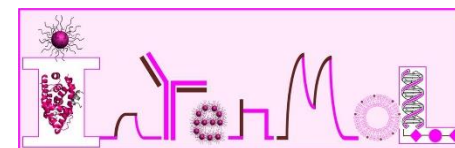


ED Techniques d'études des Interactions Moléculaires UE901



05/11/2024



Magali Noiray
magali.noiray@i2bc.paris-saclay.fr



université
PARIS-SACLAY



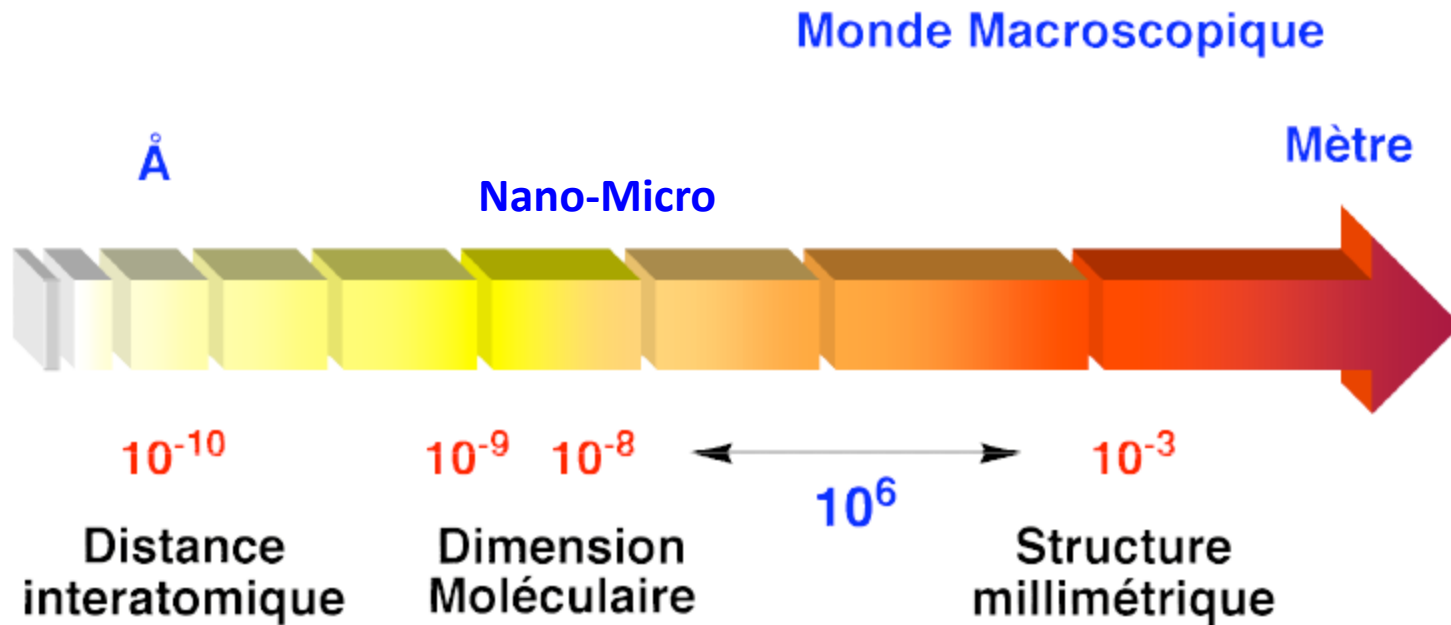
Ingénierie et Plateformes
au Service de
l'Innovation Thérapeutique



Plan de l'ED

- Interactions Moléculaires :
Qu'est-ce que c'est? Comment les mesurer?
- Présentation de la PF
 - Appareillages et Techniques
 - Comparaison des informations
- 3 Techniques
 - Technique ITC: principe et résultats
 - Technique SPR: mise au point d'un protocole expérimental
- Exemples de projets

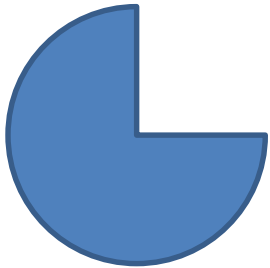
Echelle des Dimensions



Interactions Moléculaires: définition



Récepteur
Interactant
Partenaire

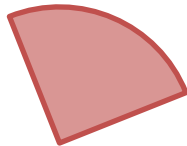


Interactions Moléculaires: définition



Récepteur
Interactant 1
Partenaire 1

Ligand
Interactant 2
Partenaire 2



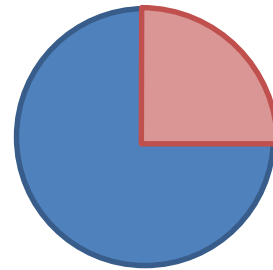
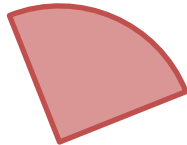
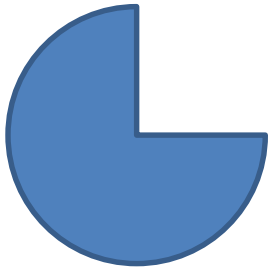
Interactions Moléculaires: définition



Récepteur
Interactant 1
Partenaire 1

Ligand
Interactant 2
Partenaire 2

Complexe



Complémentarité de
de
de

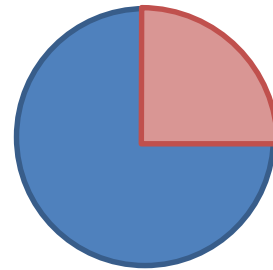
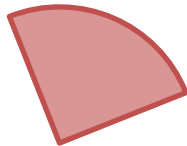
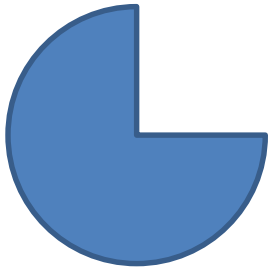
Interactions Moléculaires: définition



Récepteur
Interactant 1
Partenaire 1

Ligand
Interactant 2
Partenaire 2

Complexe



Complémentarité de forme
de charges
de taille

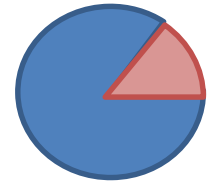
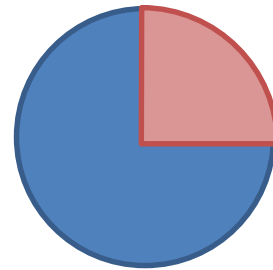
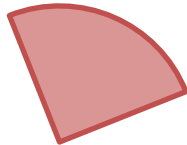
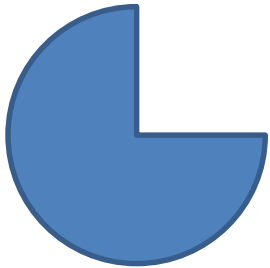
Interactions Moléculaires: définition



Récepteur
Interactant 1
Partenaire 1

Ligand
Interactant 2
Partenaire 2

Complexe



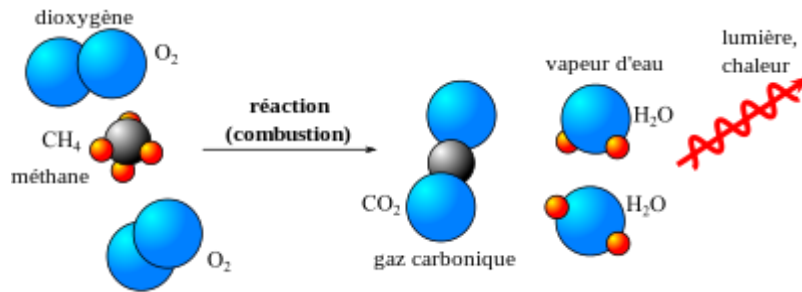
Complémentarité de forme
de charges
de taille

Réactions Chimiques: définition



Réactifs

Produits



Liaisons covalentes:

Cohésion des atomes au sein des édifices moléculaires

Courte portée, forces de liaison/interaction plus fortes

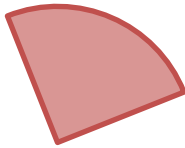
Interactions Moléculaires: définition



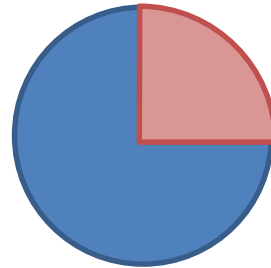
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



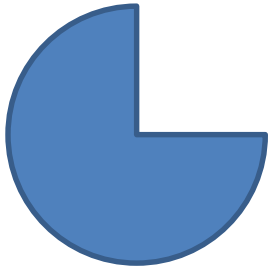
1.

2.

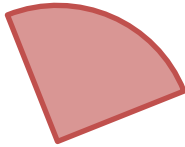
Interactions Moléculaires: définition



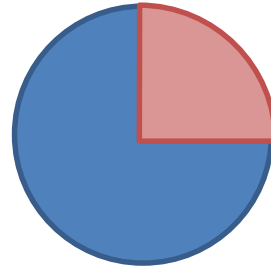
Récepteur



Ligand



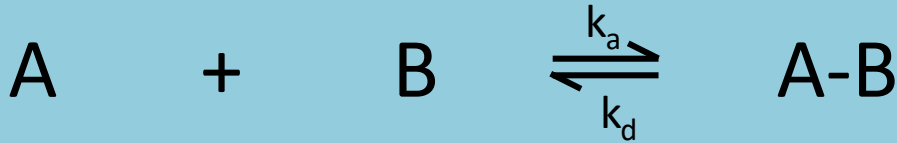
Complexe moléculaire



1. Réversibilité

2. Equilibre

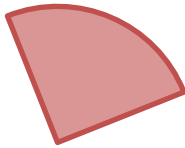
Interactions Moléculaires: définition



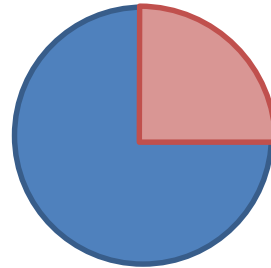
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



1. Réversibilité

2. Equilibre

$$[A]_{\text{éq}} * [B]_{\text{éq}} * k_a = [A - B]_{\text{éq}} * k_d$$

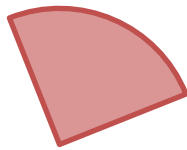
Interactions Moléculaires: définition



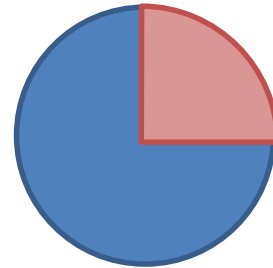
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



1. Réversibilité

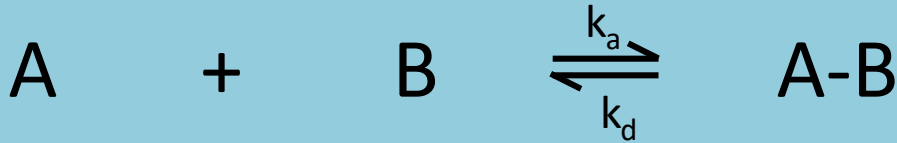
2. Equilibre

$$[A]_{\text{éq}} * [B]_{\text{éq}} * k_a = [A - B]_{\text{éq}} * k_d$$

$$K_a = \frac{[A - B]_{\text{éq}}}{[A]_{\text{éq}} [B]_{\text{éq}}} = \frac{1}{K_d}$$

K_d a la dimension d'une
son unité est le molaire ou .

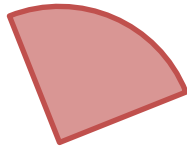
Interactions Moléculaires: définition



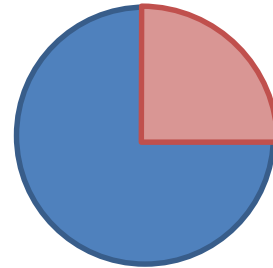
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



1. Réversibilité

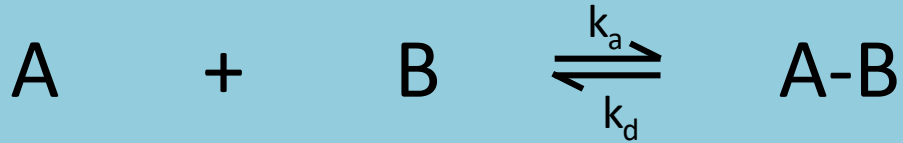
2. Equilibre

$$[A]_{\text{éq}} * [B]_{\text{éq}} * k_a = [A - B]_{\text{éq}} * k_d$$

$$K_a = \frac{[A - B]_{\text{éq}}}{[A]_{\text{éq}} [B]_{\text{éq}}} = \frac{1}{K_d}$$

K_d a la dimension d'une concentration:
son unité est le molaire « M » ou mol/L.

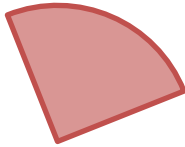
Interactions Moléculaires: définition



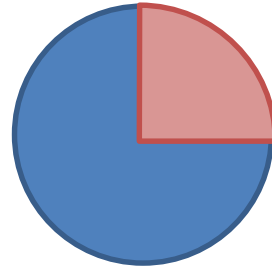
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



$$K_d =$$

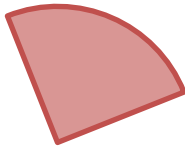
Interactions Moléculaires: définition



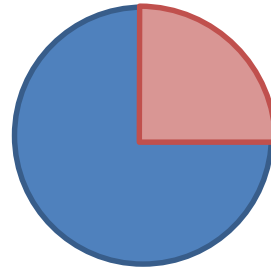
Récepteur



Ligand



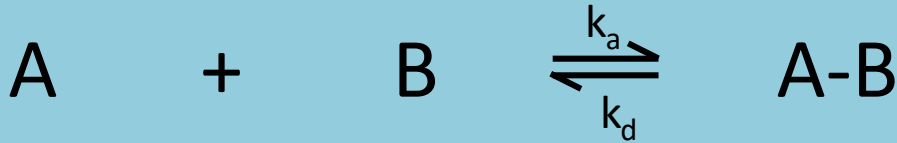
Complexe moléculaire



$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{k_d}{k_a} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_d dépend de
la
la pression P
l'

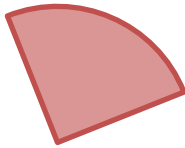
Interactions Moléculaires: définition



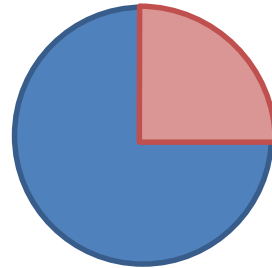
Récepteur



Ligand



Complexe moléculaire



$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{k_d}{k_a} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_d dépend de

la **température T**

la pression P

l'**environnement** (pH tampon, sels)

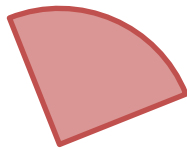
Interactions Moléculaires: définition



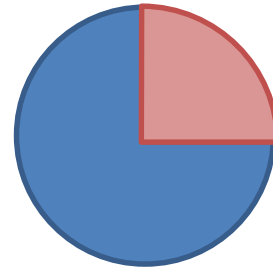
Récepteur



Ligand



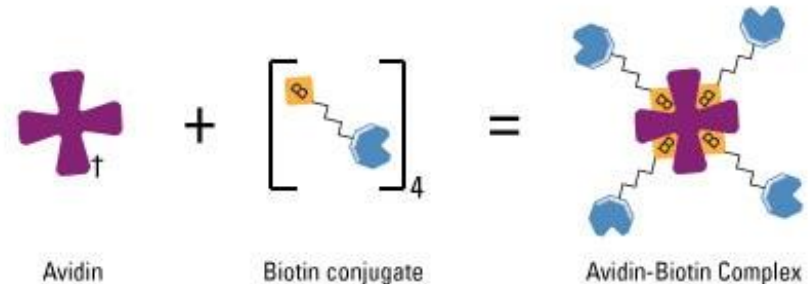
Complexe moléculaire



$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{k_d}{k_a} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_d dépend de
la **température T**
la pression P
l'**environnement** (pH tampon)

Plus l'interaction est forte, plus K_d est petit.



Les types d'interaction mises en jeu

- **Liaisons électrostatiques** attractives ou répulsives

- Charges (noyau , e-)

Charge/charge

Charge/dipôle

- Moment dipolaire

Dipôle/dipôle

Dipôle/dipôle induite

Dipôle induit/dipôle instant.

