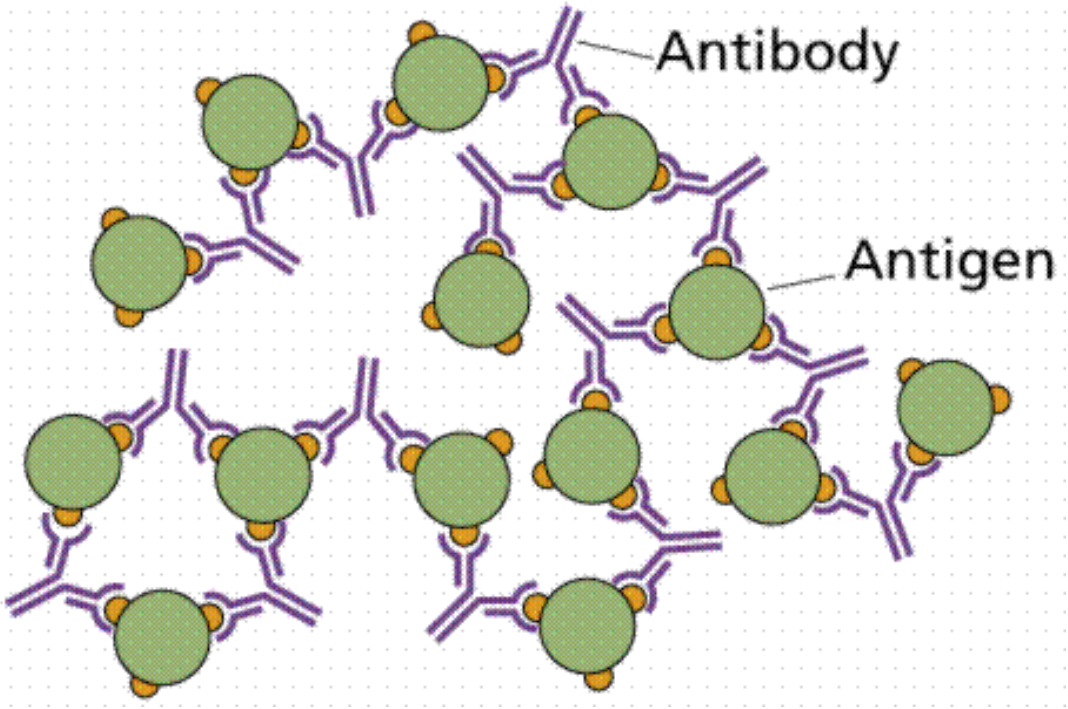
0 Plan

- 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)**



Faculté de Médecine Lyon Est

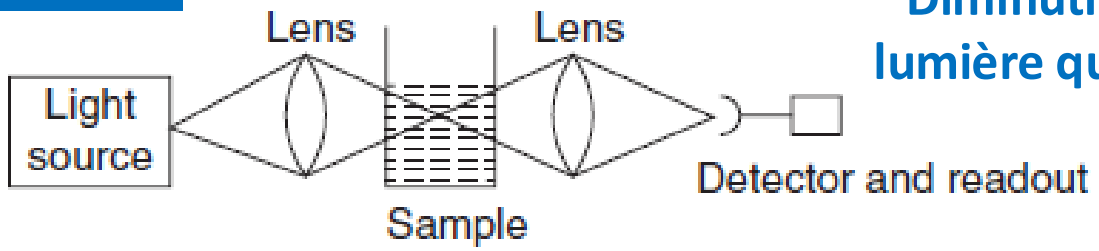
2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

