

**TRAVAUX PRATIQUES
L2 PHARMACIE**

UE 4

**BIOCHIMIE ET BIOLOGIE
CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
(B.B.C.M.)**

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2024 - 2025

**Responsable : Mme N. MEJDOUBI-CHAREF ;
najet.mejdoubi-charef@universite-paris-saclay.fr**

Equipe enseignante :
B. Benoit ; A. Bruneel ; E. Bugnard ; F. Gesbert ; J. Hamelin ; N. Mejdoubi-Charef ;
R. Perrier ; A. Pilon ; J. Vergnaud ; S. Lorin ; C. Le Gléau ; I. Traore ; L. Lagadec ; A. Malet

Sommaire

	<i>page</i>
<i>Planning du TP</i>	3
<i>Comment prélever avec précision ?</i>	4
<i>Introduction générale</i>	6
<i>Séance Enzymologie</i>	7
<i>Etablissement de la courbe d'étalonnage de PNP</i>	7
<i>Détermination des V_0 pour 2 solutions de phosphatase acide</i>	8
<i>Compte rendu « Enzymologie »</i>	10
<i>Détection par Western-blot de l'actine dans des extraits protéiques totaux</i>	12
<i>Séance Préparation des extraits protéiques totaux à partir de cellules en culture</i>	13
<i>Séance Dosage protéique et préparation des échantillons pour le Western blot</i>	16
<i>Séance Western-blot</i>	19

Planning du TP

5 séances de 13h30 à 17h30

Thématique	Nb de séances	Jour	Compte-rendu à rendre
Enzymologie	1	lundi <u>ou</u> mardi	le lendemain
Préparation des extraits protéiques totaux à partir de cellules en culture	1	lundi <u>ou</u> mardi	
Dosage protéique et préparation des échantillons pour le Western blot	1	mercredi	
Western blot (électrophorèse, électrotransfert, coloration au rouge Ponceau, saturation)	1	jeudi	Examen dosage protéique et culture cellulaire
Western blot (immunorévélation)	1	vendredi	Examen WB

Les manipulations et les comptes-rendus seront faits **en binômes** ; les **examens** seront faits en **individuel**.

La note finale de TP BBCM comptera pour 8 points/50 à l'UE4.

Les TP sont obligatoires. **Toute absence doit être justifiée** auprès du responsable des TP (par un certificat médical) et seules les absences **justifiées pourront être rattrapées**.

Examen

Merci de prévoir papier, crayon et calculatrice.



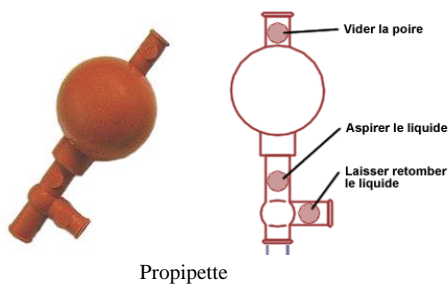
Comment prélever avec précision ?

*Il est strictement interdit de pipeter à la bouche
Toujours choisir le matériel adapté au volume à prélever*

- A partir de 50 mL : éprouvette graduée



- Entre 1 et 25mL : propipette + pipette graduée jetable (5mL, 10mL, 25mL)



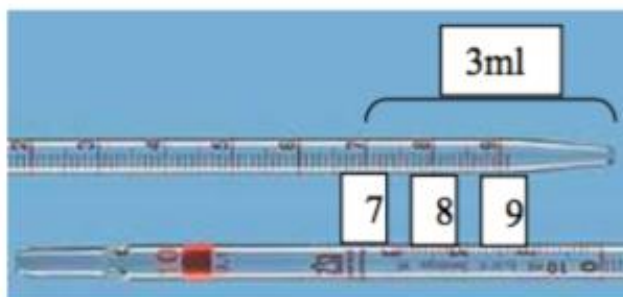
Propipette



Tourner la mollette
haut = aspirer
bas = verser

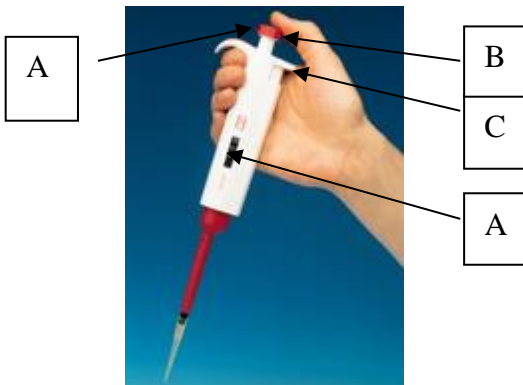


Appuyer sur un bouton
haut = aspirer
bas = verser



Pipette graduée jetable

- Entre 1 μL et 1000 μL (1 mL) : pipette à piston + cône jetable



Pipette (avec son cône)

Des **volumes mini** et **maxi** sont indiqués (**A** selon les pipettes)

Régler le volume à prélever (tourner molette/piston **B**)

NE PAS ALLER AU-DELA DES LIMITES INDIQUEES

Utiliser piston **C** pour éjecter le cône après usage



Différentes tailles de cônes : choix en fonction de la pipette

Ne pas prendre les cônes à la main

Enfoncer la pipette bien verticale dans un cône

Toujours utiliser un cône adapté et procéder selon l'ordre suivant

1. Appuyer sur le piston **B** jusqu'au premier cran pour **chasser l'air**
2. Placer la pointe du cône dans le liquide à prélever (inutile de plonger tout le cône dans le liquide).
3. Relâcher doucement la pression du pouce sur le piston pour **aspirer**
4. Pour **verser** le liquide prélevé, appuyer sur le piston **B** jusqu'au deuxième cran (donc en butée).
5. Avant de relâcher le piston, relever la pipette en dehors du liquide
Rq : toujours verser au fond du tube en touchant la paroi, surtout pour les petits volumes

Introduction Générale

Les **protéines** sont des constituants essentiels d'une cellule et d'un organisme, dans lesquels elles assurent des fonctions très diverses. Elles peuvent jouer un rôle structural (comme l'actine), un rôle enzymatique (phosphatase acide), un rôle hormonal ...