Kessom

Debye

London

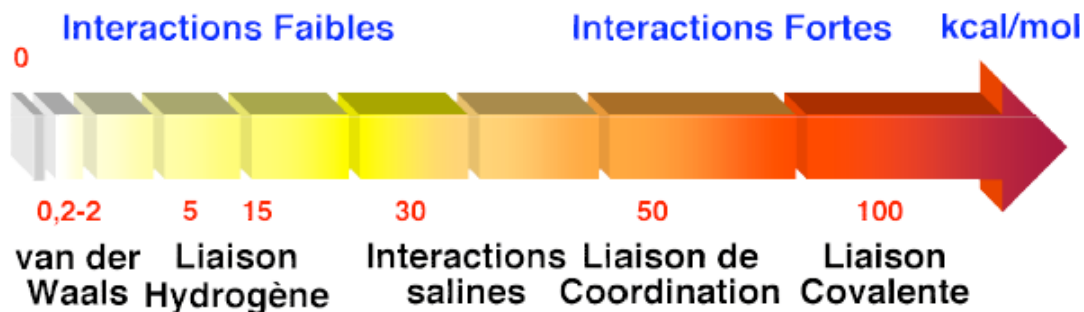
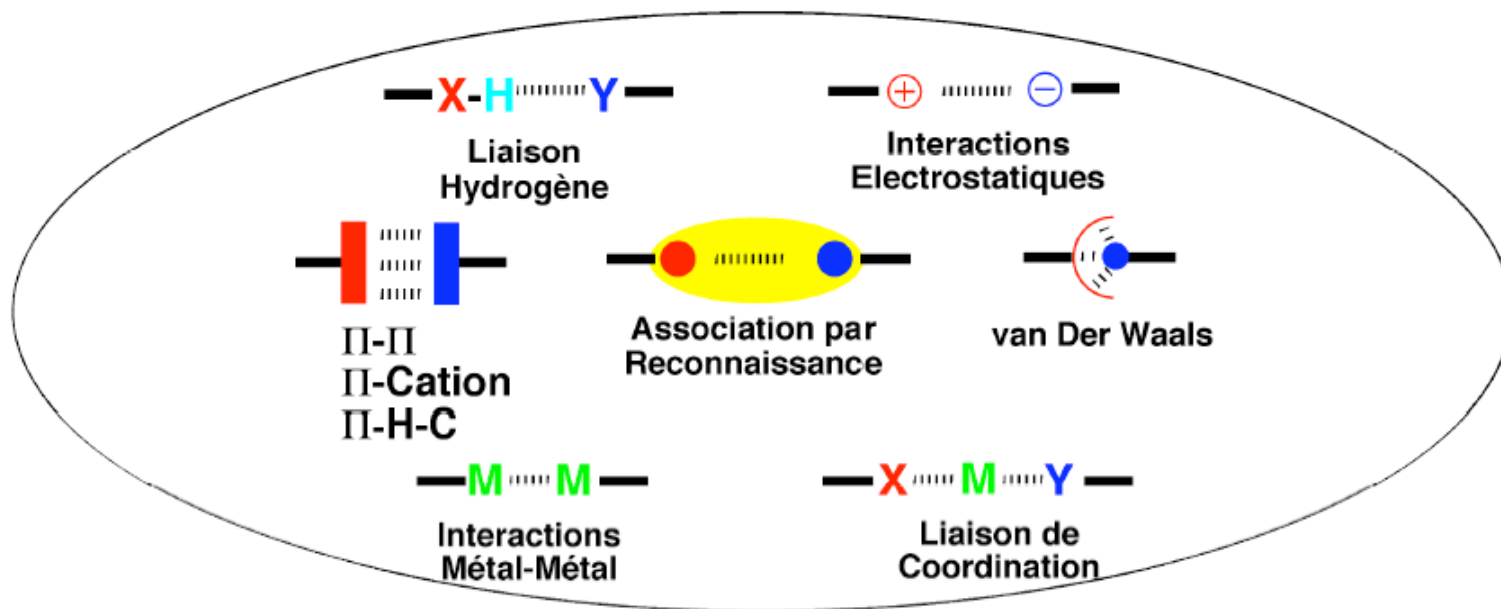
- Forces attractives de **van der Waals** (courte portée)

- Forces répulsives de **Pauli**

- **Liaisons hydrogène** (cohésion phases solides/liq)

10fois – intense que liaison cov.

La Boite à outils de la chimie supramoléculaire



Les techniques d'interactions moléculaires

In-cellulo

In-vitro

1. In solution
2. On a surface

In-silico

3 niveaux mais toutes les techniques sont complémentaires

Les techniques d'interactions moléculaires

In-cellulo/vivo

Méthode du double-hybride

FRET/BRET
(Co-immunolocalisation, Duolink PLA probe)

In-vitro

1. In solution

*biochimiques:
Elisa, Co-IP, WB

*biophysiques:
ITC, DSC, TSA, AUC,
FIDA, SEC-MALS

2. On a surface

SPR, BLI, QCM-D,
SwitchSense

In-silico

Molecular dynamics

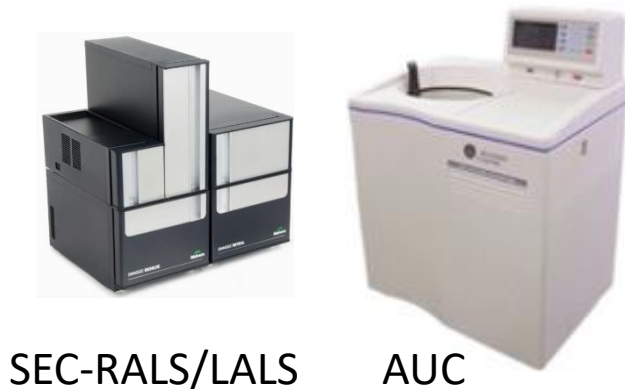
Docking

Modelling

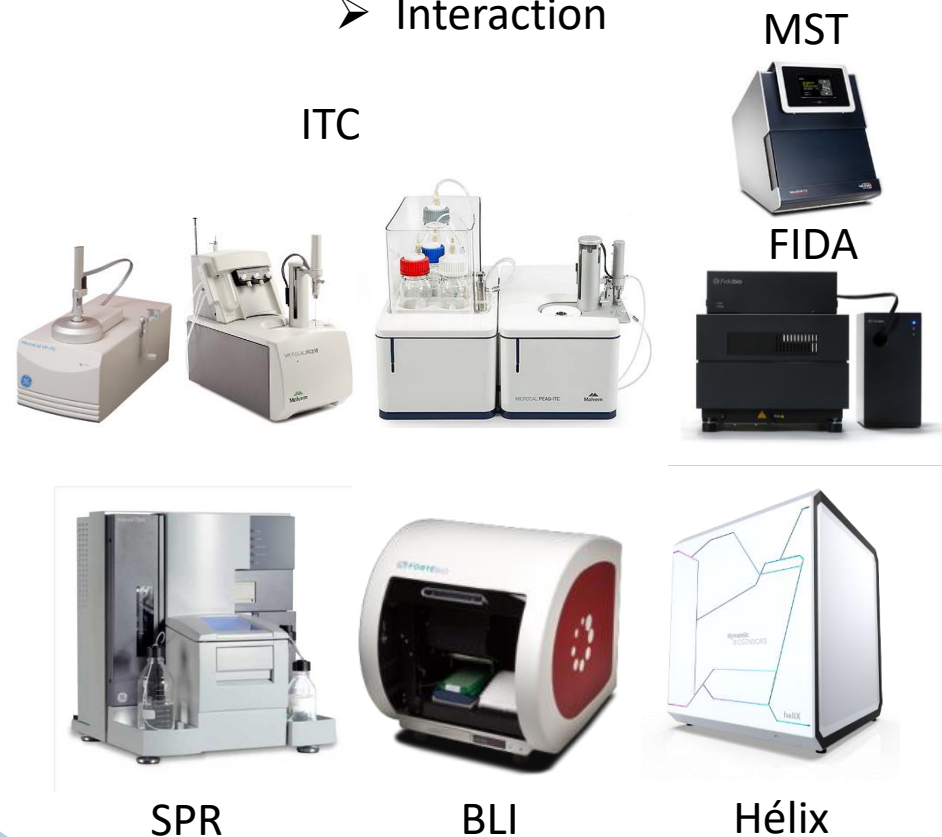
➤ Thermal stability



➤ Oligomerization states



➤ Interaction



TECHNIQUE en SOLUTION: ITC

Technique ITC

Isothermal Titration Calorimetry

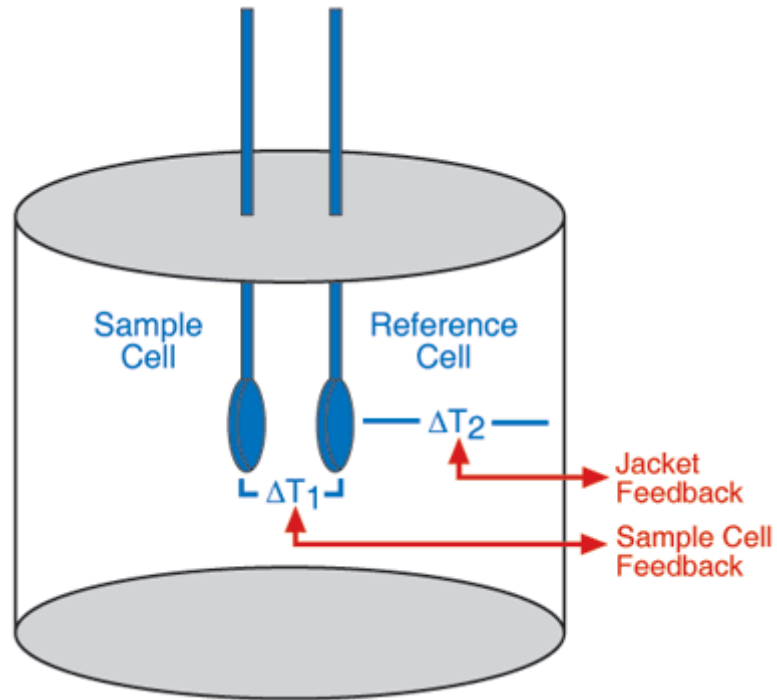
I Isothermal → T=constante

T Titration → Injection d'une substance dans une autre

C Calorimetry → Mesure de chaleur

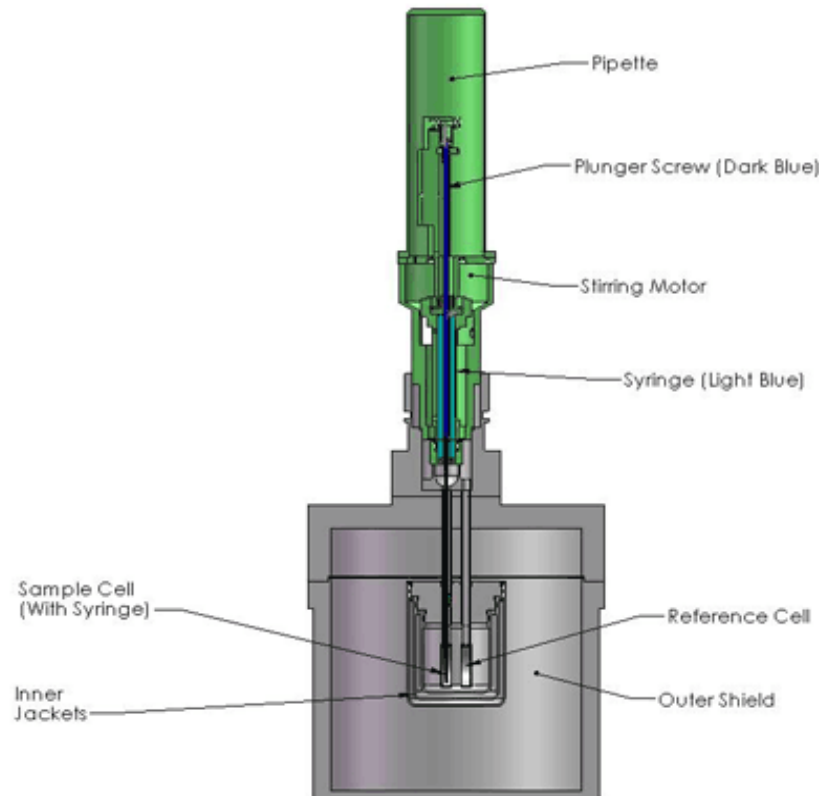
- Quand 2 substances interagissent, soit elles absorbent soit elles dégagent de la chaleur.
- Technique thermodynamique qui mesure directement la chaleur dégagée ou absorbée durant une interaction moléculaire.

Que mesure-t-on ?



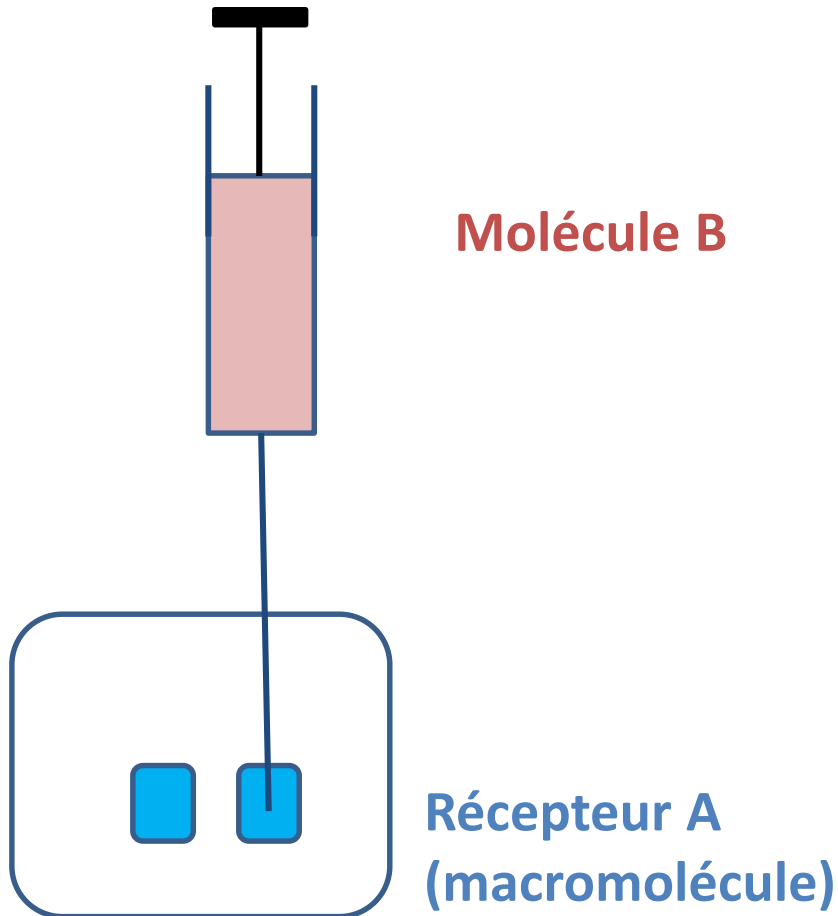
- Physiquement, on mesure la capacité calorifique d'une interaction en fonction du temps.

Qu'est-ce que l'ITC ?



La réponse ITC est exprimée en unités de $\mu\text{cal/s}$. C'est l'énergie qu'il faut fournir à la cellule échantillon pour revenir à la température de consigne de la cellule de référence.

Principe de l'analyse ITC



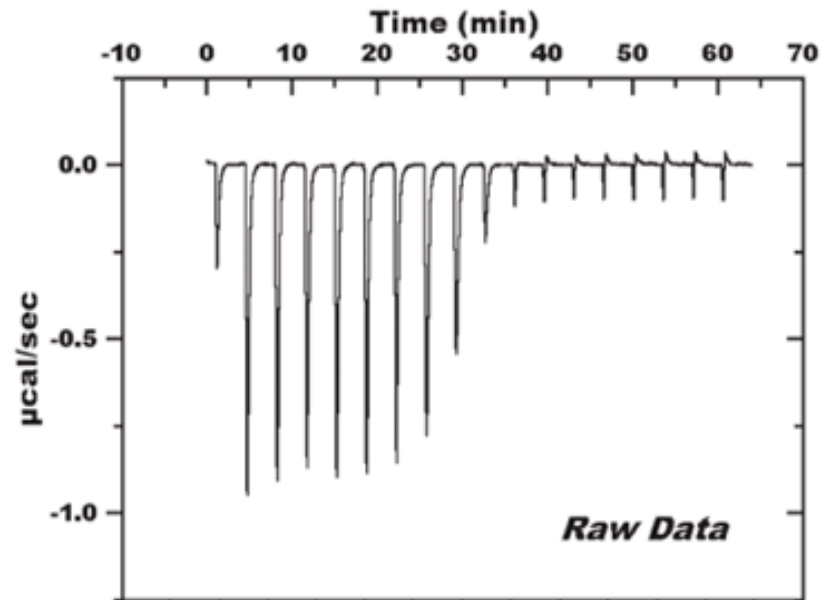
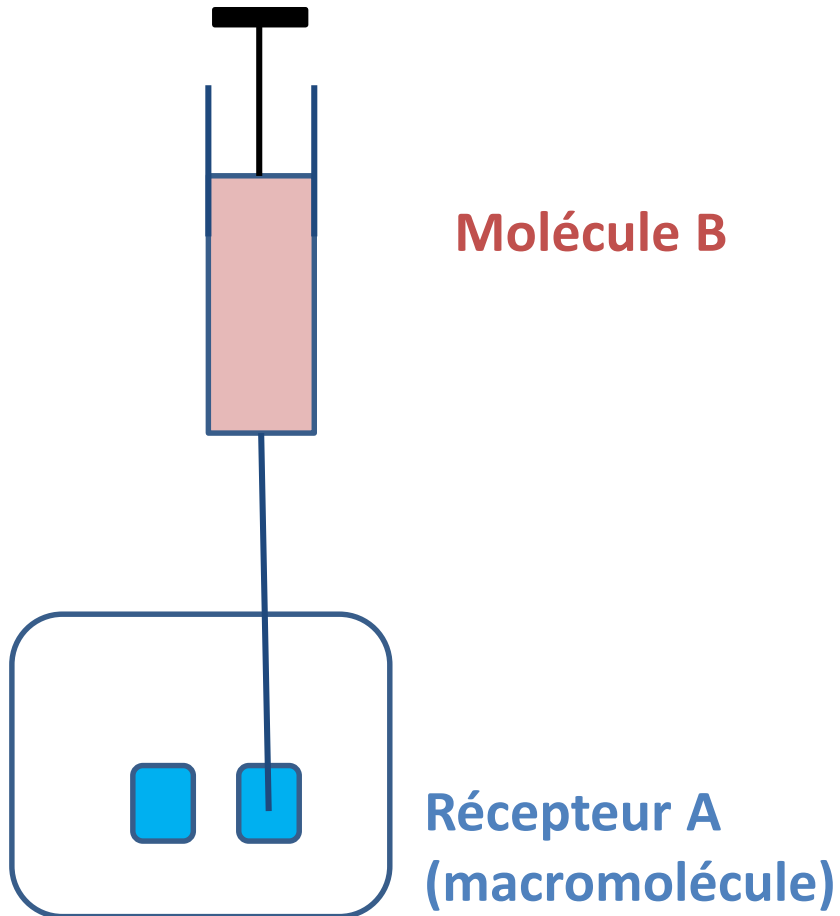
Mesure en temps réel

