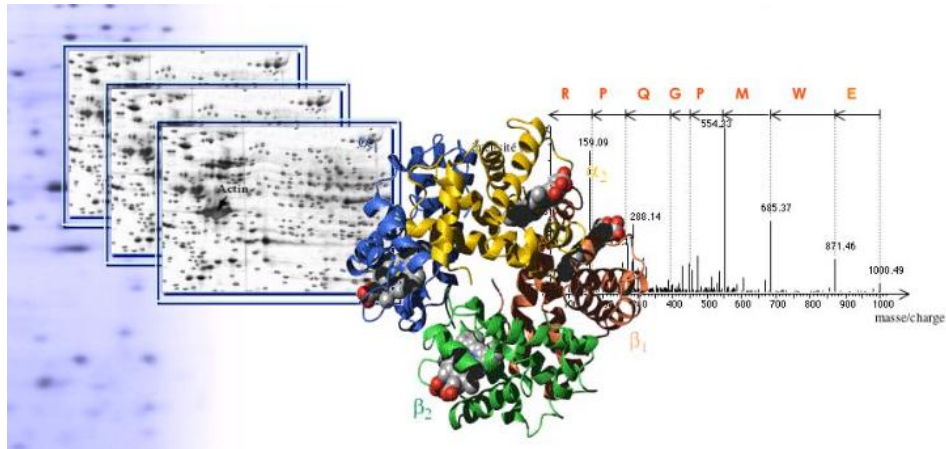


Protéomique et métabolomique appliquée



UMSB- Jijel

Master 2 Biochimie

« An experiment is a question which science poses to Nature, and a measurement is the recording of Nature's answer. »,

Max Planck

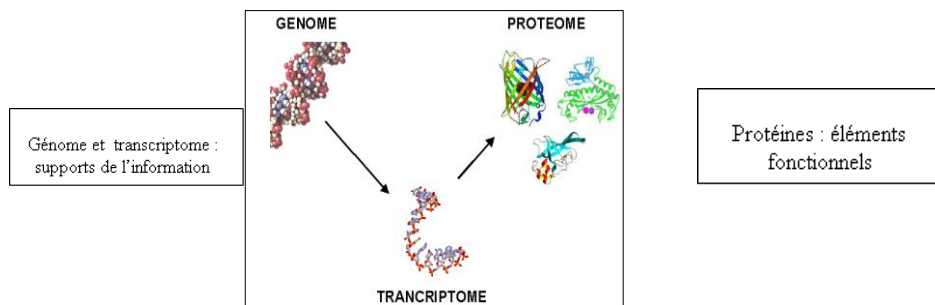
I. application et analyse protéomique

Introduction

Le Protéome

- **Le protéome:** un terme inventé pour la première fois par **Marc Wilkins en 1994**.
- Le terme de protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par un génome à un moment précis en réponse à un environnement donné (Wilkins et al., 1997).

Le protéome = le complément PROTéique du génOME (définition de Marc Wilkins)



Pourquoi étudier le protéome?

- La caractérisation du génome humain « Projet Génome Humain » (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) révèle qu'il existe **22 000 gènes (30000 gènes supposés)**
- Celui-ci a constitué une ressource essentielle pour aborder l'étude des réseaux d'interactions fonctionnelles qui commandent les processus biologiques normaux et pathologiques.
- Néanmoins, la caractérisation du génome humain n'a pas permis d'appréhender l'entière complexité des systèmes biologiques. Ceci s'explique en partie par le fait que les véritables unités fonctionnelles de la cellule sont les protéines.
- Le protéome contient un nombre beaucoup plus important de protéines que le génome contient de gènes. On estime aujourd'hui qu'il existerait environ **un million de protéines**. Le protéome est donc plus complexe.

Pourquoi étudier le protéome?

Le protéome est donc complexe et ceci à plusieurs titres:

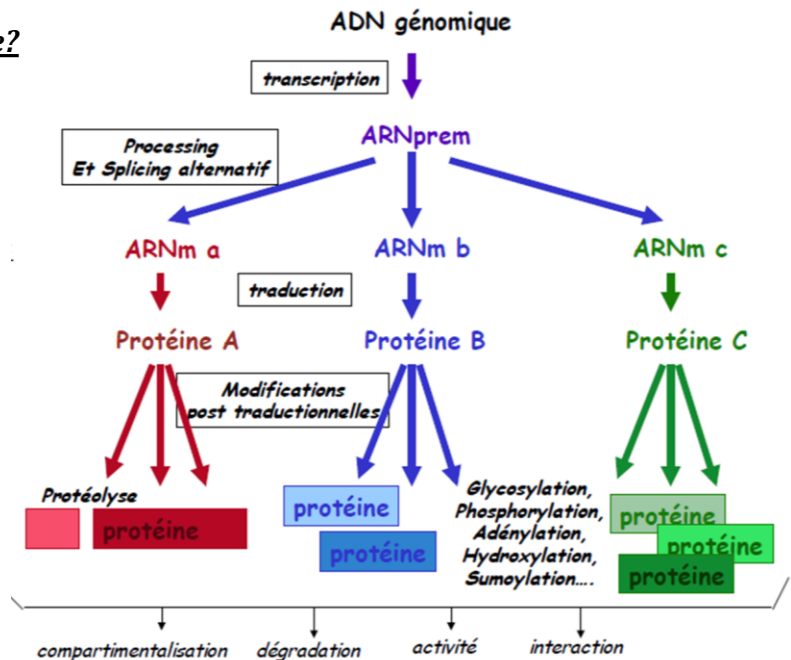
- l'épissage alternatif des transcrits primaires (plusieurs ARNm pour un gène)
- les **modifications post-traductionnelles** des protéines :

glycosylation, phosphorylation, acétylation, hydroxylation, sulfonation, ubiquitinylation, formation de ponts covalents, ancrage lipidique, clivage du peptide signal d'adressage, activation de la forme native à partir d'un précurseur (zymogène),

- Repliement
- Assemblage en complexes oligomériques

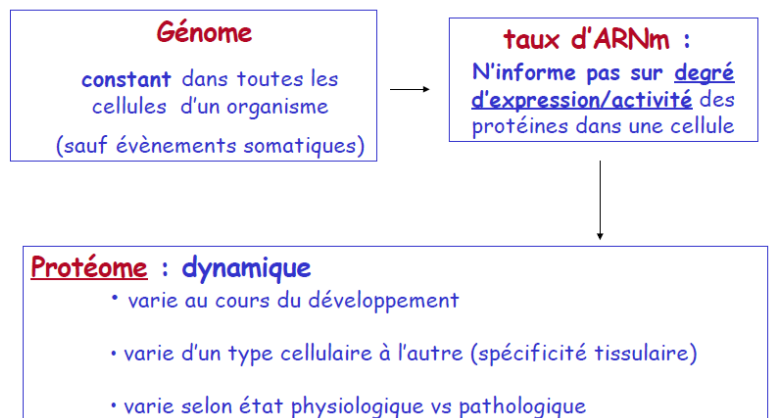
L'étude du protéome est donc indispensable et complète l'étude du génome.

Pourquoi étudier le protéome?



Dynamique du protéome

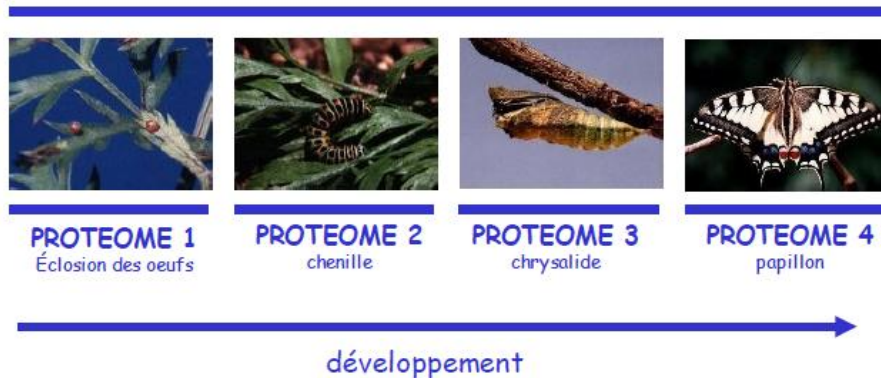
Le protéome est dynamique, le génome est constant



Alors que le génome est identique dans toutes les cellules d'un organisme quel que soit leur environnement ; le protéome est, quant à lui, une entité **dynamique et complexe**. Au sein de chaque cellule, le contenu protéique évolue en permanence en fonction des conditions intra ou extra cellulaires (étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, de la réponse à des signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique...).

