

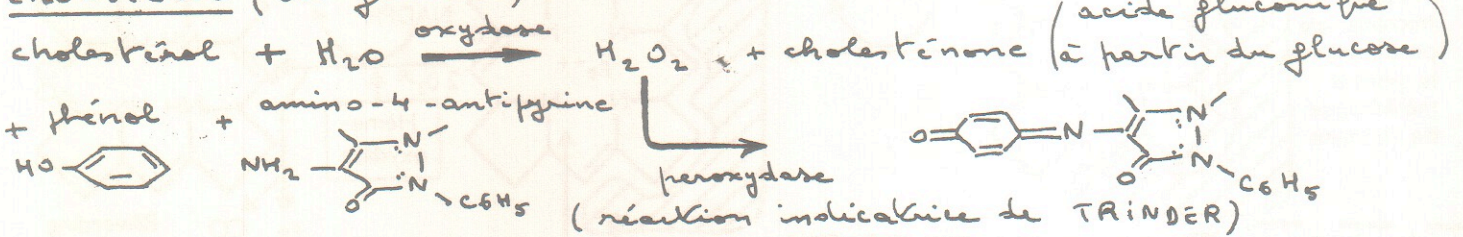
thèmes vus en ED/TP classés par techniques:

- extraction : -par effet de la force ionique (ADN de tissus humains)
- séparations: -par électrophorèse (protéines et lipoprotéines plasmatiques, fragments d'ADN plasmidique bactérien, oligonucléotides d'un séquençage d'ADN).
- par précipitation/centrifugation: ADN génomique humain, VLDL-LDL plasmatiques,
- par dialyse: salicylate de sodium lié/libre
- dosages:
 - par spectrophotométrie:
 - de métabolites (urée et bilirubine plasmatiques par réaction chimique ; cholestérol par réaction enzymatique), d'activité enzymatique (transaminase ALAT plasmatique) -

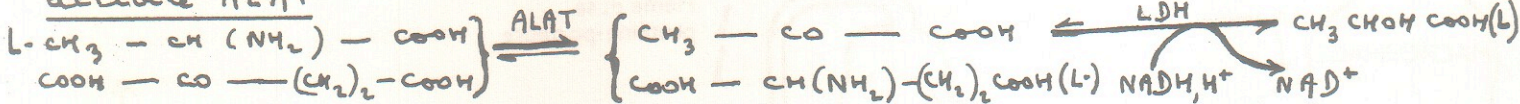
- ED 1 : A-ELECTROPHORESE (séparations par-)
- B-SPECTROPHOTOMETRIE (quantification par-)
- C-ENZYMOLOGIE (analyse quantitative par-)

(B) Réactions chimiques et biochimiques mises en jeu dans les dosages par spectrophotométrie.

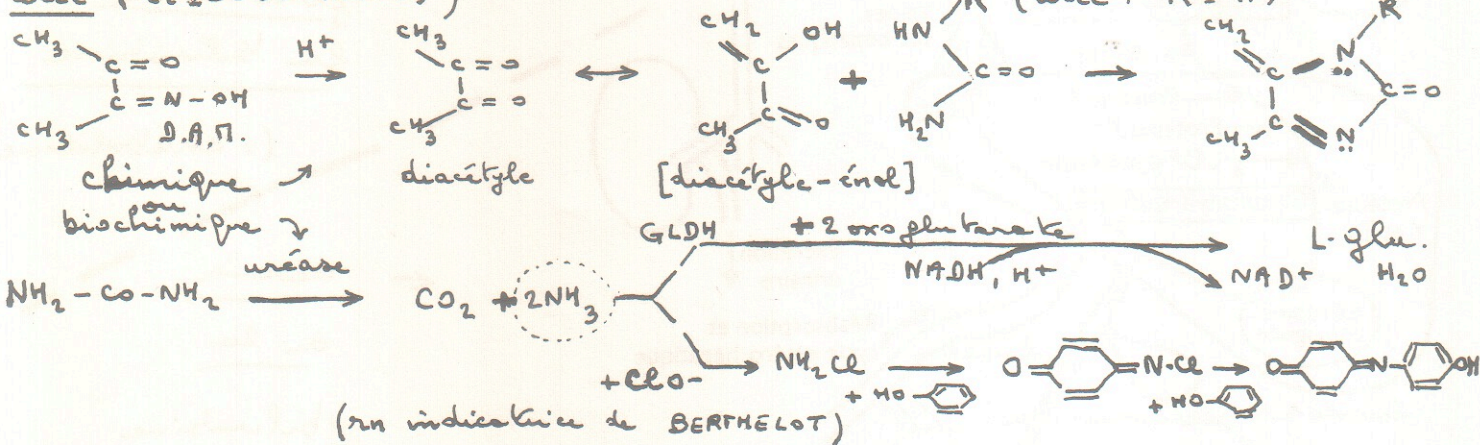
cholestérol (ou glucose):



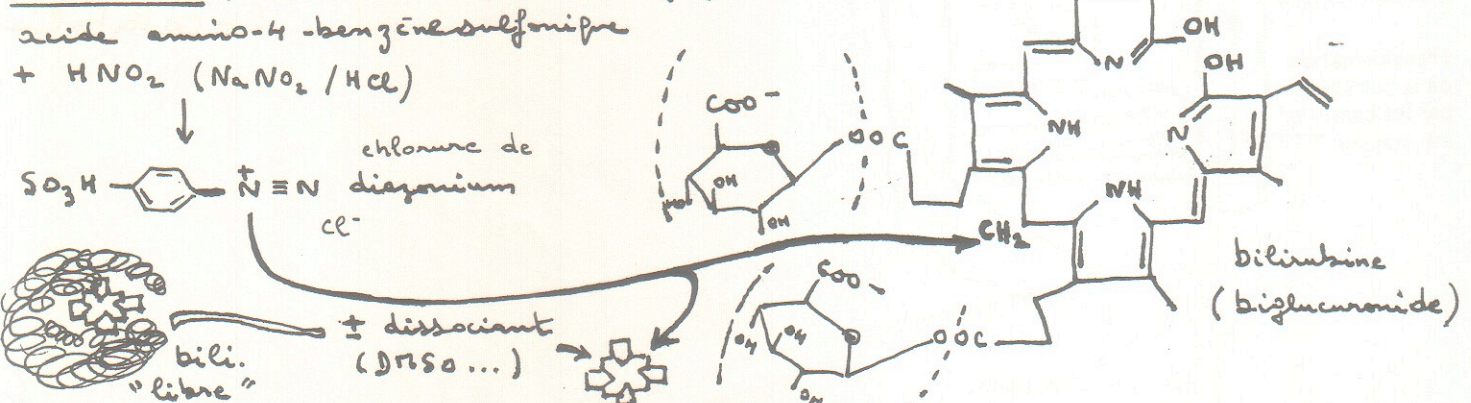
activité ALAT



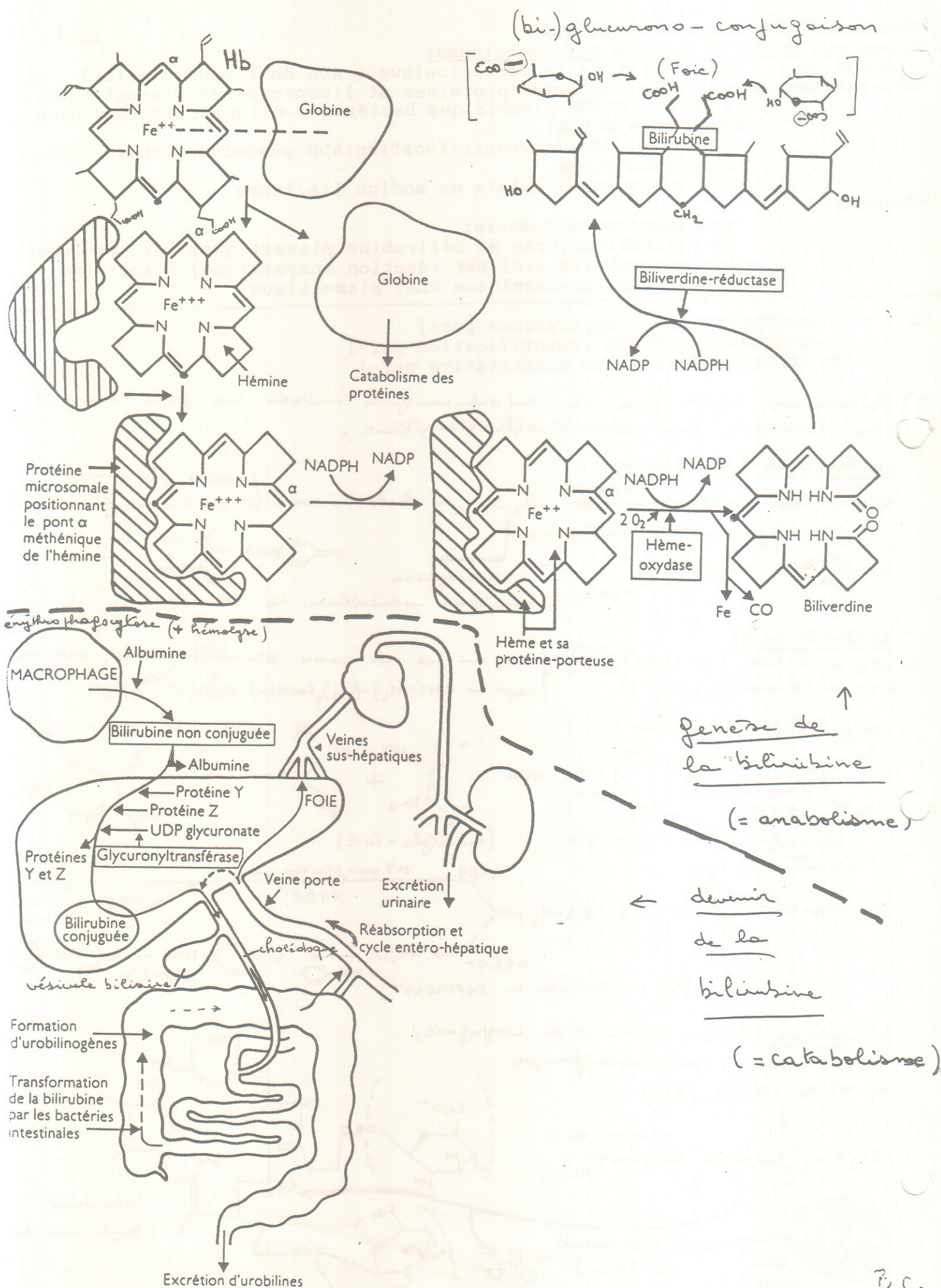
urée (et carbamides)