Dosage de protéines spécifiques en solution

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

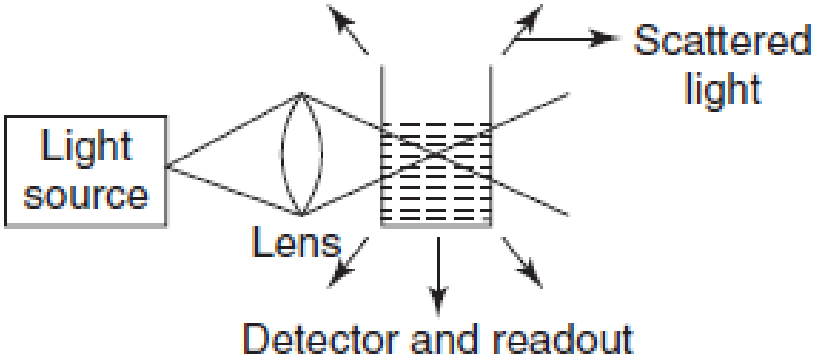
Ex: albumine, T3, CRP, …

TURBIDIMETRIE



Diminution de la lumière qui traverse

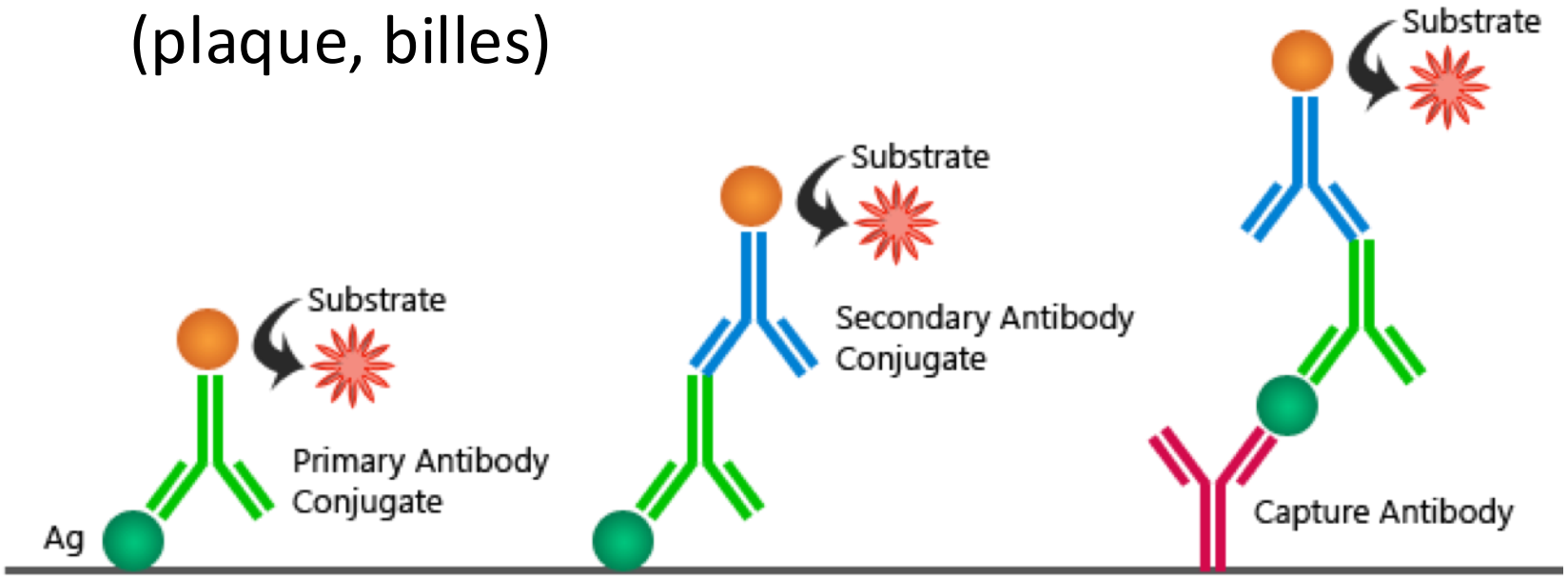
NEPHELEMETRIE



Augmentation de la lumière dispersée