Certaines protéines sont utilisées comme **marqueurs biologiques**, permettant le **diagnostic** et le suivi thérapeutique de nombreuses maladies. C'est le cas, par exemple, de protéines exprimées spécifiquement par des cellules tumorales dont la détection permet de diagnostiquer la présence d'une tumeur chez un patient. Dans ce cas, il est nécessaire de détecter leur présence ou leur activité, et d'avoir une approche quantitative ou semi-quantitative pour comparer des échantillons biologiques entre eux.

De nombreuses techniques permettent de détecter ou de doser les protéines ou leur activité enzymatique. Au cours de ces travaux pratiques, nous utiliserons deux de ces techniques basées sur différentes propriétés des protéines.

- Lorsque la protéine est une enzyme, il est possible d'en évaluer la concentration en déterminant son **activité enzymatique**. De nombreux tests diagnostiques utilisés en laboratoire de biologie médicale sont basés sur cette détermination (dosage d'enzymes plasmatiques telles que l'ASAT, l'ALAT qui sont des transaminases hépatiques et musculaires).
- Lorsque l'on dispose d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt, il est possible de la détecter et de l'identifier dans un échantillon biologique grâce à la technique de **Western-blot**. Cette technique est largement utilisée dans les laboratoires de recherche qui s'intéressent aux rôles des protéines, mais également dans les laboratoires de biologie médicale pour le diagnostic de certaines pathologies. Le Western-blot est par exemple utilisé comme test de confirmation de la séropositivité pour le VIH.

Nous allons aborder ces deux techniques en nous intéressant plus particulièrement :

1. A la détermination de l'activité enzymatique de la **phosphatase acide**
2. A la détection semi-quantitative de l'**actine** dans un extrait protéique total obtenu à partir de cellules en culture.

Séance Enzymologie

1) Présentation de la séance

Dans des **conditions dites « conventionnelles »** (température, pH, force ionique, excès de substrat...), **l'activité d'une enzyme** (exprimée en U/L ou katal/L) est appréciée **indirectement** par la **vitesse initiale V_0** (idéalement V_{\max}) de la réaction qu'elle catalyse.

L'enzyme étudiée en TP est la **phosphatase acide**. Elle exerce, à pH acide, une activité catalytique sur l'hydrolyse d'esters phosphoriques portés par des molécules simples ou des macromolécules et nous utiliserons le paranitrophénylphosphate (PNPP) comme substrat :

Paranitrophénylphosphate + Eau \rightleftharpoons paranitrophénol (PNP) + phosphate

(L'eau, étant en excès, elle peut être négligée dans les calculs)

Vous allez déterminer les **activités enzymatiques d'une enzyme E** (phosphatase acide) dans **2 solutions A et B**.

Les vitesses initiales V_0 sont déterminées à partir de cinétiques d'incubation en présence de **2 solutions d'enzyme** (A et B) et d'une solution de substrat (PNPP) à une concentration fixée et en large excès par rapport à celle de l'enzyme.

Pour chaque cinétique, la **V_0** de la réaction est obtenue en mesurant la variation de la concentration en produit (paranitrophénol = PNP) libéré par unité de temps. Les temps choisis (**2 minutes, 4 minutes, 6 minutes et 8 minutes**) correspondent théoriquement à des conditions de vitesse initiale. La concentration en PNP formé est obtenue après mesure de son absorbance à **410 nm**, celle-ci étant reportée sur papier millimétré pour obtenir une **courbe d'étalonnage** représentant l'absorbance du PNP à 410 nm en fonction de sa concentration.

2) **Etablissement de la courbe d'étalonnage de PNP**

A pH 10 (en présence de NaOH), le PNP (et non le PNPP) prend une **coloration jaune** dont l'absorbance (λ_{\max} à 410 nm) est proportionnelle à sa concentration. Ainsi, les concentrations en PNP produit lors d'une cinétique pourront être déduites des absorbances mesurées à 410 nm grâce à l'établissement préalable d'une courbe d'étalonnage.

Préparation de la gamme de paranitrophénol (PNP ; **volumes en mL**) :

Préparer séparément **2 séries** de la gamme étalon ci-dessous :

Numérotez 6 tubes à hémolyse, de 0 à 5 (en deux séries identiques) et placez-les sur un portoir. Commencer aux choix par l'un des 3 composés (Tampon, PNP ou NaOH). Changer de cônes entre chaque prélèvement et déposer les solutions au fond des tubes à hémolyse. Les cônes en plastiques doivent être jetés dans les bouteilles d'eau minérale en plastique de vos paillasses.