bilirubine (libre + dissociant, ou conjuguée)

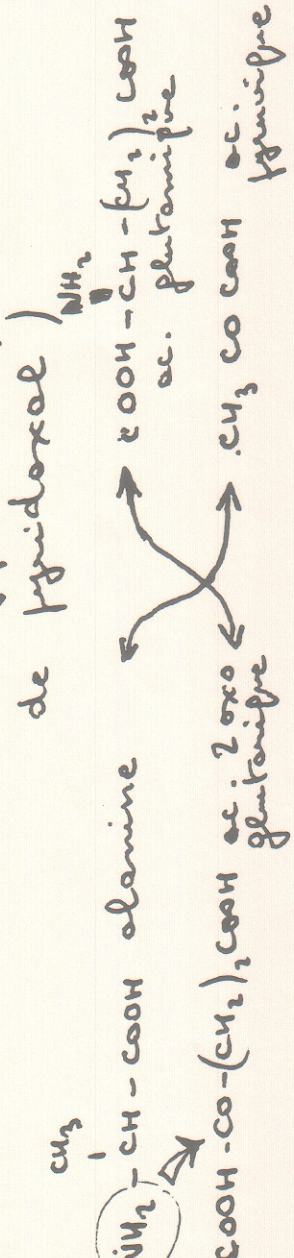


ED) - METABOLISME DE LA BILIRUBINE.

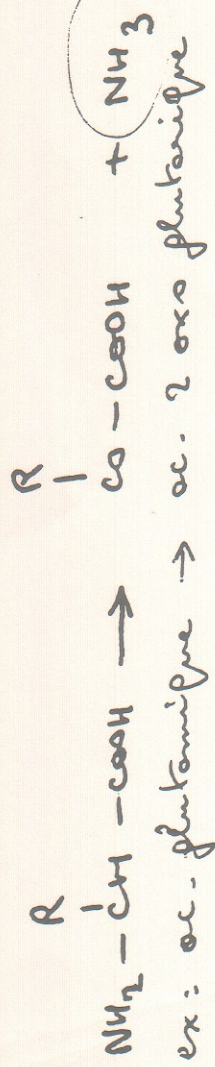


métabolisme des amino-acides

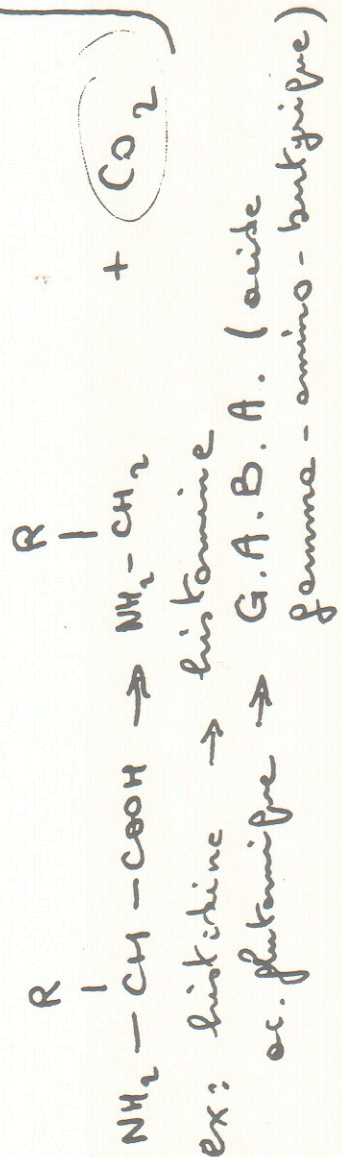
transamination (coenzyme = phosphate de pyridoxal)



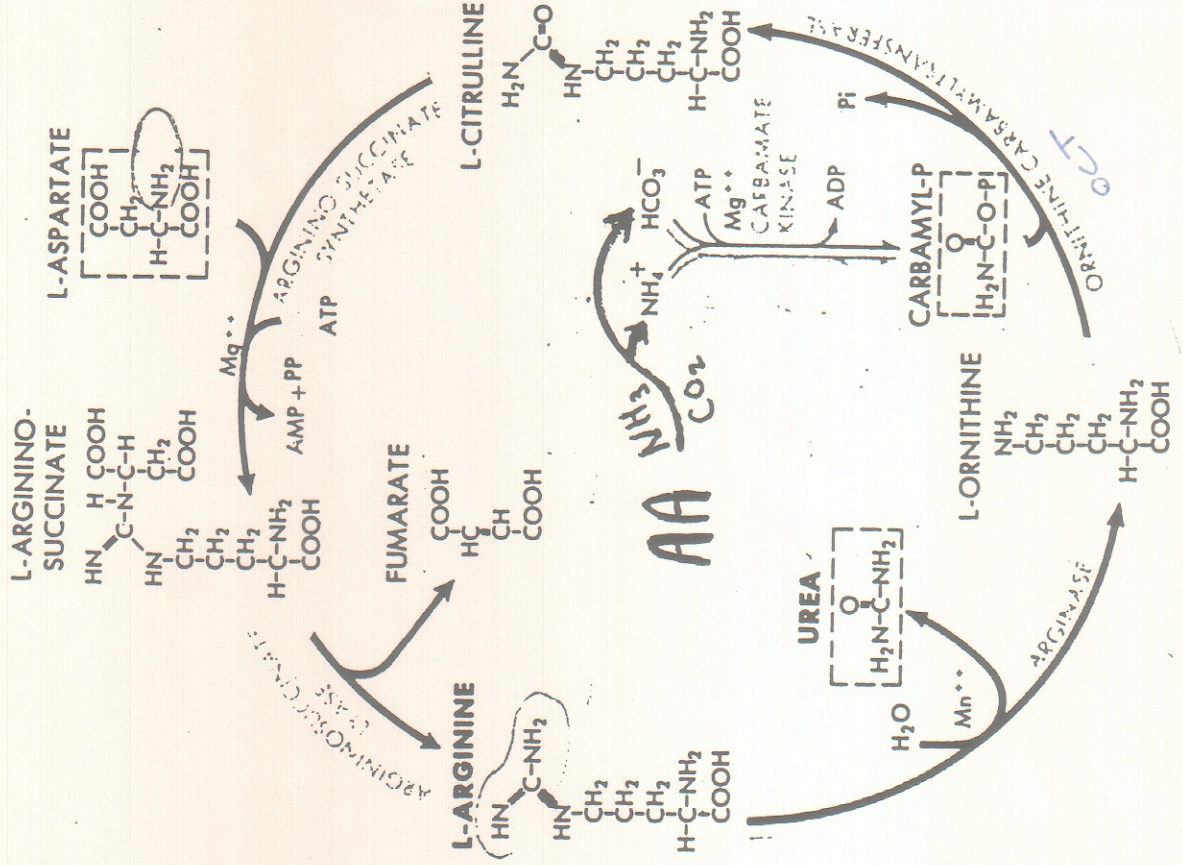
• désamination



• décarboxylation



cycle de l'urée



électrophorèse : séparation des molécules chargées de un champ électrique. si $pH > pI_i \rightarrow$ + ou - anionique, selon ΔpH , usage pH alcalin de 8,5 à 9.

supports :

- acétate de cellulose (≠ nitro cellulose du Blot). aspect papier.
- gel d'agarose, a dissolution à chaud de poudre blanche d'agar agar \rightarrow solidification réversible, faire fondre pour réutiliser.
- gel de polyacrylamide : polymérisation chimique, selon conc, maillage + ou - xeré $CH_2=CH-CO-NH_2$

\rightarrow prot : digest sur acétate de Φ , migration de - vers + on parle de globulines, de albumine.

\rightarrow lipoprot : sur gel d'agarose, séparation selon charge. avec colorant lipophile ou opalescent LDL VLDL HDL

\rightarrow lipoprot : sur gel de polyacrylamide, séparation selon taille les LDL vont plus vite que VLDL.