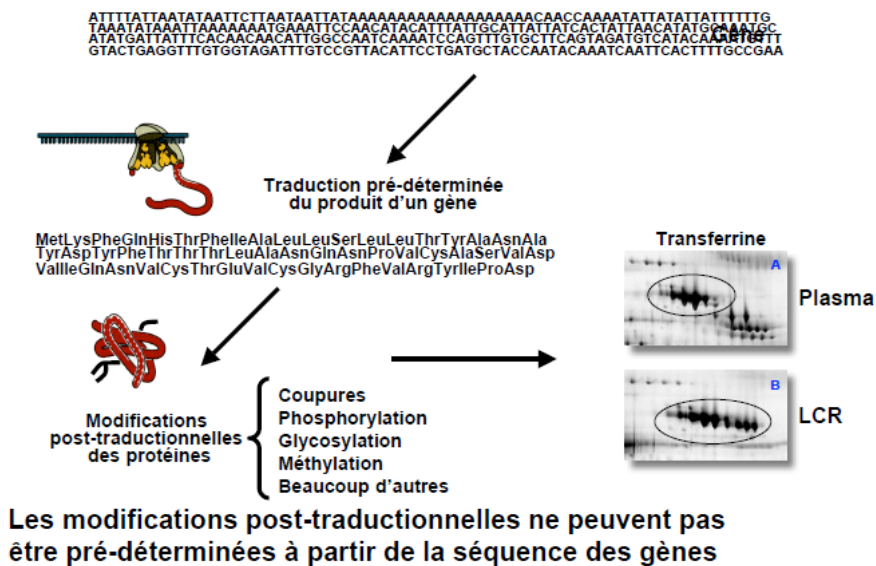
Dynamique du protéome: varie au cours du développement

1 GENOME

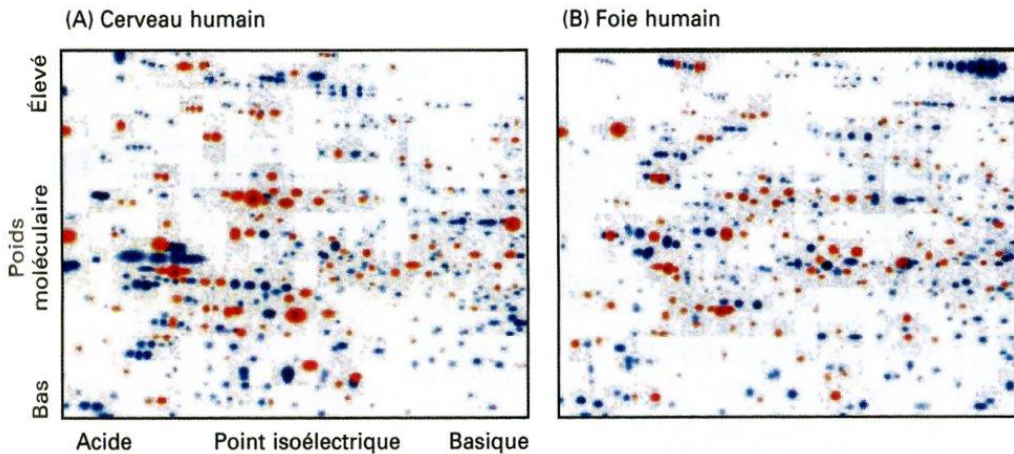


L'exemple de la chenille et du papillon illustre la différence fondamentale qui existe entre les niveaux génomique et protéomique. Ces deux organismes, apparemment différents, ont exactement le même génome mais des protéomes distincts. **Il est donc important, pour comprendre un organisme, d'étudier son génome mais aussi son protéome.**

Dynamique du protéome: varie d'un type cellulaire à l'autre



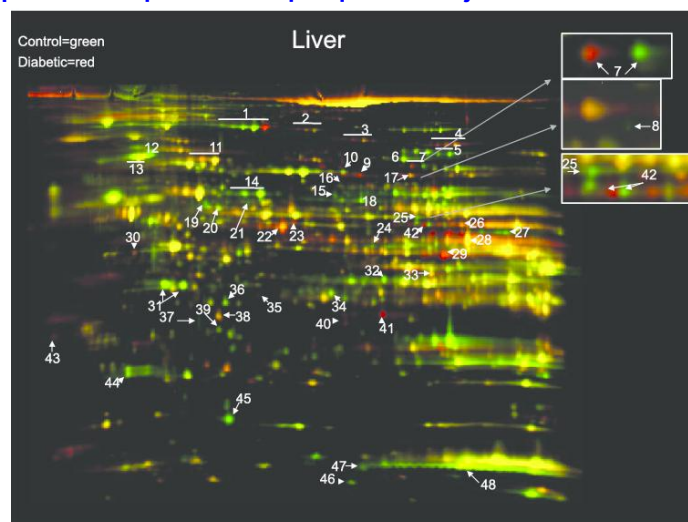
Dynamique du protéome: varie d'un type cellulaire à l'autre



Les protéines retrouvées dans **les deux** électrophorèses bidimensionnelles sont repérées en **rouge**, celles présentes dans **une seule** en **bleu**. Toutes les cellules n'expriment pas les mêmes protéines alors que leur information génétique est la même.

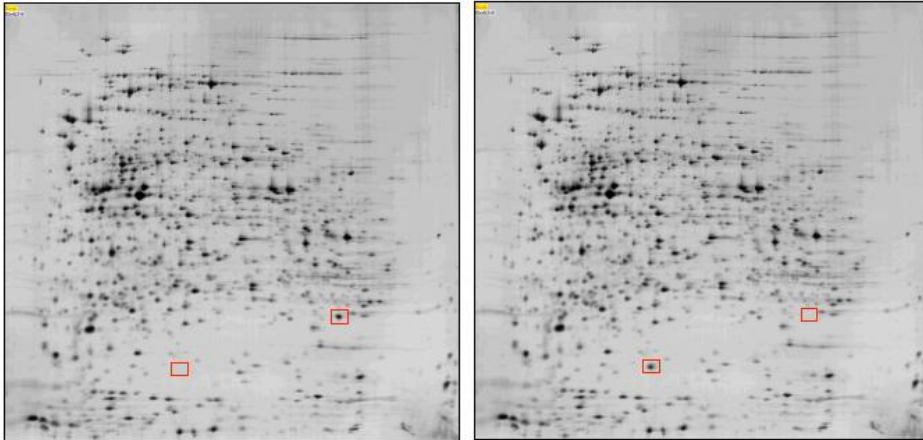
Dynamique du protéome: varie suivant l'état physiologique et/ou physiopathologique

Comparaison du protéome hépatique d'un sujet sain vs une diabétique



Dynamique du protéome: varie suivant l'environnement (conditions extracellulaires)

Comparaison d'*E.COLI* sauvage vs. résistant



La protéomique

La protéomique: l'étude du protéome, l'analyse du protéome

- Elle consiste à **identifier**, **caractériser** et **quantifier** l'ensemble des protéines exprimées dans un échantillon biologique à un instant donné et sous des conditions définies.
- Est la discipline de la «**comparaison quantitative de protéomes similaires sous différents stimuli permettant une meilleure compréhension des processus biologiques complexes**».

La protéomique: objectifs et applications

- Dériver des informations fonctionnelles sur les protéines (localisation, sites de liaison de ligands....)
- Mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires
- Étudier des voies de signalisation impliquées dans des processus biologiques ou dans le développement de maladies
- Identifier de nouvelles espèces
- Identifier des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines)
- Découvrir et valider l'utilisation de biomarqueurs protéiques utiles au dépistage de maladies, au suivi de leur évolution ou encore à l'évaluation de l'efficacité d'un traitement (biologie clinique)