Introduire dans chacun de ces 12 tubes : **0,5 mL de NaOH 0,2 mol/L.**

Dans ces 12 tubes, la soude servira à **stopper la cinétique enzymatique** aux temps 2, 4, 6 et 8 minutes et en sa présence le **PNP prendra une coloration jaune.**

4 - L'ensemble de la cinétique enzymatique se fait dans le bain-marie à 37°C dans les gros tubes (et non pas sur la paillasse). Vos 12 tubes de sodes doivent être prêts et à T°C ambiante. Déclencher le chronomètre et verser à 37°C **1 mL de substrat dans les tubes A, B, et T selon le schéma ci-dessous** (page 10, gros tubes). Respecter les 30'' d'intervalle. Bien **agiter**. **Pour commencer la cinétique il est essentiel de prélever précisément 1 mL de substrat** (vérifier que votre cône est bien dans la solution, n'aspirer pas d'air, garder vos gros tubes à 37°C). **Changer de cône à chaque fois**, pour ne pas contaminer les tubes entre eux.

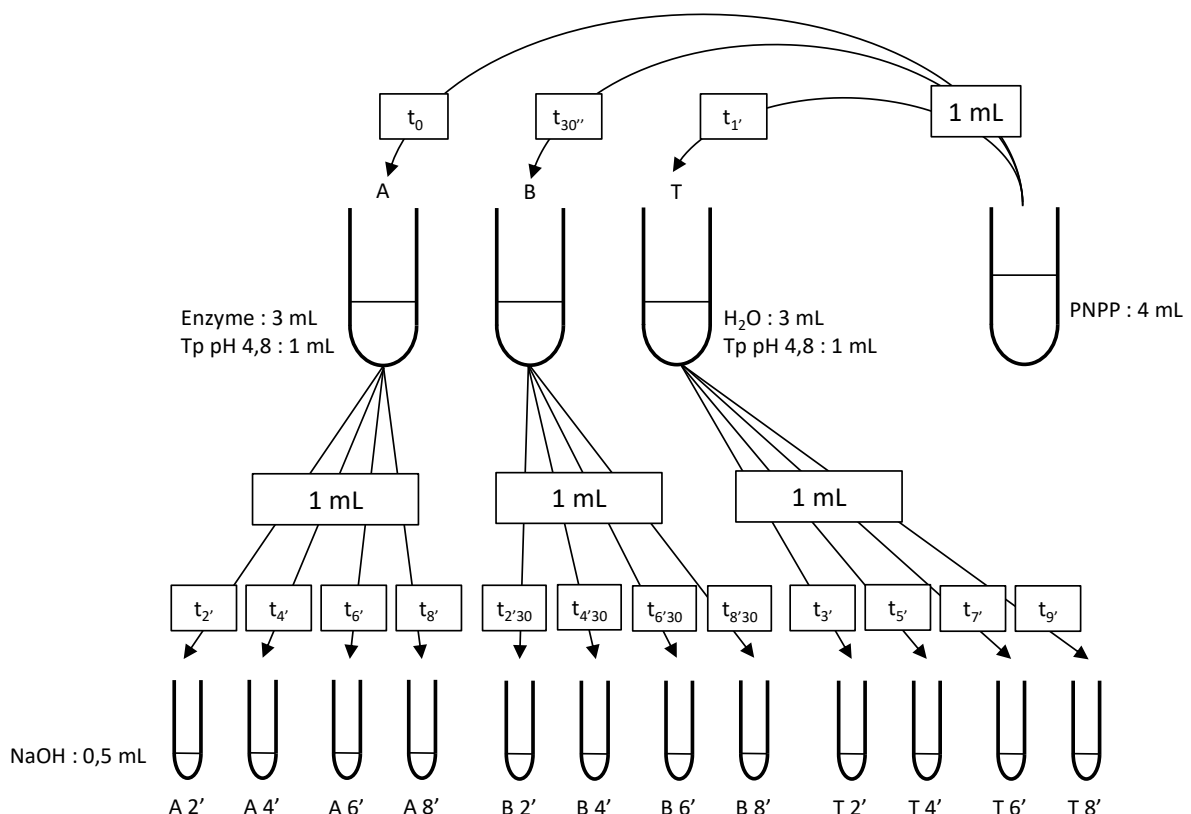
5 - Arrêt des cinétiques

- Aux temps 2, 4, 6 et 8 minutes de chaque incubation, **prélever 1 mL dans chacun des tubes A, B, et T (les gros tubes doivent rester dans le bain-marie à 37°C).**

- Introduire ces 1mL dans les petits tubes de soude correspondants (12 petits tubes qui sont **hors du bain-marie**, à température ambiante).

- **Bien agiter** pour arrêter efficacement chaque réaction avec la soude.

Rq : **il est essentiel de prélever 1 mL** (vérifier que votre cône est dans la solution, n'aspirer pas d'air, garder vos gros tubes à 37°C). **Changer de cône à chaque fois**, pour ne pas contaminer les tubes entre eux. **Respecter les temps indiqués**, sinon la cinétique sera faussée.