\rightarrow ADN : gel d'agarose, le gel est épais \rightarrow digest de un nuit la distance n'est pas proportionnel au nb de bases du DNA

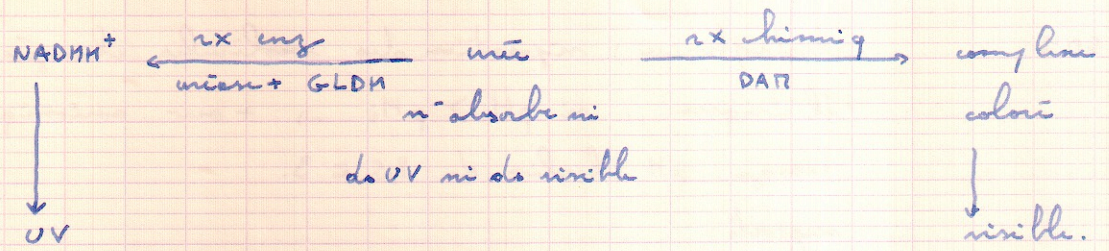
\rightarrow ADN : gel de polyacrylamide, la distance est fonction proportionnelle à taille / nb bases.

agarose \rightarrow fragments de restriction

PAA \rightarrow séquençage.

spectrophotométrie

ici quantification. autres méth : gravimétrie, titration, nephélométrie, HPLC, CPG, EIA, ELISA, RIA; colorimétrie et spectrophotométrie et simples, automatisable, peu cher, réversible.



2 stratégies : étalonnage ou absorbance

C	C _E	C _D
A	A _E	A _D

$$C = \frac{1}{E} A$$

$$C_D = C_E \cdot \frac{A_D}{A_E}$$

Bili : tonique au niv central, coloration des ictères.
prot du transport = Alb.

∫ une li glucuronos conjugaison au bili → hydrosoluble et moins tonique.

sg : Bili libre cad non conjugué → faire de hépatocyte + 2 ac glucuroniques.

↓
bili conjugués coexistent de bili.

dosage bili : apprécier la santé de l'hépatocyte.

si grosse ∫ → reflux par conaux banchés → ictère à bili conjugué

si libre → ictère à bili libre

cholestase : → au arrêt de l'écoulement de la bili dt les éléments refluent de sg.

dosage : non violacé

pour bili conjugué : la diazotation est directe, facile à faire & plasma.

pour bili libre : ne réagit pas, me réagit de l'Alb pour DMSO.

urée :

la faire condenser NH_4^+ et HCO_3^- en urée. de la mito-C.

cycle de l'urée = ornithine, OCT = enzyme du syst.

si peu d'urée de plasma \rightarrow la condensation ne fait mal.

\hookrightarrow insuffisance hépatique.

si trop d'urée de plasma \rightarrow insuffisance rénale en gros concret.

but : exploration fonctionnelle hépatobiliaire.

titre

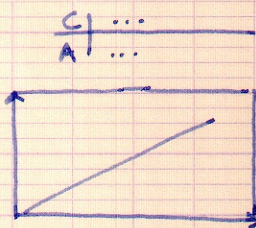
dosage de _____

date

but : pourquoi ?

principe : comment ? \rightarrow cours

manus ou résultats expérimentaux



graphes à coller avec scotch
étiqués si \oplus cours.

résultat : 3 millimol/l

+ cf échantillon.

conclusion, si patho ...



Ne rien écrire ici

Nom :

Prénoms :

(en caractères d'imprimerie)

Epreuve de BIOCHIMIE 3ème Année - Question ED-TP

Ne rien écrire ici

Epreuve de Biochimie métabolique et appliquée - 3ème année
Question portant sur ED/TP

On sait depuis longtemps que des hyperammoniémies entraînant des symptômes neurologiques graves ont pour origine un déficit héréditaire en ornithine-carbamyl-transférase (O.C.T.) lié au chromosome X. Un diagnostic prénatal peut être fait soit par recherche d'une mutation sur l'ADN, soit par mesure de l'activité OCT à partir de biopsie réalisée in utero.

1. On rappelle que l'OCT (EC 2.1.33) permet la transformation de la L-Ornithine $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$, en un uréide, la L-Citrulline. Ecrire la réaction catalysée par l'OCT .

Note

Signature du correcteur :

2. Dans quel système ou voie métabolique intervient cette réaction ?

3. Dans quel type de cellules ou d'organe trouve-t-on la plus forte activité OCT ?

Suite au verso

4. La L-Citrulline réagit, à chaud en milieu acide, avec la diacétylmonoxime (DAM) pour former un produit de condensation de couleur rose.

Ecrire la structure du dérivé coloré obtenu.

5. On veut mesurer l'activité OCT tissulaire, en utilisant la réaction à la DAM pour doser la citrulline.

Décrire les différents éléments qui doivent entrer dans la composition :

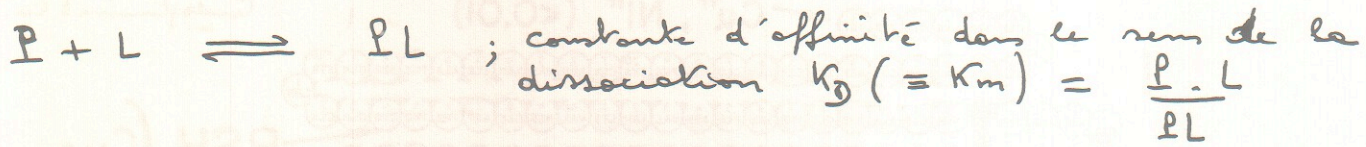
- du milieu d'incubation

- du réactif utilisé pour le dosage de la citrulline.

Quelle précaution faut-il prendre pour supprimer une interférence possible lors de l'utilisation du réactif à la DAM ?

ED2 - Manipulation VI : Affinité d'une protéine P (albumine) pour un médicament ou ligand L (salicylate)

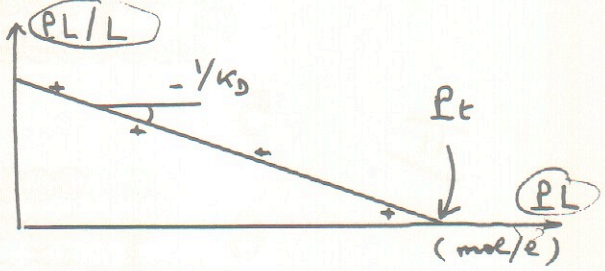
- Etablissement de la fonction de SCATCHARD



(P_t = nb de sites potentiels totaux pour ce ligand
 = PL sites de la protéine liée + P sites de la protéine libre
 donc $P = P_t - PL$)

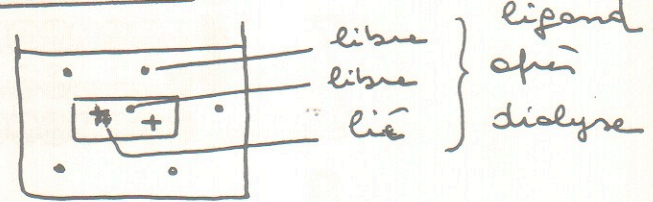
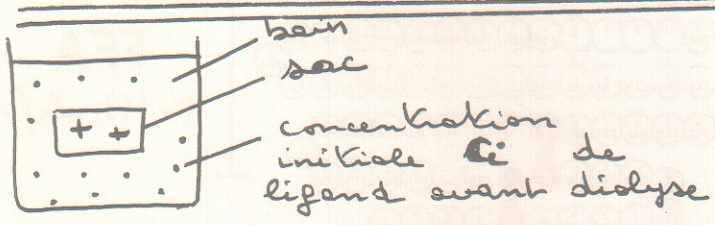
$K_D = \frac{(P_t - PL) \cdot L}{PL} \Rightarrow K_D \cdot PL = (P_t - PL) \cdot L$

$\frac{PL}{L} = \frac{P_t - PL}{K_D} = -\frac{1}{K_D} \cdot PL + \frac{P_t}{K_D}$ (droite de SCATCHARD)



sur 4 conc.

- Calcul de la concentration de ligand lié PL :



q_i (quantité de médicament) initiale = q_f (quantité de médicament finale répartie dans les 2 compartiments).