Approches de la protéomique

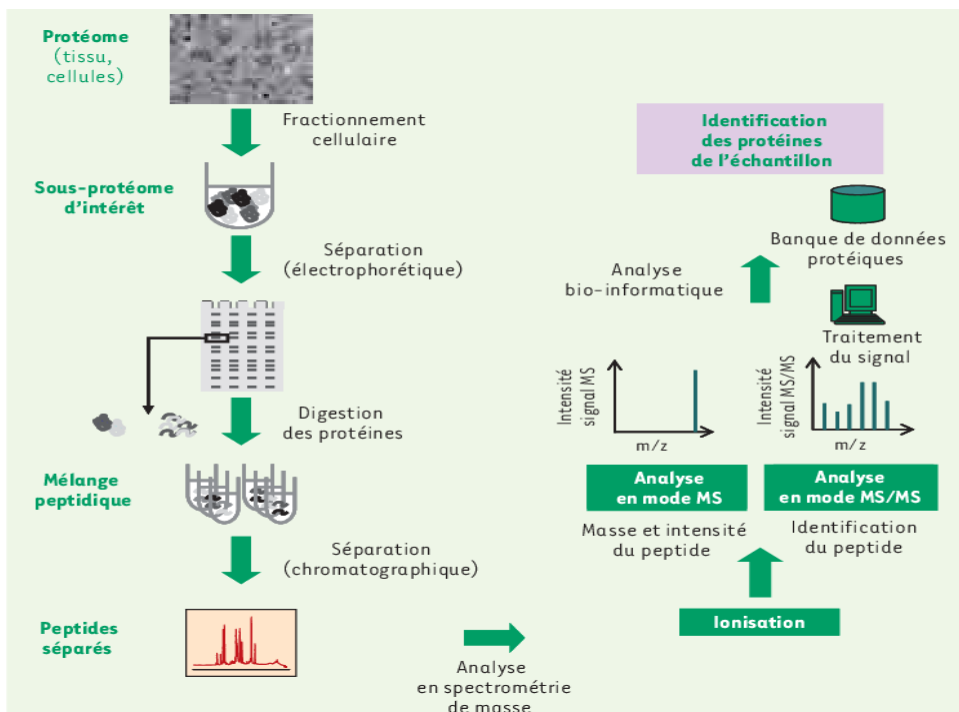
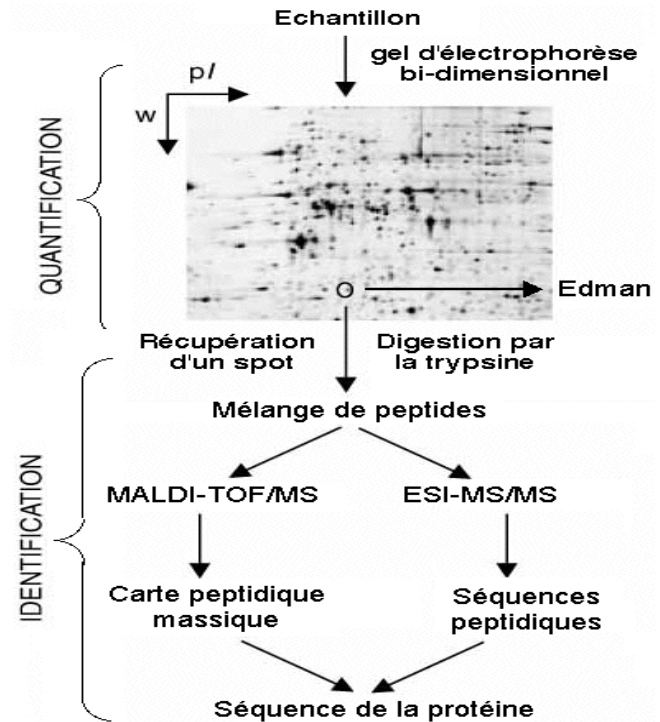
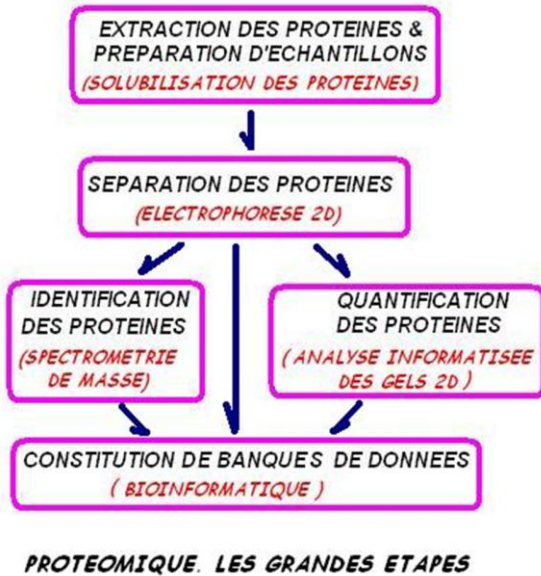
1. La protéomique descriptive: le but est de fournir une image de l'ensemble des protéines exprimées par une cellule, un tissu ou un organisme donné (protéomique qualitative, quantitative, topologique (localisation subcellulaire de la production des protéines) et recherche de modifications post traductionnelles).

2. La protéomique différentielle: il s'agit d'étudier l'expression des protéines de tissus ou d'organismes entre deux conditions différentes et de déterminer les variations d'expression protéique de manière qualitative et quantitative.

3. La protéomique fonctionnelle: le but est de pouvoir élucider les interactions entre protéines, pour établir des réseaux d'interaction, de façon à mieux appréhender leurs fonctions et leurs régulations.

4. La protéomique structurale: le but est de déterminer la relation entre la structure et la fonction d'une protéine, en particulier par la résolution de sa structure tridimensionnelle.

Les étapes de l'analyse protéomique



Les étapes de l'analyse protéomique: en résumé

- Extraction et solubilisation des protéines avec ou sans fractionnement (cas particulier des [protéines membranaires](#))
- Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle ou par des [techniques de chromatographie](#) (protéomique en vrac ou étude de peptides particuliers)
- Révélation des protéines dans les gels puis l'analyse d'image des gels
- Récupération des spots de protéines et la digestion par des protéases
- *Le cas échéant, la détermination de la séquence N-terminale par la [dégradation d'Edman](#) dans le but de rechercher des candidats dans les banques de données*

Les étapes de l'analyse protéomique: en résumé

- Spectrométrie de masse (**mode MS**): obtention de cartes peptidiques massiques
- Spectrométrie de masse en **tandem (mode MS/MS)**: détermination de la séquence complète des protéines
- Analyse bioinformatique (identification des protéines, annotation des protéines et des gènes, recherche de motifs structuraux, analyse des structures, ...)

1- Extractions des protéines

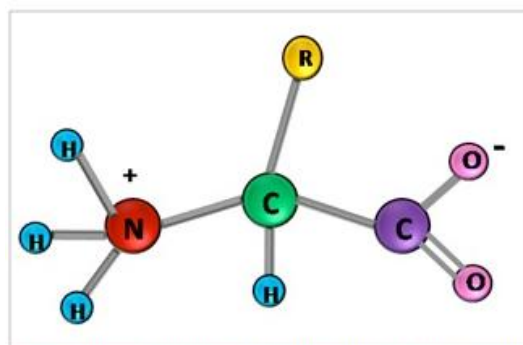
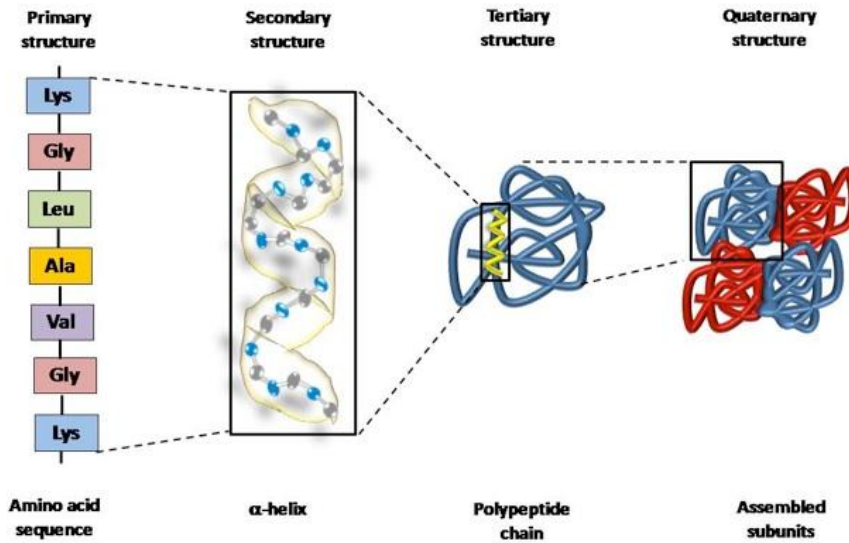


Fig1: General structure of amino acid: An amino group, carboxylic group and R-group side chain.



Levels of structural complexity of proteins

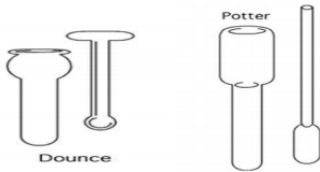
1- Extractions des protéines

C'est une étape cruciale car elle peut entraîner une dégradation ou une dénaturation irréversible des protéines et compromettre leur identification.

- Si la protéine se trouve **dissoute dans un liquide biologique** (ex: plasma, LCR, urines, salive...) aucune méthode d'extraction n'est nécessaire.
- Si la protéine est à extraire d'**un tissu** ou d'une **culture cellulaire**, l'extraction commence par la destruction de l'organisation cellulaire par des méthodes mécaniques, chimiques ou par l'action d'enzymes.

Techniques mécaniques

Le broyage: les broyeurs mécaniques (en verre) sont utilisés dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée.



