

Compte rendu TPs

TP 1 : Étude de la viabilité cellulaire

Introduction - contexte scientifique :

Le processus de développement de médicaments est complexe et coûteux, impliquant souvent la recherche de milliers de molécules avant qu'une seule ne soit commercialisée. L'évaluation précoce de la cytotoxicité des candidats médicaments est alors essentielle pour sélectionner les molécules les plus prometteuses. Les méthodes *in vitro* sont couramment employées pour évaluer la viabilité cellulaire. Les tests de viabilité cellulaires permettent de prévoir la toxicité d'une molécule pour prédire et éviter tout effet indésirable sur l'organisme.

Méthode :

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique du CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay développée par Promega. Cette méthode se base sur la réduction du MTS en formazan par les cellules métaboliquement actives, permettant ainsi de mesurer la viabilité cellulaire. L'intérêt d'étudier la viabilité cellulaire est de prévoir les effets des candidats médicaments en regardant leur impact sur la prolifération cellulaire. Ainsi, pour choisir le meilleur candidat médicament il nous suffira d'analyser leur IC₅₀, soit la concentration de la molécule pour laquelle on observe une réduction de 50% de la viabilité cellulaire par rapport à un contrôle n'ayant subi aucun traitement, afin d'en déduire le meilleur candidat médicament.

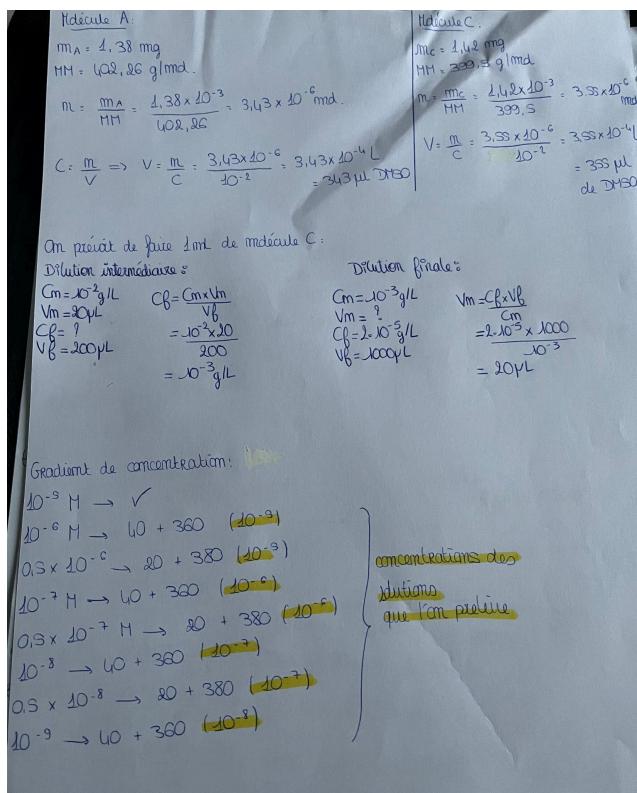
Ce test MTS étudie alors la métabolisation par la NADPH du MTS en un produit coloré. L'activité de la NADPH peut être mesurée par test spectrophotométrique. Lorsque l'on observe un changement de couleur (orange/brun) et donc une certaine absorbance mesurée à 490nm, on considère que le NADPH est fonctionnelle et que les cellules sont vivantes.

En général, un test de viabilité cellulaire se déroule comme suit :

- 1) Cellules mise en culture sur une boîte de 96 puits
- 2) Temps d'incubation d'1 nuit
- 3) traitement des cellules par les molécules à tester
- 4) exposition des cellules à ces molécules pendant 3 jours
- 5) ajout de MTS pour étudier l'activité de la NADPH
- 6) test spectrophotométrique pour détecter un changement de couleur
- 7) Calcul du pourcentage de cellules vivantes grâce aux absorbances

Dans le cadre de ce TP, nous étudierons la cytotoxicité de 3 candidats médicaments, le composé A, le composé B, et le composé C. Nous choisirons ensuite de travailler avec le composé C avec les gradient de concentrations suivants : 10⁻⁵, 10⁻⁶, 0,5*10⁻⁶, 10⁻⁷, 0,5*10⁻⁷, 10⁻⁸, 0,5*10⁻⁸, 10⁻⁹ pour déterminer l'IC₅₀.

On commence d'abord par préparer des quantités adéquates de solution de molécule A et la solution de la molécule C :



Résultats :

On commence par calculer le pourcentage de viabilité des cellules. Le témoin représente une viabilité cellulaire de 100% pour une absorbance de 0,347.