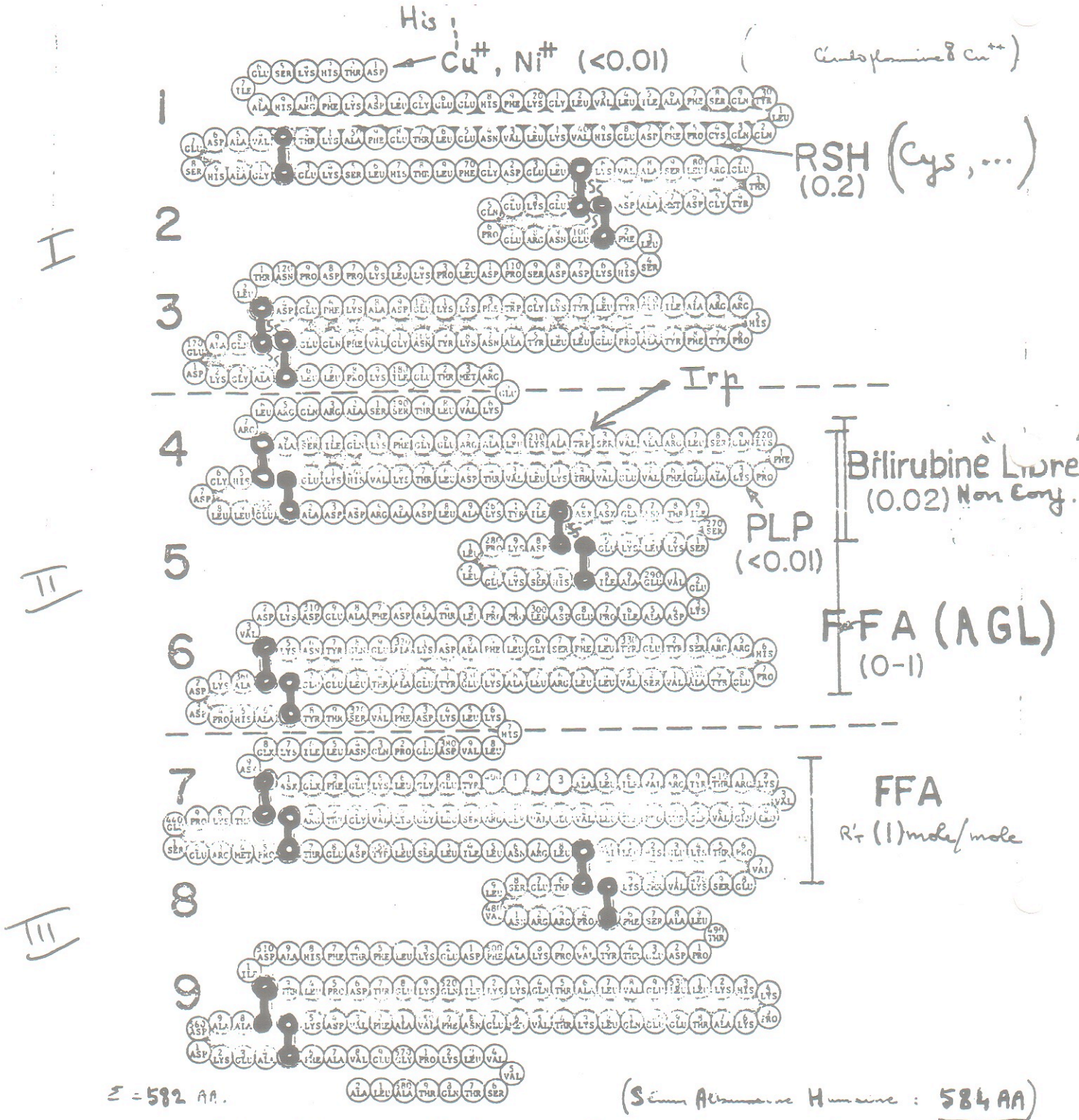
$C_i \times V_{bain} = C_{libre} \cdot V_{sac} + C_{liée} \cdot V_{sac} + C_{libre} \cdot V_{bain}$

$\Rightarrow PL = C_{liée} = \frac{C_i \cdot V_{bain} - C_{libre} (V_{sac} + V_b)}{V_{sac}}$

$\frac{V_{bain}}{V_{sac}} = 10$

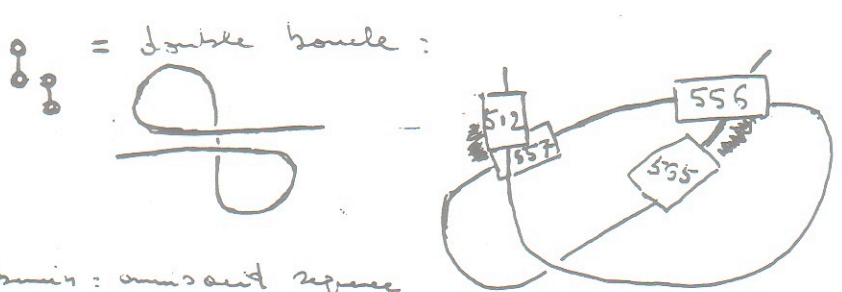
$PL = 10 \cdot C_i - 11 \cdot L_{libre}$
 (ligand lié) (L étant la conc de ligand libre m le bain après dialy)

Structure de la sérum albumine



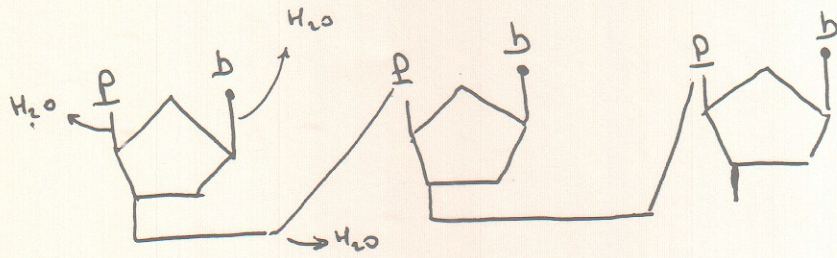
Amino acid sequence of bovine serum albumin, as determined by Brown. Cysteine residues forming disulfide bonds are shown as dark circles. Numerals indicate the resulting double loops. The three domains are indicated by dashed lines. Binding sites or locales for certain ligands are shown; the numbers in parentheses are the relative loading (\bar{v} , mole/mole) under normal conditions in the blood.

AGL: Acides Gras
"Libres"
PLP: Pyridoxal
Phosphate



ED 2 - Manipulation IV : estimation du degré de pureté d'une solution d'ADN par dosage du désoxyribose -

ADN :



dosage du désoxyribose : absorbance visible (diphénylamine)
 de l'ADN : - UV (250 nm)

établissement du rapport expérimental $R = \frac{\text{mg désoxyribose} / \ell}{\text{mg ADN} / \ell}$

établissement du rapport idéal (ou attendu) $R' = \frac{\text{masse mol. d. ribose}}{\text{m. m. d'1 nucléotide moyen enchainé}}$

calcul de la masse molaire d'un nucléotide moyen :

ππ. désoxyribose		134
ππ. acide phosphorique		98
ππ. d'une base "moyenne" compte tenu de la fréquence numérique de chaque base A ≈ 30% etc.	$\left\{ \begin{array}{l} A : 135 \times 0,30 \\ G : 151 \times 0,20 \\ C : 111 \times 0,20 \\ T : 126 \times 0,30 \end{array} \right.$	40
		30
		22
		38

- 3 molécules d'eau éliminées pour les associations -54
310

d'où $R' = \frac{\text{désoxyribose}}{\text{ADN}} = \frac{134}{310} \approx 0,43 = 43\%$

détermination du degré de pureté

$\frac{R}{R'}$

b	C
d.r.	O
43%	N
	T
	A
	T
	N
P	A
	N
	T

" ADN "

ex : - concentration déterminée par l'étudiant de 1500 mg de désoxyribose par litre.
 - concentration déterminée en UV de 7500 mg d'ADN par litre
 $\Rightarrow R \text{ expérimental} = 0,20 \text{ (ou } 20\%)$
 $\Rightarrow \text{degré de pureté} = \frac{0,20}{0,43} = 0,465 \text{ (ou } 46,5\%)$

ED 2.

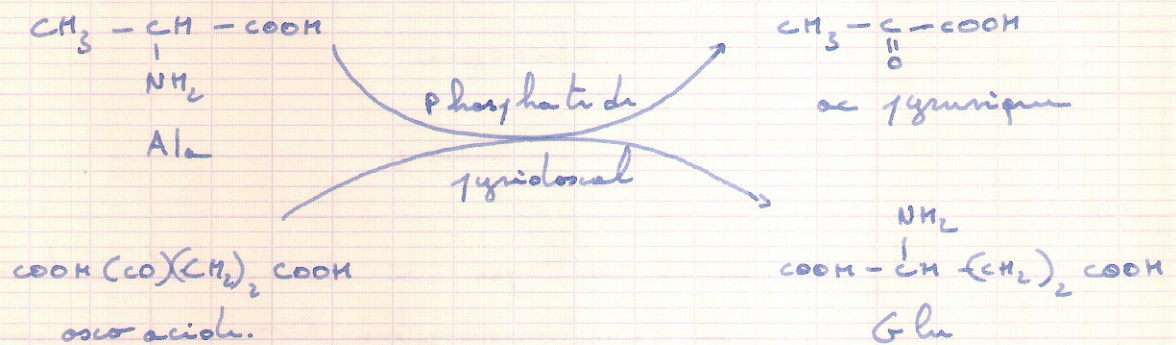
enz: affinité + capacité.
↓
quantitatif → qualitatif.

incubation enz = rx enz - substrat de tampon (pH)
+ 0°C 37°C + Coenz.

pour ALAT: rajout substrat coenzyme.

pour S: cholestérol: rajout enz coenzyme.
de la 2 cas: dosage P.

ALAT: S = Ala AT = enz amino-transfère.
utilise 2 substrats.



localisation: foie, muscle. (≠ fabriquant prot).

but: détorsion ammoniacale

ajustement % ≠ AA.

≠ très riches en trans A. myo + hépatocyte.

↳ cytolys: diversément des enz de reg.

exprimer en capacité de travail: hépat

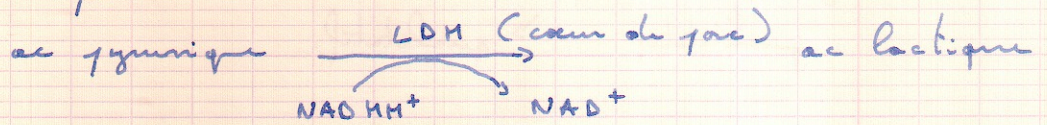
étude cinétique: même P ou S.

ou s'arrange avoir cinétique 0 → excès de S.

transfère par une autre enz avec Coenz.