Pas besoin de marquer les molécules

Milieu complexe

Interaction en solution

Principe de l'analyse ITC



Obtention d'une mesure brute

Les différentes étapes d'une mesure ITC

1 seule étape (programmation) = la titration

1 mesure de référence = la dilution (contrôle négatif)

* Choix de la vitesse d'agitation

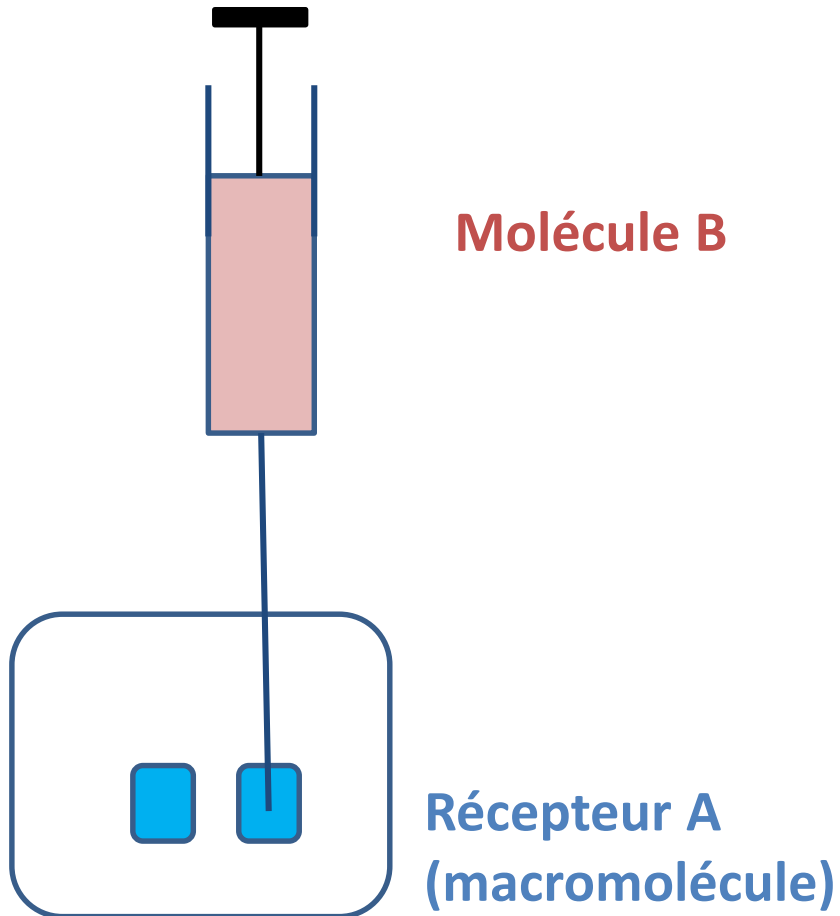
* Choix des concentrations des interactants A et B

Principe de l'analyse ITC

[Vidéo Malvern: principe de la technique ITC](https://www.youtube.com/watch?v=o_IpWcWKNXI&t=6s)

https://www.youtube.com/watch?v=o_IpWcWKNXI&t=6s

Analyse ITC – des facteurs à maîtriser



1. Concentrations de A et B
2. Milieu de l'analyse (identique)
3. Vitesse d'agitation
4. Température d'analyse

L'instrument d'ITC

Station de lavage automatique de la cellule

Station de lavage automatique de la seringue
Seringue d'injection avec moteur d'injection + agitateur magnétique

Enceinte adiabatique

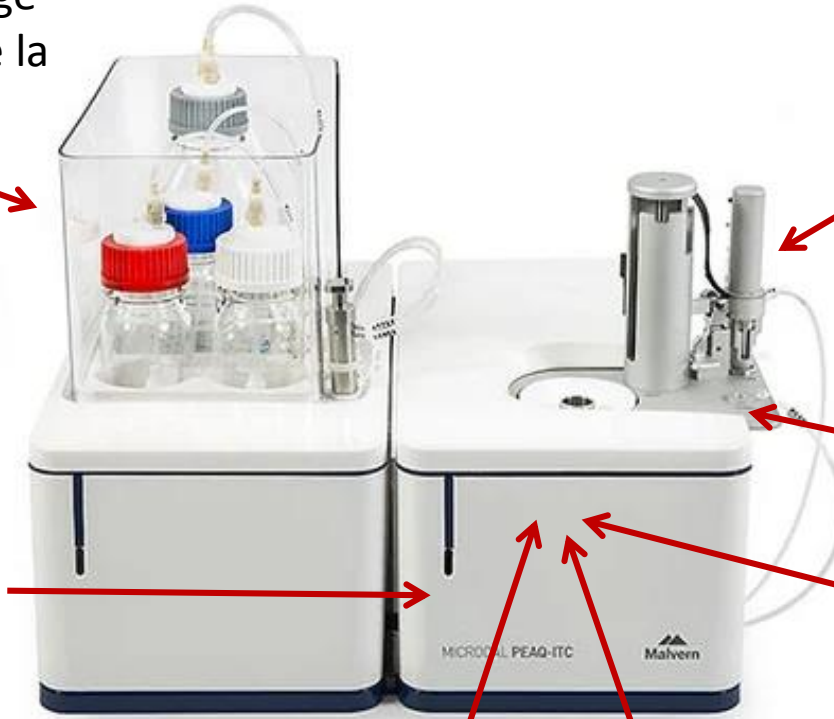
Chargement échantillon

Cellule échantillon (S)

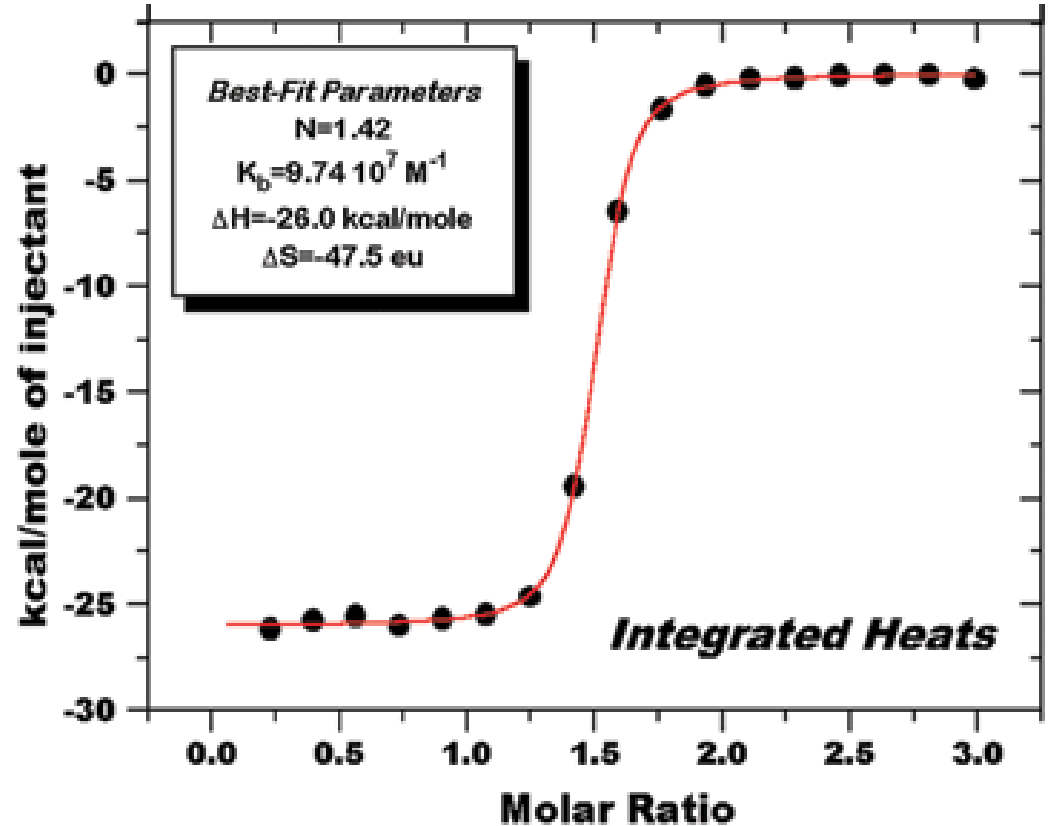
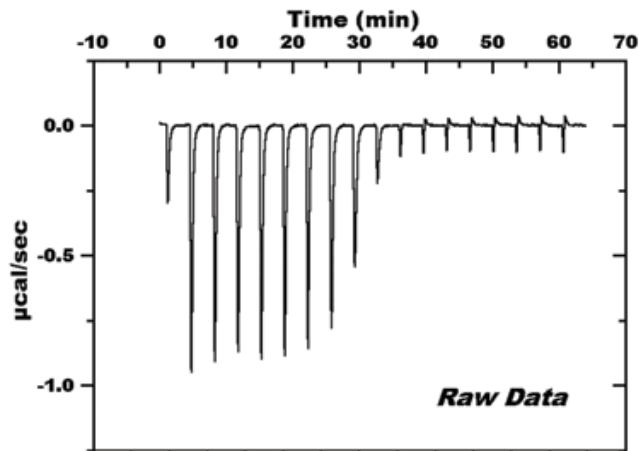
Cellule de référence (R)

Système Peltier

Ordinateur de pilotage et d'analyse



Expérience parfaite d'ITC

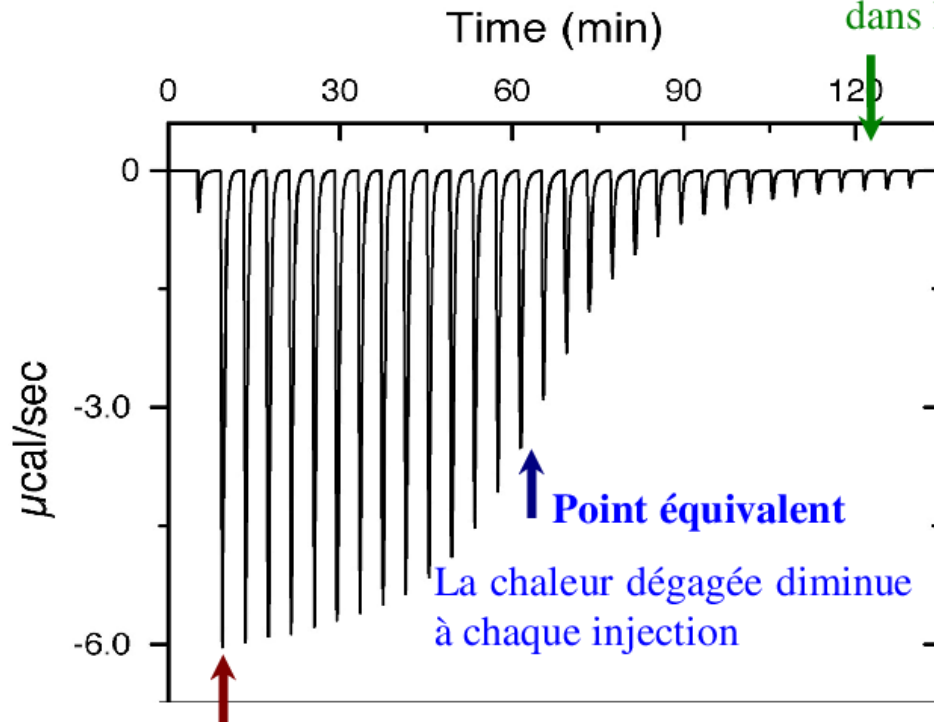


Enthalpogramme (isotherme) de bonne qualité

Sigmoïde de Boltzman

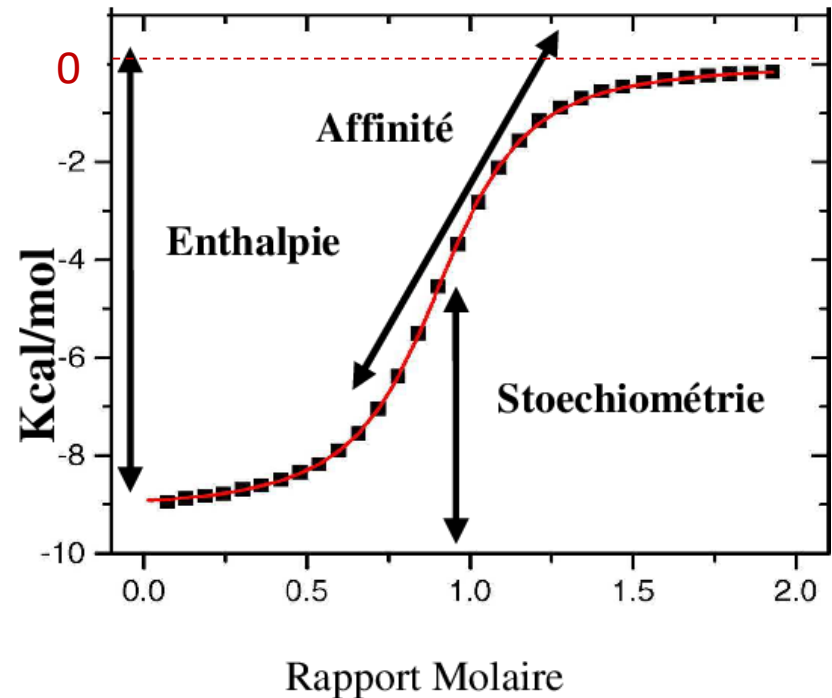
Extraction des données ITC

ajout de ligand avec comme conséquence sa dilution dans la cellule de mesure.



Début de la titration

Toutes les molécules de ligand se fixent à la protéine. La protéine n'est pas saturée.



Les informations obtenues par ITC

- Stoechiométrie d'interaction entre 2 molécules (**n**)
- Mesure de la constante d'association **$K_a = 1/K_D$**
- Mesure de l'enthalpie et de l'entropie de réaction **ΔH , ΔS**

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT * \ln K_a$$

Connaissance du **profil thermodynamique complet** de l'interaction en **1 seule expérience**: la comparaison des facteurs enthalpique et entropique révèlent les forces mises en jeu lors de la formation du complexe et le mécanisme d'interaction.

Les informations obtenues par ITC

Profils thermodynamiques

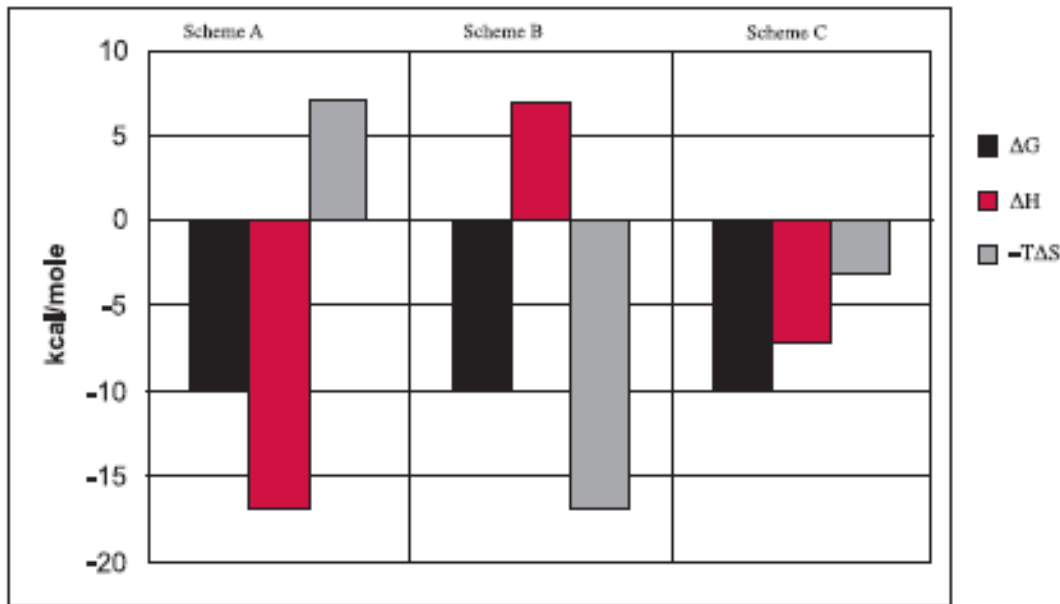


FIGURE 1. Thermodynamic signatures for three different drugs binding to same target. Scheme A: good hydrogen bonding and a conformational change. Scheme B: binding dominated by hydrophobic interactions. Scheme C: Favorable hydrogen bonding and hydrophobic interactions.