À partir de ces données et des valeurs d'absorbance de nos divers composés, on va pouvoir faire un produit en croix pour déterminer leur viabilité cellulaire.

Viabilité cellulaire des autres molécules:

- Molécule de référence = 90,7%
- Molécule A = 89,3%
- Molécule B = 91,9%
- Molécule C = 10,42%

C (en nmol/L)	logC (nM)	Viabilité (%)
10000	4	1,06
1000	3	1,15
500	2,698970004	7,78
100	2	28,8
50	1,698970004	72,6
10	1	73,5
5	0,698970004	91,1
1	0	91,9

Pour déterminer la valeur d'IC50, nous tracerons la courbe de viabilité cellulaire en fonction du log de la concentration.

Approximativement, on trouve que la viabilité maximale est de 92%, $92/2 = 46\%$
 on regarde à 46%, le logC correspondant. On a environ $\log C = 1,7$ nM soit $C = 50,11 \text{ nM}$.
 Ici, l'IC50 de la molécule C est d'environ 50,11 nM.



Ainsi, une concentration de 50,11nM de la molécule C est nécessaire pour observer une réduction de 50% de la viabilité cellulaire.

TP 2 : Étude de l'interaction moléculaire (affinité) ligands - cible moléculaire biologique (récepteur)

Principe du TP :

Le principe est d'évaluer l'affinité de 2 ligands envers le récepteur P2X7 en déterminant leur constante d'affinité K_i . En utilisant des membranes de cellules HEK293 surexprimant le récepteur cible, les ligands sont testés à différentes concentrations dans des puits de plaque Optiplate. Après incubation avec un ligand de référence radiomarqué, l'activité radioactive est mesurée pour chaque puits.

Les données obtenues permettent de calculer l' IC_{50} , représentant la concentration à laquelle 50 % de la liaison du ligand de référence est inhibée par les ligands testés. À partir de l' IC_{50} , la constante d'affinité K_i peut être déterminée, donnant ainsi des informations cruciales sur l'interaction entre les ligands et le récepteur P2X7, essentielles pour la conception de médicaments et la compréhension des mécanismes biologiques.

Méthode :

La méthode utilisée est la méthode de déplacement, une technique qui permet d'évaluer l'affinité des ligands pour un récepteur cible. Pour cela nous utiliserons le ligand de référence radiomarqué 3H-A804598, et la mesure de sa liaison au récepteur P2X7. Les composés à tester sont ajoutés à des concentrations variables dans des puits de plaque Optiplate contenant des membranes de cellules HEK293 préalablement diluées dans du Tampon d'affinité composé de Tris-HCl à 50mM et de BSA à 0,1%. En comparant les données obtenues avec et sans les composés à tester, il est possible de déterminer l'effet de déplacement et d'obtenir des informations sur l'affinité des ligands pour le récepteur P2X7.

Préparation du tampon d'affinité:

Tris-HCl

$$2M \xrightarrow{V=0,375 \text{ mL}} 50 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_m = \frac{C_f \times V_f}{C_m} = \frac{50 \times 10^{-3} \times 15}{2}$$

$$V_m = 0,375 \text{ mL}$$

BSA

$$3\% \xrightarrow{V=500 \mu\text{l}} 0,1\%$$

$$V_m = \frac{C_f \times V_f}{C_m} = \frac{0,1 \times 15}{3}$$

Préparation de la solution de membranes diluées:

Dilution pour 1 puit:

$\hookrightarrow 10 \mu\text{g}/\text{puit}$

$$V_m = \frac{C_f \times V_f}{C_m} = \frac{48,78 \times 205 \times 10^{-3}}{1767} = 5,66 \mu\text{l de mL/puit}$$

$$+ 199,3 \mu\text{l de tampon d'affinité}$$

Dilution pour 50 puits: (on prévoit 50 puits pour avoir une marge)

$283 \mu\text{l de membranes} + 9967 \mu\text{l de tampon}$

⚠ on prépare
des solutions
10x plus
concentrée pour
avoir la concen-
tration adéquate
lors de l'ajout des
les puits

Préparation du radioligand:

Pour 1 puit: $V_m = \frac{C_f \times V_f}{C_m} = \frac{8000 \times 10^{-3} \times 25}{8,33 \times 10^{-5}} = 2,4 \mu\text{l}$

Pour 50 puits:

