METHODOLOGIE EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

# Analyser la transcription

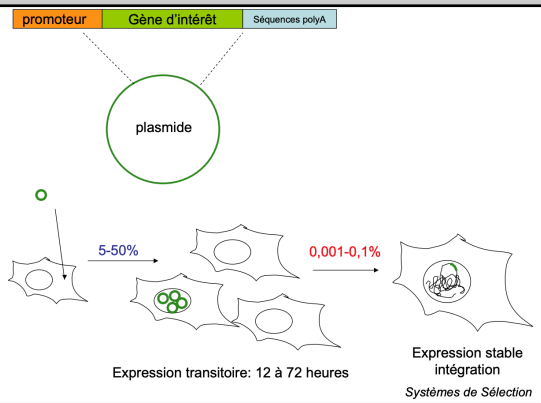
## RT-PCR

- **quantification en temps réelle** = « real time - PCR »
- **mesurer la quantité d'ADN polymérisé** à chaque cycle (temps réel) grâce à un **marqueur fluorescent**.
- Signal proportionnel à la quantité d'amplicons
- **GAPDH** : ¢ de la glycolyse + cytosolique
  - ≈ **témoin de charge**

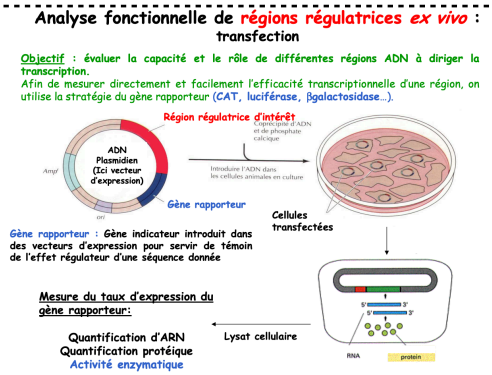
METHODOLOGIE EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

# Analyse de l'efficacité transcriptionnelle de régions ADN régulatrices

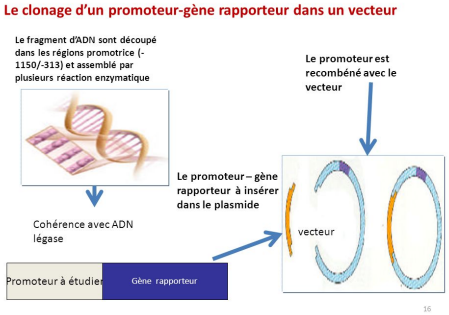
## Transfection




- Etudier l'**effet de la surexpression** d'un gène d'intérêt (protéine d'intérêt)
- Etudier l'**effet de l'inhibition** de l'expression d'un gène d'intérêt
- Exprimer un **oncogène pour immortaliser** une population cellulaire
- Suivre la **localisation subcellulaire** d'une protéine « étiquetée » (taguée)
- Etudier la **régulation de l'activité** d'un promoteur de gènes
- Utilisation de :
  - Vecteurs **plasmidiques**
  - Vecteurs **viraux**
    - rétrovirus, lentivirus, adénovirus



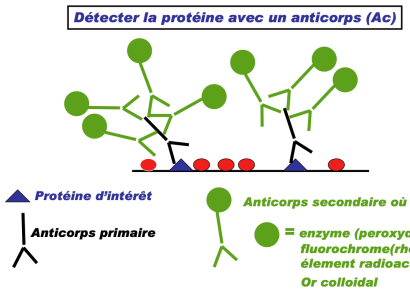

## Technique du gène rapporteur



Analyser des protéines et leurs interactions

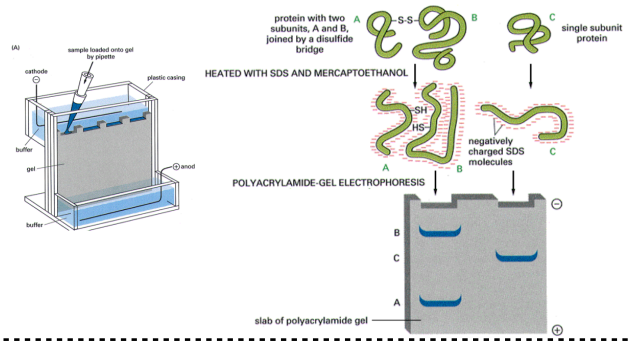
# Détecter la protéine avec un anticorps (Ac)

## Immunocytochimie, Immunofluorescence




## Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

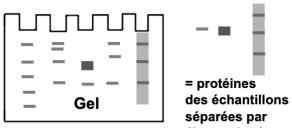
PAGE= polyacrylamide gel electrophoresis
SDS-PAGE= sodium dodecyl sulphate-PAGE