(conclusion 0 chimique → olivine coloré.

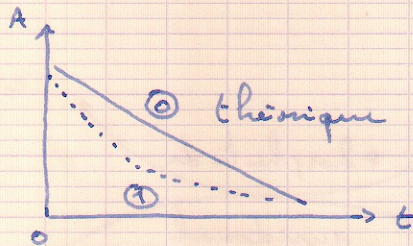
principe:



1^{er} temps: 1^{er}S + plasma + Coenz + LDH + NADH⁺
mouiné de bain pour avoir 37°C.

SFBC (30°C) société française de biologie
après, ajout 2^{es}S: la trans A connue.
min de spectro. même A.

absorbance \rightarrow dipert: afficher valeur 0,5 (ou 1)
même amplitude de ΔA Hcs les min.



on ne sait pas si [S] n'est saturante. \rightarrow vite valeur 1
me faire même un temps très court. + on prolonge
+ c'est faux.

la meilleure valeur est faite la (1^{er}) min.

$$A = \epsilon c \quad c = \frac{A}{\epsilon} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{\epsilon}$$

$$\text{activité} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \underbrace{1305}_{\substack{\text{fact} \\ \text{dilu.}}} + \epsilon$$

$$= \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{d}$$

conseil: estimer ΔA attendue en 1 min si

$$c = 2001/l \quad c = 300 \text{ nkatol/l}$$

Q Alat sanguine due au bruit de fond
 $C_n = 20 \text{ UI/l.}$

Changement d'unités $\text{UI} \leftrightarrow \text{katel.}$

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol/min}$$

$$\text{" / l} \quad \quad \quad \text{" / l}$$

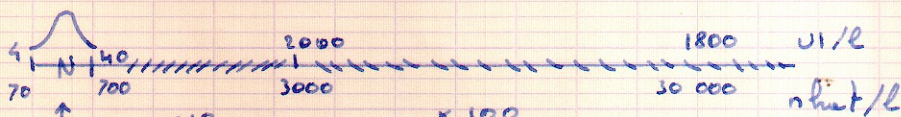
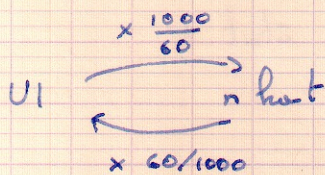
$$1 \text{ katel} = 1 \text{ mol/s} = 10^6 \mu\text{mol} \times 60 / 60\text{s}$$

$$= 10^6 \cdot 60 \mu\text{mol/min.}$$

$$1 \text{ kat} = 60 \cdot 10^6 \text{ UI}$$

$$1 \text{ nkat} = 60 \cdot 10^6 \cdot 10^{-9} \text{ UI}$$

$$1 \text{ nkat} = \frac{60}{1000} \text{ UI}$$



muscle : myopathie | infarctus myocardique.
 foie : cirrhose | hépatite
 chronique \leftrightarrow aiguë

signe biologique : même. lid.

syndrome : associa \emptyset signe clinique + lid

myopathie \rightarrow Duchenne, Becker.

ALAT = TGP ou TPG ou SGPT
transférase glutamique pyruvique.

ASAT = ac aspartique
TGO ou SGOT ou GOT
transférase glutamique oxalo fumarique.
ou oxalo aspartique.

en micro φ.

selon cœur, muscle, foie, → valeurs cytolyses φ.

selon type d'organe :

nb : PAL, S'NU, γ GT = γ glutamyl transférase.

cytoP : ALAT, LDH, ASAT, CK

mitoC : ASAT, OCT, CK

lysosomes : PAC. microsomes : γ GT.

dosage différentiel → état φ

cholestérol: même de plasma.

voient une coenzyme: cholestérol oxydase. avec production H_2O_2 qui est facile à détox.

par une coenzyme = peroxydase. libère O_2 qui oxyde la chromogène.

phénol + amino 4-antipyrine \rightarrow quinoneimine rose

même de substrat: \rightarrow pas de O_2 .

pour plasma très riches de 3 à 10 min pour incubation à $37^\circ C$ ambiante.

intérêt: % cholestérol transporté par tel ou telle protéine

\hookrightarrow LDL, VLDL, HDL
"mauvais" "bon"

précipitation des (V)LDL, dosage

\hookrightarrow $\frac{\text{Cholestérol T}}{\text{HDL}}$ si rapport fort: risque / $N \leq 5$
" faible: bon / 3 \rightarrow 12.

enz de domaine qualitatif.

pour marquage en repimage.

on: mise en évidence mutation avec sonde.

enz: PAL, peroxydase.

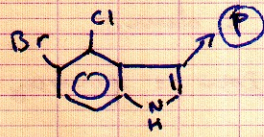
soit aglycose, ou incorpore θ (Niche translation).

en bout chaîne

\hookrightarrow sulfone θ ou oxydase
 \hookrightarrow histone, qui sera neutralisé par Ac marqué à PAL ou peroxydase.

pan PAL S = BCIP

bramo chloro indo phosponylo.



gd pte P, derivat ben.

pan promyden: oxyde \ominus par H_2O_2 , + Produkt chromogin.

protéine ligand \rightarrow \approx généraliser.

Σ des sites potentiels peuvent accepter ligands : P_t

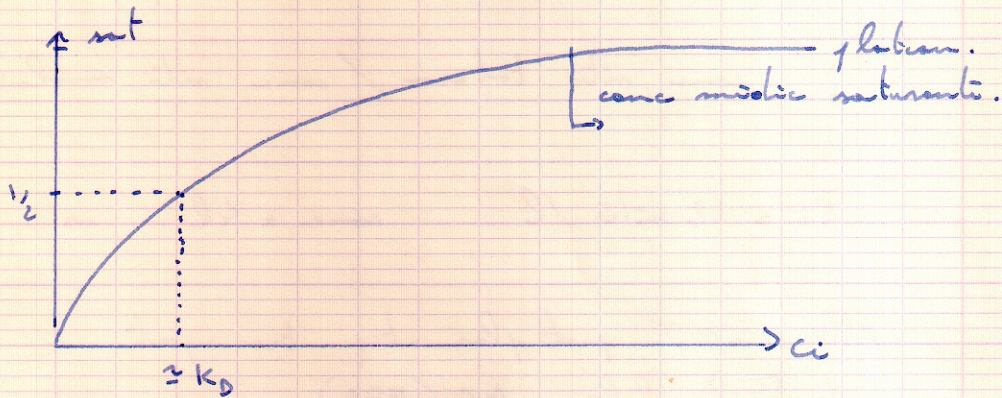
Σ sites liés P_L .

donc $P_{\text{libre}} = P_t - P_L$

$$P_L \cdot K_D = (P_t - P_L) \cdot L$$

$$\frac{P_L}{L} = \frac{P_t - P_L}{K_D} = -\frac{1}{K_D} \cdot P_L + \frac{P_t}{K_D}$$

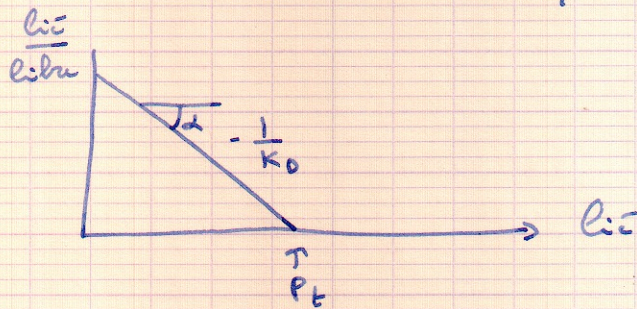
on a : q conc \neq , dialyse déjà faite.



+ K_m grand, + affinité petite.

faire exponentielle \rightarrow on pas tricher prendre q_t .

lors linéarisation \rightarrow prendre les q_t on expo seulement.



capacité de transport du sodium lacté
par la sérum alb. exprimée en mm.
plasma : 40g / l Alb.

apprécier affinité. une comparaison.

$$AgAc : K_D = 10^{-15} \text{ M.}$$

$$\text{avidine histine} = K_D = 10^{-15} \text{ M}$$

↳ prot. du blanc d'œuf.

$$\text{duplex DNA (cande pour cible)} K_D = 10^{-20} \text{ M.}$$

en mm moléculaire : nb site fixation ?

$$= \frac{\text{conc site totaux}}{\text{conc site moléculaire}}$$

$$Pt = 12 \text{ sites / l} \quad \text{conc} = 4 \text{ l.} \rightarrow 3 \text{ sites.}$$

Alb : 60% prot. plasmatiq. transport
↳ Bili libre, AG (FFA)

test quantitatif DNA.

- absorbance $\approx 260 - 280$.

- mesure difficile (280 \rightarrow prot) \rightarrow estimation.

