Pour toutes les expériences, il faut avoir :

* Les échantillons à tester :
  + Un échantillon de référence qui sert de repère pour être comparer aux autres conditions expérimentale.
* Des étapes de vérifications qui peuvent prendre la forme de contrôles :
  + Négatif la condition n’est pas présente. Elle ne doit pas être détectée.
  + Positif condition expérimentale certifiée. Sa présence est assurée.

Les solutions courantes :

* PBS (tampon phosphate salin) tampons qui a la même osmose que les cellules. Il est composé principalement de ions qui stabilise les biomolécules.
* SDS il est à la fois un détergent et un dénaturant. Le SDS est fortement négatif. Il se lie de façon importante et permet de même charge à toutes les protéines (utilisé notamment pour les électrophorèses).
* Les alcools :
  + éthanol, isopropanol pour précipiter de les acide nucléiques.
* Sels Favorisent les liaisons d’hydrogène.
* Intercalant ADN
* Chloroforme
* Fixateur. Évite l’autolyse :
  + Formaldéhyde (abrégé en formol). Liaison covalente intra et inter protéines.
* H2O2 inhibition irréversible par une suroxydation du co facteur (hème Fe2+) des peroxydases. Des péroxydases sont utilisées comme cytochrome.
* Dextran de sulfate formamide molécule qui s’entourent d’eau. Elle augmente la concentration des autres composées notamment leur probabilité de rencontre.
* Agents chélateurs molécules qui bloquent les ions bivalents.
* Dénaturant protéine aqueuse avec lipides, Solubiluse adn arn : phénol
* guanidinium thiocyanate lyse cellule + dénature
* Les ADN précipitent à pH acide ou faire une extraction phénol / chloroforme.

# Les protéines

* pour linéariser les protéines :
  + Saut de pH et d’acrylamide

### Westernblot

Nature du support utilisé :

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Nature du support | sensibilité |  |  |  |
| nitrocellulose | ++ |  |  |  |
| PVDF | - |  |  |  |

# Immunomarquage

Important les anticorps atteignent leur maximum d’efficacité en condition physiologique. Il faut penser à les rétablir.

L’immunomarquage utile le fait que les anticorps sont :

* Spécifiques. Ils reconnaissent une séquence particulière.
* Capable de reconnaitre une très grande quantité de molécules différentes. Le nombre de combinaison différentes de la zone de reconnaissance pouvant être générée est de plusieurs milliards.

Certains anticorps ont été transformés pour être « visible » par l’ajout d’une enzyme :

* Fluorescente.
* Transforme un substrat en composé coloré (généralement avec une péroxydase).

NB : ces deux propriétés ne dépendent pas de la liaison de l’anticorps avec son antigène. Cela explique l’importance des étapes de lavage.

Contrôle

* Négatif vérifier que seul l’anticorps primaire est spécifique. Tous sauf C1.
* Positif vérifier que C1 reconnait l’antigène d’intérêt. (Test sur un milieu dont la composition est connue).

### Les types de lots d’anticorps

Deux types de lots d’anticorps sont utilisés :

* Monoclonaux. L’anticorps issue d’une seule cellule souche de lymphocytes.
* Polyclonaux. Plusieurs anticorps qui ciblent le même antigène notamment avec des épitopes différents.

Rmq : Les polyclonaux peuvent permettre d’amplifier le signal.

### Principe de l’utilisation des anticorps secondaires

/ antigène + anticorps avec enzyme substrat via la région constante.

## Elisa

Il existe deux méthodes ELISA :

* ELISA détecter la présence d’un anticorps.
* ELISA sandwich détecter la présence d’un antigène.

Méthode pour détecter des anticorps.

La production des anticorps se fait par des cellules transformé en cellules « immortelles ».

Purifier par chromatographie.