6 - Mesure des absorbances à 410 nm

Pour chaque série de 4 tubes (A2, A4, A6, A8 / B2, B4, B6, B8), mesurer l'absorbance des tubes A et B à 410 nm en **réglant le zéro de l'appareil sur le tube T (T2, T4, T6, T8)** correspondant. Reporter les valeurs d'absorbance dans le tableau **QIII.2 du compte rendu.**

Une fois les courbes tracées, jeter vos solutions dans les grands éviers en bout de paillasse, rincer les tubes à l'eau du robinet et les placer dans la bassine prévue à cet effet (petits tubes hémolyse) ou sur le portoir de votre paillasse (gros tubes). Ces données permettent de tracer les graphes de la question **QIII.3** du compte rendu.

En fin de séance, vous devez ranger vos paillasses (propipettes, micropipette à piston, portoirs, boîtes de cônes) et tabourets.

Tous les cônes et pipettes graduées plastiques souillés doivent être placés dans votre poubelle de paillasse (bouteille plastique d'eau minérale).

Compte-rendu « Enzymologie »

I. Questions « Introduction »

- Indiquer la réaction enzymatique étudiée. Quelle est l'enzyme, le substrat, le produit ?
- Enoncer les conditions nécessaires pour la mesure de vitesses initiales (V_0)

II. Courbe d'étalonnage du PNP

QII.1- Donner la définition et le rôle de la gamme d'étalonnage du PNP.

QII.2- Compléter le tableau suivant après avoir explicité votre calcul pour un tube. Calculer la concentration de PNP (en $\mu\text{mol/L}$) dans chaque tube **avant l'addition de soude** (à cet effet, indiquer le volume réactionnel avant l'ajout de la soude, cf page 8).

Quel est l'intérêt de faire 2 séries de tubes ?

Tube	0	1	2	3	4	5
[PNP] $\mu\text{mol/L}$						
Abs _{410nm} série 1						
Abs _{410nm} série 2						

QII.3- Après avoir placé **tous les points expérimentaux des 2 séries sur un graphe**, tracer la meilleure droite moyenne étalon $A(410\text{ nm}) = f([\text{PNP}])$ **en $\mu\text{mol/L}$** (papier millimétré, une seule droite passant par le maximum de points des 2 séries).

QII.4- Calculer la pente de votre droite d'étalonnage. A quoi va vous servir ce coefficient directeur de la droite d'étalonnage ?

III. Détermination des V_0 pour 2 solutions d'enzyme

QIII.2- Compléter le tableau ci-après.

- à partir des absorbances mesurées et en utilisant la droite d'étalonnage établie précédemment, déterminer les concentrations en produit PNP ($\mu\text{mol/L}$) formé dans le milieu réactionnel. Expliquer votre raisonnement pour la condition A2 et indiquer si des valeurs sont inexploitable en justifiant.

Tube	A2	A4	A6	A8	B2	B4	B6	B8
Abs _{410nm}								
[PNP] en $\mu\text{moles/L}$								
Temps en min								

QIII.3- Sur une nouvelle feuille, tracer sur un même graphe les 2 courbes $[\text{PNP}] = f(t)$ correspondant à chaque solution d'enzyme A et B. **Comparer ces 2 courbes et indiquez si vous êtes bien dans les conditions de V_0 .** Utilisez les courbes pour déduire les V_0 en $\mu\text{mol/L/min}$ correspondant à chaque solution d'enzyme.

QIII.4- En déduire l'activité enzymatique (AE) en phosphatase acide **dans la cuve, en U/L** pour chaque solution A et B (sachant que 1 unité U d'enzyme est la quantité d'enzyme permettant de transformer 1 $\mu\text{mol/min}$ de substrat).

Ensuite, en déduire les AE (en U/L) en enzyme **des 2 solutions de départ** (sans tenir compte de la soude, pour être cohérent avec la gamme étalon). **Expliquer vos calculs pour la solution A.**

QIII.5- Conclure sur l'activité enzymatique de la phosphatase dans les solutions A et B de départ.

	Solution A d'enzyme	Solution B d'enzyme
V_0 $\mu\text{mol/L/min}$		
AE dans le milieu réactionnel (enzyme diluée) U/L		
AE de départ (enzyme pure fournie) U/L		

Détection par Western-blot de l'actine dans des extraits protéiques totaux

L'objectif de ces 4 séances de TP est de détecter la présence de protéines dans des cellules grâce à la technique de Western-blot. Au cours de ce TP, nous allons nous intéresser à l'actine un composant majeur du cytosquelette. Dans ce but, plusieurs étapes expérimentales sont nécessaires :

- 1- Préparation des extraits à partir de cellules en culture : 1 séance
- 2- Dosage des protéines totales contenues dans les extraits totaux : 1 séance
- 3- Western-blot (électrophorèse SDS-PAGE + électrotransfert + immunorévélation) :
2 séances

A. Séance « Préparation des extraits protéiques totaux à partir de cellules en culture »

I. Principe

Les cultures cellulaires de mammifères sont réalisées dans des conditions permettant d'assurer la stérilité microbiologique (Poste de Sécurité Microbiologique) en présence d'antibiotiques et d'antifongiques. Afin de conserver leur capacité proliférative, les cellules sont cultivées sur des milieux complexes adaptés aux différents types cellulaires (**sels minéraux, acides aminés, glucose, vitamines, facteurs de croissance** apportés en général par du sérum de veau fœtal (SVF)). Les cultures cellulaires sont maintenues à **+37°C** dans une **atmosphère saturée en eau** et dans un environnement gazeux **contenant 95% d'air et 5% de CO₂** (le dioxyde de carbone, permet de tamponner le milieu de culture afin de maintenir un **pH compris entre 7,2 et 7,4**).