La bombe à disruption: consiste à traiter l'échantillon avec de l'azote liquide (à haute pression).



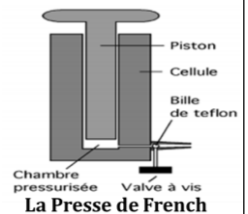
La sonication (Ultrasons): permet de lyser les cellules en suspension.



Sonificateur

La congélation-décongélation: les cycles de congélation (-20°C) et de décongélation (37°C), utilisée surtout lorsqu'il s'agit d'une protéine bactérienne.

La Presse de French: utilisée pour interrompre la membrane plasmique des cellules. Fiable, efficace et préserve l'activité enzymatique dans les cellules.



Techniques chimiques

- Choc osmotique
- Modification de la force ionique ou du pH

Techniques enzymatiques

Pour lyser la paroi cellulaire des levures, des plantes et des bactéries par différentes enzymes comme le lysozyme, la lyticase

Procédure d'extraction

- ***A partir d'un tissu*** : broyage grâce à l'appareil de Potter. L'éclatement des cellules est achevée par choc osmotique ou encore par sonication ce qui va lyser les membranes des cellules.
- Un choc osmotique peut suffire à briser la membrane cellulaire de cellules fragiles. Ce choc peut être assisté par un léger traitement avec un détergent (ce qui permet aussi d'aider à maintenir les protéines en solution). Une certaine action mécanique peut aussi être ajoutée au processus: un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères.
- Finalement, dans tous les cas, une méthode brutale peut aussi être utilisée. Le traitement aux ultrasons, une lyse mécanique utilisant des billes de verre ou une presse French, comme les cycles de congélation/décongélation, sont tous des moyens envisageables.

Procédure d'extraction

- ***A partir d'un organite particulier***: on effectue un fractionnement cellulaire: on sépare les différents constituants de la cellule grâce à l'ultracentrifugation = sédimentation accélérée (centrifugation différentielle = succession d'ultracentrifugations pour lesquelles on fait varier la durée et la vitesse de rotation)
- ***À partir des cellules bactériennes, de levures ou végétales***: l'utilisation de lysozyme est nécessaire

- **La solution d'extraction**

Dans le cas d'un tissu, beaucoup de protéines sont en effet hydrophobes et donc difficiles à extraire, ce qui est également le cas de protéines fortement ancrées à des structures cellulaires. On doit faire appel à des solutions d'extraction. Le tampon d'extraction doit avoir:

- Fort pouvoir tampon (Bis-TRIS, Tris, Glycine),
- Agents réducteurs (glutathione, l'acide ascorbique, le beta-mercaptoethanol ou le dithiothreitol (DTT))
- Détergents (CHAPS, Triton X-100, SDS à faible concentration)
- Agents chaotropes (urée, thiourée)
- Les inhibiteurs de protéases (PMSF, EDTA, Pepstatin A...)
- Le glycérol est souvent ajouté pour la stabilisation des interactions protéine-protéine.

Stratégie d'ensemble pour purifier une protéine d'intérêt

Les protéines sont purifiées par des **méthodes de fractionnement**; on utilise les différentes propriétés physico-chimiques de la protéine étudiée pour l'isoler progressivement des autres substances cellulaires.

Les propriétés physico-chimiques exploitées dans les différentes techniques de séparation sont:

- La solubilité
- La charge ionique
- La taille moléculaire
- La spécificité

Propriété physico-chimique**Techniques de séparation****Solubilité**

Précipitation (centrifugation, filtration)

Charge ionique

Chromatographie par échange d'ions

Electrophorèse

Focalisation isoélectrique

Taille moléculaire

Ultracentrifugation

Chromatographie par gel-filtration

Electrophorèse (SDS-PAGE)

Spécificité

Chromatographie d'affinité

Solubilisation et précipitation des Protéines

- **La solubilité** peut-être utilisée pour purifier certaines protéines car certaines sont solubles dans des conditions données alors que d'autres précipitent dans ces mêmes conditions.

- ***Influence de la concentration en sel***

En amenant la concentration en sel de la solution protéique à une valeur toute juste inférieure à celle pour laquelle la protéine désirée précipite, on élimine une bonne partie des protéines non-voulues. Suite à une filtration ou par une centrifugation, on peut alors précipiter la protéines d'intérêt en augmentant légèrement la concentration en sel, laissant ainsi une autre portion de protéine non-voulues en solution.

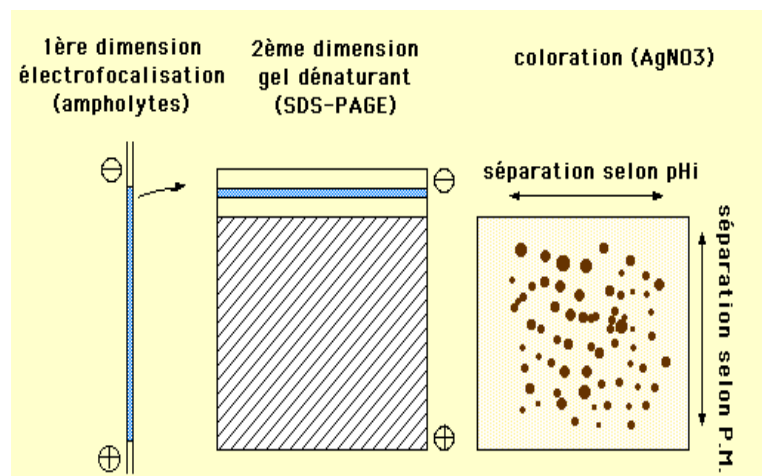
- ***Influence des solvants organiques***

On utilise des solvants organiques miscibles à l'eau comme l'acétone ou l'éthanol pour précipiter les protéines.

2- Electrophorèse bidimensionnelle

2- Electrophorèse bidimensionnelle

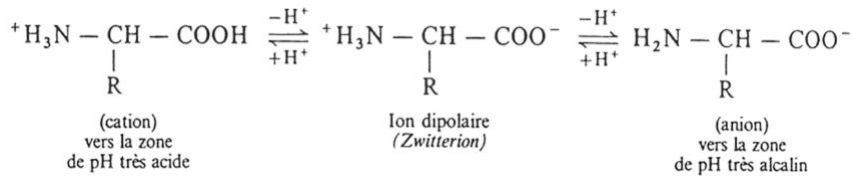
- Séparation des protéines en deux dimensions: selon leur charge puis selon leur poids moléculaire
- La technique avait été introduite par **O'Farrell et Klose** en 1975.
- **Avantage:** permet d'avoir une vue générale des protéines exprimées par un génome (= Protéome) ; ne sont visibles que les protéines exprimées en quantité suffisante (colorées)



2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par **Isoélectrofocalisation (IEF)**

- **Principe** : Pour toute protéine, il existe un pH isoélectrique (pHi), pH pour lequel la protéine est électriquement neutre et ne se déplace pas dans un champ électrique (la conductivité de la protéine est nulle: $\gamma = 0$).
- La charge nette d'une protéine est la somme des charges négatives et positives de ses extrémités et des chaînes latérales des acides aminés qui la composent.
- Les protéines sont des molécules amphotères, elles peuvent être chargées positivement, négativement ou pas avoir de charge selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent.



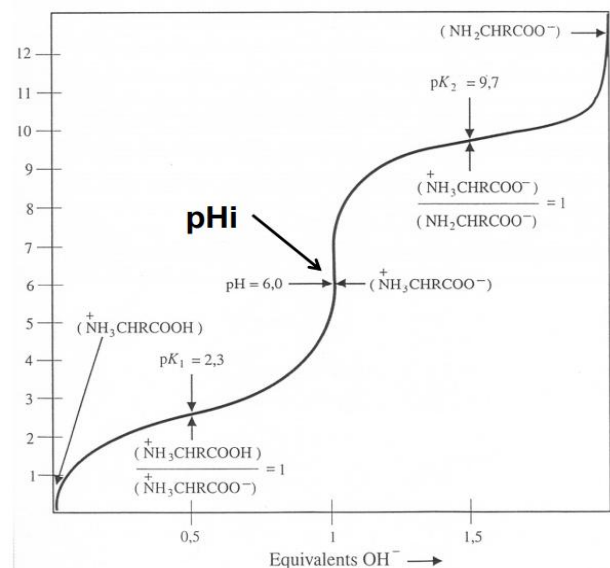
2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par **Isoélectrofocalisation (IEF)**

pHi de la protéine > **pH** de la solution : la protéine est chargée **positivement**

pHi de la protéine < **pH** de la solution : la protéine est chargée **négativement**

pHi de la protéine = **pH** de la solution : la protéine n'as pas de charge = **charge nulle**



