

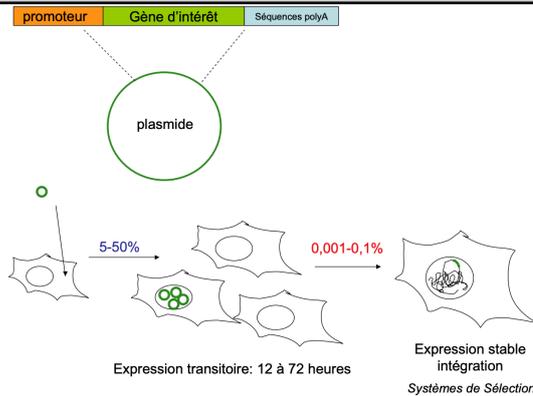
## Analyser la transcription

### 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** :  $\phi$  de la glycolyse + cytosolique
  - $\approx$  **témoin de charge**

## Analyse de l'efficacité transcriptionnelle de régions ADN régulatrices

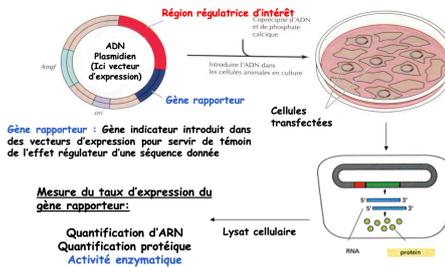
### Transfection



- 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

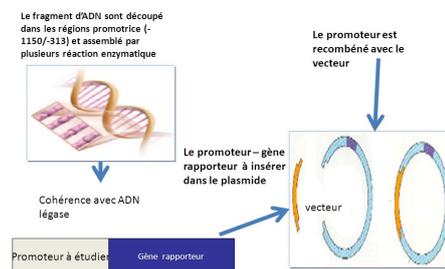
#### Analyse fonctionnelle de régions régulatrices *ex vivo* : transfection

**Objectif** : évaluer la capacité et le rôle de différentes régions ADN à diriger la transcription.  
 Afin de mesurer directement et facilement l'efficacité transcriptionnelle d'une région, on utilise la stratégie du gène rapporteur (CAT, luciférase,  $\beta$ galactosidase...)



### Technique du gène rapporteur

#### Le clonage d'un promoteur-gène rapporteur dans un vecteur

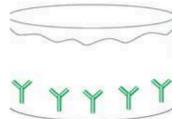




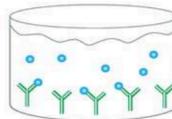
## Western Blot (WB)

- 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 étudiée 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

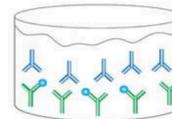
## ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)



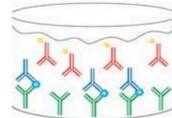
1: AC spécifique de la protéine à doser fixé (« coated ») au fond du puit



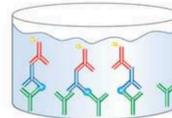
2: ajout du lysat ou du serum (ou du standard) dans le puit. Incubation. L'AC spécifique va capter la protéine à doser



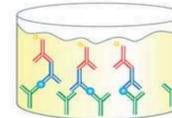
3: lavage pour éliminer les protéines non liées. Ajout d'un autre AC, polyclonal, spécifique de la protéine à doser



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



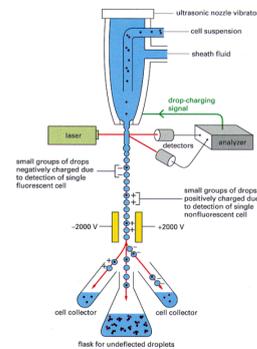
5: lavage et incubation avec le substrat de l'enzyme, réaction colorée



6: ajout solution stop et mesure de l'absorbance

- Quantifier une protéine sans la séparer

## Cytométrie en flux

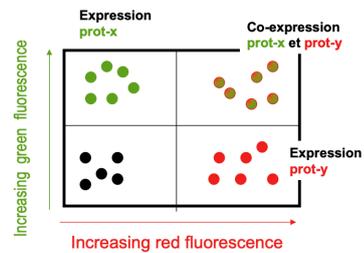


Cytomètre en flux  
Trieur de cellules= FACS=  
Fluorescence-activated cell sorter