ΔH

Forces de l'interaction:
Liaisons hydrogènes
Liaisons ioniques
Interactions de van der Waals

ΔS

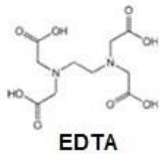
Interactions hydrophobes
Déshydratation
Changement de conformation

Technique ITC

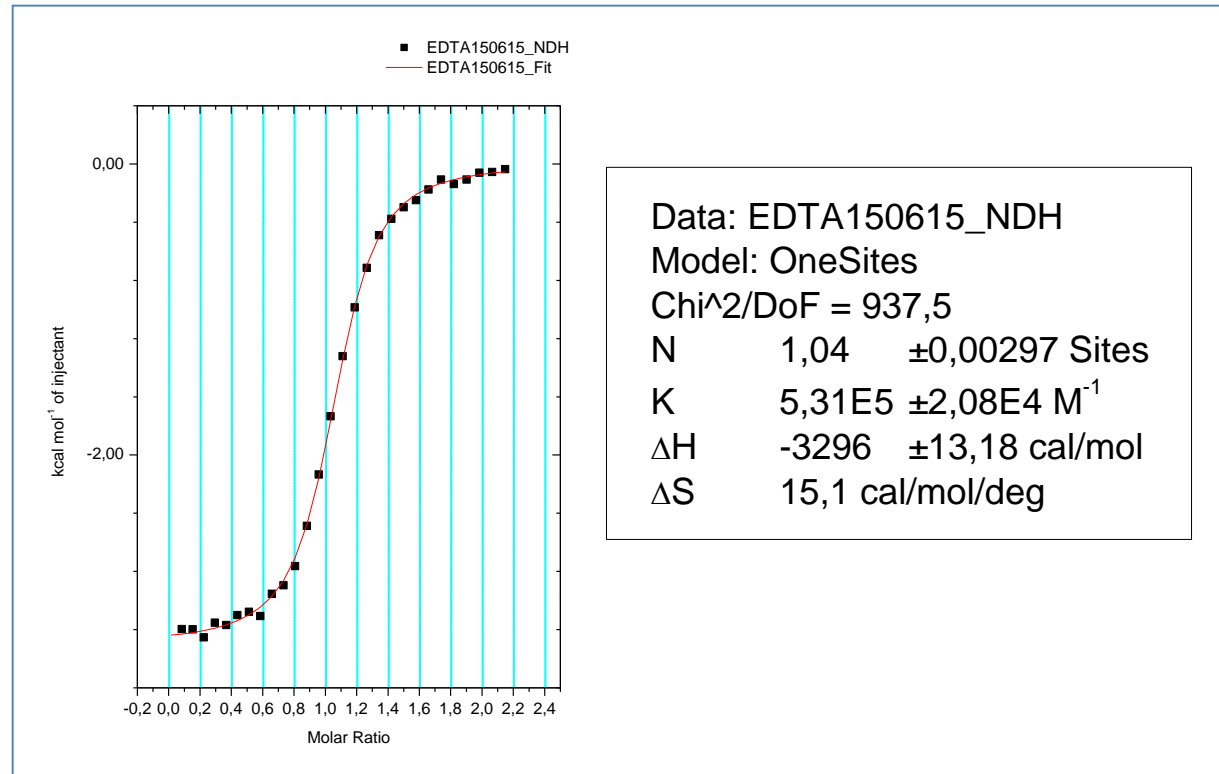
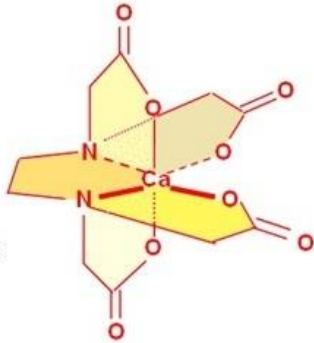
Avantages (+)	Inconvénients (-)
<ul style="list-style-type: none">– Mesure en temps réel– Pas de marquage– Mesure en solution– Masse du composé indifférente– 1 seule mesure– Milieux complexes	<ul style="list-style-type: none">– Volumes– Présence d'alcool, DMSO– pH à ajuster– Choix des concentrations

Application 1: Ion – Molécule chimique

Chélation du Calcium par EDTA

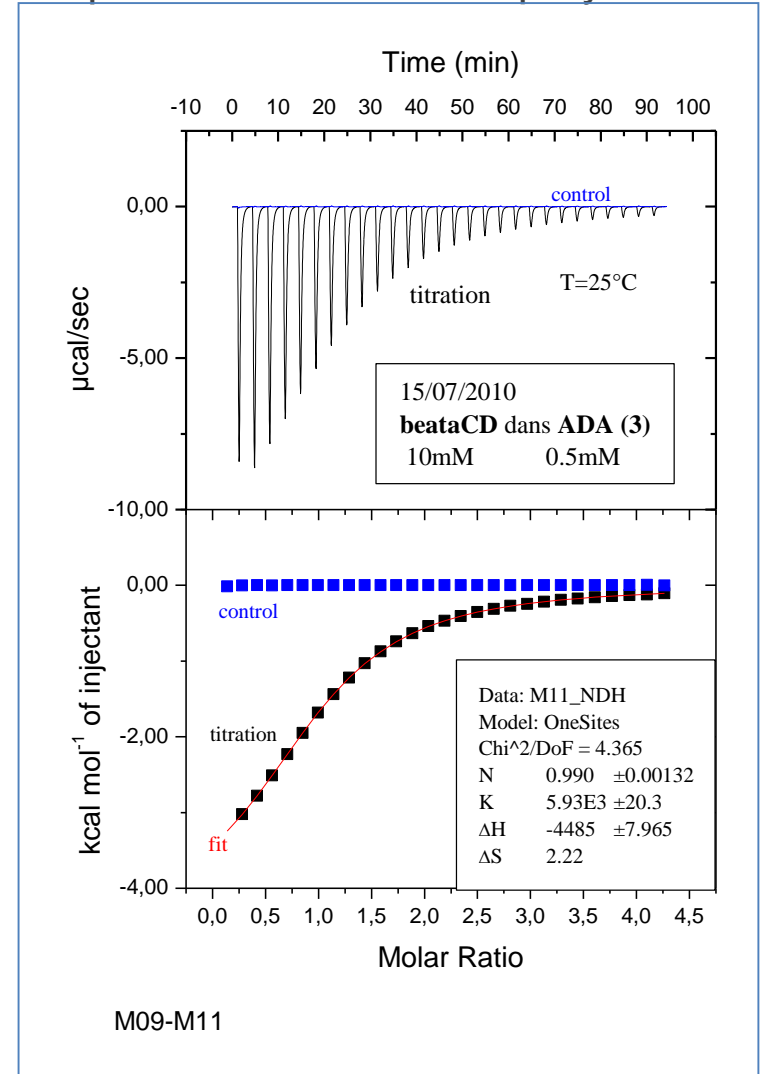
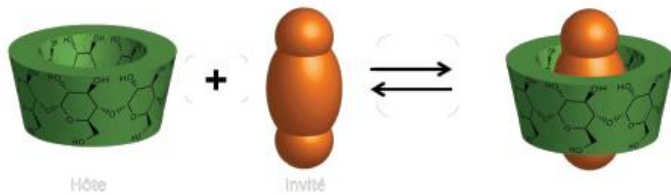


L'EDTA réagit quantitativement avec les ions Ca^{++} présents dans l'eau



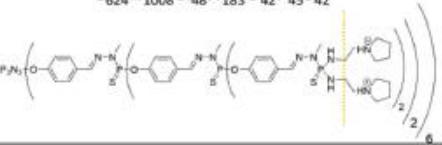
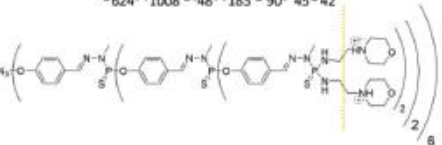
Application 2: Sucre -Petite Molécule

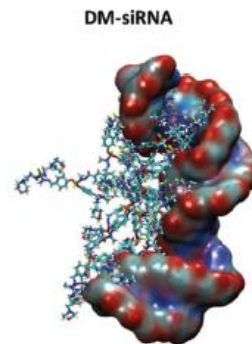
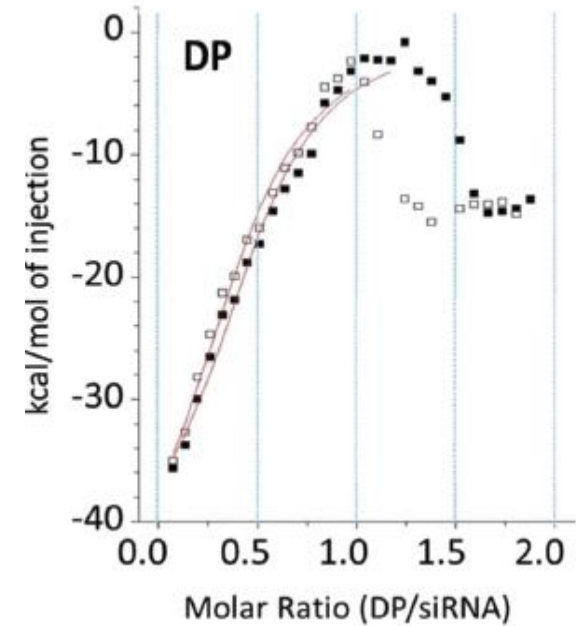
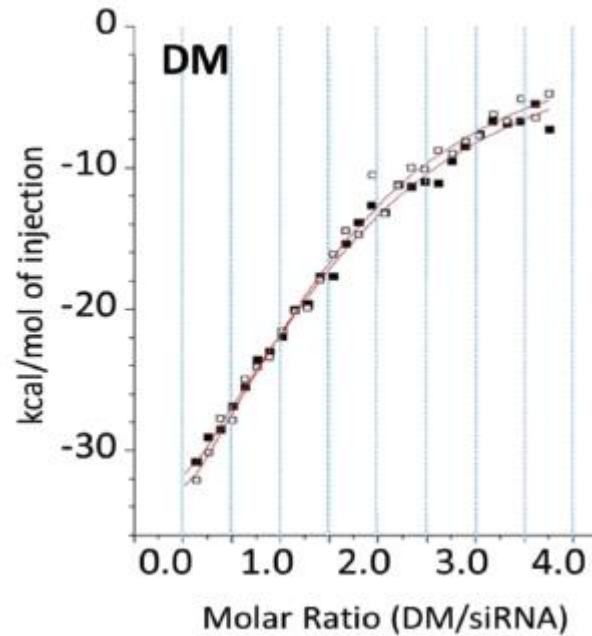
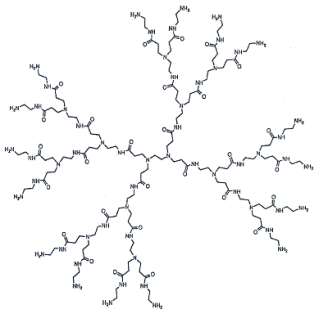
Encapsulation de petite molécule dans β -cyclodextrine



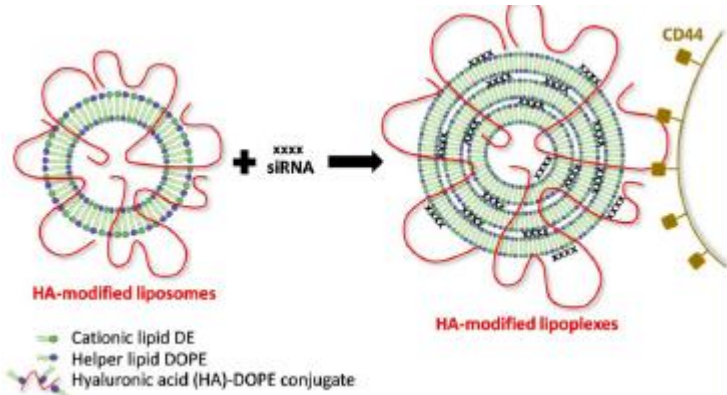
Application 5: ADN-Dendrimères

Chargement de siRNA dans dendrimères

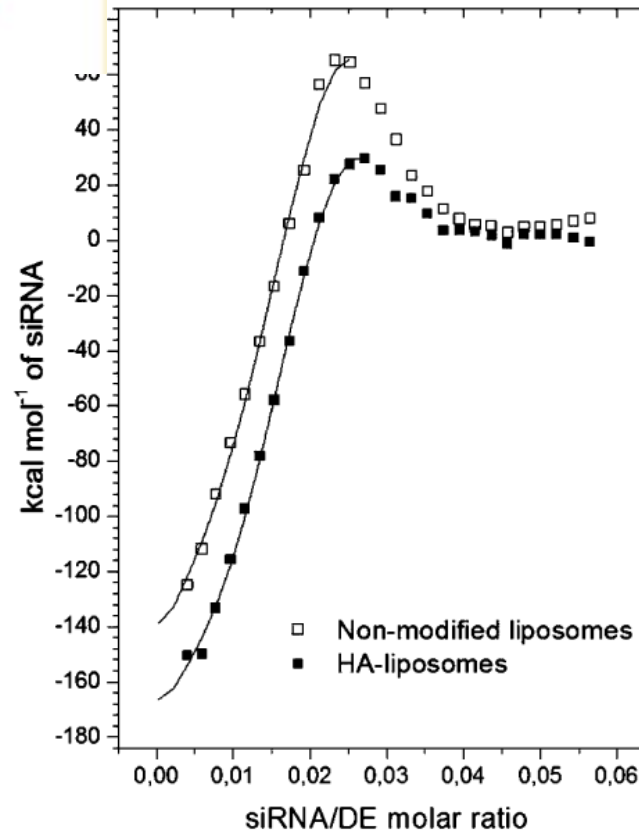
Name	Formula and Structure
DP	$C_{624}H_{1008}Cl_{48}N_{183}O_{42}P_{45}S_{42}$ 
DM	$C_{624}H_{1008}Cl_{48}N_{183}O_{90}P_{45}S_{42}$ 



Application 6: siRNA-Liposomes



Chargement en siRNA de liposomes
= formation de lipoplexes

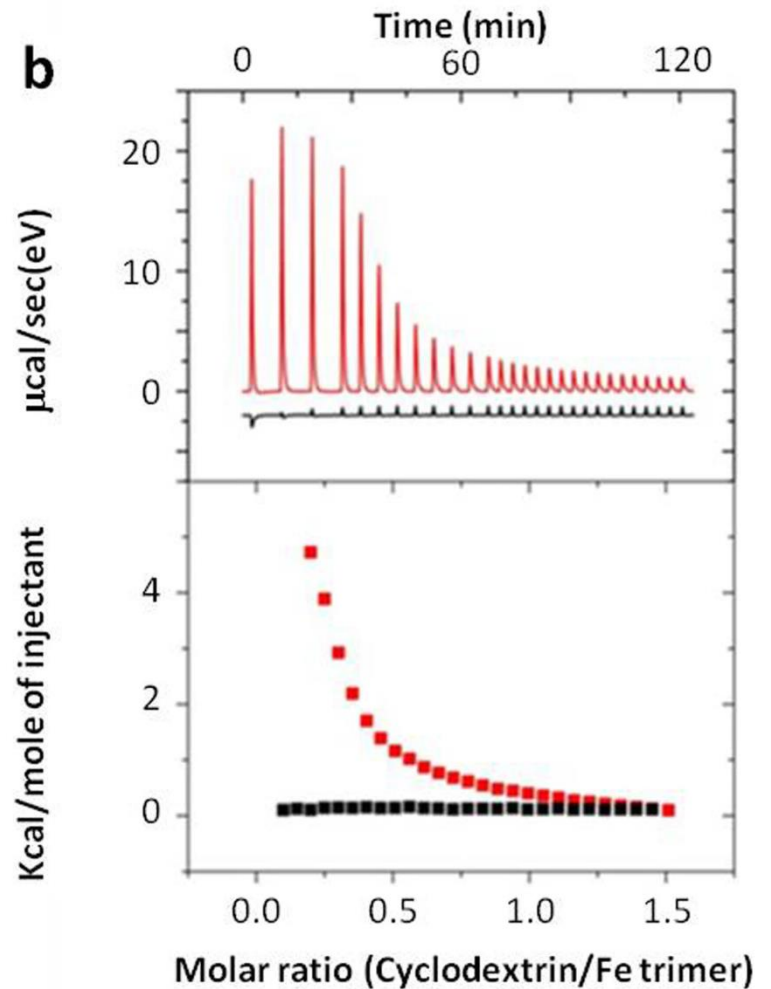
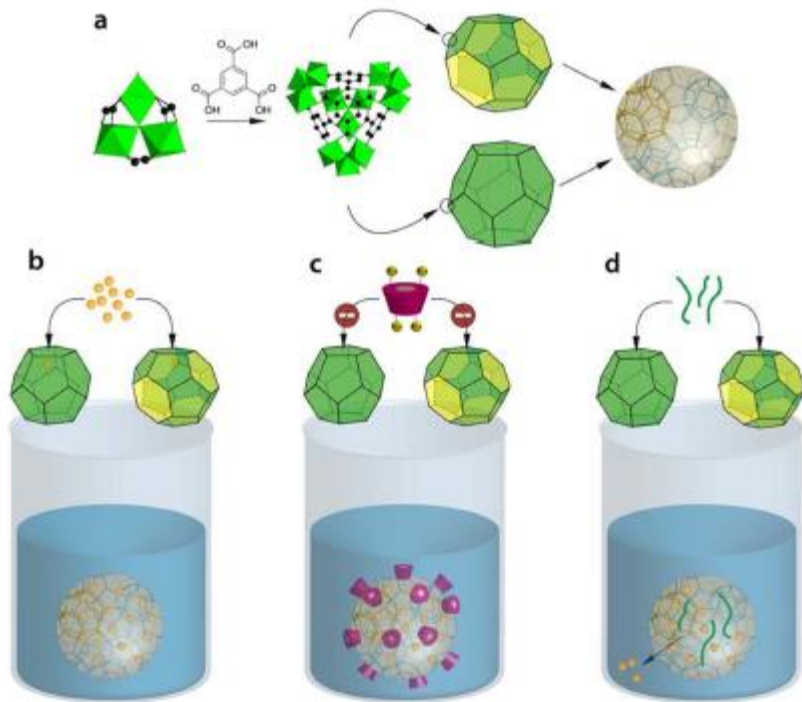


HA-liposomes
 Chi² = 4,950E6
 N 0,0153 ±5,31E-4 Sites
 K 1,51E8 ±6,16E7 M⁻¹
 ΔH -2,061E5 ±1,22E4 cal/mol
 ΔS -654 cal/mol/deg

Non-modified liposomes
 Chi² = 1,229E7
 N 0,0155 ±0,00131 Sites
 K 9,74E7 ±4,88E7 M⁻¹
 ΔH -2,052E5 ±3,57E4 cal/mol
 ΔS -652 cal/mol/deg