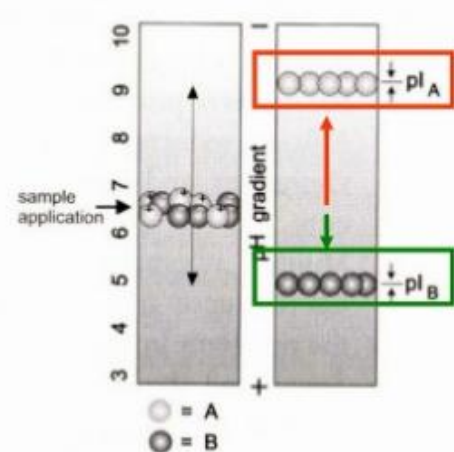
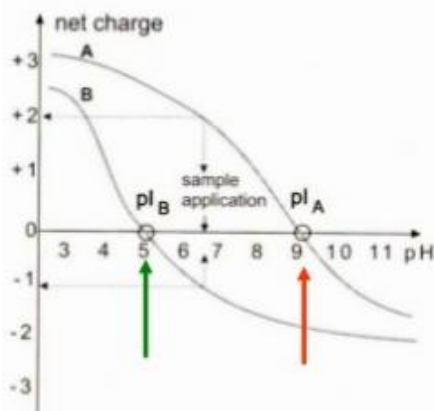
2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par *Isoélectrofocalisation (IEF)*

- Au sein d'un même extrait protéique on aura un ensemble des protéine à différentes charges et pHi.
- Dans la focalisation isoélectrique, les protéines (à l'état natif, non dénaturées) migrent dans un tube étroit de gel de polyacrylamide dans lequel il est établi un gradient de pH. Chaque protéine migre dans le gradient de pH jusqu'à un point qui correspond à son pH isoélectrique et elle se stabilise à ce niveau.
- L'IEF est une méthode de séparation à haute résolution, elle permet la mesure des **pHi** de différentes protéines

2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par *Isoélectrofocalisation (IEF)*



2- Electrophorèse bidimensionnelle

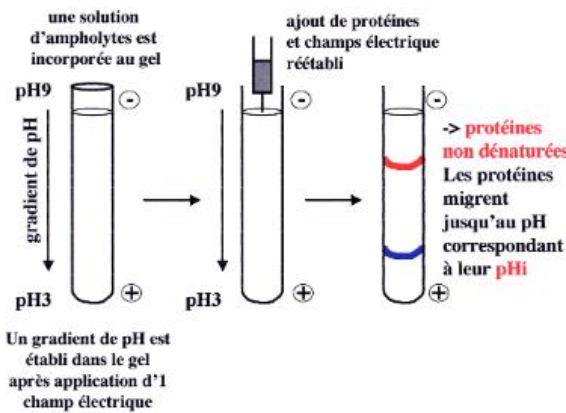
Première dimension: séparation selon la charge par **Isoélectrofocalisation (IEF)**

- Dans la focalisation isoélectrique, les protéines migrent dans un tube étroit de gel de polyacrylamide dans lequel il est établi un gradient de pH.

Deux façon pour former un gradient de pH

A) La technique IEF classique: par des ampholytes

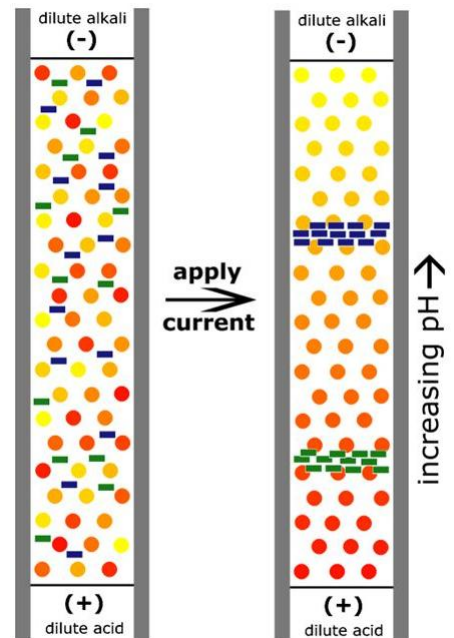
- Un gradient de pH généré par des **ampholytes** vecteurs , développée pour la première fois par Svensson (1961) et est mise en pratique par Vesterberg en 1969
- Les ampholytes est un mélange d'isomères des acides oligoamino et oligocarboxyliques aliphatiques de faible poids moléculaire qui génèrent un gradient de pH dans sous un champ électrique



Inconvénients

- Instabilité dans le gel
- Dégradation lors du dépôts d'échantillons concentrés
- Reproductibilité réduite (superposition)

Pour cela, ils ont été remplacés par des bandelettes à gradient de **pH immobilisées (IPG)**



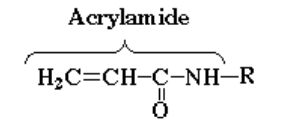
2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par ***Isoélectrofocalisation (IEF)***

B) Gradient de pH immobilisé = Immobilized pH gradient (IPG)

Développée par l'Allemande **Angelika Görg**

- Le gradient de pH fait parti intégrante du gel de polyacrylamide.
- Les immobilines (des groupements acides et basiques ayant un effet tampon) co-polymérisent avec les molécules d'acrylamide dans le gel d'IEF. Ainsi, les groupes chargés portés par les immobilines qui forment le gradient de pH sont covalamment attachés à la matrice de polyacrylamide et donc immobilisés.



**R = groupement tampon
acide faible ou base faible**

E. Jaspard (2009)

R correspond à un **groupement carboxyle** ou à une **amine tertiaire** qui forment une série de molécules tampon avec différentes valeurs de pK_a d'ionisation

2- Electrophorèse bidimensionnelle

Première dimension: séparation selon la charge par ***Isoélectrofocalisation (IEF)***

- Les immobilines forment un gradient de pH dans le gel de polyacrylamide en appliquant un champ électrique, puis le gel est déshydraté et conservé.
- Les IPG se présentent sous forme de bandelettes (strips) faciles à utiliser et dont les dimensions les plus courantes sont 180mm X 3.5mm pour seulement 0.05mm d'épaisseur.
- Cette technique permet d'obtenir des gradients de pH reproductibles et très étroits : une pente de 0.01 unité pH / cm peut séparer un mélange de protéines avec une différence de pI de 0.001 unité pH.



Strip (bandelette)

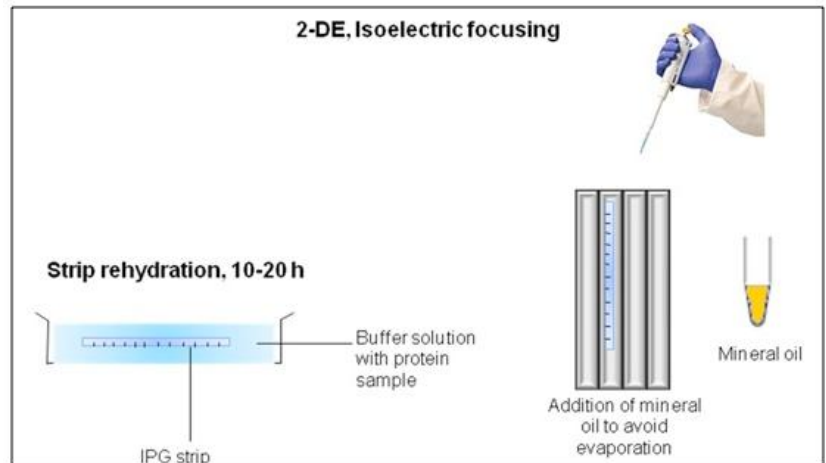
Mode opératoire de l'électrophorèse a focalisation isoélectrique

Réhydratation des IPG strips

1- Réhydratation passive (sans courant) du strip toute la nuit, par une solution à base de:
Urée, CHAPS, triton X100, tampon IEF et DTT

But:

- Hydratation du gel
- adsorption efficace des protéines sur le gel



2- Ajout de l'huile minérale

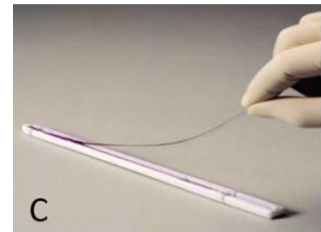
But: prévenir la déshydratation du gel



Retirer le film protecteur



Déposer la solution de réhydratation



Mouiller le strip dans la solution de réhydratation (**coté gel vers le bas**)