Dans ces conditions, la croissance cellulaire se fait de façon exponentielle. Pour maintenir la culture, il faut alors transférer une partie des cellules dans une nouvelle boîte de culture : on dit qu'on « passe les cellules ».

Pour les cellules adhérentes, le **décollement des cellules** de leur support est réalisé grâce à un mélange de **trypsine-EDTA**. La trypsine est une enzyme protéolytique qui digère les protéines d'adhésion, l'EDTA (acide éthylène diamine tetracétique) est un chélatant du Ca⁺⁺ qui a un rôle important dans l'adhérence cellulaire.

Après décollement, **la trypsine est inhibée par addition d'un volume connu de milieu de culture (le sérum de veau fœtal SVF contient un inhibiteur tryptique naturel)**. La concentration de la suspension cellulaire est alors déterminée après comptage. Ceci permet soit de réensemencer une nouvelle culture à un nombre de cellules donné, soit ici dans le TP **d'analyser des constituants cellulaire après lyse des membranes avec des détergents**.

II. Technique

Avant de toucher aux flacons de cellules, il faut porter des gants

1. Disposer sur votre paillasson

- La **trypsine-EDTA** préchauffée au bain-marie à +37°C.
- Un tube à bouchon de 15 mL avec votre numéro de binôme.
- Le flacon T25 de **cellules** à passer.
- Une poubelle contenant de l'eau de Javel diluée.

2- Décollement des cellules

- Observer les cellules au **microscope**.
- **Verser la totalité du milieu de culture** dans la poubelle liquide sans toucher les bords de la poubelle.
- Rincer les cellules par **2 mL de PBS** avec une pipette stérile de 5 mL (cf composition PBS p16). Agiter sur un plan horizontal, puis jeter le PBS. Jeter la pipette dans la poubelle.
- Verser **1 mL de trypsine-EDTA** sur les cellules à l'aide d'une micropipette.
- Boucher le flacon
- Agiter doucement le flacon dans un plan horizontal puis le **mettre à plat dans l'incubateur (+37°C)** pendant **5 minutes**.

- Observez les cellules au **microscope**. Ensuite, **taper chaque côté de la boîte**, tenue horizontalement, à coups secs avec le plat de la main. Observez de nouveau les cellules au **microscope**, pour s'assurer qu'elles sont toutes en suspension.

- Après décolllement des cellules, ajouter **4 mL de milieu de culture à la pipette** dans la boîte (pour arrêter l'action de la trypsine). **Récupérer les 5 mL de suspension cellulaire pour la mettre dans votre tube de 15 mL propre** (n'aspirer pas de bulle d'air, cela peut endommager le filtre de la pipette. A la place prélever en plusieurs fois si nécessaire).

3- Récupération des cellules

- Bien **homogénéiser** les 5 mL de suspension de cellules à la pipette sans faire trop de bulles. **Prélever immédiatement 100 µL** et les placer au fond d'un tube Eppendorf en touchant la paroi avec votre cône (pour comptage, voir étape 4 à faire pendant la centrifugation).

- Centrifuger le tube contenant les cellules **3 min à 2500 rpm. (centrifugation I)**.

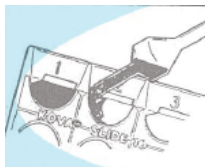
Après centrifugation, verser le surnageant dans la poubelle en renversant doucement le tube pour ne pas décoller le culot de cellules.

- Resuspendre le **culot** dans **500 µL de PBS**. Transvaser dans un tube Eppendorf de 1,5 mL (inscrire votre numéro de binôme).

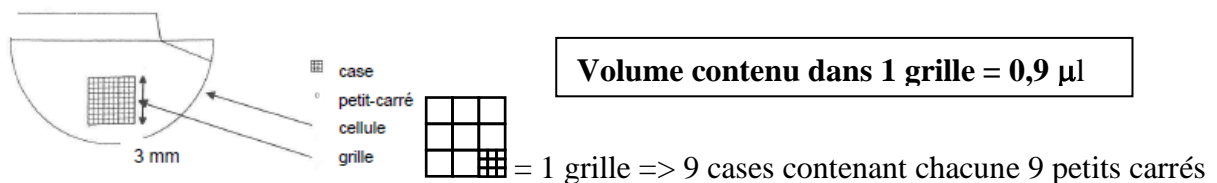
4- Comptage des cellules

- Bien homogénéiser les **100 µL de votre suspension de cellule** et en prélever **12 µL** pour les déposer dans une **cellule de comptage**.

Une lame contient 10 cellules de comptage et chaque cellule de comptage est à usage unique. Placer le cône à 45° dans l'encoche. Remplir toute la cellule de comptage et ne pas faire de bulle.



- Placer votre lame sous **microscope**. Au sein de chaque cellule de comptage se trouve une grille. Cette grille est conçue pour correspondre à 0,9 µL.



Compter les cellules contenues dans 1 case (= 9 petits carrés) correspondant à 0,1 µL.

Calculer le **nombre total de cellules contenues dans** la suspension (5 mL) d'où vous avez prélevé les 100 µL pour comptage en vous aidant du tableau à compléter ci-dessous.

Pour remplir le tableau suivant :

- Indiquer le nombre de cellules comptées dans une case.

- En déduire la concentration cellulaire de votre suspension (nombre de cellules / mL)

- Donner le volume total de votre suspension cellulaire (mL) (dans laquelle vous avez prélevé les 100 µL) qui servira à préparer les extraits protéiques.