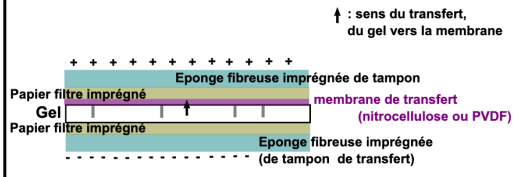

- pour séparer les molécules d'ADN, d'ARN ou de **protéines**
- en fonction de leur **taille** et de leur **charge électrique**.
- Les anions ⊖ migrent vers l'anode ⊕.
- Les cations ⊕ vers cathode ⊖.
- Les prot ayant un petit PM migreront plus loin que les grosses.
- Méthode dénaturante : ajout SDS
  - Se lie à la prot
  - empêche son repliement
  - Lui confère une charge ⊖

## Western Blot (WB)

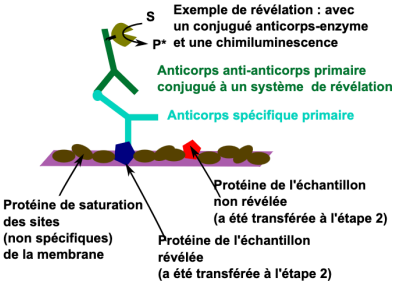
**1. Séparation électrophorétique (SDS-PAGE généralement)**




**2. Transfert sur une membrane ( électrotransfert en pratique)**




**3 Révélation immunochimique**




**4 Visualisation**

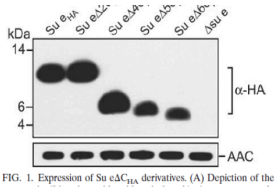



FIG. 1. Expression of Su eΔC$_{HA}$ derivatives. (A) Depiction of the

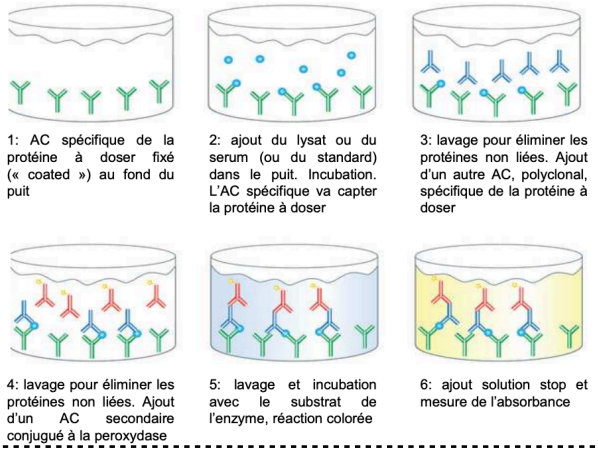
Une "image" des signaux obtenus pour une analyse qualitative et aussi (semi)-quantitative.

**Le western blot permet de répondre à 2 grands types de question :**
**- la protéine X est-elle présente dans mon échantillon ?**
**- le niveau d'expression de la protéine X est-il différent selon le type de cellules, le traitement à un agent donné...**

## Western Blot (WB)

- Technique d'**électrophorèse** permettant d'**analyser les protéines**
- **Migration** des protéines dans un **champ électrique** et au travers d'un gel maillé :
  - dépôt des protéines sur le haut du gel, puis migration vers le bas du gel
    - **plus** une **protéine** est **petite**, **plus** elle **migre bas**
  - **révélation** de la protéine étudié par utilisation d'**anticorps**
- **Semi-quantitatif**
- Ne permet **pas de localiser une protéine** mais apporte des informations sur :
  - sa **présence/absence**
  - son **poids moléculaire**
  - sa **quantité relative** dans l'échantillon
- **α-actine** : témoin de charge

## ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)



1: AC spécifique de la protéine à doser fixé (« coated ») au fond du puit

2: ajout du lysat ou du serum (ou du standard) dans le puit. Incubation. L'AC spécifique va capter la protéine à doser

3: lavage pour éliminer les protéines non liées. Ajout d'un autre AC, polyclonal, spécifique de la protéine à doser

4: lavage pour éliminer les protéines non liées. Ajout d'un AC secondaire conjugué à la peroxydase

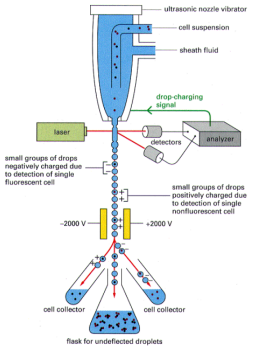
5: lavage et incubation avec le substrat de l'enzyme, réaction colorée

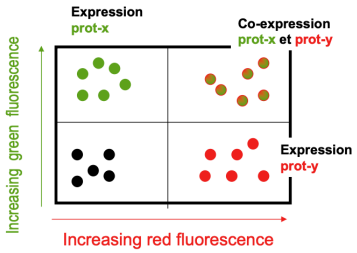
6: ajout solution stop et mesure de l'absorbance