Sandwich 2 anticorps qui réagissent avec le même antigène

## Immunomarquage sur coupe histologique (tissu)

En fonction de l’enzyme utilisé

Démasquage :

* Dénaturation par pH et température (y un baille cheloud avec le formol. Ce dernier étant lié de façon covalente).
* Lavage avec un sérum de l’animal qui possède les anticorps pour saturer. ????

Blocage ou inhibition :

* Neutraliser les péroxydases déjà présentes avec de l’eau oxygéné (H2O2), le substrat de l’enzyme.

Problèmes spécifiques :

* Membrane cellulaire traversé
* La fixation peut interférer un obstacle

Immunomarquage.

Contre coloration pour accentuer et faciliter la lecture.

# Histologie

Biopsie prélèvement d’une petit portion d’un tissu.

Préparation des organes l’histologie

1. Fixation avec du formaldéhyde.
2. Déshydratation succession de bain d’éthanol pour prévenir de la dégradation des tissus.

## Préparation des tissus pour l’observation au microscope optique

1. Substitution par du butanol car il solubilise la paraffine.
2. Imprégnation avec la paraffine
3. Enrobage (ou inclusion)
4. Coupe très fine de l’organe avec un microtome.
5. Déparaffinage (toluène)

NB : Xylène, toluène et butanol 3 solvants dans la paraffine.

## Préparation des tissus pour l’observation au microscope électronique

### Coloration

Réhydratation des tissus pour la coloration.

Coloration les plus fréquentes :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Coloration | Noyau | Cytoplasme | MEC |
| HES ou  trichrome de Masson | Hématoxyline de Gill (eau) | Éosine (alcool) | Safran (alcool) |
|  |  |  | Bleu d’aniline |
| Picro-Indigo-Carmin | Rouge nucléaire | Picro-Indigo-Carmin | |

Attention utilisé pour les lavages des solvants des colorants (généralement alcool ou eau).

### Montage lame

Conservation du prélèvement préserver de la déshydratation.

# Microscopie électronique

Osmium fixateur de lipides et de protéines. Métaux contient de nombreux électrons.

# Les acides nucléiques ADN ARN

Stabilité des complexe bi caténaire ARN/ARN > ARN/ADN > ADN/ADN.

Problème lié à l’hybridation :

* Les séquences ARN et ADN masqué avec des protéines.
* Les interactions non spécifiques (sonde et anticorps). Solution : Lavage et saturé en composé organique (protéines, ADN ARN).

Attention aux RNAses et aux ADNases présent dans les lysosomes il faut les neutraliser avant de purifier les polymères nucléiques.

Adn 260nm Absorption maximales des bases.

Vérifier la pureté par l’absorption. Ration 260/280 nm

Adn Extraction sur mini colonne de cilice. (diapo)

BET, le bromure d’éthidium fluorescente UV émet dans le visible.  
ADN bactérien est protégé des enzymes de restricition par méthylation.

30 000 gènes sont exprimés en générale, en moyen, a un moment donné dans une cellule eucaryote ? 10 000 environ.

## Hybridation in situ (dans un tissu)

Problème de :

* Traversée la membrane cellulaire
* La fixation des protéines peut bloquer la reconnaissance des sites d’intérêts.

Il est utile de détruire les sondes non hybridées avec une DNAse ou une RNAse pour limiter le bruit.

Mg+ co facteur de la Taq et stabilise augment utilisaton parcimonie.

Comparaison semi quantitative migration sur gel et comparaison de la tailel des bandes.

PCR

Contrôle positif : pas la polymérase.

Contrôle négatif : pas l’ARNm (donc de l’ADNc) de la protéine d’intérêt.

Migration d’ADN sur gel

BET remplacé par GelGreen pour visualisé l’ADN.

Dénaturant Guanidinium -thiocyanate (action de bloquer les RNAse

Acide nucléique affinité avec la silice conserver que l’ARN (on sature l’ADN avec des sels).

Concentration ARN sepectro (p78) ou fluomètre

Pureté de l’aRN Absorbance 260 et 280 comprise entre 1,9 ;2.3 l’absorbance de la tryptophane qui change de forme en fonction ud pH.