- Calculer le nombre total de cellules contenues dans votre suspension qui a servi à préparer les extraits protéiques.

Moyenne du nombre de cellules / case	Volume d'une case (μL)	Concentration cellulaire (nb cellules / mL)	Volume total de votre suspension cellulaire (mL)	Nombre total de cellules dans la suspension	Volume tampon de lyse à ajouter (μL)

5- Lavage des cellules et lyse cellulaire

- Centrifuger **3 min à 2500 tours/min** le tube Eppendorf contenant les **cellules** reprises dans **500 μL de PBS. (centrifugation II).**
- Aspirer le surnageant.
- Reprendre le **culot** par **50 μL de tampon de lyse froid** (cf composition ci-dessous) **par million de cellules (en arrondissant au million près), homogénéiser** avec une micropipette pour dissocier le culot de cellules (les détergents moussent, attention si vous avez un petit volume).
- Incuber **30 min dans la glace.**
- Centrifuger **10 min à 13 000 tours/min au froid. (centrifugation III).**
- Prélever le **surnageant, le placer dans un tube nommé A** (avec votre N° de binôme) et jeter le culot. Placer votre tube A dans la glace pour que vos enseignants le conservent ensuite à -20°C).

III. Composition des réactifs

Tampon de lyse 1X à utiliser à 4°C :

TrisHCl pH 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	1%
DOC	0.5%
SDS	0.1%
Cocktail inhibiteurs de protéases	1X
PMSF	1 mM
EDTA	5 mM
NaF	10 mM
NaOV	1 mM

Tampon PBS 1X:

NaCl	8g/L
KCl	0,2g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44g/L
KH ₂ PO ₄	0,24g/L
pH ajusté à 7,4 avec HCl	

B.Séance « Dosage protéique et préparation des échantillons pour le Western blot »

1) Dosage protéique

I. Principe

Dans le but de déposer sur gels de polyacrylamide une quantité connue de protéines, il est nécessaire de réaliser un dosage de protéines totales. Les protéines totales contenues dans les extraits protéiques issus de la lyse des cellules seront dosées selon la **technique à l'acide bicinchoninique (BCA)**. A cet effet, le dosage de protéines d'une **gamme étalon d'albumine bovine** sera réalisé.

La technique au BCA est dérivée de la **méthode au Biuret**. En **milieu alcalin**, les ions cuivriques Cu^{2+} présents dans le réactif sont **réduits par les protéines** en ions cuivreux Cu^+ , formant ainsi des complexes qui présentent un maximum d'absorbance à **540 nm**.

La sensibilité de cette méthode au Biuret est améliorée par la présence de **l'acide bicinchoninique (BCA)** dans la technique au BCA (domaine de mesure des concentrations protéiques de 0,05 à 2 g/l). Les ions cuivriques **Cu^{2+} présent dans le réactif sont réduits par les protéines en ions cuivreux Cu^+ qui forment avec le BCA un complexe coloré en violet absorbant à 562 nm.**

II. Technique

1- Décongeler votre extrait protéique total (tube A préparé lors de la séance « extrait protéique » et qui correspond à votre échantillon protéique pur).

Préparer **3 tubes** Eppendorf contenant 50 μL d'une dilution au 1/10, 1/5 et 1/2 respectivement de votre extrait protéique dans du NaCl 0,15 M.

Afin de préparer vos dilutions, prélever et placer au fond du tube d'abord le NaCl 0,15 M, qui sert de diluant. **Homogénéiser votre extrait protéique avant de prélever les volumes requis, sinon vos dilutions seront faussées.** Pour les petits volumes, s'assurer que vous ne prélevez pas de l'air et bien déverser dans le NaCl au fond de l'Eppendorf. Mélanger votre dilution.

2- Préparer les 7 tubes indiqués sur le tableau ci-dessous :

	0 Blanc	1 Etalon 1	2 Etalon 2	3 Etalon 3	4 Extrait protéique dilué 1/10 ^e	5 Extrait protéique dilué 1/5 ^e	6 Extrait protéique dilué 1/2
NaCl 0,15 M	25 μL	-	-	-	-	-	-
Albumine 0,25 g/L	-	25 μL	-	-	-	-	-
Albumine 0,5 g/L	-	-	25 μL	-	-	-	-
Albumine 1 g/L	-	-	-	25 μL	-	-	-
Extrait protéique 1/10 ^e	-	-	-	-	25 μL	-	-
Extrait protéique 1/5 ^e	-	-	-	-	-	25 μL	-
Extrait protéique 1/2	-	-	-	-	-	-	25 μL

3- Quand tous vos tubes (0 à 7) sont prêts, ajouter dans chacun 500 µl de **BCA**, en changeant de cône. **Agiter** et placer les tubes **30 minutes à +37°C et à l'obscurité**.

4- Mesurer l'absorbance (**DO à 562 nm**) en réglant le zéro du spectrophotomètre sur le blanc de la gamme d'étalonnage (tube 0 contenant le NaCl).

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage, déduire la concentration de votre extrait protéique

5- Compléter le tableau ci-après.

Tracer la courbe d'étalonnage sur papier millimétré.

En déduire, si vos données sont exploitables, les concentrations de l'extrait protéique dilué au 1/10^{ème}, 1/5^{ème} et au 1/2. Justifiez si les données sont exploitables ou non.