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

**Ac anti prot. X**

**Ac anti prot. Y**

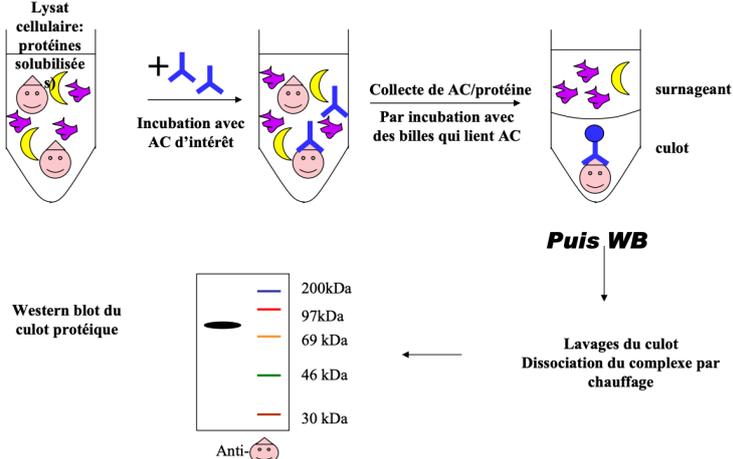


## Cytométrie en flux

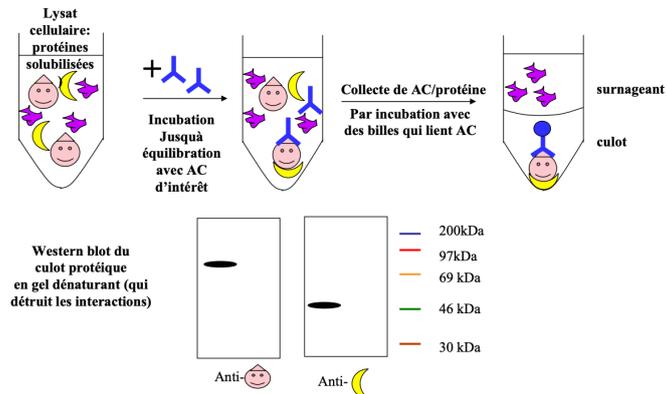
- Objectifs
  - **Reconnaître** et **trier** les  $\phi$  fluorescentes
  - **Compter** le nombre total de  $\phi$  exprimant la prot
- Différentes étapes
  1. Mise en contact d'une **suspension cellulaire** avec des **Ac** couplé à un fluorochrome spécifique
  2. Introduction de la suspension cellulaire dans un ensemble permettant de **séparer les  $\phi$  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  $\phi$  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  $\phi$  **fluorescentes**
    - **Positive** aux  $\phi$  **non fluorescentes**
  7. **Tri des  $\phi$**  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



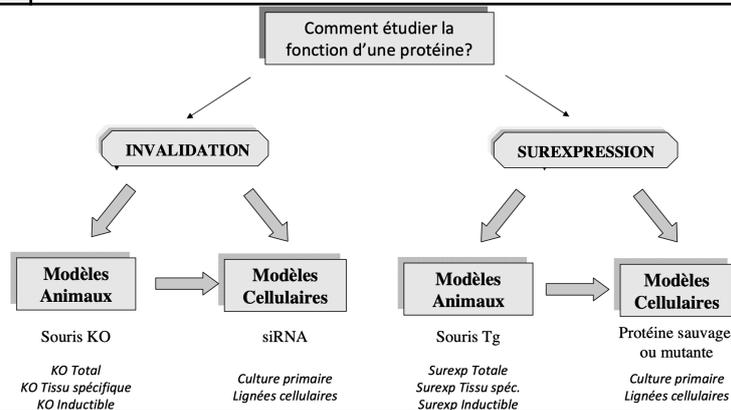
### Séparer la protéine d'un mélange et recherche d'interaction