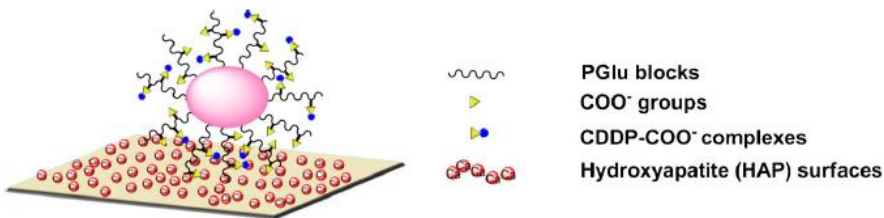
Application 7: Sucre-Nanoparticules

Molécule CD ou CD-P – Metal-Oxide-Framework (MOF)

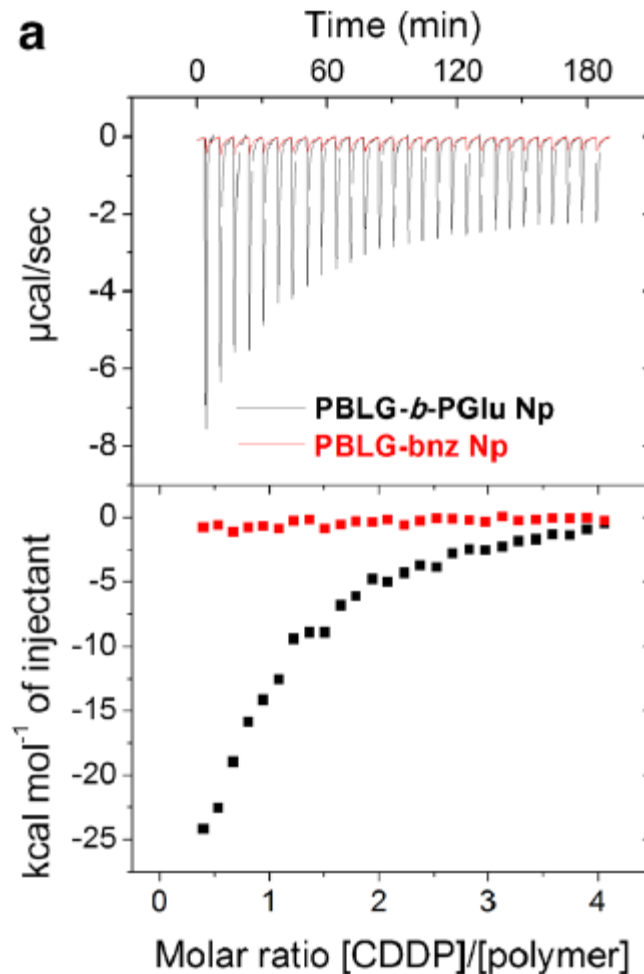


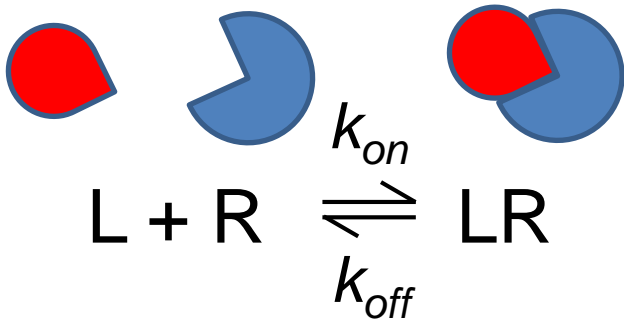
Application 8: Molécule-Nanoparticules

Ciblage de l'os (hydroxyapatite) avec NP polymériques



Methods The amphiphilic copolymer poly(γ -benzyl-glutamate)-block-poly(glutamic acid) (PBLG-*b*-PGlu) was synthesised by ring opening polymerization and nanoparticles were obtained by a simple nanoprecipitation method. Nanoparticles were characterized in terms of cisplatin interaction, association, and release as well as interaction with hydroxyapatite and their cytotoxicity was studied in three prostate cancer cell lines.

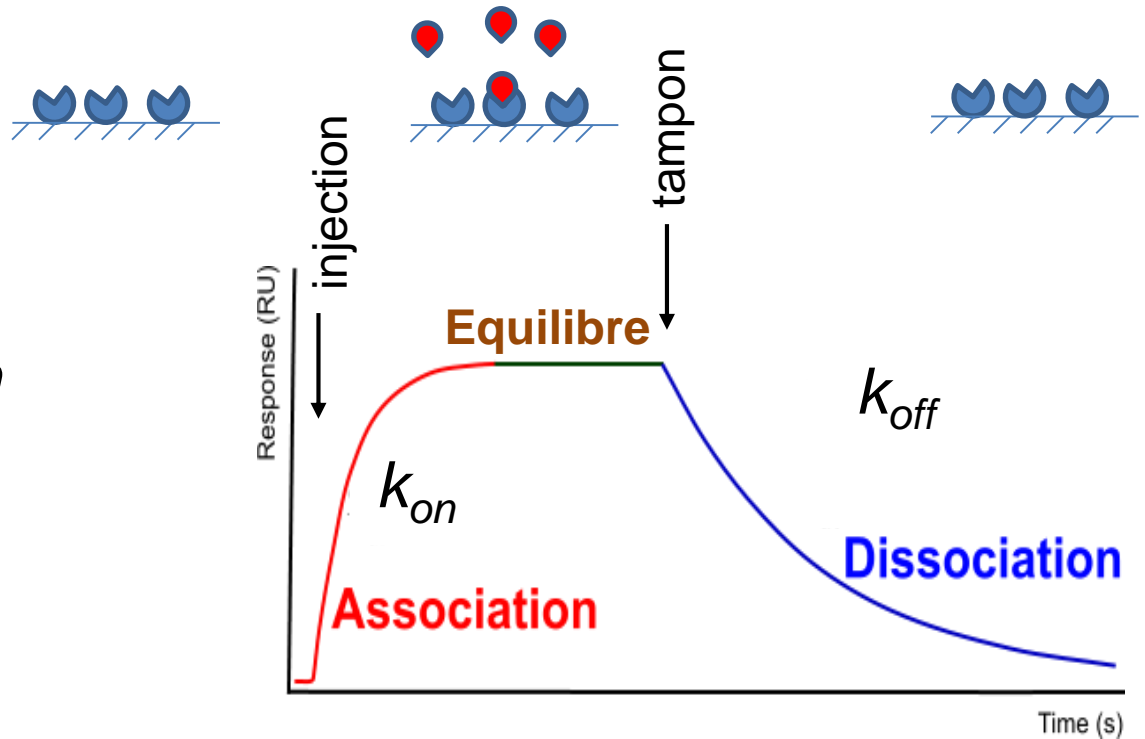




Association: rapidité avec la quelle les molécules interagissent = k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)

Dissociation: rapidité avec la quelle les complexes se dissocient = k_{off} (s^{-1})

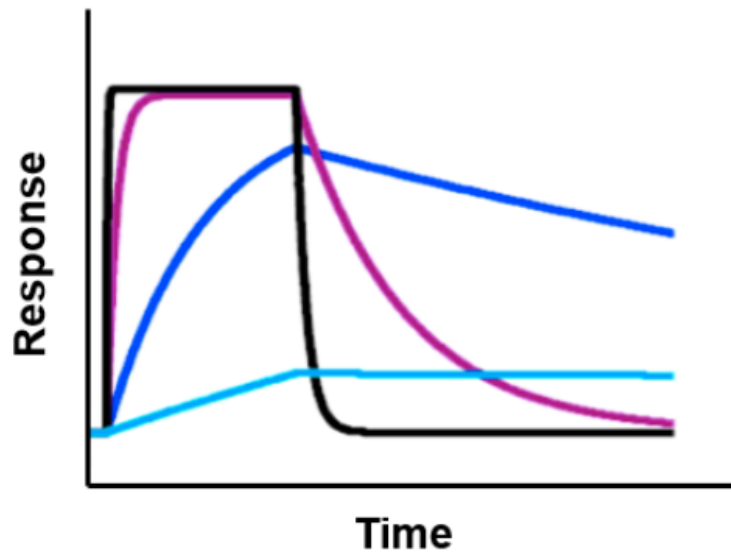
$$K_D = k_{off} / k_{on}$$



Kinetic constants assessment

With the same K_D value, kinetics can be different !!!

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

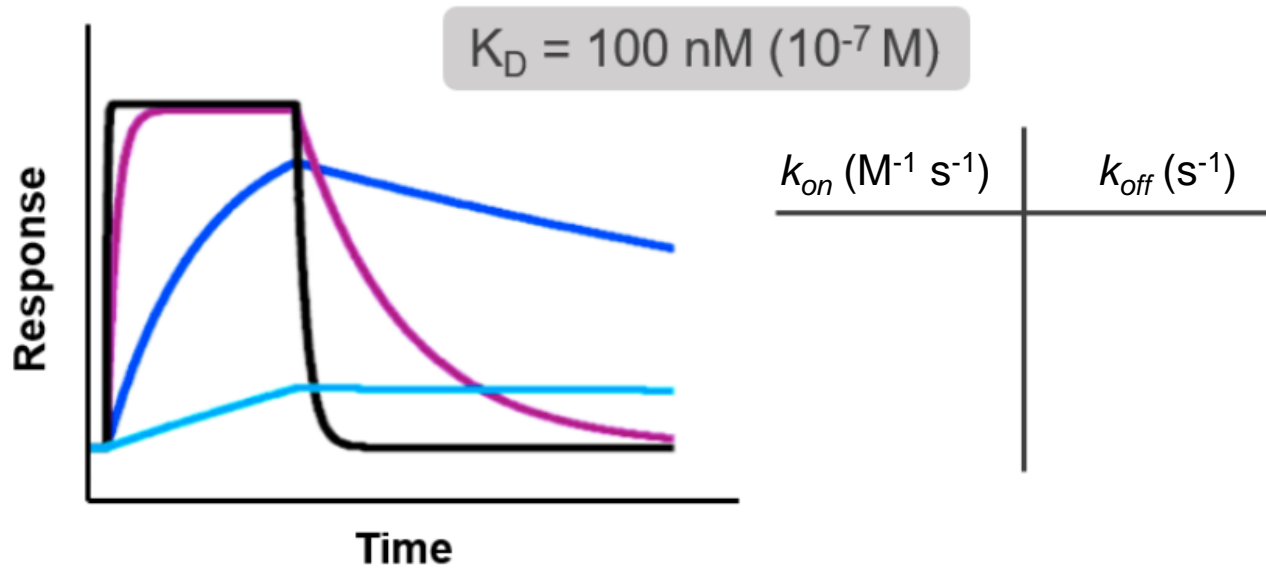


$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$

Kinetic constants assessment

With the same K_D value, kinetics can be different !!!

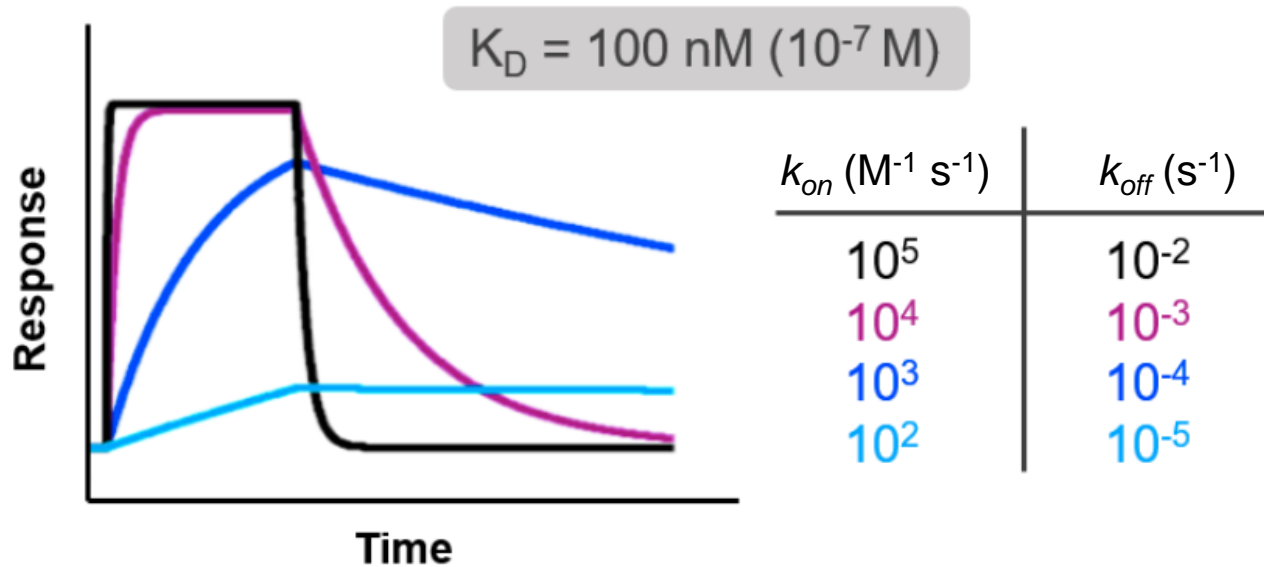
$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$



Kinetic constants assessment

With the same K_D value, kinetics can be different !!!

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

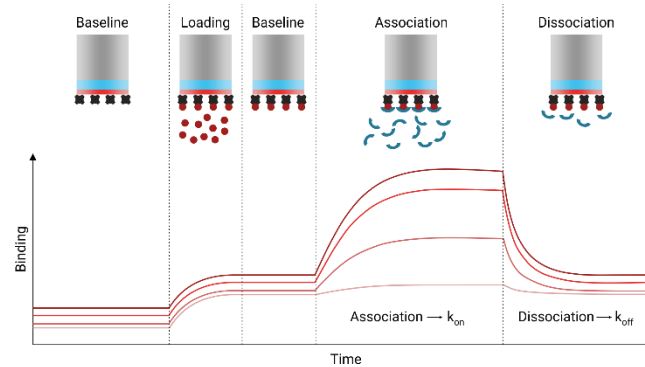


❖ OctetRed96e (Fortebio - Sartorius)

= Bio-Layer Interferometry (BLI)

In wells (no fluidics)

- Affinity constant K_D
- Kinetic constants : k_{on} and k_{off}



❖ Biacore T100 (Cytiva)

= Surface Plasmon Resonance (SPR)

In flow (cartridge)

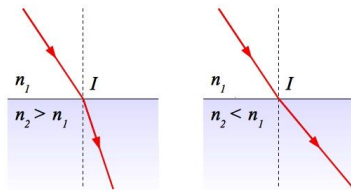
- Affinity constant K_D
- Kinetic constants : k_{on} and k_{off}



TECHNIQUE de SURFACE (1): SPR

Qu'est-ce que la SPR ?

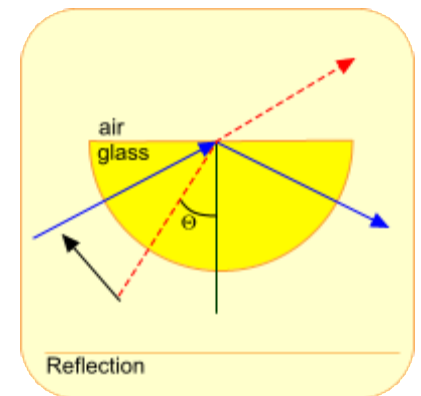
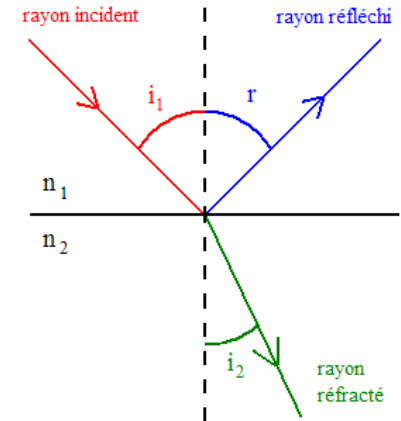
- Quand la lumière passe d'un milieu à un autre, ayant chacun un indice de réfraction, elle est déviée selon la loi de Snell-Descartes:



$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

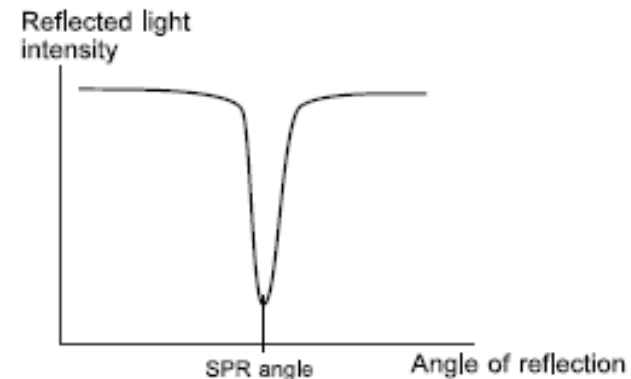
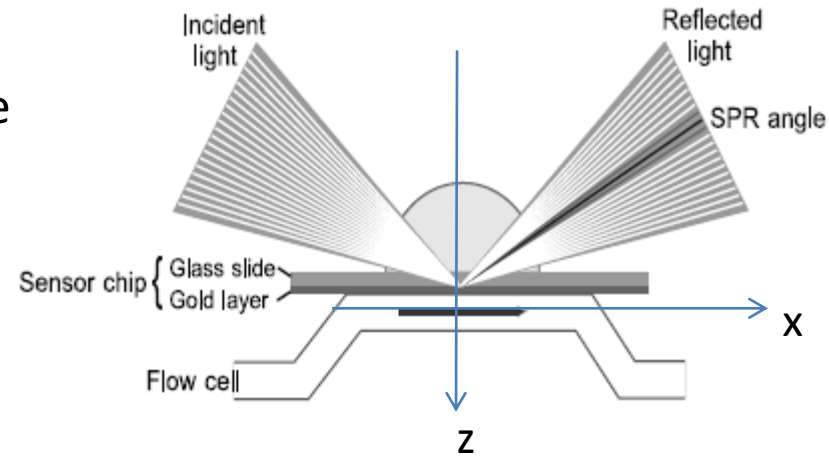
- Lorsque l'on atteint un angle « critique », la lumière est totalement réfléchie.

$$\theta_c = \text{Arc sin} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad n_1 > n_2$$

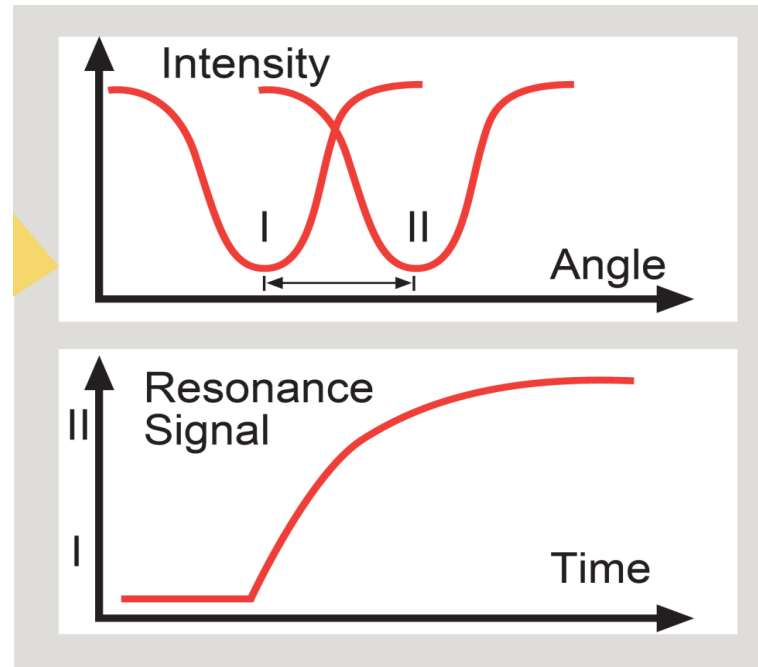


Pour avoir la SPR ?