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

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

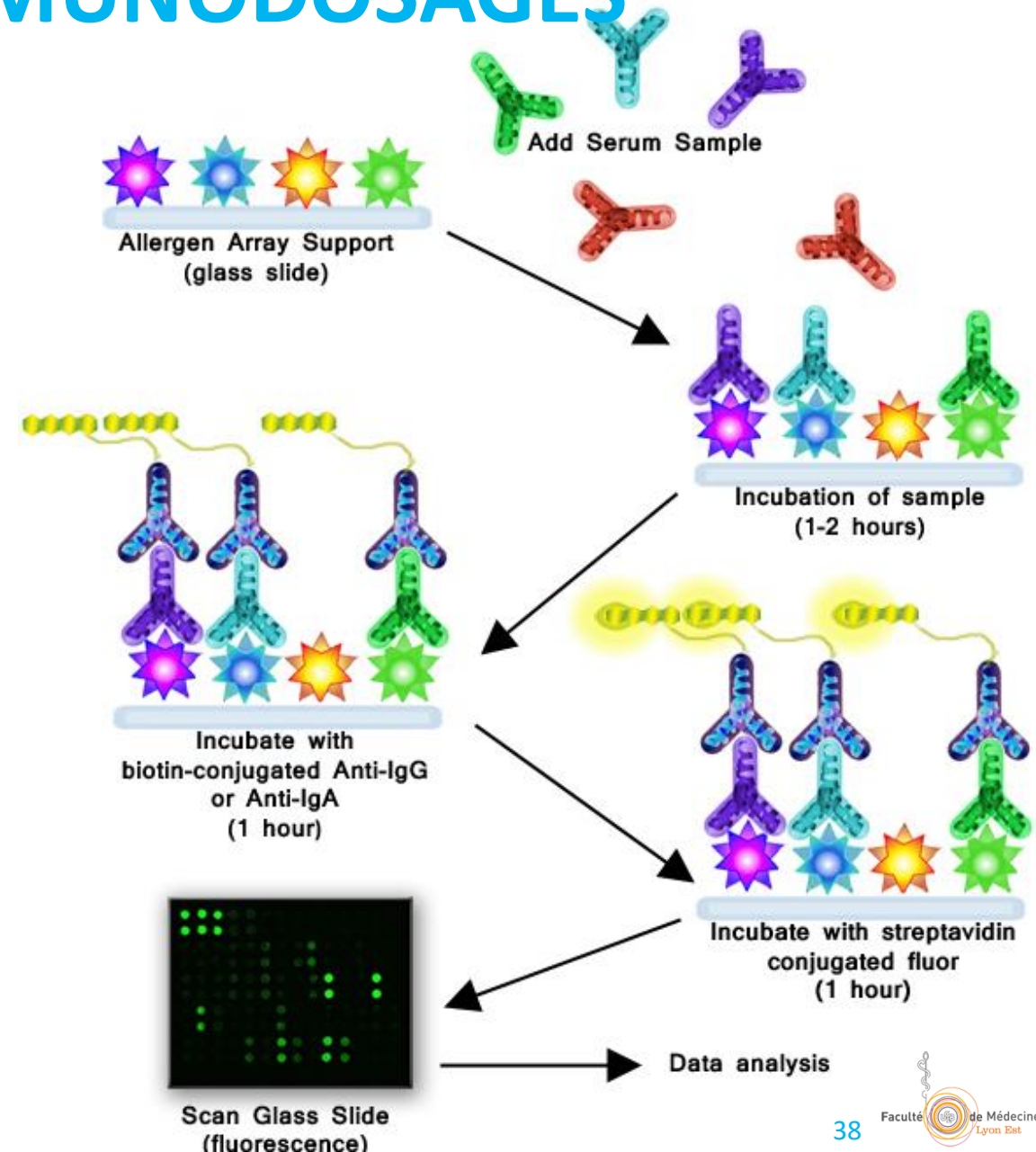


DIRECT ELISA	INDIRECT ELISA	SANDWICH ELISA
Signal=f(**conc. Ag**)	Signal=f(**conc. Ag**) **<u>ou</u>** =f(**conc. Ac**)	Signal=f(**conc. Ag**)