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

METHODOLOGIE EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

<b>Marqueurs</b>	<b>Ki67</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marque <b>tes les phases</b> : G1, S, G2, M</li> </ul>
	<b>BrDu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• analogue de la <b>thymidine</b></li> <li>• détecter les cellules dont la <b>réplication</b> de l'ADN est <b>active</b></li> </ul>
<b>Séquence consensus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Séquence idéalisée d'une région donnée</b> d'un acide nucléique ou d'une protéine</li> <li>• dans laquelle <b>chaque position</b> représente la <b>base</b> ou l'<b>acide aminé</b> r</li> </ul>	
<b>Méthodes d'inactivation :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- à gauche : siRNA</li> <li>- À droite : KO</li> </ul>	<p>dsRNA or Hairpin Dicer siRNA duplex Ago Formation of RISC siRNA-mRNA complex RISC Sliced mRNA GENE SILENCING</p>	<p>séquences promotrices gène à invalider insertion d'un autre gène (Lac Z par exemple) élimination du gène à invalider gène inséré en lieu et place du gène invalidé, sous le contrôle de ses séquences promotrices</p>
<b>Retard sur le gel :</b>  <b>EMSA</b>  <b>(Electrophoretic Mobility Shift Assay)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• basé sur le <b>retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide</b> de duplexes d'<b>oligonucléotides de séquences courtes</b> en présence de protéines ou de complexe protéique ayant la propriété de reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt.</li> <li>• La <b>variation de migration</b> des duplexes (ou sonde) complexés aux protéines par rapport aux duplexes libres est <b>suivie grâce au marquage radioactif au 32P</b> des sondes nucléotidiques.</li> <li>• Peut être réalisé <b>à partir de protéines purifiées</b> ou d'un <b>extrait protéique plus complexe</b> (extrait nucléaire par ex)</li> </ul>	



<p style="text-align: center;"><b>ChIP</b> <b>(Immunoprécipitation de la chromatine)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Obj</u> : savoir <b>si une protéine donnée lie un fragment précis d'ADN</b>.</li> <li>• <u>Avantage majeur</u> :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>in vivo</b> (analyse faite sur les cellules vivantes.)</li> </ul> </li> <li>• <u>Protocole</u> :             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. après la croissance des cellules dans les conditions souhaitées, <b>toutes les protéines qui touchent l'ADN</b> y sont <b>immobilisées</b> par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction grâce à un traitement au <b>formaldéhyde</b>.</li> <li>2. <b>Cellules lysées</b>,</li> <li>3. Puis les <b>complexes ADN-protéines fragmentés</b> en courts segments</li> <li>4. St <b>immunoprécipités</b>.                 <ul style="list-style-type: none"> <li>- à l'aide d'un <b>anticorps dirigé</b> contre la protéine d'intérêt (l'activateur de transcription X, par exemple), permet de récupérer les <b>protéines</b> voulues ainsi que <b>toutes les régions d'ADN auxquelles elles étaient liées lors du pontage initial au formaldéhyde</b>.</li> </ul> </li> </ol> </li> </ul>	<p>The diagram illustrates the ChIP protocol in four stages:         <ul style="list-style-type: none"> <li><b>A) Chromatine</b>: Shows a DNA strand (ADN) with a protein of interest (Protéine d'intérêt) and other proteins (Protéines) bound to it.</li> <li><b>B) Pontage</b>: The DNA-protein complex is cross-linked to a solid support (Support solide).</li> <li><b>C) Fragmentation</b>: The cross-linked complex is fragmented into smaller pieces, followed by washes (Lavages) to remove non-specific proteins.</li> <li><b>D) Renversement du pontage</b>: The cross-links are reversed, and the DNA is purified (Purification de l'ADN). The final step is PCR with specific primers (PCR avec amorces spécifiques) to amplify the DNA fragments.</li> </ul> </p>
<p style="text-align: center;"><b>Trypsine</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• endoprotéase</li> <li>• <b>hydrolyse les liaisons peptidiques</b> dans lesquelles un acide aminé basique (<b>Lysine, Arginine</b>) engage sa fonction acide.</li> </ul>	