- Réflexion totale
- Fine couche de métal pour avoir résonance
- Onde évanescente de distance de propagation λ
- La mesure de la chute d'intensité ΔI du faisceau réfléchi correspond à une mesure de l'angle de résonance $\Delta\theta$
- $\Delta\theta$ en fonction de Δn du milieu biologique qu'il y ait ou non des molécules
- $\Delta\theta$ en fonction du temps est une mesure en continu de l'interaction sans marquage

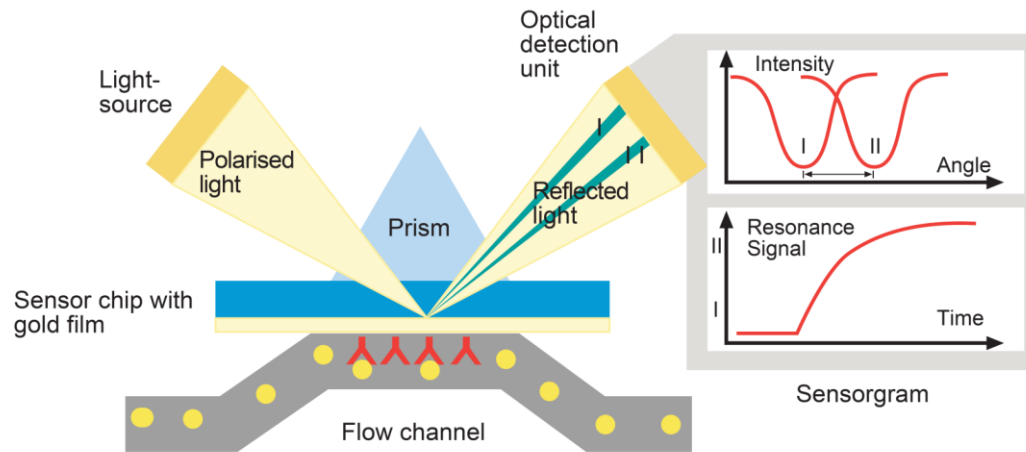


Que mesure-t-on ?



- Physiquement, on mesure le déplacement du minimum de réflexion.

Que mesure-t-on ? Quelle unité?

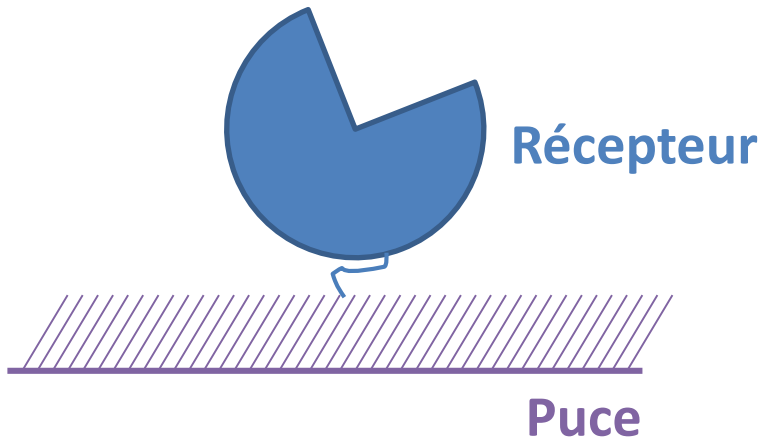


La réponse SPR est exprimée en unités de résonance (RU). **1 RU = 10^{-4}°** .

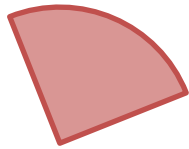
Pour la plupart des protéines, cela correspond à des changements de concentration de l'ordre de **1000RU = $1\text{ng}/\text{mm}^2$**

→ **densité surfacique massique de molécules (QUANTITATIF)**

Principe de l'analyse SPR



Principe de l'analyse SPR



Molécule d'intérêt
en circulation

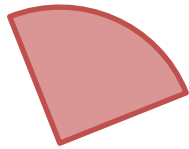


Récepteur



Puce

Principe de l'analyse SPR



**Molécule d'intérêt
en circulation**

Mesure en temps réel

Pas besoin de marquer les molécules

Milieu complexe

Technique de surface

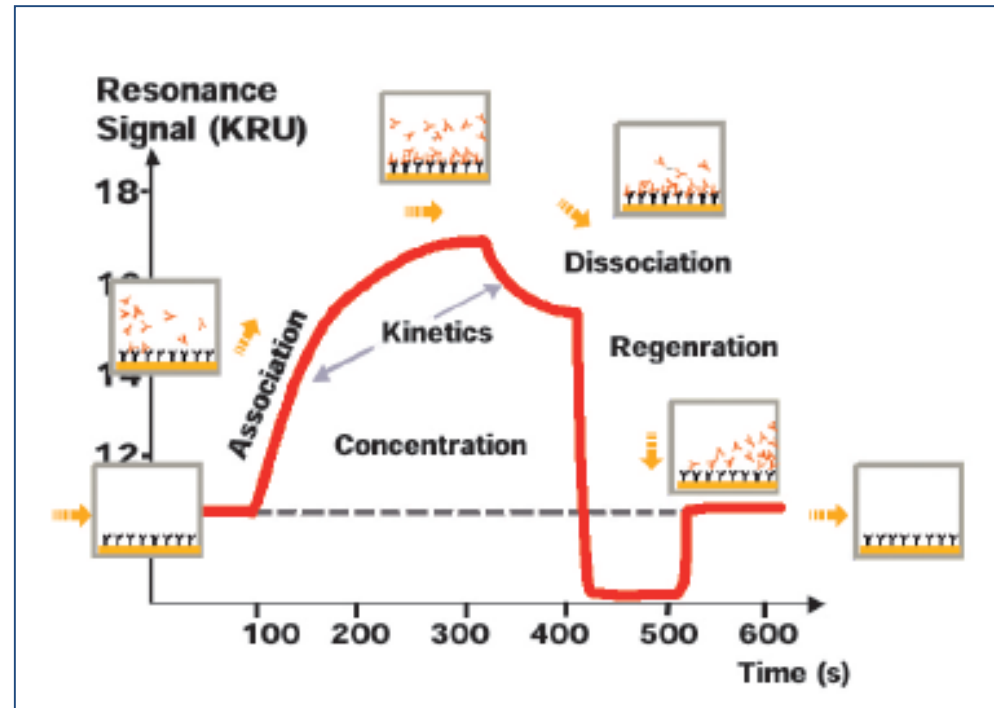
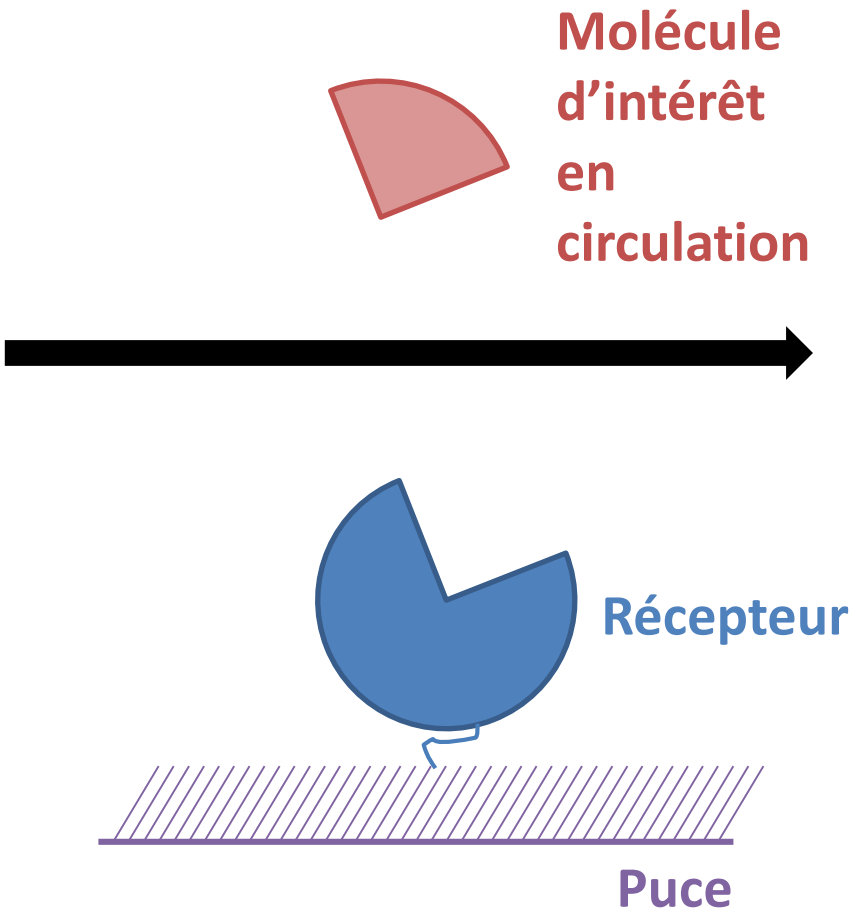


Récepteur



Puce

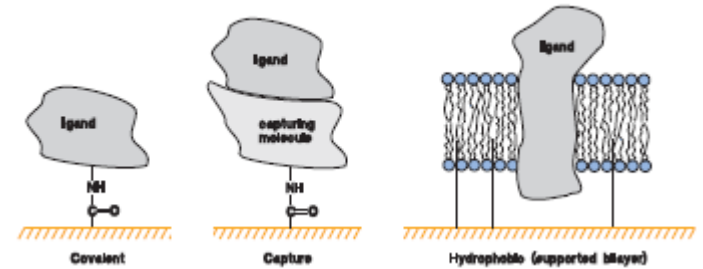
Principe de l'analyse SPR



Obtention d'un sensorgramme

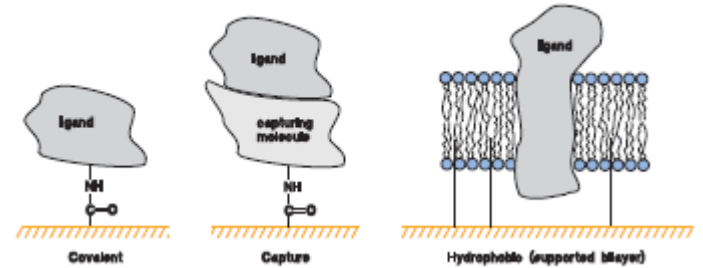
Les différentes étapes d'une mesure SPR

Immobilisation ou Capture

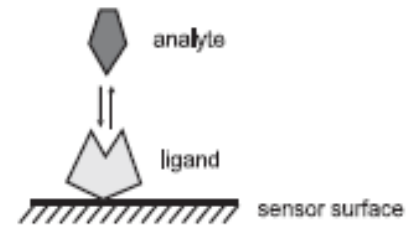


Les différentes étapes d'une mesure SPR

I Immobilisation ou Capture

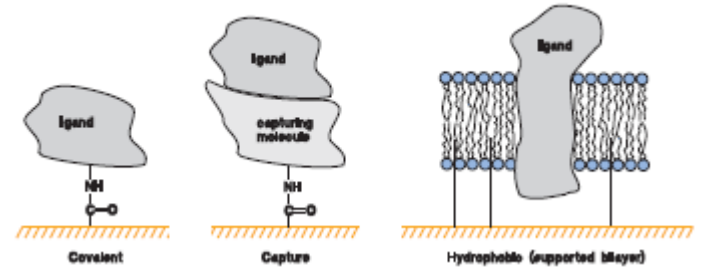


II Association
État stationnaire
Dissociation

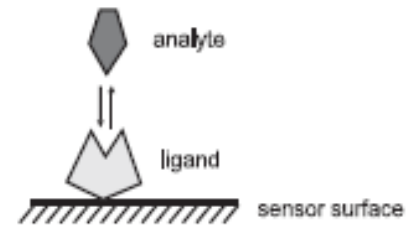


Les différentes étapes d'une mesure SPR

I Immobilisation ou Capture



II Association
État stationnaire
Dissociation



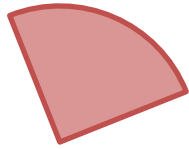
III Régénération

Principe de l'analyse SPR

[Vidéo Cytiva: principe de la SPR](https://www.youtube.com/watch?v=nkcC9BLmlrA)

<https://www.youtube.com/watch?v=nkcC9BLmlrA>

Analyse SPR – des facteurs à maîtriser



**Molécule d'intérêt
en circulation**

4. Connaissance des échantillons
(Sensibilité des molécules, masse molaire, concentration,...)



3. Milieu de l'analyse = tampon



Récepteur

2. Taille des molécules et nature de l'interaction



Puce

1. Chimie de couplage, orientation, intégrité du récepteur

0. Température

L'instrument de SPR

Aiguille pour
prélèvement des
échantillons

Seringue et
pompes
pour flux

Tampon
de
course

Optique et
Cartouche
Microfluidique

Puce

Poubelle

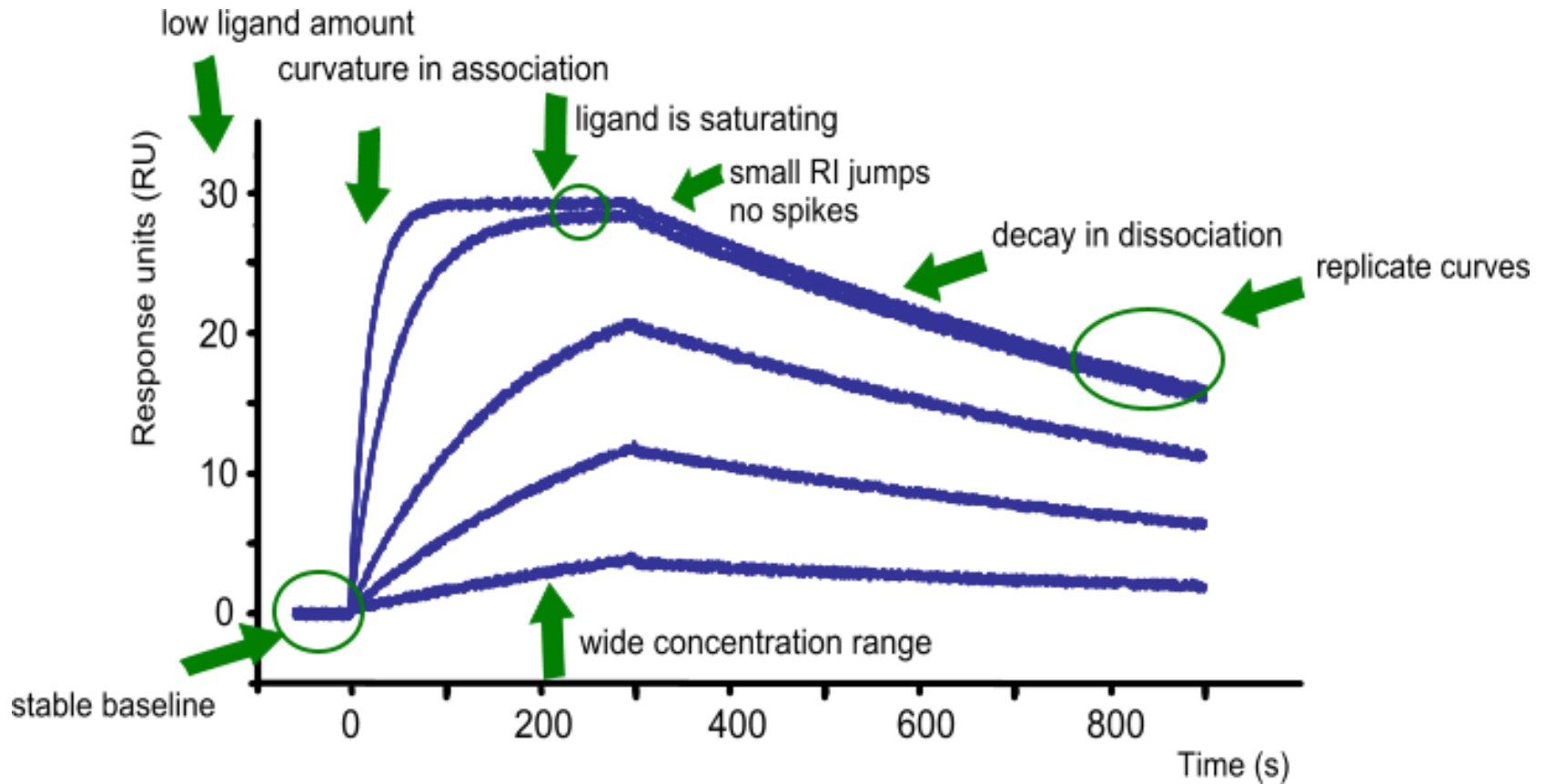
Eau pour rincer le
système fluide

Echantillons et réactifs
dans rack contrôlé en
température

Ordinateur
de pilotage
et d'analyse



Expérience parfaite de SPR



Sensorgrammes de bonne qualité

Les information obtenues par SPR

- Spécificité d'une interaction entre 2 molécules (**réponse oui/non → screening**)
- Mesurer les vitesses d'association k_{on} et de dissociation k_{off}
- Mesurer la constante d'affinité K_D
- *Indirectement, mesurer la **concentration effective** d'un des interactants, après établissement d'une courbe de calibrage ou non (**CFCA**)*