$V_m = 120 \mu\text{l} \text{ dans } 2130 \mu\text{l de tampon d'affinité}$

Préparation des gradients de concentration (ligand 1 et ligand 2),

C₁ C_m = 10000 μM V_m = 25 μL
 C_f = 1000 μM V_f = 250 μL

C₂ C_m = 1000 μM V_m = 10 μL } de C₁
 C_f = 100 μM V_f = 100 μL }

C₃ C_m = 1000 μM V_m = 10 μL } de C₂
 C_f = 100 μM V_f = 100 μL }

C₄ C_m = 100 μM V_m = 10 μL } de C₃
 C_f = 10 μM V_f = 100 μL }

C₅ C_m = 10 μM V_m = 10 μL } de C₄
 C_f = 1 μM V_f = 100 μL }

C₆ C_m = 1 μM V_m = 40 μL } de C₅
 C_f = 0,1 μM V_f = 80 μL }

C₇ C_m = 0,1 μM V_m = 20 μL } de C₆
 C_f = 0,01 μM V_f = 100 μL }

C₈ C_m = 0,1 μM V_m = 10 μL } de C₇
 C_f = 0,01 μM V_f = 100 μL }

C₉ C_m = 0,01 μM V_m = 10 μL } de C₈
 C_f = 0,001 μM V_f = 100 μL }

Résultats :

Pour chacun des 2 ligands, on commence par calculer la moyenne d'absorbance de la gamme de dilution.

On trace les courbes des 2 ligands de l'absorbance en fonction de la concentration des molécules utilisées.

Graphiquement, on détermine $\log C = 3,2 \text{ nM}$ soit $C = 1584 \text{ nM}$.

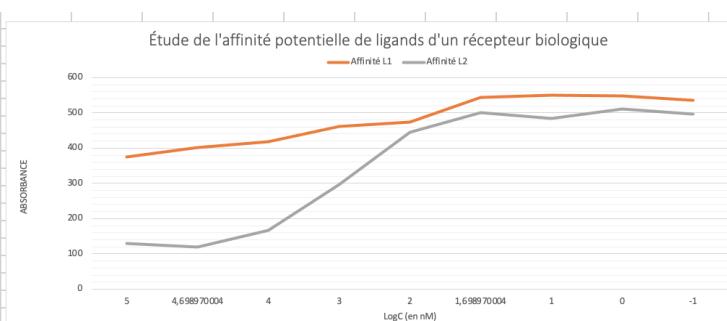
Ici, l' IC_{50} du ligand 2 est d'environ 1584 nM soit 1,584 μM .

$$Ki = (1584,89) / (1 + (8,33 \cdot 10^{-5} / 20,63)) = 40 \text{ nM}$$

Il est impossible de calculer l' IC_{50} du ligand 1 car les valeurs sont beaucoup trop élevées.

Cela peut signifier que la molécule C n'a aucune affinité avec les récepteurs.

C (en nmol/L)	$\log C$ (nM)	Affinité (%)	Affinité L1	Affinité L2
100000	5	69,9	375,5	129
50000	4,698970004	74,7	401	119,5
10000	4	77,9	418,5	166
1000	3	86,03	462	297
100	2	88,36	474,5	444
50	1,698970004	101,3	544	501
10	1	102,4	550	485
1	0	102,05	548	510,5
0,1	-1	99,72	535,5	497,5



TP3: Application de la PCR au diagnostic de l'hémochromatose par PCR RFLP

Séquence du gène de l'hémochromatose

1. Déterminer la séquence et la position de 2 amores :

Séquence : 5'- **ctttcctgtc aagtgcctcc** -3'

tttgtgaag gtgacacatc atgtgacc tc tca gatggactt
 gaactactac ccccaagaaca tc accatgaa gtggctgaag gataaggcgc caatggatgc
 caaggagttc gaa ctaaag acgtattgcc caatggggat gggacacctacc agggctggat
 aaccttggct **gtac**ccccctgi g g g a a g a g c a g a g a t a a c g tgccagggg agcacccagg
 cctggatcag ccccttattg t gatctgggg tatgtgactg atgagagcca ggagctgaga
 aaatctattg ggggtt gaga **g g a g t a c** ctg aggaggtaat tatggcagtg agatgaggat
 ctgcttttgc tt a g g g g t g g c c g a g g g t g g c a a t c a a a g g c t t a a c t t g c t t t
 gtttttagagc c c t c a c c g t c t g c a c c t a g t c a t c a g t g g a g t a t g c t g t
tttgtcgta tcttgtcat tggaa - 3'

Position : 101 - 625

Longueur : 524 nucléotides

Amorce 1 : 5'- **ctttcctgtc aagtgcctcc** -3'