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

- **Ex: Allergies**

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

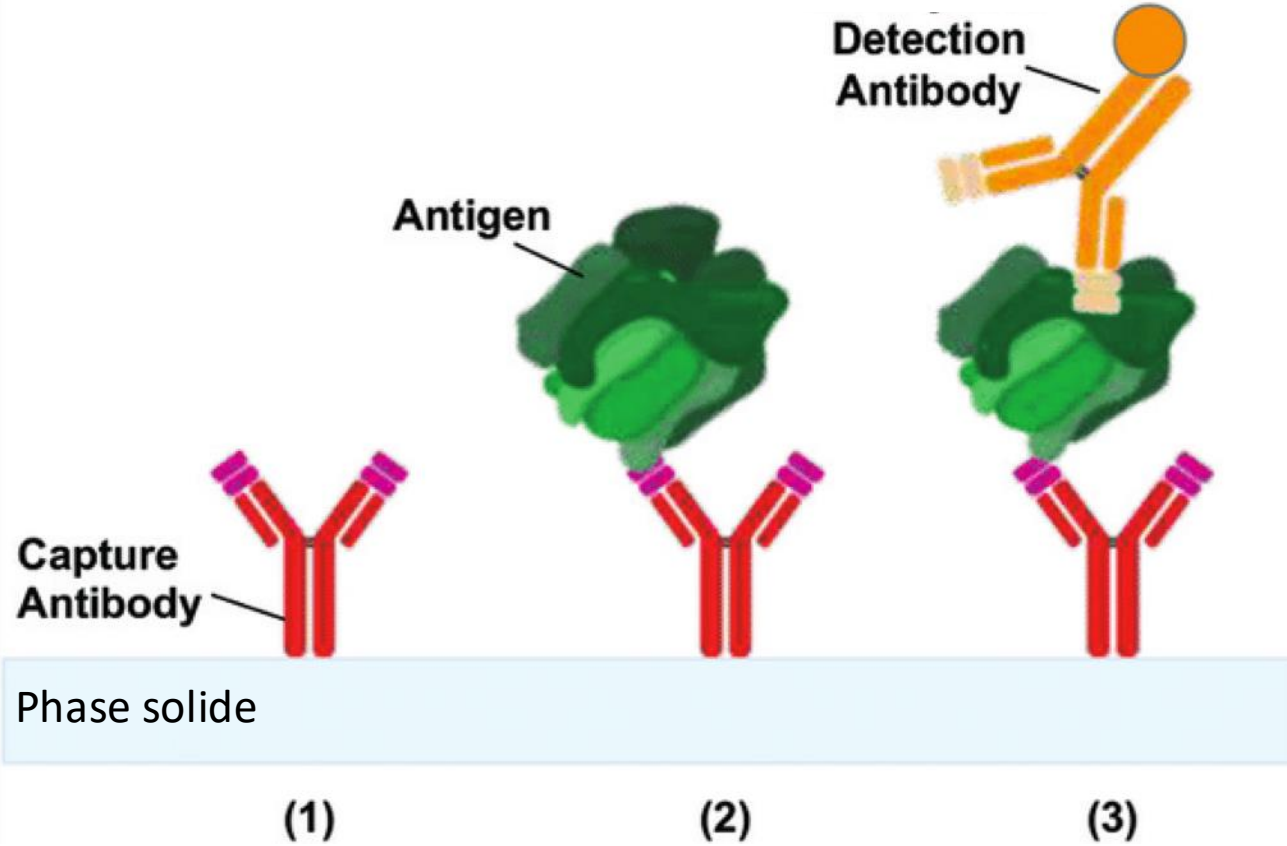


Faculté de Médecine Lyon Est

2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

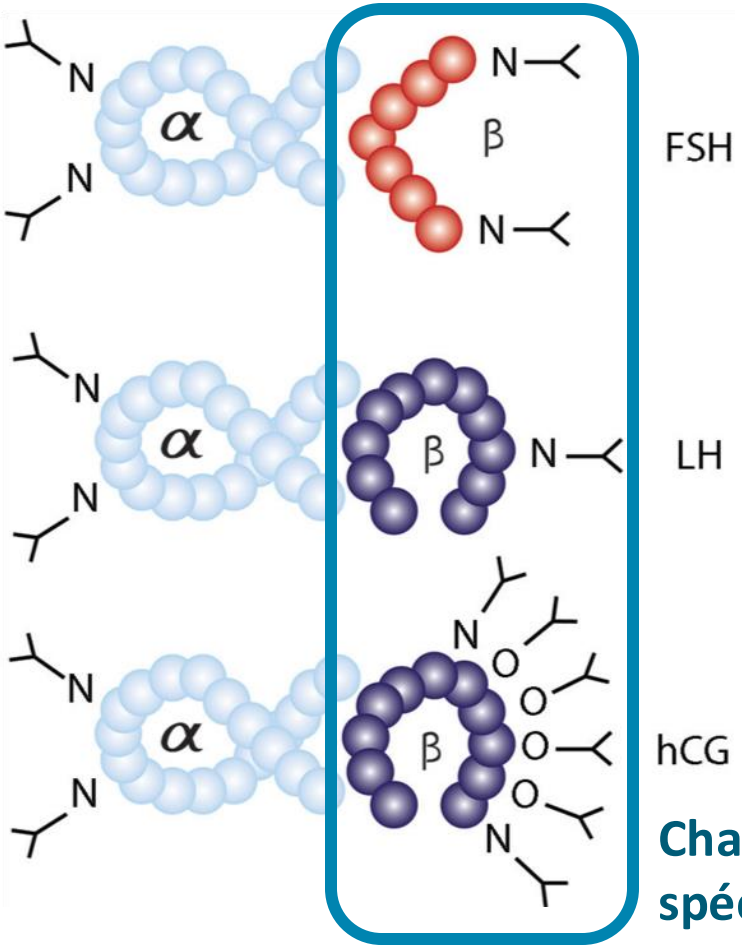
- **Immunométrie sandwich**