- hydrolyse base, si Uracile \rightarrow contamination par ARN.
on ne fait que dosage de ribose.

de ribose + di-phénylamine \rightarrow bleu.

rapport ~~avec~~ DNA \approx de ribose. \rightarrow nucléotides libres.
moyen.

après calcul 43% de ribose

rapport pondéral expérimental : d_{r}/DNA

plus le rapport est proche de 43%, plus il est pur
si rapport faible : \exists contamination protéiques.

fact :

$$\frac{R_{\text{expérimental}}}{R_{\text{attendu}}} = \frac{X}{0,43} = \text{degré de pureté.}$$

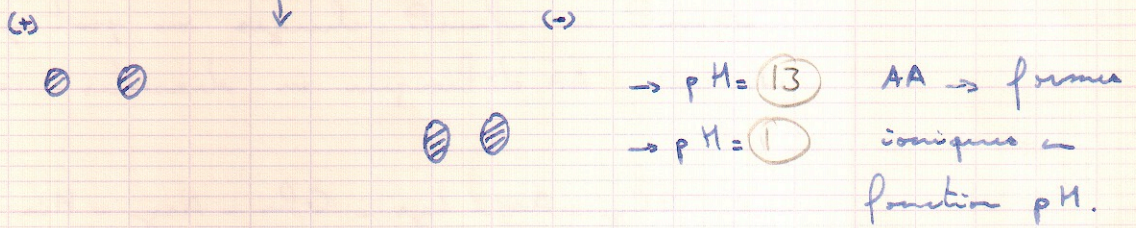
meth etude ppts.

electrophoresis.

use: - valine electrophoresis at $pH=1$ $pH=13$.

- dipeptides: Gly - Arg a)
 Gly - Glu b)
 Gly - Glu - Arg c)

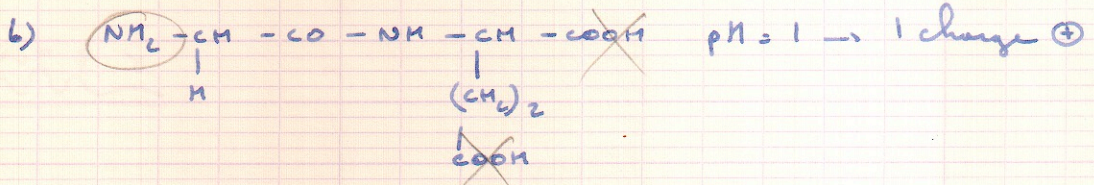
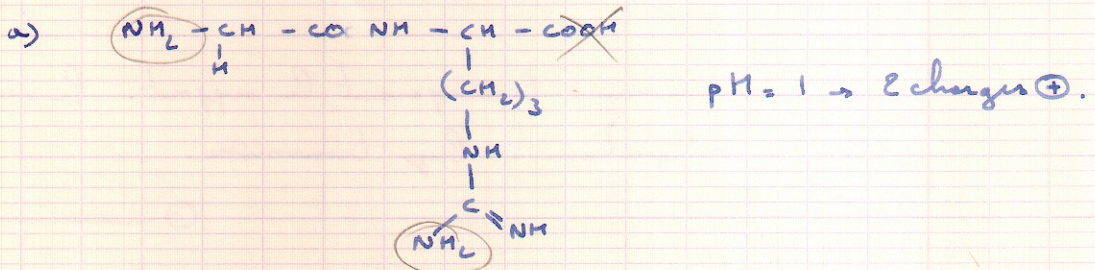
visualization per ninhydrine. → col bleu.
 dipole

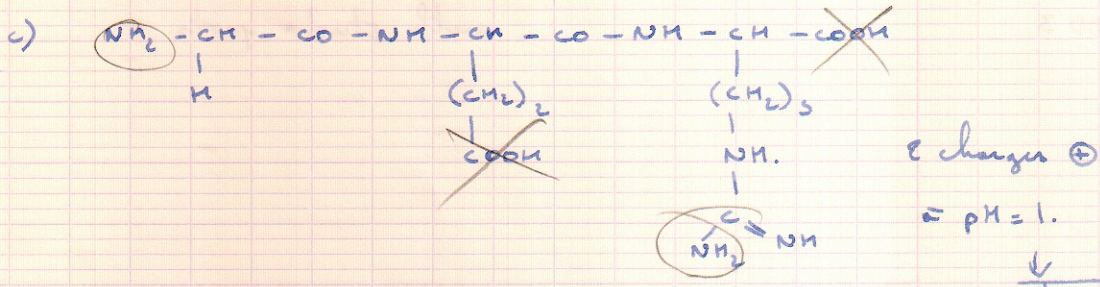


à quelle fois $pH=1$, $pH=13$.

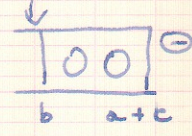
explique pourquoi on ne voit que 2 tâches au lieu de 3.

- basique Arg
- acide Glu
- les 2 Arg + Glu.

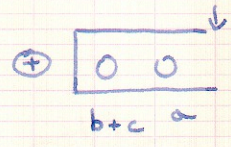




séparation en fonction charge (sur papier).
 sur ce support : la taille n'influe pas.



- $\approx \text{pH} = 13$
- a) \rightarrow 1 charge \ominus
 - b) \rightarrow 2 charges \ominus
 - c) \rightarrow 2 charges \ominus

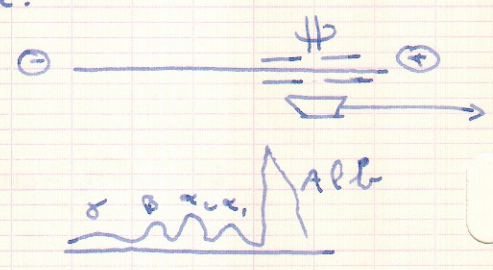


sur \ominus = face \ominus charges sur prot, pH de la milieu.
 du nb AA di basique ou diacides constitutifs.

ex: Gly - Arg - Lys - Glu - Arg - His - Ala.

TP : $\text{pH} = 8,6$, électrof prot, sur acétate Φ , range Ponceau.
 sur trace of poly TP.
 autre support : gel d'agarose. (peu conc \rightarrow pas de terminage. pas de séparation en fonction masse/mol.
 le colorant utilisé ici = noir Amido-Schwartz.

la bande transparente le support. le milieu de migration : Lys transamin.



agrose - utilisé car + cher.

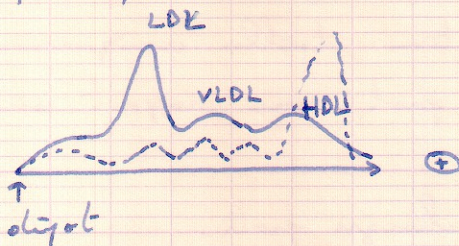
lipidogramme.

pas facile à utiliser sur support simple
 ↳ coloration difficile.

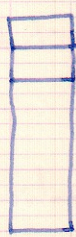
idem électroφ sauf φ col: lipophile → noir sandoz.

+ électroφ important serum car col ⊖ évidente.

principe est le même.



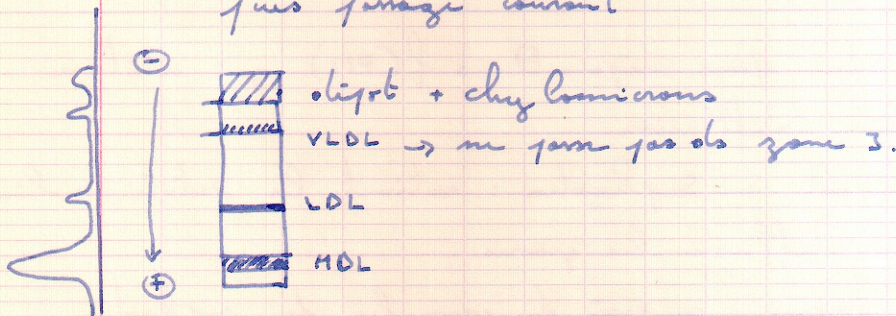
autres supports: gel de polyacrylamide à gradient de densité
 tube en verre



zone 1 → ESph de serum + colorant (noir sandoz).
 ↳ + acryl amide + méthylène bis acrylamide
 + catalyseur + stabilisateurs
 ↳ photopolymérisation (1/2 h).
 $c_1 < c_2 < c_3$

de hauts bas, de + en + cher
 restant à un φ de séparation → effet mann.

plus passage courant



↳ VLDL (qui β) migrent ⊖ que les LDL (β)

↳ = taille moléculaire, ne peuvent migrer de zone 3

autre: gels avec gradients.

lipidogramme : a \ominus et int \ominus t.

int \ominus t : pour donner les hypolipidémies.

si prot de a $\hat{=}$ répartition \rightarrow répara \ominus + fine.

analyse par H $_2$.

\Rightarrow biob.

tracé de recherche biob.

un SDS page = Poly Acrylamide Gel Electrophoresis.

répartition $\hat{=}$ fonction taille uniquement.

SDS se fixe sur prot avec rapport constante entre
m \ominus m.

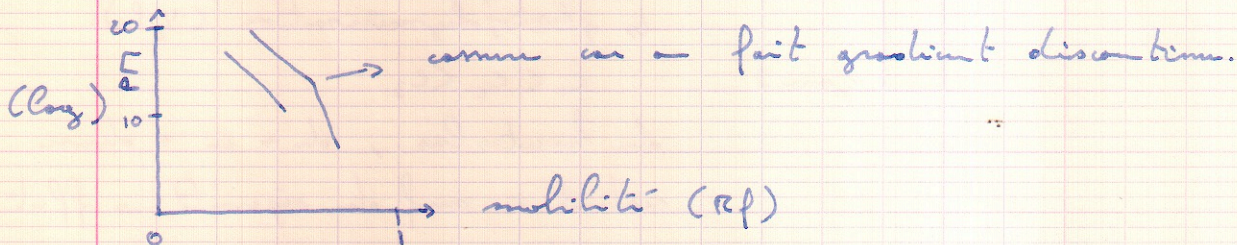
ls masquage des charges prot.

ls répara \ominus $\hat{=}$ fonction pI. pas des charges.

