Pour toutes les expériences, il faut avoir :

* Dans les échantillons tester, il faut un échantillon de référence (ou témoin) qui sert de repère pour comparer les résultats aux autres conditions expérimentales.
* Des étapes de vérifications comme vérifier la présence de ses cellules au microscope ou réaliser des contrôles :
  + Négatif la condition n’est pas présente. Elle ne doit pas être détectée.
  + Positif condition expérimentale certifiée. Sa présence est assurée.

Important, il faut ajouter le plus possible des étapes de vérifications.

Important lorsqu’il y a des composés communs entre plusieurs échantillons, il est préférable de préparer une solution globale qui sera à distribuer dans chaque échantillon pour limiter la variation des conditions expérimentale entre les échantillons.

Réplica biologique plusieurs individus avec dans les mêmes conditions.

Réplica technique plusieurs analyses d'un même échantillon.

## Fabrication d’une gamme

Échantillon artificiel constitué une gamme permet de s’assurer que la gamme contiendra la valeur de tous les échantillons.

Noter les noms des échantillons sur les parois et pas sur les couvertes pour éviter les problèmes de sens.

# Les techniques utilisées

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 et charge les protéines négativement (utilisé notamment pour les électrophorèses).
* Les alcools :
  + Éthanol, isopropanol pour précipiter les acides 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 cofacteur (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
* Phénol solubilise l’ADN et ARN.
* Guanidinium thiocyanate lyse cellule + dénature
* Les ADN précipitent à pH acide ou faire une extraction phénol / chloroforme.
* Osmium fixateur de lipides et de protéines. Métaux contient de nombreux électrons.
* Agent intercalant de l’ADN et de l’ARN iodure de propidium.
* Mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures.

### 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.

### Condition

Non dénaturante conserve les liaisons non covalentes notamment les complexes protéiques.

Type de mutations :

* Mutation perte de fonction : mutation qui conduit à l’absence de production de l’ARN.

Technique d’étude de séparation moléculaires

* Électrophorèse :
* SDS-PAGE
* Chromatographie :

Techniques d'étude des protéines :

|  |  |
| --- | --- |
| Technique | Objectif et principe |
| Chromatographie | Ensemble de techniques ayant pour but de séparer les composées. |
| Immunoprécipitation | Montrer que deux protéines s’associent. |
| Western blot | vérifier la présence des deux protéines. |

# L’analyse des résultats en biologie

|  |
| --- |
| Vocabulaire |
| Témoin & référence & standard |
| Contrôle |
| Inhiber/favoriser |
| Perturber |
| Direct/Indirect  Indirect se réfère à une substance qui agit sur une voie de signalisation. |
| Progressive/instantané |
| Organiser/désorganiser |
| Compétition |
| Localisation |
| Endogène exogène |

## Étude de documents (méthode)

1. Partir de la pathologie
2. Technique utilisée en précisant s'il s'agit :
   * d’une approche macro ou microscopique.
   * de conditions expérimentales in vivo ou in vitro. Attention il faut nuancer les résultats car il peut exister d'importantes différences entre ces deux conditions.
3. Déterminer le témoin.
4. Objectif (à mettre sous forme de question) Quel est l’objectif de l’expérience ? À quelle question les chercheurs souhaitent répondre ? À formuler sous forme d’une question.
5. Résultats/observation : décrire les résultats. Il faut commencer par l’expérience témoin.
6. Interprétation. D’après ce que je sais….
7. Réponse à la question posée de façon explicite.
8. Proposer des hypothèses pour expliquer le résultat.

Rmq : pour la rédaction, l’objectif doit apparaitre avant la technique utilisée.

Attention il faut nuancer les résultats car il peut exister d’importantes différences entre les conditions expérimentales in vivo et in vitro.

# Méthodes d’étude du rôle d’un type cellulaire

Pour déterminer le rôle d’un type cellulaire, on détruit le type cellulaire étudié. Il existe deux méthodes, l’utilisation :

* D’animaux dont l’expression des gènes qui fabriquent le type cellulaire étudié est bloqué.
* La filtration par l’utilisation d’antigènes qui ciblent des récepteurs membranaires spécifiques de la cellule étudiée. Cette méthode peut être réalisé soit :
  + À l’intérieur de l’organisme. La fixation des anticorps qui conduit à la mort cellulaire.
  + À l’extérieur de l’organisme. Les cellules sont filtrées par exemple par l’ajout d’aimant aux anticorps.

PFU méthode pour mesurer la quantité de molécules virales. Lors d’expériences, les quantités virales utilisées sont définies autour de celles qui conduit à un taux de mortalité de 50%.

# Les principales méthodes

* Blot détection d’une protéines ou d’un polymère d’acide nucléique spécifique.
* Chromatographie méthode de séparation.
* Électrophorèse séparation par le poids moléculaire (taille des chaines dépliées).

Attention à l'électrophorèse la distance de migration dépend de la quantité d'ADN ou de protéines sur le gel. Si les quantités entre la gamme étalon et l'échantillon sont trop importantes.

## Purification des protéines

Migration sur gel SDS-Page

La migration permet en plus de créer des échantillons avec des protéines d’une gamme de taille restreinte.

Dénaturation des protéines qui sera utile pour faciliter le découpage en peptides.

## Découpage des protéines en peptides

Rétablir les paramètres chimiques optimales pour que les endopeptidases soit le plus efficace. Dans l’idéale il faudrait qu’elle lyse tous les séquences reconnu.

Les endopeptidases sont

Trypsine coupe aux niveaux des aa cycliques.

Des différences existent entre les enzymes en termes d’efficacité et de spécificité. Autrement spécifique. Elle coupe en sauf

Utilisation d’urée favorise l’activité de la trypsine.

## Chromatographie

Fractionne l’échantillon de départ

Gradient particulièrement utilisée affinité notamment pour les complexes protéiques.

Propriété physique des molécules

Par ce pourrait servir à identifier une erreur

Affinité

* Biotine (vitamine B8) avec le strept.
* Du nickel avec l’histidine.
* Hydrophobe avec des chaines carbonées. De grande taille pour les petites molécules et petite avec les grandes molécules pour
* grandes molécules non polaire avec de petites chaines carbonées (sinon les molécules restent collées).

Baisse pH et solvant.

Haute pression sur appareil ? micro-taille paramètre

75nm taille échantillon

Avantage

Pb : utilisation sels étape d’élimination des sels.

Électrophorèse (taille point isoélectrique)

Poids moléculaires apparent

Deux types de HPLC :

Mobile : polaire (inverse apolaire)

Stationnaire : apolaire (inverse polaire avec la silice)

Molécules sortent en premier : polaire

## Quantification des protéines

Il existe plusieurs méthodes mon quantifié l’ADN :

* L’électrophorèse
* La spectrométrie de masse.

Limite de l’électrophorèse (visualiser modification post traductionnelle) pas très reproductible

Quelques avantages de la spectrométrie de masse :

* Certaines coloration sont compatibles avec spectrométrie notamment Coomassie.