- Quantifier une protéine sans la séparer

**Cytométrie en flux**

***-Détecter : expression/ co-expression cellulaire de protéines***




Cytomètre en flux
Trieur de cellules= FACS=
Fluorescence-activated cell sorter

## Cytométrie en flux

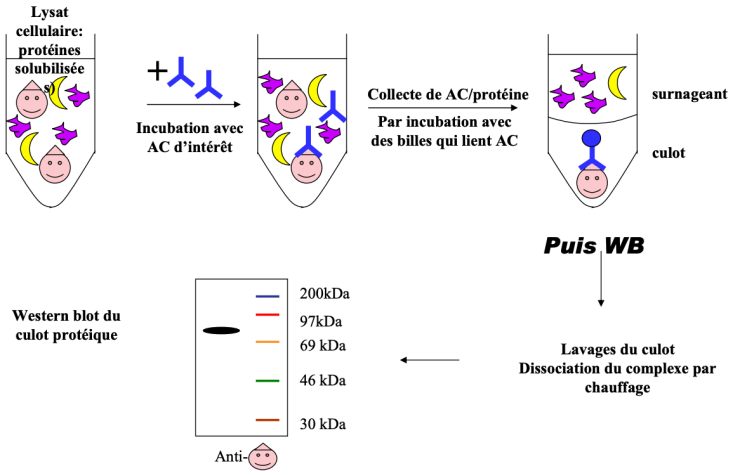
- Objectifs
  - **Reconnaître** et **trier** les ¢ fluorescentes
  - **Compter** le nombre total de ¢ exprimant la prot

- Différentes étapes
  1. Mise en contact d'une **suspension cellulaire** avec des **Ac** couplé à un fluorochrome spécifique
  2. Introduction de la suspension cellulaire dans un ensemble permettant de **séparer les ¢ les unes des autres** et de les diluer
  3. Passage dans un tuyau ne laissant passer qu'une cellule à la fois
  4. **Inclusion** des ¢ dans des gouttes
  5. Passage devant un **faisceau laser** permettant la détection de la fluorescence
  6. **Affectation** par un analyseur d'une **charge** :
     - **Négative** aux ¢ **fluorescentes**
     - **Positive** aux ¢ **non fluorescentes**
  7. **Tri des ¢** par un électro aimants

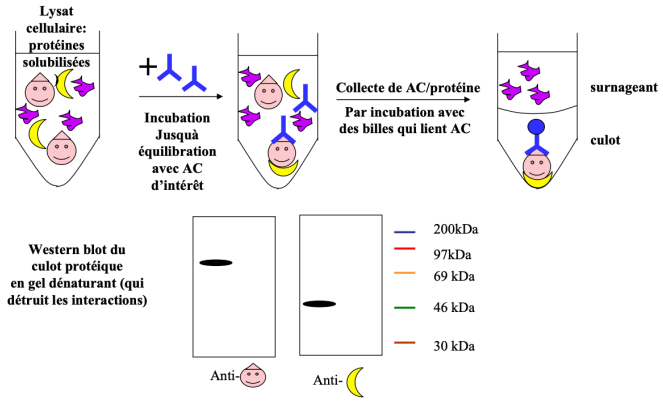
- Résultats :
  - Les cellules n'exprimant pas l'antigène recherché sont peu fluorescentes et se retrouve sur la gauche du graphique
  - Celles exprimant l'antigène recherché ont une forte intensité de fluorescence et se retrouve sur la droite du graphique

## Immunoprécipitation

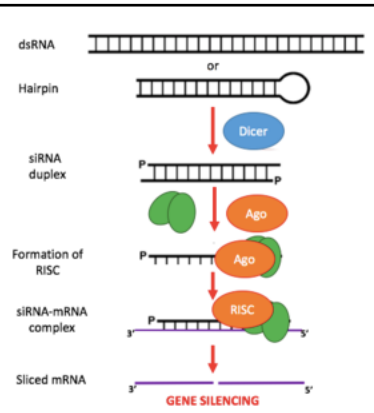
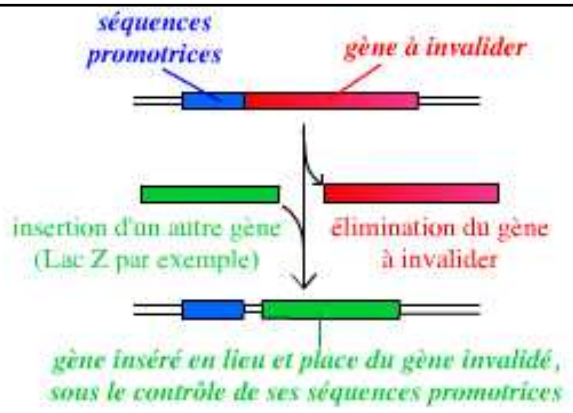
***Séparer la protéine d'un mélange, puis la détecter***