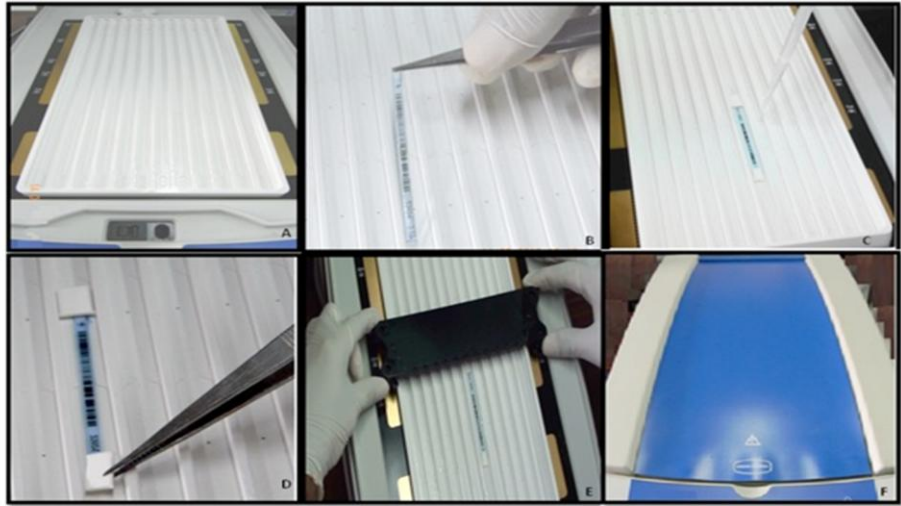
NB

L'échantillon à séparer peut être déposé avant le lancement de la migration s'il n'a pas été inclus dans la solution d'hydratation



NB

- Après réhydratation, le strip est placé dans ligne de chambre de migration avec le **coté gel vers le haut**
- L'extrémité acide du strip est placée du côté anodique.



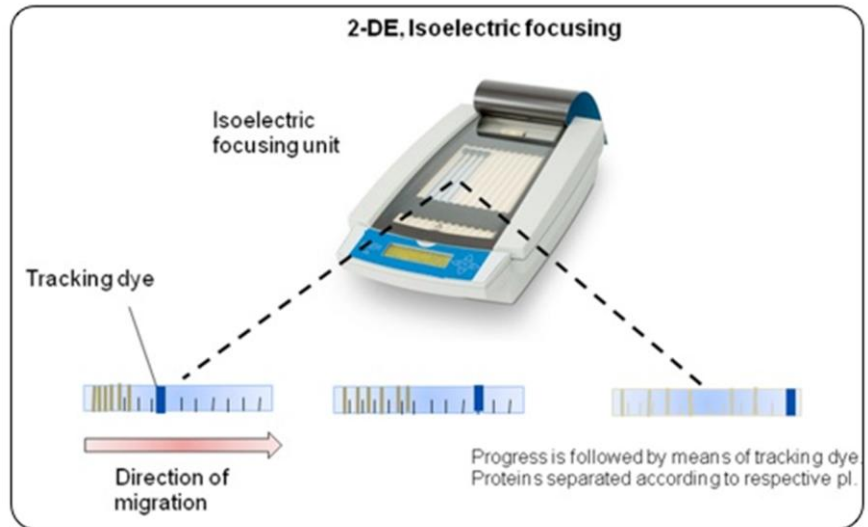
Process of isoelectric focusing of proteins. a) Assembly on Instrument b) Rehydrated strip is placed in the lane c) Mineral oil is poured to prevent drying of strip d) Wicks are placed on either side e) Electrodes are placed across the strip f) The IEF lid is closed and focusing started g) Schematic representation of IEF and separation on first dimension.



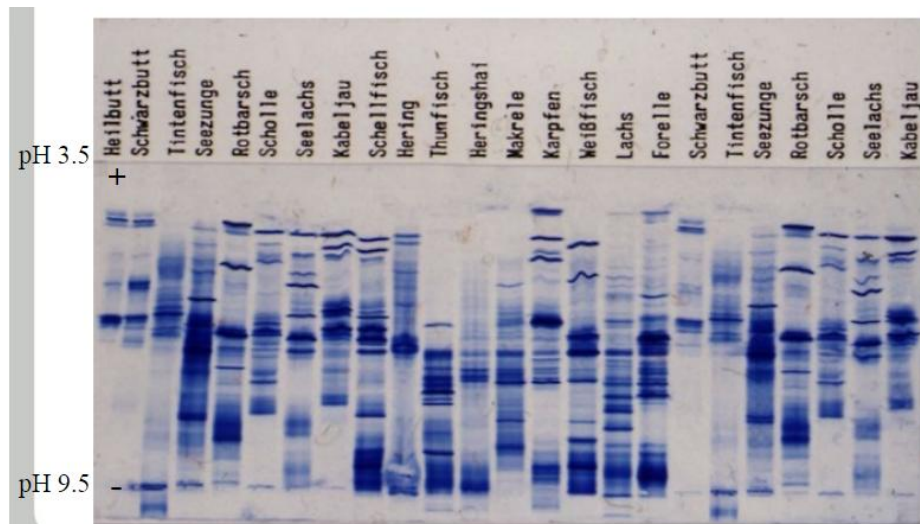
Migration

Les condition de migration
(voltage et temps) sont ajustées
en fonction:

- Du type du trip
- De l'échantillon à séparer



Representation of separation of proteins on a IPG strip

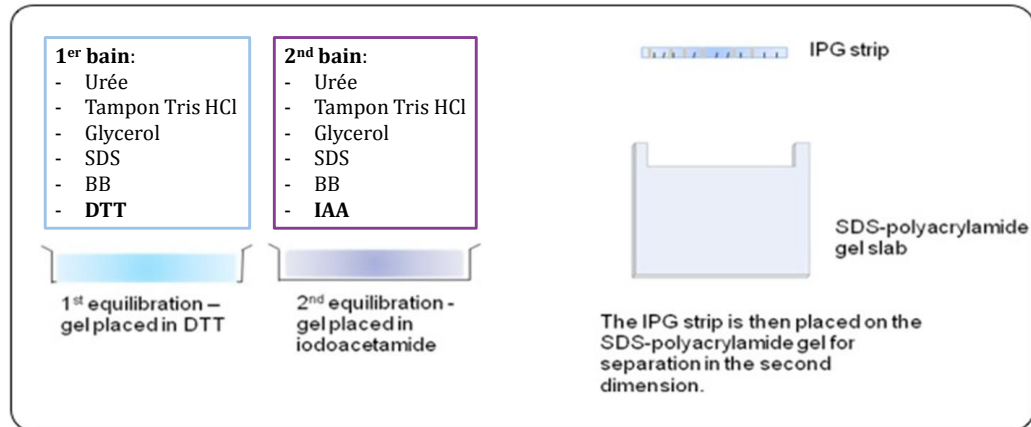


Exemple de profils IEF

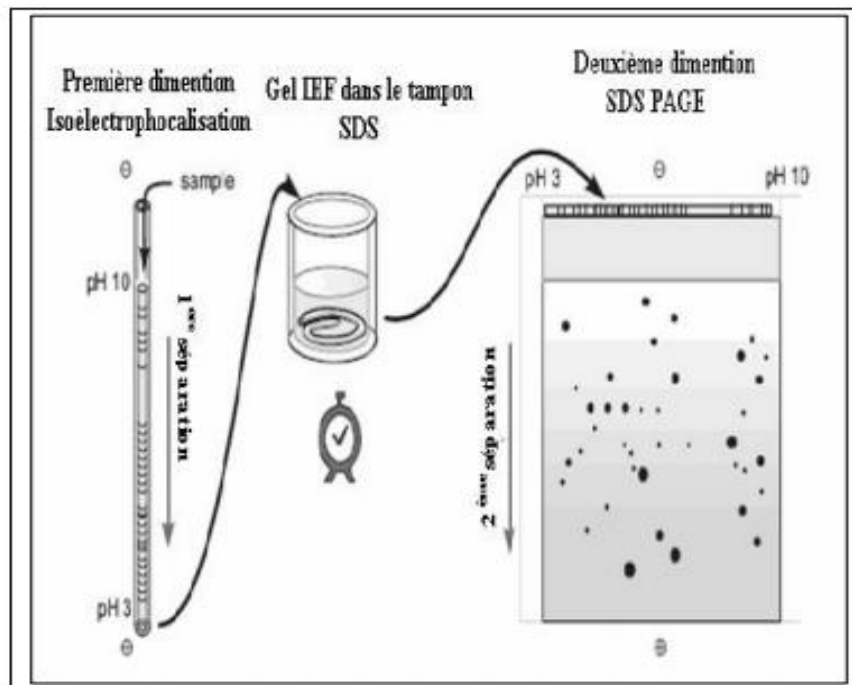
Équilibration des strips

But: - éliminer certains constituants, dont les immobilines, et de charger les protéines de SDS.