\rightarrow détermine \ominus pI de prot.

prot de m \ominus m connu \rightarrow courbe étalonnage

+ 1 prot de pI inconnu.



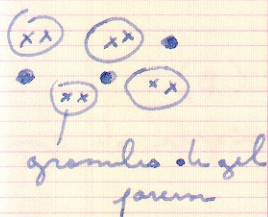
entre les pour répara \ominus = f(pI) qui utilise
exclusion-diffusion.

au départ : Sephadex : retient les petite molécules
laisse diffuser les grosses.

gel poreux composé de granules de sephadex.

les petites prot st incluses de gel, qui est de un
gel volumineux. les grosses de disperant de volume
mort \rightarrow exclues.

autres intermédiaires : prot moy, partiellement incluses



séphadex = polyamide lact → dénaturation.

3 différents types.

type

G10 → G100

↑ taille réseau

exclusion du

gel, de volume

mort.

lim sup lim inf.

↳ inclusion de gel

↳ sortie retardée

→ relation entre volume d'élution et PM.

→ t

éluant



⊙ v_0

grand

sort de suite



x

moins

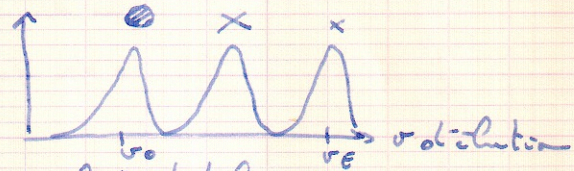
retardée



x

petite

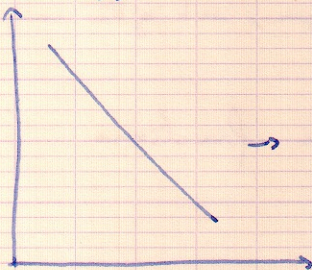
après



↳ volume élu total.

$$v_E/v_0 = -a \log PM + b.$$

$\log(PM)$



→ détermination de PM.

↳ usages : PM, séparation pour élution (séparation rapide) lors du marquage prot (dosages immunologiques).

ex: peptide PM = 40.000

marquage par I^{125} .

→ (peptide marqué (un résidu Tyr prot).
+ I^{125} en excès → se détermine sans.

préparation : séphadex G50, domaine de fractionnement de 1500 à 30000

déterminer θ volume sort v_0 par absorption bleu
e $PF = 2.10^6$.

↳ 3ml.

purification

volume d'élution des peptides? 3ml.

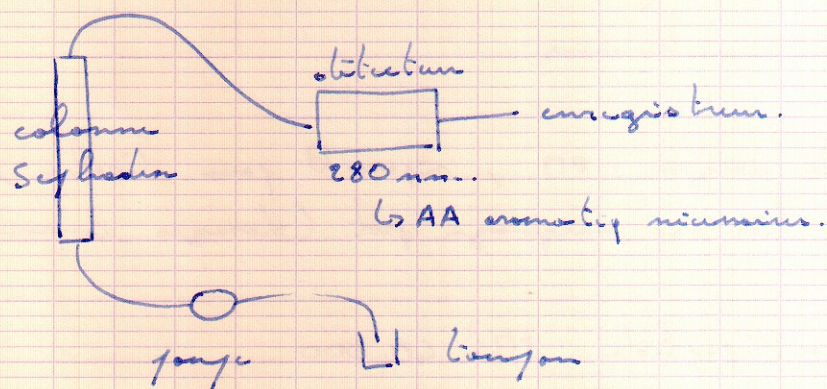
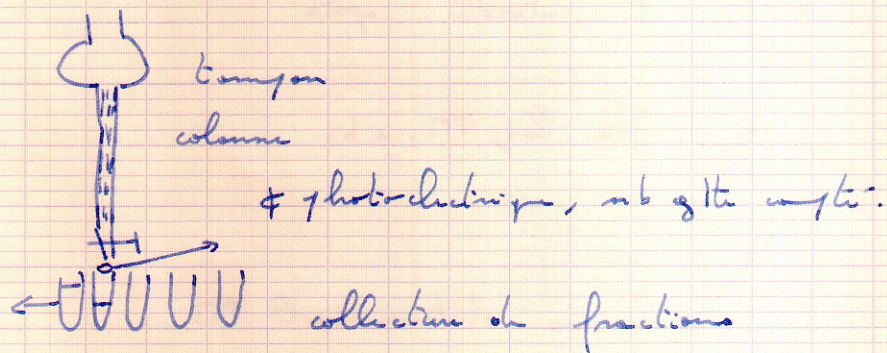
ou on trouve code un indice? en volume \rightarrow lavage.

I ne être inclus de gel.

on peut pas de faire purification fine.

pas de séparation peptide marqué / peptide non marqué
+ ex peptidique (par I 185).

montage:



cas : - étude 2 proté A et B, par électrophorèse en gel PA
 - milieu SDS + unité 8M.

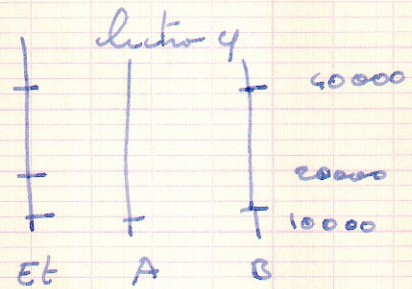
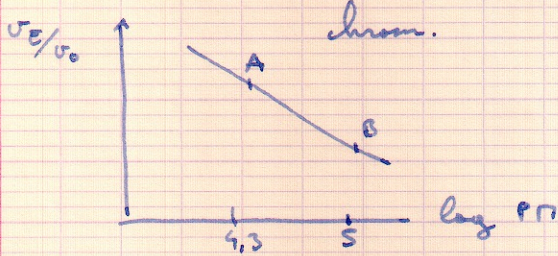
- par chromatographie exclusion-diffusion en milieu non dénaturant.

- obtient résultats suivants :

- Q : - quelle est la molécule produite par SDS.
 - que représente v_e/v_0 ?
 - quelle est la structure IV de chq proté A et B ?

réactif pour élimination de proté, partie structure III.
 (10 unités rigides).

dissociation en milieu acide, unité à certaines conc
 chrom.



la proté unifiée
 calcul PI de la proté unifiée.

$$B = 10^5 = 100\,000$$

$$A = 20\,000$$

la proté : n unités.

$$B : n \text{ unités de } 10\,000 + 40\,000$$

$$A = n \text{ unités de } 10\,000$$

$$A = 2 \text{ n unités de PI} = 10\,000$$

$$B = 2 \text{ combinaisons : probable}$$

2 = 40000	2 = 10000
1 = 40000	6 = 10000

par Hz

dosage d'enz, pourquoi on a une sérum de sérum? ...
mult de fois.

role foie:

organe très vascularisé touchant à Hs le métabolisme
le + important: proté \rightarrow Alb, transferrine, pré Alb,
facteurs de coag (TP etc...).

aussi les lipides

glycémie et réserves importantes glucose. (des troubles
hépatique \rightarrow hypogly.

lipides: synthèse importante, cholestérol, AB,
rôle de rétention substances métab et hormones (hormones,
élimination NH_4^+ ... métab si insuffisance, en l'absence
 \rightarrow pousser et adapter les doses.

rôle de rétention de la bil., élimine la bilirubine.

4 qd syndromes. (surt métab.) à degré Δ .

\rightarrow insuffisance hépatique: touche les fonctions métabol
ique du foie (synthèse \downarrow) et rétention. de affections
chroniques et de les états aigus.

\rightarrow rétention biliaire au cholestérol: éléments de la
bil de sé. \uparrow enz cholestérol est donc \uparrow en cas de
rétention.

\rightarrow cytolysé: \uparrow perméabilité $\&$ et libération du contenu.

passage de sang : TGP, TGO, Fu (LDH, OCT).
→ rx inflammatoires. le foie réagit en sécrétant
des lgs de affections chroniques : ↑ bloc β &
de la cirrhose mais = élévation de prot sériques.

enz plasmatiques:

• spécifiquement sang.

↳ enz intérieurement de l'hémostasie et fibrinolyse.

↳ cas de la lip lipase qui a un rôle clarifiant
hydrolyse des trig. des cT et VLDL.

• non spécifiquement sang.

- présentes à un taux faible de sang.

- et ↑ conc = signe lésion tissulaire.

↳ marqueur diagnostique et une maladie. ex: dosage
de transA.

↳ peut permettre préciser l'organe lésé.

↳ peut de certains cas renseigner sur l'importance
de la lésion.

en patho: sang

Heq: TGP, TGO, OCT, LDH, GLDH (enz foie)
PAL, γ GT, S'No. (cholestérol)

γ GT (éthylisme chronique, induction).

cardiaq: TGO, LDH (1 et 2), CK, CK MB (fraction
particulière au cœur. assez spécifique).

musculaire: ↑ TransA (TGO), CK, CK MB.

osseux: PAL (les remodelage osseux)

pancréas: amylase (ur et sang) lipase. → de
pancréatite aiguë (urgence).

prostaté: phosphatase acide pour les tumeurs prostaté
(testostérone labile) (CPA).

utilise Θ iso-enzymes spécifiques de certains tissus.

cas des CK MB $\hat{=}$ fraction myocardique.