Position : 101-120

Longueur : 20 nucléotides

Amorce 2 : 5'-**tttgtcgta tcttggcat tggaa** -3'
5'-aaacagcagt agaacaagta acctt - 3' traduit
3'- ttcca atgaacaaga tgacgacaaa -5' anti-sens
Position : 601-625
Longueur : 25 nucléotides

2. Calcul des Tm de chacune des amorces :

Amorce 1 :
Tm basique : 53.8 °C
Tm Salt adjusted : 60.5 °C

Amorce 2 :
Tm basique : 52.8 °C
Tm Salt adjusted : 60.9 °C

3. Proposer protocole d'amplification : 1000 EN 60s

- Nom: Amplification_gene_cible
- Température et temps des étapes:
 - Étape 1: 95°C pendant 5 minutes (dénaturation initiale)
 - Étape 2: 95°C pendant 30 secondes (dénaturation)
 - Étape 3: **60°C** pendant 30 secondes (température d'alignement des amores)
 - Étape 4: 72°C pendant 35 secondes (extension) (31,44)
 - Répéter les étapes 2 à 4 pour un total de 30 cycles
 - Étape 5: 72°C pendant 10 minutes (extension finale)

!!! la température d'alignement des amores ne doit pas excéder 60°C pour ne pas que

Calcul temps d'élongation :

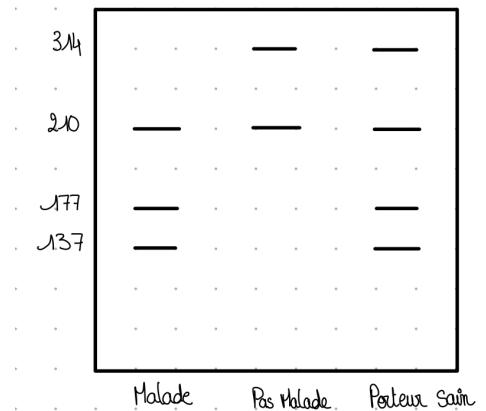
on sait que la vitesse de la Taq polymerase est de 1min pour 1000 nucléotides

Donc pour la longueur de notre séquence qui est de 524 nucléotides, il faudra chauffer 35 secondes. (produit en croix)

Choix du marqueur :

Il faudra choisir un marqueur qui puisse marquer nos 3 fragments selon leur taille, notre premier fragment contient 210 nucléotides, le second 137, et le troisième 177.
Le marqueur qui semble le plus adapté est le 1,1% Rooti garose HR + 0,8% Synergel (réf 2810) puisqu'il permet de détecter les fragments à partir de 50 nt jusqu'aux fragments de 500 nt.

Schématisation du profil électrophorétiques attendus :



Séquence partielle du gène NOS2 Homo Sapiens

1. Déterminer la séquence et la position de 2 amores :

Séquence : 5'- **ttccaccagt atgcaatgaa tggg**aaaaaa gacatcaaca acaatgtgga gaaagcccccc
tgtgccacct ccagtccagt gacacaggat gaccctcagt atcacaacct cagcaagcag
cagaatgagt ccccgccagco cctcgtggag acgggaaaaga agtctccaga atctctggtc
aagctg**gatg caacccatt gtcctccca** - 3'

Position : 301 - 511

Longueur : 1 nucléotides

Amorce 1 : 5'- **ttccaccagt atgcaatgaa tggg** -3'

Position : 301-325

Longueur : 24 nucléotides

Amorce 2 : 5'- **gatg caacccatt gtcctccca**-3'

5'- ctac gttggtaa caggagggt - 3'

3'- **tggggaggac aatgggttg catc** -5'

Position : 487-510

Longueur : 24 nucléotides

2. Calcul des Tm de chacune des amores :

Amorce 1 :

Tm basique : 55.7 °C

Tm Salt adjusted : 63.6 °C

Amorce 2 :

Tm basique : 60.8 °C

Tm Salt adjusted : 68.5 °C

3. Proposer protocole d'amplification :

- Nom: Amplification_gene_cible
- Température et temps des étapes:
 - Étape 1: 95°C pendant 5 minutes (dénaturation initiale)
 - Étape 2: 95°C pendant 30 secondes (dénaturation)
 - Étape 3: **63°C** pendant 30 secondes (température d'alignement des amorces)
 - Étape 4: 72°C pendant 30 secondes (extension)
 - Répéter les étapes 2 à 4 pour un total de 30 cycles
 - Étape 5: 72°C pendant 10 minutes (extension finale)

Notez que la température d'alignement (étape 3) est choisie en fonction de la température de fusion des amorces (moyenne des Tm). Dans ce cas, nous avons choisi une température de 63°C.