Technique SPR

Avantages (+)

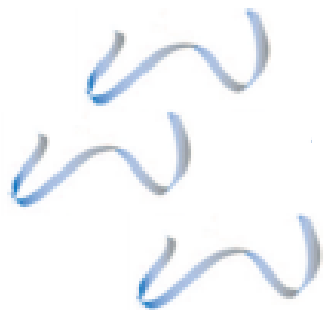
- Mesure en temps réel
- Pas de marquage
- Petits volumes
- Faibles concentrations
- Echantillons colorés
- Multiplexage sur puce
- Large gamme de puces
(possibilité de développement à façon)
- Contrôle de la température
- Masse du composé à détecter
(100Da)

Inconvénients (-)

- 1 interactant immobilisé
- Flux permanent: transfert de masse
- Profondeur de détection
(300nm)
- Pureté de l'échantillon
- Choix du modèle cinétique en fonction de la connaissance de ses échantillons

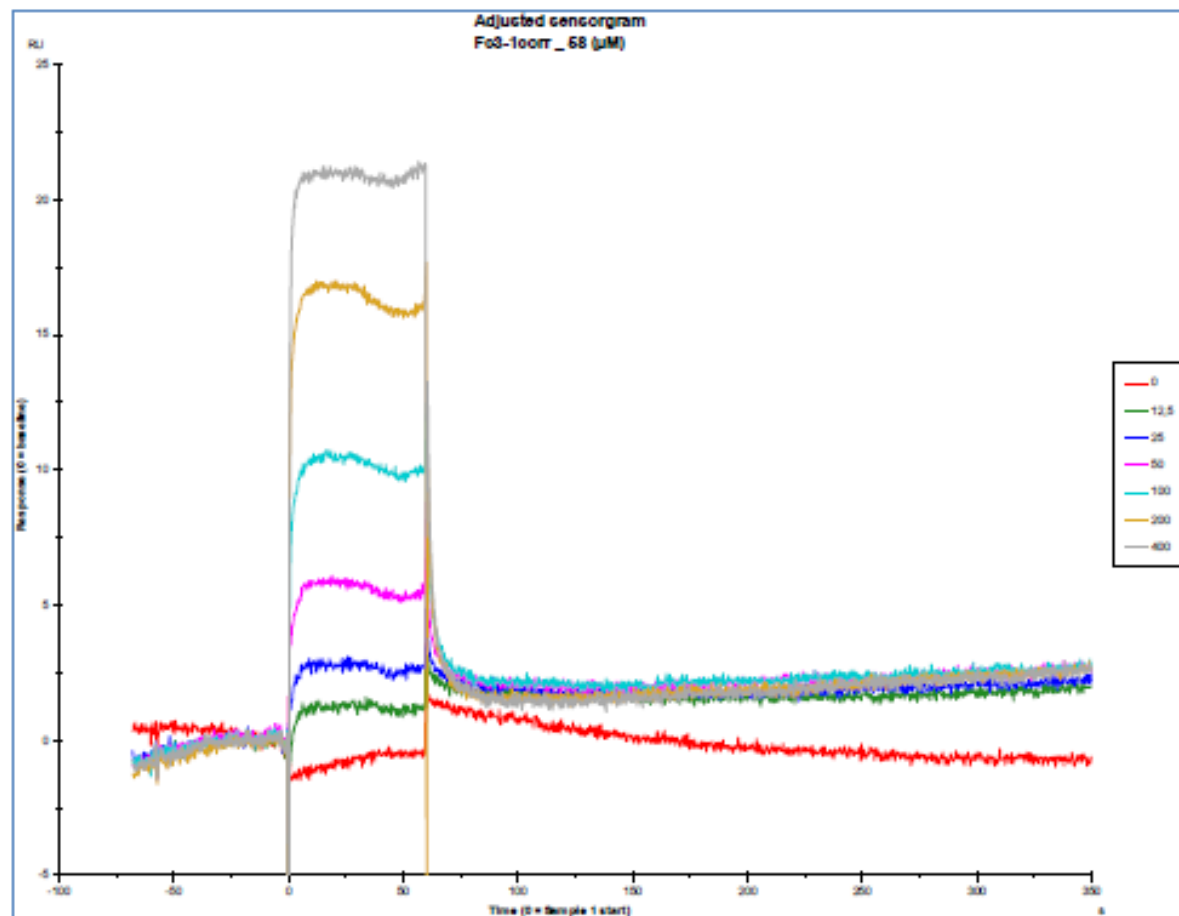
Application 3: Peptide $A\beta_{1-42}$ -Petite Molécule

Peptide AB1-42 – Molécules chimiques thérapeutiques



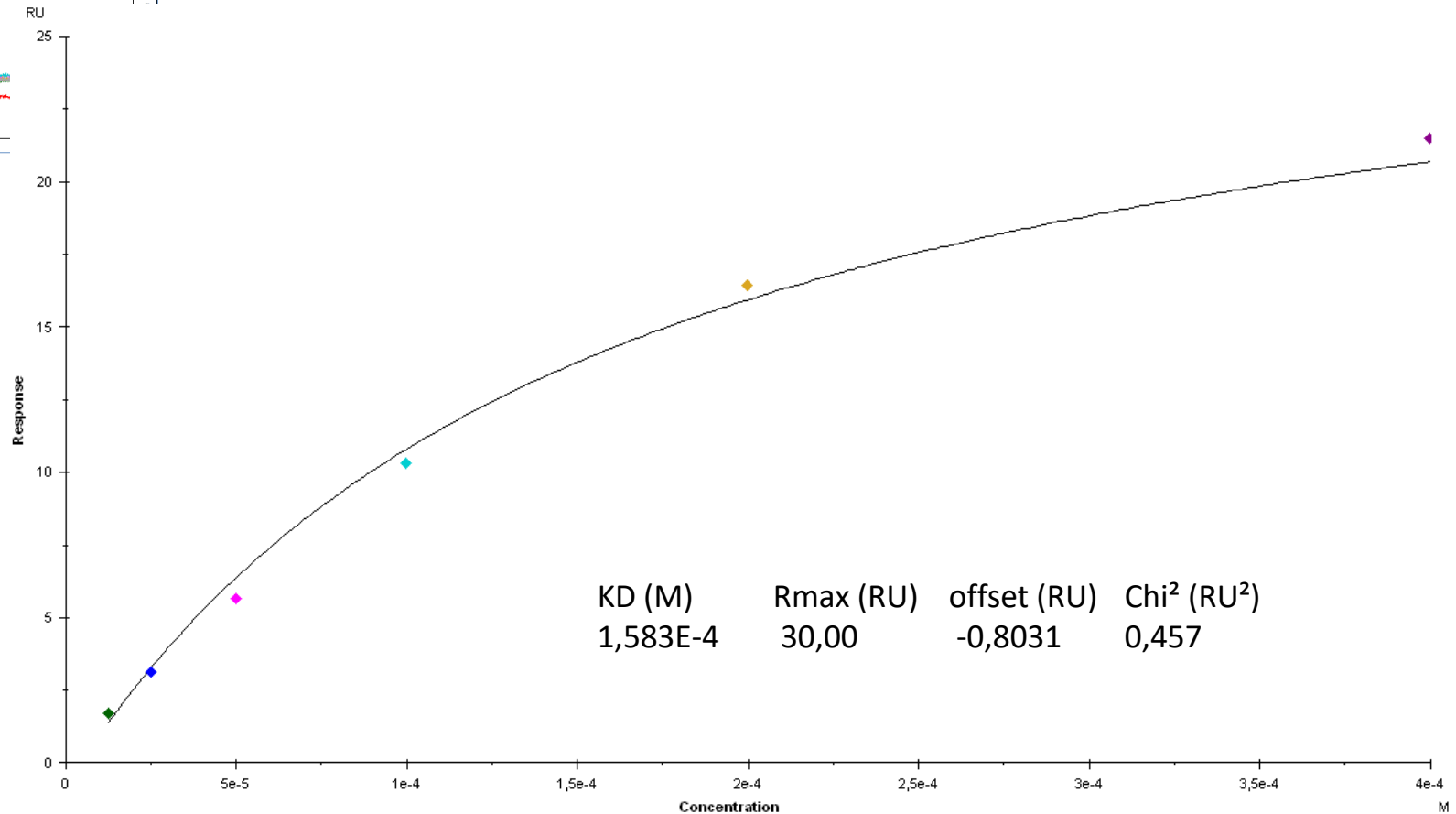
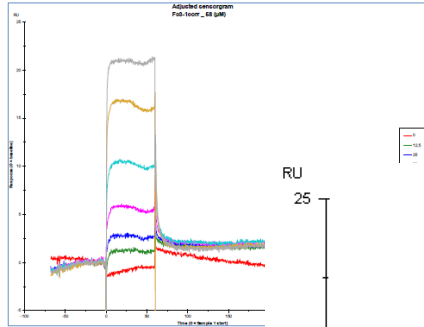
Diverse $A\beta$ monomer structures

J. Kaffy et al, J. Medicinal Chemistry
2016, vol.59, p.2025



Application 3: Peptide $A\beta_{1-42}$ -Petite Molécule

Peptide AB1-42 – Molécules chimiques thérapeutiques



Application 4: Protéine-Protéine

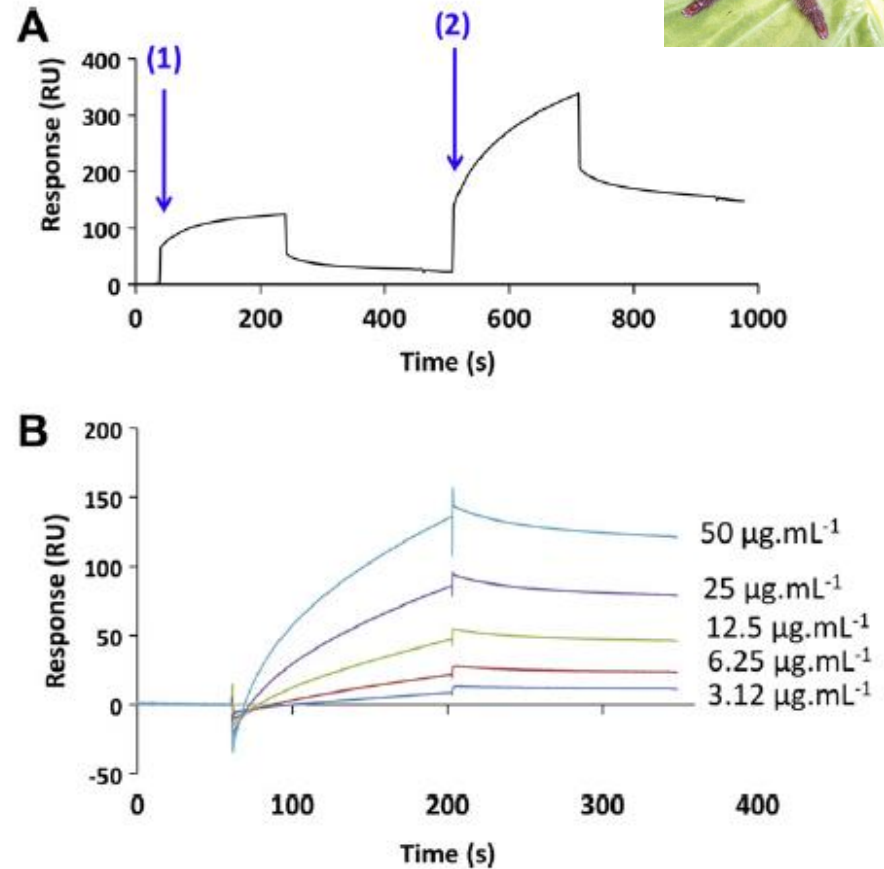
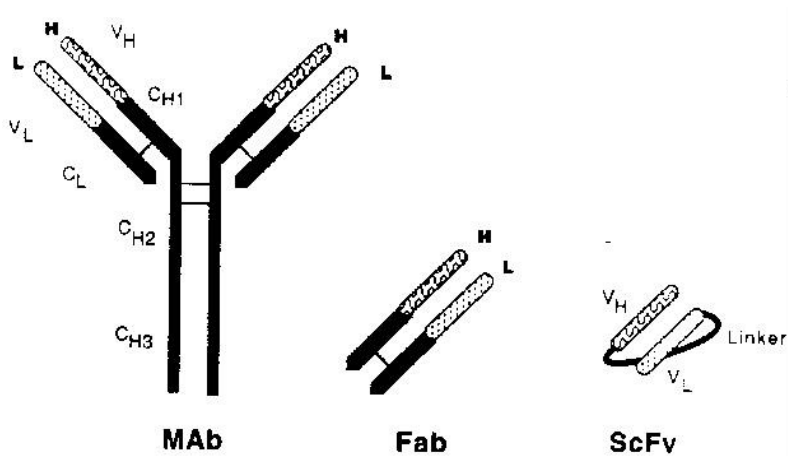
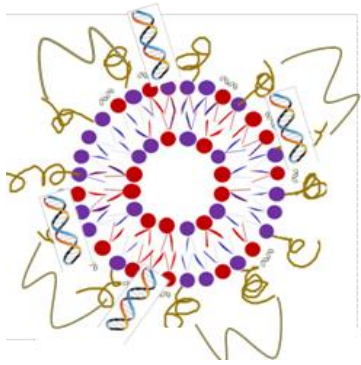


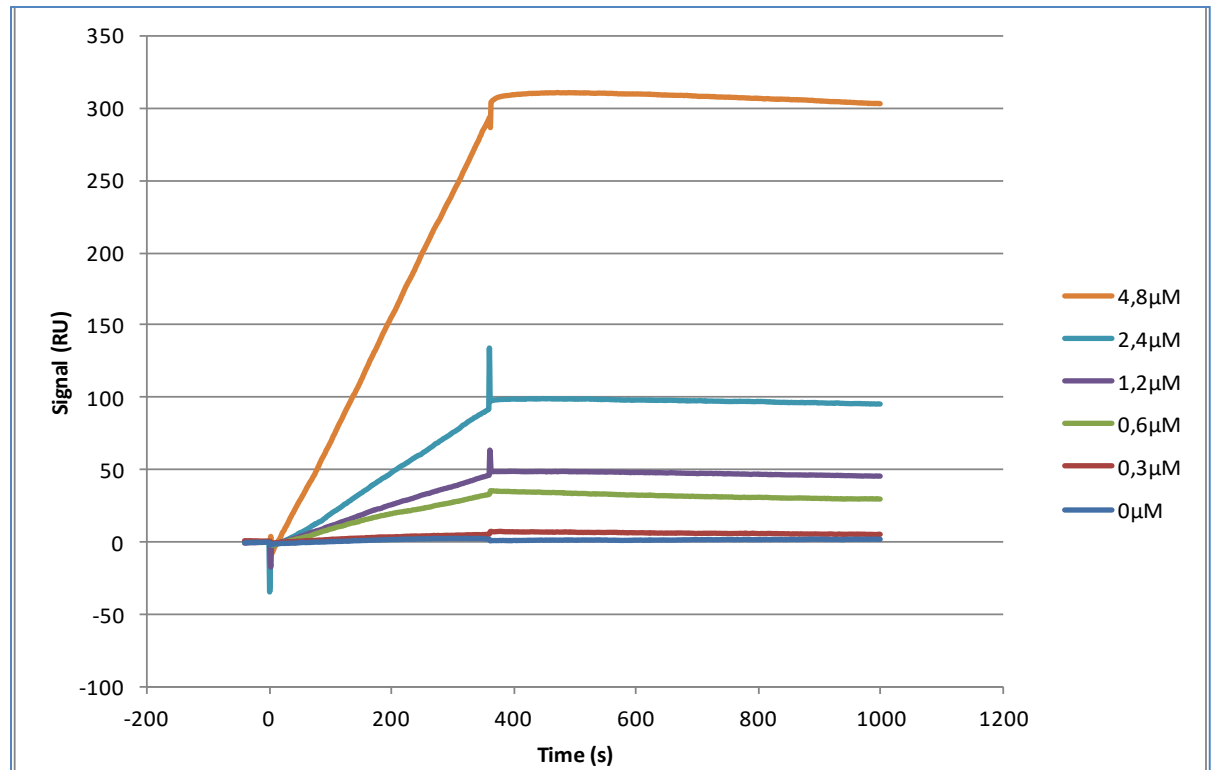
Fig.4. Real-time analysis of the interaction of antibody fragments with biotinylated Protein L captured on a SA sensorchip. (A) Manual run in which periplasmic extracts containing scFv 3J24 (1) and scFv 3J24-P8 (2) were injected. (B) Injection of increasing amounts of purified scFv 3J24-P8.