Tube	Blanc	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Extrait protéique dilué au 1/10 ^e	Extrait protéique dilué au 1/5 ^e	Extrait protéique dilué au 1/2
Abs _{562nm}							
[protéines] de l'échantillon g / L	0	0,25	0,5	1			
[protéines] déduite pour le tube A g / L							

6- A partir des valeurs obtenues pour les échantillons dilués au 1/10^{ème}, 1/5^{ème} et au 1/2, recalculer la concentration de l'extrait protéique pur (tube A) et compléter le tableau ci-dessus. (Ne pas tenir compte du BCA pour être cohérent avec la gamme).

Comparer vos 3 valeurs de concentration (ou celles que vous avez) et en déduire la concentration de votre extrait protéique pur du tube A. Convertir la concentration de votre extrait protéique du tube A en µg/µL pour la suite.

2) Préparation des échantillons en vue du Western blot

On souhaite visualiser, par Western blot, l'actine contenue dans **10 µg (tube B)** et **40 µg (tube C)** de protéines totales.

1- Calculer le volume d'extrait protéique à prélever à **partir du tube A** (préparé lors de la séance « extrait protéique » et qui correspond à votre échantillon protéique pur). Indiquer le volume de NaCl à ajouter pour avoir un volume final de 20 µL pour B et C.

Nous disposons de tampon Laemmli concentré 4 fois soit 4X.

Tampon Laemmli concentré 4X (utilisation 1X)

Tris-HCl 2,5 M pH 6,8	0,5 mL
β-mercaptoéthanol	0,5 mL
SDS 20%	2,0 mL
Bleu de bromophénol	quelques grains
Glycérol	2,0 mL

2- Calculer le volume de tampon Laemmli à ajouter à votre extrait (extrait brut + NaCl) de façon à avoir une concentration finale de 1X en tampon Laemmli pour vos échantillons B et C.

Compléter le tableau suivant :

TUBE A	TUBE B			TUBE C		
[protéines] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	V pour 10 μg de protéines (μL)	V NaCl (μL)	V Laemmli (μL)	V pour 40 μg de protéines (μL)	V NaCl (μL)	V Laemmli (μL)

3- Procéder à la **préparation de vos échantillons B et C** à partir de votre extrait pur A (décongelé et bien homogénéisé) et en commençant par mettre le NaCl. Verser au fond du tube en touchant la paroi, surtout pour les petits volumes puis ajouter le Tp Laemmli. Changez de cônes et soyez précis en pipettant. Indiquer vos numéros de binômes sur les tubes B et C.

5- Mettre les 2 échantillons au bloc chauffant **5 min à 100°C**. Centrifuger 30 secondes à vitesse maximale (pour faire décanter la condensation présente dans le capuchon et sur les parois du tube après chauffage).

Placer vos **tubes B et C dans la glace** (vos enseignants les conserveront à -20°C).

C. Séances « Western-blot »

Le **Western-blot** est une méthode permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Il est possible, grâce à cette technique, de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon, d'évaluer sa taille, son abondance, les variations de cette abondance, effectuer des comparaisons d'abondance entre différents groupes, etc. La technique de Western-blot nécessite plusieurs étapes :

- 1- L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS
- 2- L'électrotransfert
- 3- L'immunorévélation

1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

I. Principe

En présence de **SDS** (un détergent ionique fort), les protéines sont dénaturées (par dissociation des liaisons non covalentes). La réduction des ponts disulfures par le **β -mercaptoéthanol** complète cette dénaturation des protéines. De plus, le SDS va contribuer à charger globalement négativement les protéines et va conférer à toutes les protéines un rapport charge/masse sensiblement identique. **La vitesse de migration des protéines dans un gel de polyacrylamide ne dépend donc plus que de leur taille.**

II. Technique

La plupart des réactifs étant toxiques, utiliser des gants et une propipette

1- Préparation des gels et dépôt des échantillons

Vous disposez de gels de polyacrylamide pré-coulés. Ces gels sont constitués, dans la partie supérieure, d'un **gel de concentration** à 4% d'acrylamide et dans la partie inférieure, d'un **gel de séparation** dont le pourcentage d'acrylamide dépend de la MM de la protéine d'intérêt (ici, **10 %**).

Laisser tremper quelques instants le gel dans du tampon d'électrophorèse puis **retirer délicatement le peigne** qui a servi à former les puits du gel, en tirant vers le haut.

- Positionner la cassette de gel dans son **support**. Refermer avec le système de verrouillage.
- Insérer le support + cassette de gel dans la **cuve** à électrophorèse.
- Monter le système dans la cuve. Remplir la cuve (compartiments anodique et cathodique) avec du **tampon d'électrophorèse 1 X**. Vérifier l'étanchéité du système.

Tampon d'électrophorèse concentré 10X (utilisation 1X)

Glycine	36 g
Tris base	7,6 g
SDS	2,5 g
Eau distillée	qsp 250 mL

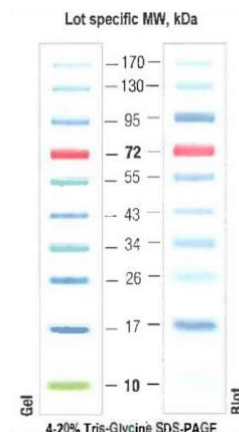
- Dans un des puits du gel de polyacrylamide et à l'aide d'une pipette munie d'un cône effilé, déposer en "sous-marin" un **marqueur de masse moléculaire coloré** contenant un mélange de protéines de masses moléculaires connues (5 μ L par dépôt).