# Les méthodes d’études des protéines

Ces méthodes servent à identifier une protéine d’intérêt.

Pour dénaturer (déplier) une protéine, il faut utiliser deux types de substances :

* Des agents réducteurs qui suppriment les ponts disulfures
* Des dénaturants de suppriment les liaisons non covalentes (hydrogène ou Van der Vaal).

Absorption 280nm par noyau phénol desles tryptophanes et les tyrosine

### Vocabulaire

Ne pas utiliser le terme tache. On parlera de bande ou de spot.

Dialyse technique consistant à diminuer la concentration de molécules en créant un gradient chimique.

Chromatographie ensemble de méthodes qui permet la séparation de composants chimiques.

Lyophiliser méthode qui consiste à retirer l’eau d’un produit en le congelant puis en faisant évaporer la glace par une baisse de la pression.

Westernblot (ou transfert de protéines) est une méthode combinatoire :

1. Électrophorèse sur gel.
2. Transfert sur une membrane.
3. Coloration des protéines.

## Chromatographie

Il existe quatre types de chromatographie :

* d’exclusion qui sépare en fonction de la taille et de la forme appelé poids moléculaire en kDa.
* D’affinité qui filtre par affinité avec un ligand. Les composés se détachent progressivement (élués).
* D’échange d’ions. Des billes chargées retiennent les molécules d’intérêt et sont éluées progressivement.
* Sur couche mince.

Rmq : il existe une chromatographie qui utilise des anticorps à la place des ions.

### Chromatographie d’exclusion

Les molécules passent dans des billes percées. Plus la molécule est grosse plus vite elle sortira. On a une relation linéaire entre log de la taille en fonction du volume élué.

volume d’élution des plus grosses molécules, celles qui ne peuvent pas entrer dans les billes.

Ka coefficient de partage : .

### Chromatographie d’échanges d’ions

Les protéines sont mises dans une colonne échangeuse avec des billes qui possèdent une charge opposée à la protéine d’intérêt. Les protéines sont détachées progressivement par plusieurs lavages (le solvant est appelé analyte) qui cassent les interactions faibles càd de type :

|  |  |
| --- | --- |
| Hydrogènes | Van Deer Val |

## Électrophorèse

Il existe plusieurs types d’électrophorèse :

* En gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium (PAGE SDS) sépare par la taille.
* Par focalisation isoélectrique (IEF) sépare par la charge électrique.

L’électrophorèse 2D consiste à réaliser une séparation :

|  |  |
| --- | --- |
| en fonction du point isoélectrique (IEF) | par la taille. |

## Méthode révélation

Pour révéler la présence de protéines, il est possible de colorer par :

|  |  |
| --- | --- |
| Bleu de Coomassie (non spécifique) | Antigène (spécifique) |

Épitope région de fixation de l’anticorps.

## Purification de protéines

Activité spécifique activité totale de la protéine étudiée par rapport à la quantité de protéines présente.

Rendement activité de la protéine de l’étape par rapport à l’activité de départ.

Facteur de purification activité spécifique de l’étape par rapport à celle de départ.

## Supprimer l’expression d’une protéine

* Mutant avec un gène KO codant pour la protéine d’intérêt.
* De l’ARN infèrent qui s’hybride avec l’ARNm de la protéine d’intérêt. Il empêche la synthèse de la protéine par les ribosomes et conduit à sa destruction.

# Culture cellulaire

La sélection des cellules se fait par la composition du milieu.

Estimation de la mort cellulaire

Bleu de Trypan. Lorsque la cellule est en vie elle l’expulse et ainsi apparait plus clair.

Glutamate aa avec une durée de demi faible. Il faut soit en ajouter régulièrement soit utiliser des dérivés plus stables comme le GLutamax.

Sérum de veau par exemple, qui apporte des facteurs de croissances.

Antibiotiques comme la penicillines et la streptomycine.

Milieu de base DMEM

Confluence dede