- S'assurer de la dénaturation des protéines avant la séparation dans la deuxième dimension (SDS-PAGE) selon le poids moléculaire).



Equilibration of proteins on IPG strips before transfer to second dimension.



2- Electrophorèse bidimensionnelle

Deuxième dimension: séparation selon poids moléculaire (**SDS-PAGE**)

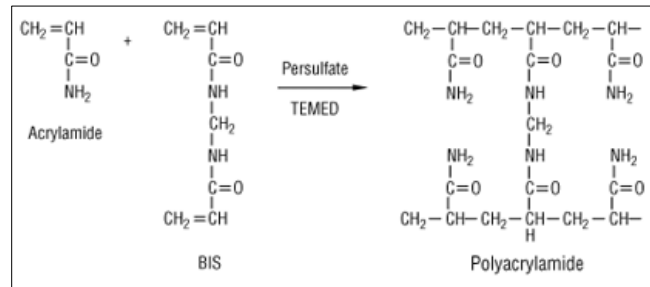
Une séparation selon la masse moléculaire sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (sodium dodécyl sulfate ou SDS) et réductrices (agent réducteur).

- **Le polyacrylamide**

polymère d'**acrylamide** et **bisacrylamide**

- Polymérisation assistée par :

- Persulfate d'ammonium (APS): **catalyseur**
- TEMED: **accélérateur**

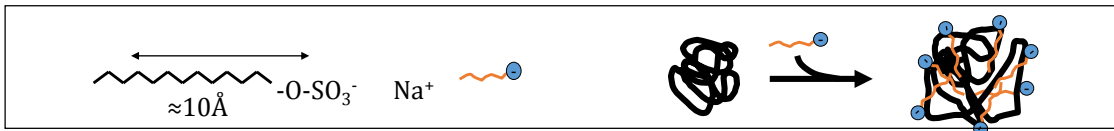


La concentration en polyacrylamide dans le gel varie selon la catégorie de protéines que l'on souhaite séparer (12.5% généralement)

Principe de la SDS-PAGE

La séparation est basé sur deux paramètres :

➤ **un agent dénaturant: SDS**: est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une **charge négative**, proportionnelle à leur taille



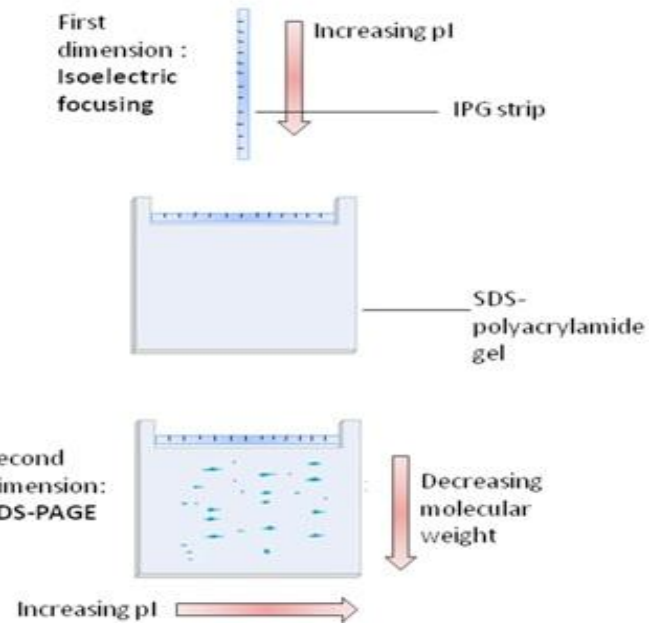
➤ **un agent réducteur**: est aussi ajouté fréquemment (réduction des ponts s-s) comme le *β*-mercaptoéthanol (HS-CH₂-CH₂-OH) ou le DTT (dithiothréitol)



Donc, en PAGE-SDS, la seule variable qui affectera la migration des protéines dans le gel est leur **taille**

2-D Electrophoresis

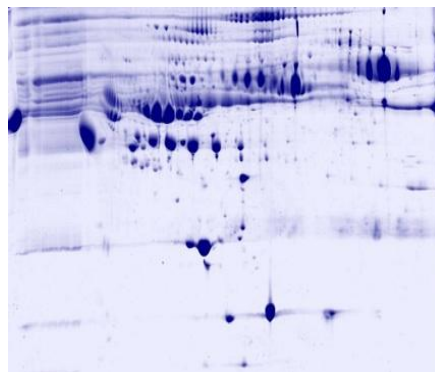
- Après séparation en fonction du **pI** par focalisation isoélectrique, le strip d'IEF est placé sur un gel SDS-PAGE: les protéines seront alors séparées selon leur masse moléculaire;
- Cette méthode très puissante permet d'obtenir une très grande résolution dans la séparation de protéines présentes dans un mélange complexe (carte protéiques: niveaux d'expression, isoformes, modification post traductionnelles.....)



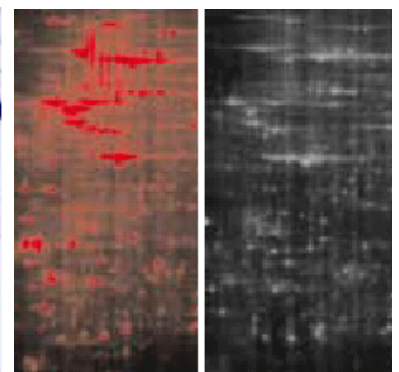
Révélation

Il existe différentes techniques permettant de détecter et quantifier les protéines à partir d'un gel. Coloration des gels pour la révélation des protéines (100 ng à 0,1 ng de protéine par spot):

- **Bleu de coomassie** : 1µg - 100 ng)
- **Bleu colloïdal** : 5 à 10 fois plus sensible
- **Nitrate d'argent** : forte sensibilité
- **Marquage radioactif ou fluorescent**: forte sensibilité (1,5 à 20 ng pour une protéine de 15 à 200 Kda)



Le « **bleu de coomassie** » est le colorant le plus communément utilisé (intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines)



Fluorophore
"Sypro Ruby"

Nitrate d'argent

Quantification sur gel

Pour la quantification sur gel, ces techniques de révélation requièrent alors l'utilisation d'un appareillage performant d'imagerie tel que les **caméras CDD**, les **scanners laser**, les **densitomètres** ou les **fluorimagers**.

Il existe de plus des logiciels d'assistance informatique, pour le traitement des images, mis sur le marché par BioRad (Melanie II, Quest), par Genomic Solutions (Bio Image2D), par Amersham Pharmacia Biotech (Phoretix 2D Full).....

3- Analyse d'image

3- Analyse d'image (quantification sur gel)

Les différences d'expression de protéines, entre deux états différents, peuvent être mesurées en quantifiant le ratio de l'intensité des spots entre deux gel-2D indépendants.

Ceci requiert en général **une assistance informatique**.

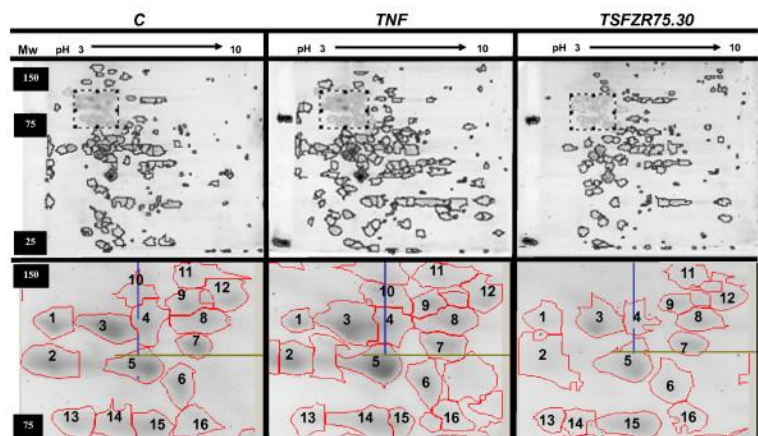
L'analyse des gels par un **logiciel** consiste en (étapes)

- L'acquisition des données
- Diminuer le bruit de fond
- Éliminer des défauts sur les gels,
- Comparer les spot par superposition,
- Effectuer une quantification relative par des mesures d'intensité et de volume des spots
- Études statistiques.