Calcul temps d'elongation :

on sait que la vitesse de la Taq polymerase est de 1min pour 1000 nucléotides

Donc pour la longueur de notre séquence qui est de 210 nucléotides, il faudra chauffer 13 secondes.

Application au clonage de la séquence codante :

Amorce sens 1 : 5' cagggaggaggctgtcacc 3'

Position : 122-141

Longueur : 20 nt

Temp : 60°C

Amorce anti-sens 2 (complémentarité !) : 5'- tcggtccgtggcaccgagt-3'

Position : 1930-1949

Longueur : 20 nt

Temp : 62°C

Enzymes utilisées :

Hind III

KpnI

5' agcaagcttcagggaggaggctgtcacc- séquence codante -
tcggtccgtggcaccgagt ggtaccaa 3'

TP 4 : dosage des protéines

L'équation de notre droite est :

$$y = 0,0394x + 0,0004$$

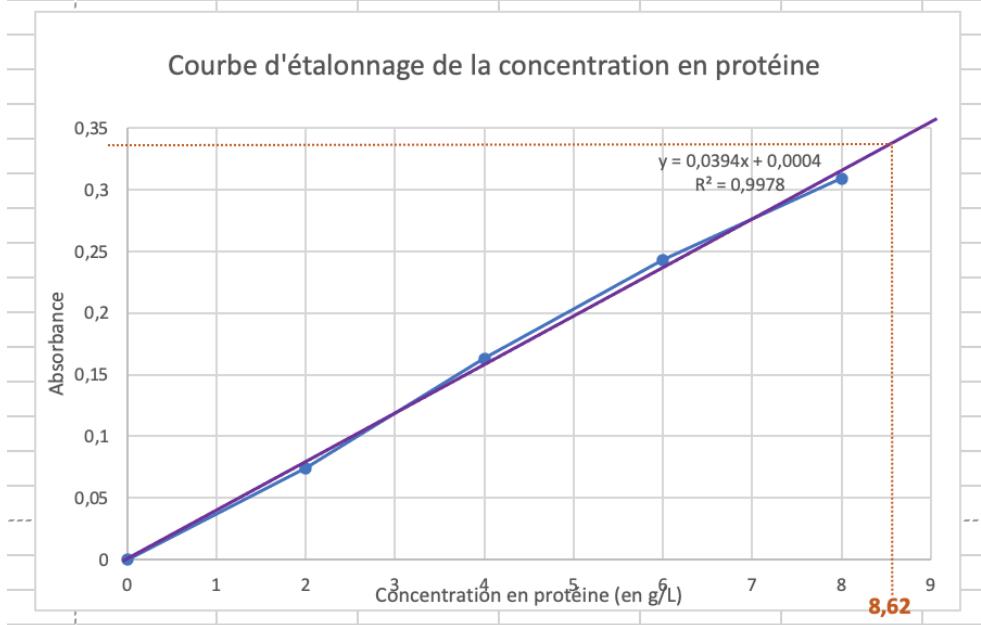
Nous connaissons l'absorbance de notre solution, on peut donc en déduire sa concentration.

$$x = (0,340 - 0,0004)/0,0394$$

$$x = 8,62 \text{ g/L}$$

	C (g/L)	A
B	0	0
E1	0,5	0,074
E2	1	0,163
E3	1,5	0,243
E4	2	0,309
Dosage		0,34

Il ne faut pas oublier qu'on a dilué notre solution au 10e donc on a 86,2 g/L de protéine dans notre plasma.



On sait que l'intervalle de référence pour les protéines sériques se situe entre 65 et 80 g/L. Ici, $86,2 \text{ g/L} > 80 \text{ g/L}$, on peut donc dire que le patient présente une hyperprotéinémie. Cette hyperprotéinémie peut être causée par une synthèse excessive soit d'immunoglobulines soit de protéines de la réaction inflammatoire.

Électrophorèse :

L'électrophorèse des protéines du sérum est très utilisée pour rechercher des modifications du profil protéique. Elle permet de séparer 6 fractions protéiques majeures : albumine, l'alpha-1 globuline, alpha-2 globulines, beta globulines et gamma globulines.

Nous allons réaliser la séparation protéique de 7 plasma différents.

On obtient ces résultats :

- patient 1 = sain
- patient 2 = sain
- patient 3 = sain
- patient 4 = hypoprotéinémie (absence de gamma globuline)
- patient 5 = sain
- patient 6 = cirrhose (forte expression de gamma globulines)
- patient 7 = hypoprotéinémie (absence de gamma globuline)