Application 6: Protéine-Lipoplexes



T. Leite-Nascimento et al,
Langmuir 2015, vol.31, p.11186

Récepteur CD44 – Lipoplexes fonctionnalisés HA



TECHNIQUE de SURFACE(2): BLI

Que mesure-t-on ?

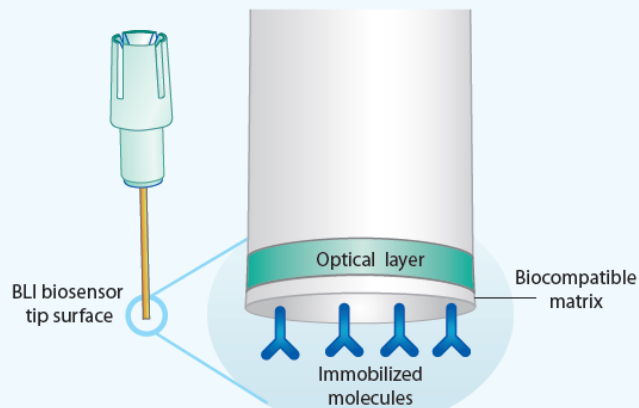


FIGURE 2: A Dip and Read biosensor, illustrating the two optical interfaces at the biosensor tip: the internal reference layer (optical layer) and the surface biocompatible matrix on which ligand molecules are immobilized.

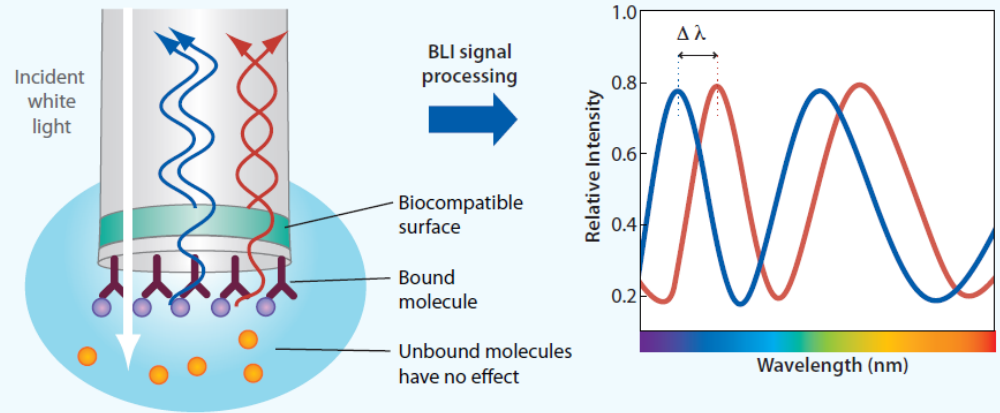


FIGURE 3: BLI is an optical analytical technique that analyzes the interference pattern of white light reflected from two surfaces. Changes in the number of molecules bound to the biosensor causes a shift in the interference pattern that is measured in real time.

- Physiquement, on mesure un décalage de spectre($\Delta\lambda$) relié à la variation d'épaisseur au bout du sensor en nm.

→ **densité surfacique de molécules (QUALITATIF)**

Design d'une expérience

1) Plaque sensors

2) Plaque échantillons

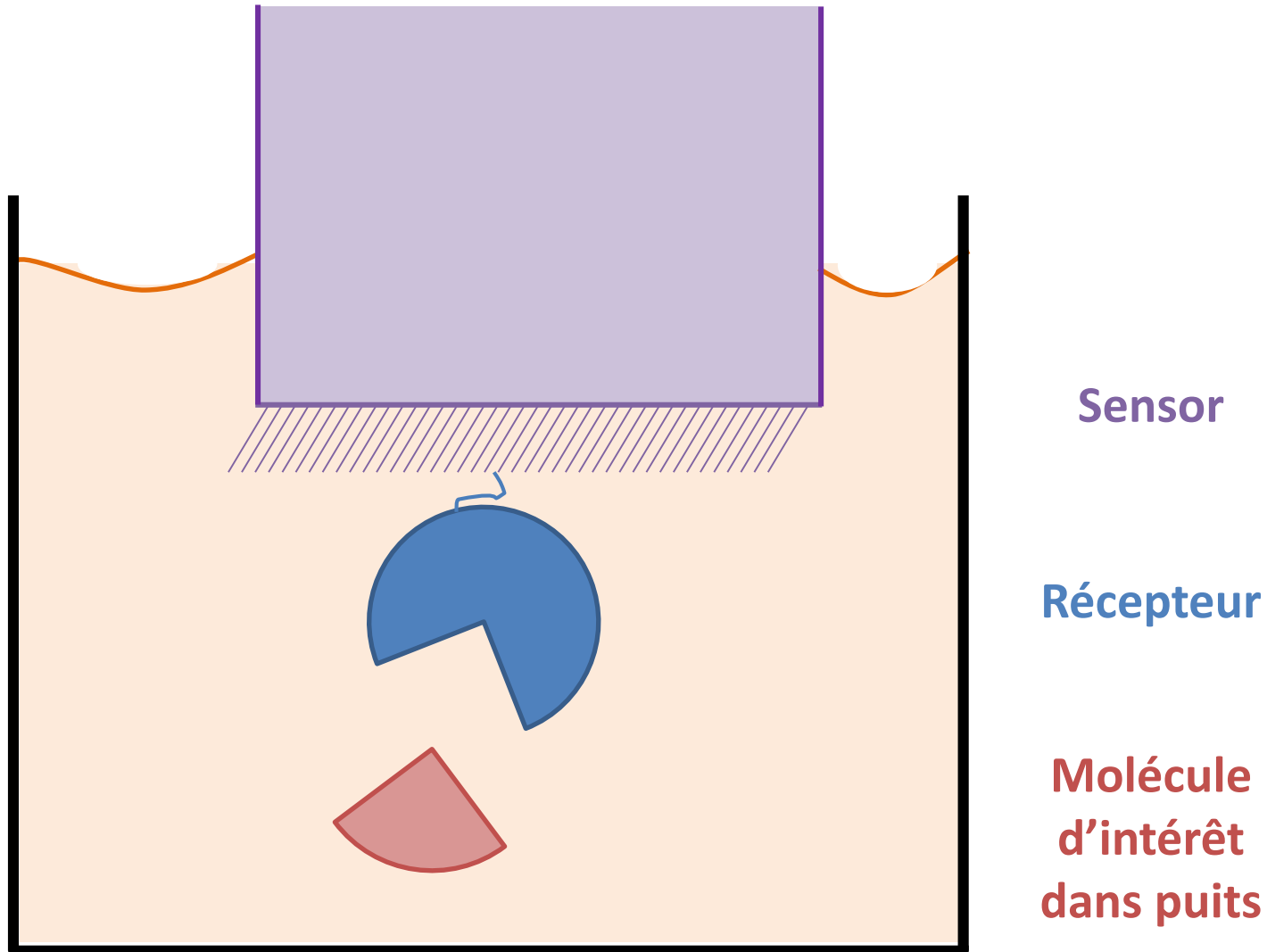
The screenshot displays the Octet Data Acquisition software interface. The main window is titled "Octet Data Acquisition 12.0.2.11 - [Basic Kinetics Experiment - 211007_ExpMethod]". The interface is divided into several sections:

- Navigation:** A top menu bar includes File, View, Experiment, Instrument, Window, and Help. Below it, a progress bar shows five steps: 1) Plate Definition, 2) Assay Definition, 3) Sensor Assignment, 4) Review Experiment, and 5) Run Experiment. A slider indicates the current active step is 3.
- Sensor Tray:** A grid of 12 columns and 8 rows (A-H) representing sensor positions. A legend below indicates that a white square represents "Unassigned sensors" and a hatched square represents "Missing sensors".
- Plate 1 (96 wells):** A 96-well plate layout with columns 1-12 and rows A-H. Each well contains a sample or pie chart, with numerical values ranging from 0 to 1000. A legend below indicates that a white circle represents "Unassigned", a purple circle represents "Samples", and a pie chart represents "Pie charts".
- Assay Table:** A table listing assay steps with columns for Assay No., Sample, Step Name, Step Type, Sensor Type, and Assay Time. The table contains 16 rows of data.
- Right Panel:** Displays "Assay 1 Step 1" with a duration of 30 s and 1000 rpm. It also shows a progress bar for the current step, indicating 0:00:10 of 1:02:25.
- Status Bar:** At the bottom, it shows "Instrument: Operation failed" and "Experiment: ERROR Plate temp: 0 °C".

A red bracket on the right side of the assay table points to the text "3) Définition des étapes de la manip", indicating the third step of the experimental design process.

Assay No.	Sample	Step Name	Step Type	Sensor Type	Assay Time	Comm
1	3	Sensor Check	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	2	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	3	Baseline 3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	4	Baseline 2	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	5	Association	Association	SA (Streptavidin)		
1	6	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)		
1	7	Regeneration	Regeneration	SA (Streptavidin)		
1	8	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	9	Sensor Check	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	10	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	11	Baseline 3	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	12	Baseline 2	Baseline	SA (Streptavidin)		
1	13	Association	Association	SA (Streptavidin)		
1	14	Dissociation	Dissociation	SA (Streptavidin)		
1	15	Regeneration	Regeneration	SA (Streptavidin)		
1	16	Baseline	Baseline	SA (Streptavidin)	1:02:25	

Principe de l'analyse BLI



Principe de l'analyse BLI

[Vidéo Sartorius: principe de la BLI](#)

https://www.youtube.com/watch?v=LAuzx4HaBgY&list=PL7wUdfVJXkoBd81rhvl_pZACTeaQaEUB2&index=1

L'instrument de BLI

8
Spectrophotomètres
sur robotique

Plaque
sensors



Plaques échantillons
dans rack contrôlé en
température



Ordinateur
de pilotage
et d'analyse

Expérience parfaite de BLI

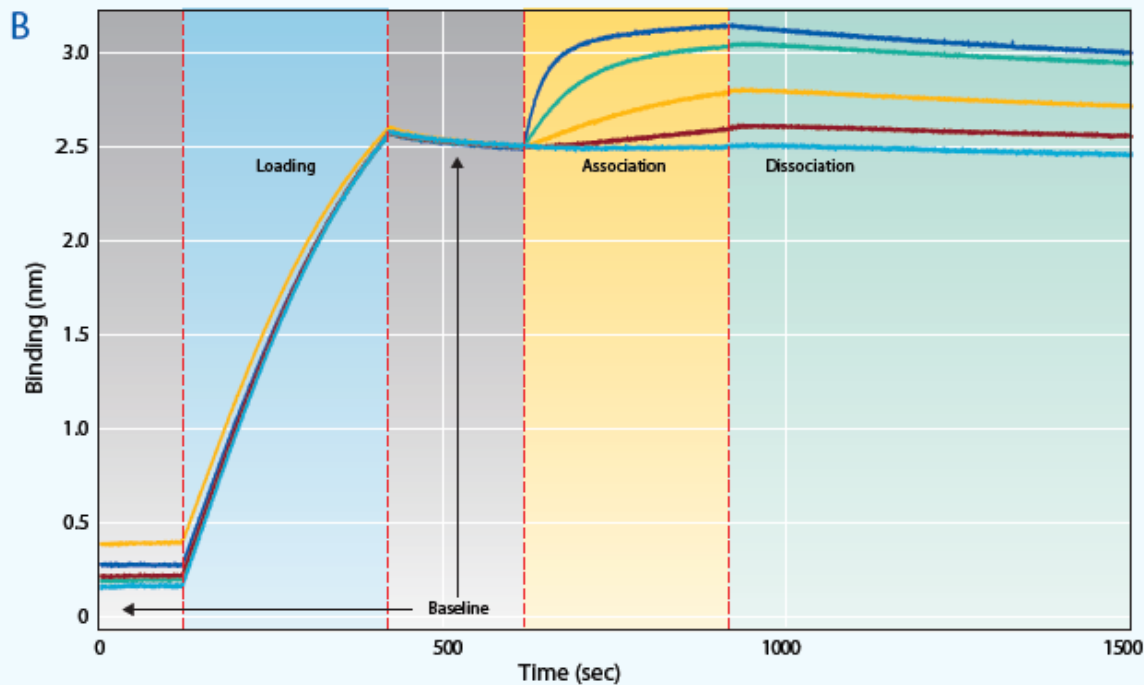


FIGURE 5: A typical binding kinetics experiment using Streptavidin biosensors. A) After an initial baseline step in buffer, biosensors are dipped into solution with biotinylated ligand. In this example, ligand molecule is an antibody. A second baseline step is performed followed by association and dissociation of analyte molecule in solution. B) A raw data sensorgram showing real-time data acquisition for each step of a kinetic assay.

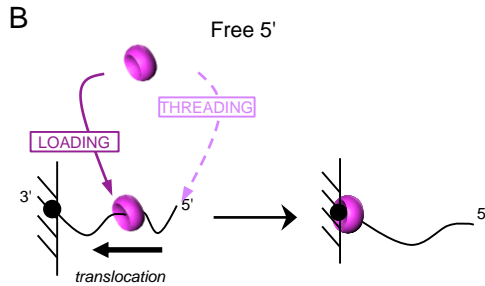
Les information obtenues par BLI

- Spécificité d'une interaction entre 2 molécules (**réponse oui/non → screening**)
- Mesurer les vitesses d'association k_{on} et de dissociation k_{off}
- Mesurer la constante d'affinité K_D

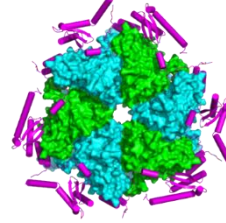
Example : DciA and DnaC loaders on DnaB helicase by BLI

In *Vibrio cholerae*

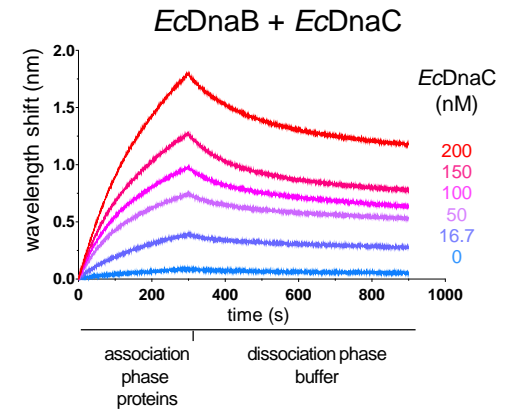
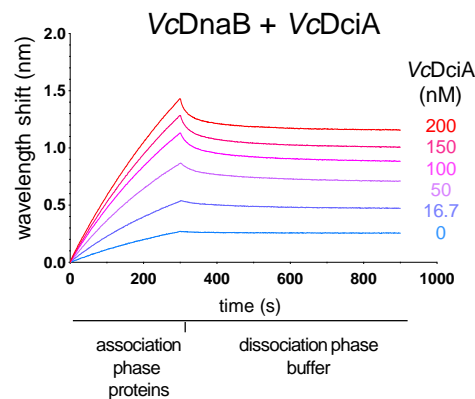
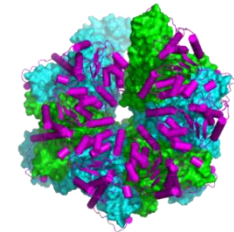
In *Escherichia coli*



VcDnaB₆ • VcDciA₆



EcDnaB₆ • EcDnaC₆



Biotinylated oligonucleotide (50 nt) are immobilized onto the surface of a streptavidin (SA)-coated probe by its 3' extremity. Association was performed with the indicated helicase at a concentration of 100 nM during 300s in a buffer solution containing ATP and MgCl₂. Dissociation was assessed in the same buffer for 600s. Increasing loader concentrations (from 0 to 200 nM in subunits, in blue to red) were analyzed.

	BLI	SPR	ITC	MST	FIDA
K_D value	Indirect K _D		Direct	Indirect	
K _D range	low		medium	medium	low-high
Kinetic constants	YES (k _{on} , k _{off})		<i>Qualitative</i>	No	
ΔH, ΔS, ΔG	Difficult to obtain		YES	NO	
Sample Volume	200μL/well (10-50μg/mL for immo, sample around KD value)	Volumes according to contact time & flow	350μL in cell @ 30μM (10KD) 80μL in syringe @300μM (100KD)	4μL/capillary (20nM fluo partner + dilution series from 20*K _D)	50μL/mix (10nM indicator + 0-20*KD analyte)
Time	30min	1h30	1h-2h	30min	1h
Cost	8€/sensors <i>maintenance</i>	180€/chip maintenance	maintenance	0,3-1,6€/cap	110-250€/cap
DMSO	Possible 5%	Difficult (n)	Difficult (c _p)	Possible	
Dvpt	Capture/Immo Regeneration	Capture/Immo Regeneration	Concentrations	Labelling	Labelling Coating
Origin of errors	Immobilization	Immobilization Mass transfer	Concentrations	Stickiness	Stickiness

Démarche qualité

- Bonne **caractérisation du matériel de départ** (caractérisation biophysique et biochimique des protéines ou autres produits utilisés)
- Vérification régulière de l'appareil, **maintenance** hebdomadaire + fournisseur ISO 9001 (NFX 50-900)
- **Suivi/Traçabilité** des numéros de lot des puces, des réactifs, des produits utilisés



CONCLUSIONS

- Toujours caractériser ses échantillons (même commerciaux) pour améliorer la qualité des expériences
- Utiliser des techniques complémentaires pour consolider/tester son hypothèse
- Bien choisir son modèle d'ajustement en fonction de ses échantillons et son hypothèse