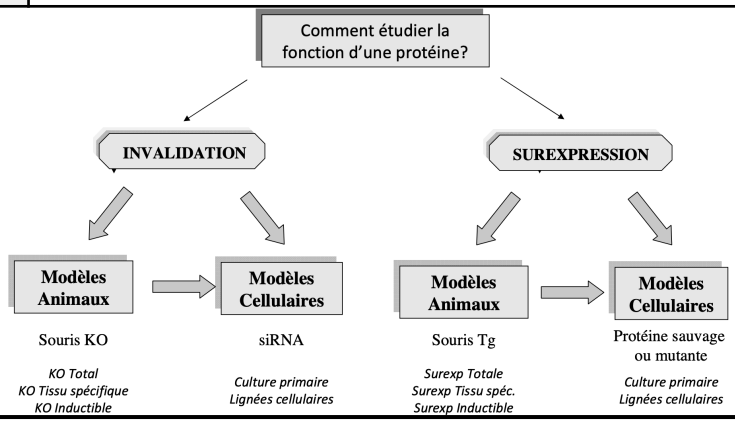


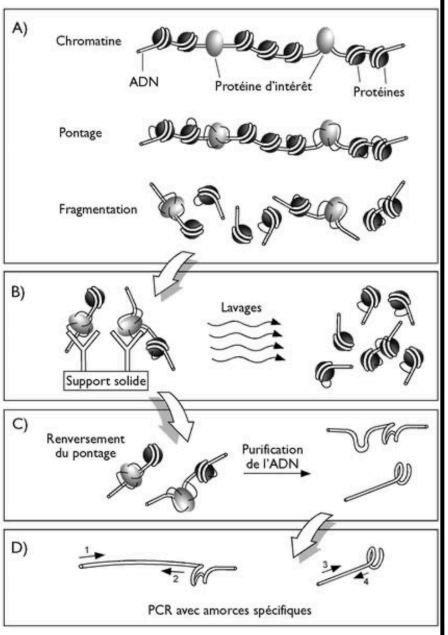

***Séparer la protéine d'un mélange et recherche d'interaction***




***Etude des interactions protéiques par co-immunoprécipitation***
***Étude des modifications post-traductionnelles également.***

| METHODOLOGIE EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE | | |
|---|---|---|
| **Marqueurs** | **Ki67** | • Marque **ttes les phases : G1, S, G2, M** |
| | **BrDu** | • analogue de la **thymidine**<br>• détecter les cellules dont la **réplication** de l'ADN est **active** |
| **Séquence consensus** | • **Séquence idéalisée d'une région donnée** d'un acide nucléique ou d'une protéine<br>• dans laquelle **chaque position** représente la **base ou** l'**acide aminé** r | |
| **Méthodes d'invalidation :**<br><br>- **à gauche : siRNA**<br>- **À droite : KO** |  |  |
| **Retard sur le gel :**<br><br>**EMSA**<br><br>**(Electrophoretic Mobility Shift Assay)** | • basé sur le **retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide** de duplexes **d'oligonucléotides de séquences courtes** en présence de protéines ou de complexe protéique ayant la propriété de reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt.<br>• La **variation de migration** des duplexes (ou sonde) complexés aux protéines par rapport aux duplexes libres est s**uivie grâce au marquage radioactif au 32P** des sondes nucléotidiques.<br>• Peut être réalisé **à partir de protéines purifiées** ou d'un **extrait protéique plus complexe** (extrait nucléaire par ex) | |



<table>
<tr><th colspan="2">METHODOLOGIE EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE</th></tr>
<tr><td>ChiP<br><br>(Immunoprécipitation de la chromatine)</td><td>
• <u>Obj</u> : savoir si une protéine donnée lie un fragment précis d'ADN.<br><br>
• <u>Avantage majeur :</u><br>
- in vivo (analyse faite sur les cellules vivantes.)<br><br>
• <u>Protocole</u> :<br>
1. après la croissance des cellules dans les conditions souhaitées, toutes les protéines qui touchent l'ADN y sont immobilisées par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction grâce à un traitement au formaldéhyde.<br>
2. Cellules lysées,<br>
3. Puis les complexes ADN-protéines fragmentés en courts segments<br>
4. St immunoprécipités.<br>
- à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (l'activateur de transcription X, par exemple), permet de récupérer les protéines voulues ainsi que toutes les régions d'ADN auxquelles elles étaient liées lors du pontage initial au formaldéhyde.


</td></tr>
<tr><td>Trypsine</td><td>
• endoprotéase<br>
• hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine, Arginine) engage sa fonction acide.
</td></tr>
</table>