  ⇨ reconnaissance de 2 épitopes

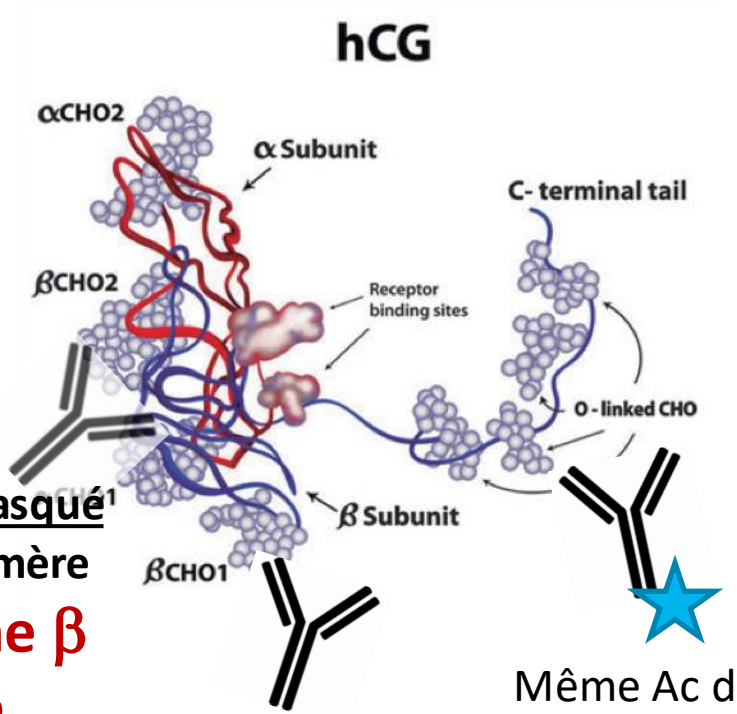


2 Quantitatives : IMMUNODOSAGES

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



Chaine β spécifique



Epitope <u>masqué</u> dans le dimère

⇨ chaine β libre

Epitope <u>exposé</u> 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

Faculté de Médecine Lyon Est