- Déposer ensuite vos **deux échantillons B et C** (10 et 40 μ g de protéines totales) en "sous-marin" dans les puits à l'aide d'une pipette munie d'un cône effilé. Noter l'ordre de dépôt des échantillons dans le gel.

2- Migration

Fermer le couvercle et brancher les électrodes. La migration se fait à voltage constant (**200 V** ; vérifier la formation de bulles au niveau du fil de l'électrode). Arrêter la migration quand le **front de migration arrive en bas du gel (30-45 minutes environ)**.

Profil de migration du marqueur coloré de masse moléculaire de protéines



2) Electrotransfert et immunorévélation

I. Principe

Les protéines, séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente par **électrophorèse en gel de polyacrylamide** en présence de SDS, **sont transférées** sous l'influence d'un champ électrique sur une membrane de nitrocellulose. Après saturation de la membrane nitrocellulose par des protéines de lait, les protéines étudiées sont ensuite identifiées par **immuno-révélation** à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine à détecter (ici, l'actine).

II. Technique

1- Electrotransfert et révélation des protéines totales

Travailler avec des gants

- Préparer le système sandwich d'électrotransfert comme indiqué ci-dessous.

Sur le coté grille noire, mettre successivement :

- *Le **scotch-brite** préalablement trempé dans le tampon d'électrotransfert.*
- *Deux feuilles de **papier filtre** épais (3MM) passée également dans le tampon de transfert.*
- *Le **gel** d'acrylamide démoulé et trempé dans le tampon de transfert.*
- *Une feuille de **nitrocellulose** préalablement saturée en tampon de transfert.*
- *Chasser les bulles d'air en faisant rouler un tube de verre sur la feuille de nitrocellulose en partant du centre de la feuille vers les bords.*
- *Deux feuilles de **papier filtre** épais puis un **scotch-brite** saturés en tampon (cf. ci-dessus).*

- Fermer le système et le placer dans le réservoir à moitié rempli de **tampon d'électrotransfert** froid, coté noir dirigé vers la cathode (noire).

Tampon d'électrotransfert

Tris base 9,09 g
Glycine 43,2 g
Ethanol 600 mL
H2O qsp 3 litres
pH 8,3

- Installer le **bloc de réfrigération** et finir de **remplir** le réservoir jusqu'en haut.

- Mettre le couvercle et démarrer le transfert (ddp = **100 V 1 heure** ou **40 V toute la nuit**).

- Sortir et ouvrir le sandwich avec précaution. **Récupérer la membrane de nitrocellulose.**

- Visualiser les protéines en colorant la membrane au rouge Ponceau. Pour cela, placer les membranes dans une boîte et ajouter 10 mL de solution de rouge Ponceau. Incuber pendant 1 minute, puis le récupérer. Rincer 3 fois à l'eau distillée pour révéler la présence des protéines (membranes à scanner par les enseignants).

- Reporter sur la photocopie de la membrane de nitrocellulose les masses moléculaires (kDa) correspondants à chaque bande du marqueur coloré. Mesurez la distance de migration de chaque marqueur de PM en utilisant la bande à 170 kDa comme repère d'origine.

Compléter le tableau suivant :

Masse moléculaire (kDa)	170	130	95	72	55	43	34	26	17	10
Distance migration (cm)	0									

Tracer la courbe d'étalonnage $\text{Log (masse moléculaire)} = f(\text{distance de migration})$ sur papier semi-logarithmique (Ce qui vous dispense de calculer les logarithmes).

2- Saturation et Immunomarquage.

Toutes les incubations et les lavages se font sous agitation constante

- Saturer la membrane par incubation dans **la solution saturante**, à 4°C pendant la nuit.
- Jeter la solution de saturation et récupérer la membrane (à scanner par les enseignants)
- Incuber la membrane dans 10 mL d'anticorps primaire anti-actine marqué HRP (HRP = peroxydase) dilué dans du TTBS (30 min à température ambiante).
- Laver ensuite la membrane avec le TTBS (3 lavages rapides et 1 lavage de 5 min).

Solution saturante

TTBS + 10% de lait écrémé en poudre

TTBS

TBS + 0,05% de Tween 20

TBS (Tris Buffered Saline)

Tris base 2,42 g
NaCl 29,22 g
Eau distillée qsp 1 litre
pH 7,5 ajusté avec HCl concentré

3- Révélation à l'ECL (enhanced chemiluminescent).

La peroxydase oxyde le luminol qui va émettre de la lumière permettant la révélation des complexes.

- Étaler 0,5 ml de réactif reconstitué extemporanément (contenant le luminol) sur la membrane et laisser agir 1 min. Retirer l'excès d'ECL avec un papier 3MM.
- Placer la membrane dans le plateau de l'appareil IBright Imaging Systems et suivez les instructions pour réaliser la révélation.
- La révélation consiste à capturer le signal émis lors de la réaction de chemiluminescence, sous forme d'image à l'aide d'une caméra haute résolution.

4- Quantification

Réalisez une quantification des signaux obtenus à l'aide du logiciel fourni. C'est une technique de densitométrie, c'est à dire, une technique basée sur la mesure de la densité et de la quantité de signal.