3- Analyse d'image (quantification sur gel)

- Les différences d'expression de protéines, entre deux états différents, peuvent être mesurées en quantifiant le ratio de l'intensité des spots entre deux gel-2D indépendants. Ceci requiert en général **une assistance informatique**.
- Le traitement d'image des gel est réalisée grâce à des logiciels d'analyse d'image des gels qui:

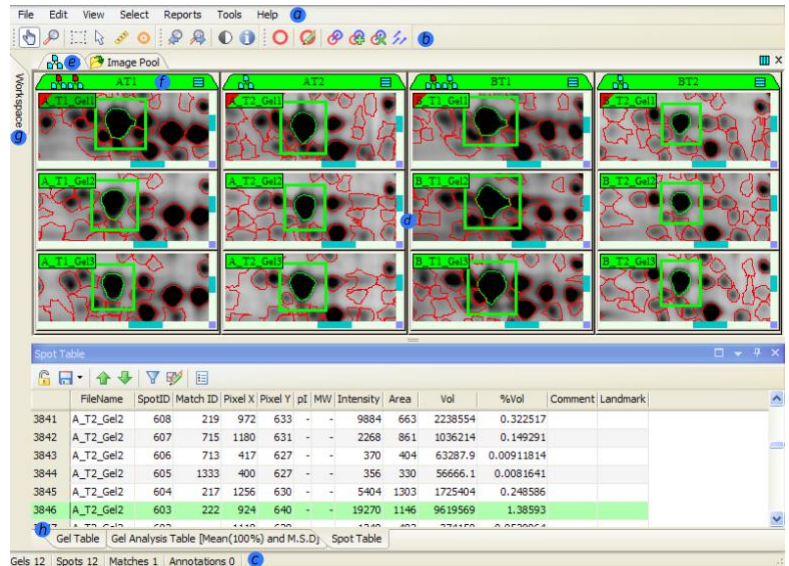
- ✓ Repèrent les spots, les dénombrent et calculent leur coordonnées (PM et pHi) et leur intensité



3- Analyse d'image

Le traitement d'image des gel est réalisée grâce à des logiciels d'analyse d'image des gels qui:

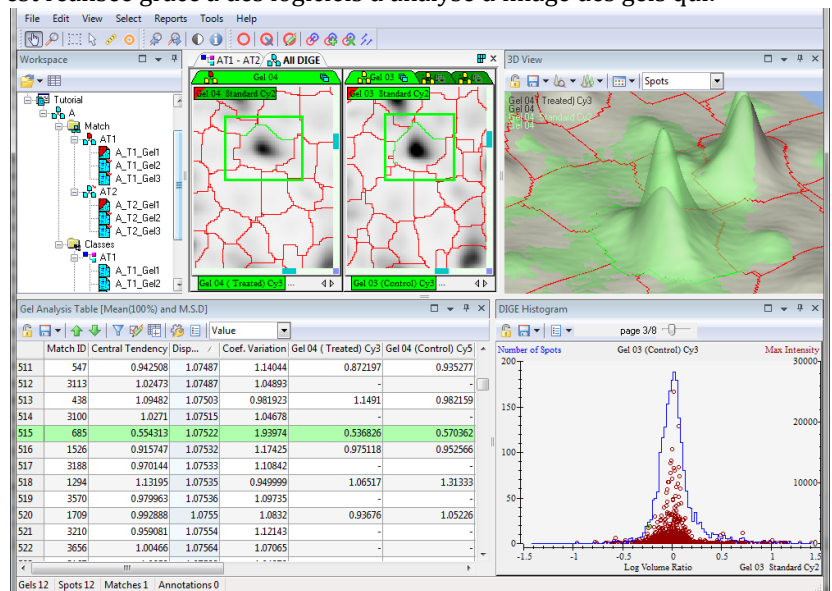
- ✓ Repèrent le ou les spots d'Intérêt
- ✓ Permettent une comparaison **intra** et **inter-gels** des niveaux d'expression des protéines



3- Analyse d'image

Le traitement d'image des gel est réalisée grâce à des logiciels d'analyse d'image des gels qui:

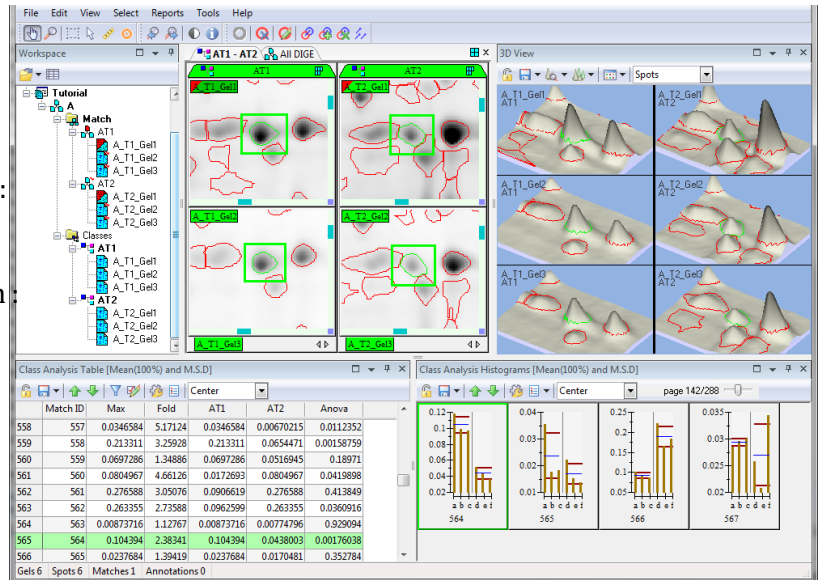
- ✓ Donnent les paramètres statistiques du spot matching (coefficient de variation, déviation standard, valeurs du t-test etc)
- ✓ Visualisent les spots par des représentations graphiques 3D



3- Analyse d'image

Exemple de logiciels et appareillage:

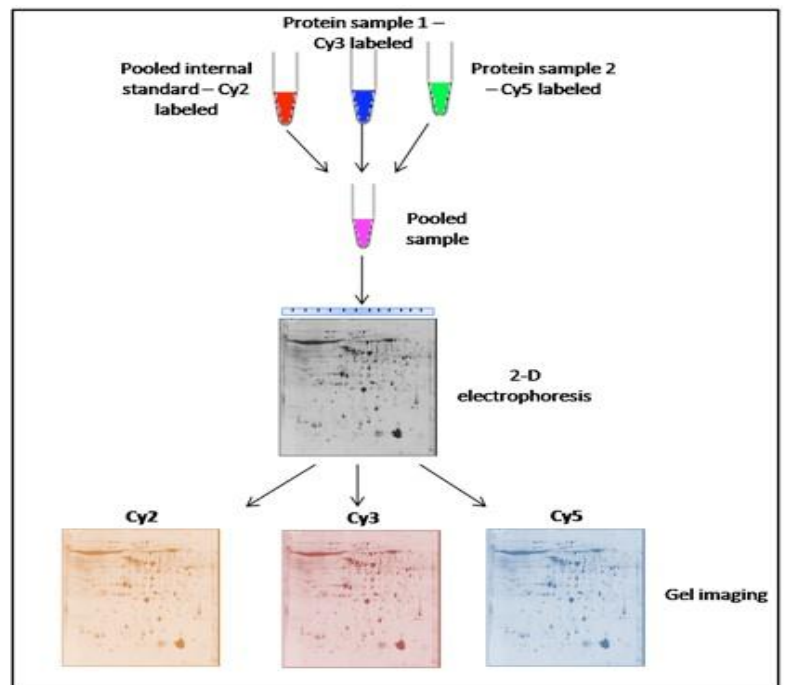
- ❖ Électrophorèse 1ère dimension :
"Protean IEF Cell" (BioRad)
- ❖ Électrophorèse 2ème dimension :
"Ettan DALTsix Large Vertical System" (Amersham Biosciences)
- ❖ Logiciel : "ImageMaster 2D" (Amersham Biosciences)



La méthode 2D-DIGE (Difference Gel Electrophoresis)

Une technique basée sur l'utilisation des marqueurs fluorescents de cyanine, elle permet:

- Une séparation et détection de **plus** de trois mélanges protéiques complexes sur **le même gel 2D**
- Une étude de l'expression relative de protéomes dans différentes conditions avec une haute reproductibilité



Quantification par méthode immunologique

Des techniques basées sur la spécificité de reconnaissance entre un anticorps et sa protéine cible ont été développées pour la protéomique **quantitative**.

Il est possible de quantifier le taux d'expression des protéines d'intérêt par la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Dans la technique appelée **IDAT** (Immuno Detection Amplified by T7 RNA polymerase) un fragment d'ADN double brin contenant le promoteur de la RNA polymérase du phage T7 suivi d'une courte séquence de taille définie est fixé de manière covalente à l'anticorps secondaire. Ainsi, après fixation spécifique de ces anticorps secondaires, la RNA polymérase T7 est ajoutée avec des NTP marqués au ³²P dans le mélange réactionnel. Il y aura alors amplification linéaire des brins d'ADN fixés. La quantité des brins d'ARN marqués synthétisés sera directement proportionnelle à la quantité d'anticorps secondaires et donc à la quantité de protéines présentes.