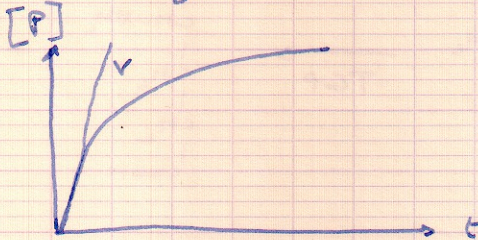
les autres : Θ d'utilité.

manque de spécificité pour les autres \rightarrow on utilise + ions marqueurs.

on s'intéresse à $H_c \uparrow$, jamais $H_c \downarrow$.

si déficit enz, on fait un biopsie tissu (mg).

même enz.



on s'intéresse à Δt faible.

ordre 0 $\rightarrow \Delta t$ court

sur automate de labo.

2^e facteur après le temps : le pH.

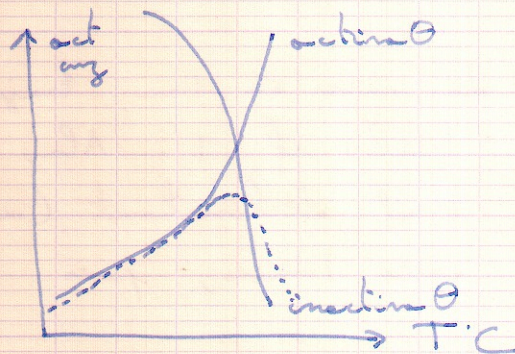
pH opt. selon enz PAL ou P acides.

↳ pic

↳ domaine large.

me pH ajusté pour mesure de la bonne activité.

3^e fact: $\Theta^{\circ}C$.



à partir de 45 $^{\circ}C$, inactivation sauf exceptions.

37 $^{\circ}C$ opt. me bonne act. enz.

de 25, 30, 37 $^{\circ}C$ Δ des volumes normale importantes on propose des fractions de conversion. moy satisfaisant

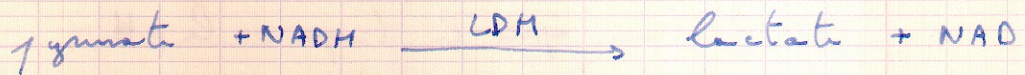
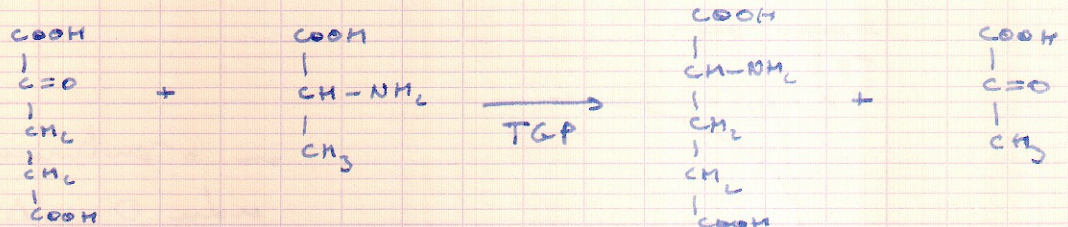
autre lecture

Composants contenant activateurs (cations).

ajouté de Coenz. en excès. parfois faire rx enzymatique pour former un activateur \rightarrow temps.

but de standardisation Θ : méthode optimisée au niveau conc., des \neq produits.

cas: même TGP.



de course de 1 cm trajet optique.

1 ml rf 1: Ala, NADH, LDH, pyridoxal P. + ^{air} 100 μ l
+ rf stabilisant (α -citra glutarate). 100 μ l

après 1 min, puis lire les min, même ΔA .

- pourquoi ne'utiliser-t-on pas d'actinom.
- de quel sens nous avons A
- calculer ΔA en fonction de ΔA en 0.1/l et en heures

noter que A est absorbance de NADH = 6300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

→ pas d'étalon. on travaille par fabrication et
stables, reproductibles et fiables.

on ne fait pas d'étalonnage.

sur les conditions optimales. (contrôle qualité).

→ elle →. NADH absorbé à 340 nm.

→ facteur déterminé de façon théorique.

$$x = \Delta A$$

UI = Q eng qui transforme 1 pmole de S / min.

nb NADH consommé / min.

$$\frac{x}{6300} = \text{conc de NADH transformé}$$
$$= \text{conc de S transformé.}$$

+ dilution rien au cours de...

$$\hookrightarrow \frac{1}{12}$$

$$\frac{x}{6300} \cdot 12 = x \cdot 1905 \cdot 10^{-6} \text{ M/l.}$$

$$\text{formule générale: } \frac{x}{\epsilon} \times \frac{V}{v} \times 10^6 = \text{UI/l.}$$

$$\hookrightarrow \times 16,6 \rightarrow \text{nkat/l.}$$

eng qui est PD faible paraît plus facilement en traces de.

mb → les 1ers libérés: PAL, S'NU, γ GT.

cytosol → ALAT, LDH, ASAT CK

mito C → CK, ASAT

hépatite virale: ALAT, ni autre support immuni.

lysonne: PAC

RE: γ GT.

enz cholestère: sur - b.

les sels biliaires viennent déchoquer la bilierité des enz de cholestère. (effet détergent).

spécificité ↪ coem: + ASAT que ALAT / par rapport réan. normal
↳ foie: les 2. ↪ réanibilité.

LDH → critère si hémolyse.

enz: lors → E de ϕ , les pompes

ATP dépendent ou échouent plus

→ gonflement, ↑ perméabilité ϕ avant l'édématisation

↳ réversible.

↳ irréversible

le passage de sq: dépend de proximité capillaire
taille enz par rapport perméabilité capillaire.

passage direct (PM faible ou perméable)

sinon passage indirect par le circuit lymphatique
↑ enz plus toxicité et métabolisme enz possible.

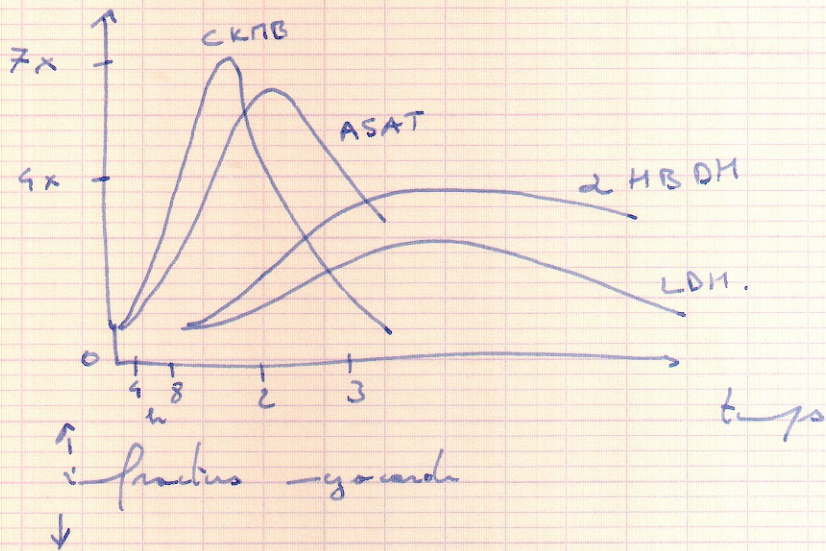
foie, rate: très vasculaire, perméable.

↳ direct de sq.

muscle sq: ⊖ perméable, passage par lymphes.

intermédiaire: coem, petites, protéine.

membre de sq = résultant de \neq facteurs, procédé
diffusion, passage direct ou indirect, \neq métabolisme
ou élimination.



tort	sensibilité	spécificité
	nb positif qd - alcool décliné	nb faux - alcool - alcool lorsque tort ⊕
CK	58%	75%
CK MB	electroph chromato immunoinhib	58%

tort : - la spécificité

CK MB réalisées que si CK fortes.

- hépatite virale aigüe épisode aigüe, pas de passage chronique.
- pour les enzymes cholériques, en relation avec ^{gravité} cholémie.
 ↑ enzymes - b. grande activité. normalisation : dépend du type d'obstacle.
- γGT ↑ ds tous les affec^t hépatiques (cholémie, en: comme tort pour virus) + altération alcoolisme.
- enzymes d'activité, d'induction. éthylisme chronique.
 γGT = marqueur.

EDS

- phanck biologiste → expression milieu reg → trouble fonct.
aussi risque apparition mutation → nec analyse de N
mutation → sonde nucléique. apparemment en gas?

mischin → suspicion, signes cliniques.

↳ analyse bio en biologiste
recherche de marqueurs.

Alb, urée, chol → insuffisance Héy?

bili PAL → cholestase?

TransA → cytolysse mult ALAT, gam le foie.

α_2 glob, γ glob (IgA) → rx inflammatoire.

↳ signes biologiques ≠ confirmation syndrome.

signes bio ≠ syndrome (individus entiers).

voir meth Sanger.

recherche = vit, lactinophages, simple lin. P13.

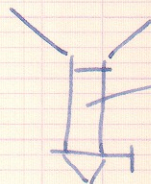
circulaire avec 1 site de restriction.

polylinché → ici, série de sites d'insertion reconnus
par endonucleases ces sites se trouvent de gène de
la β galactosidase: gène de contrôle, prouve si on a
ou non une insertion. par appétition en non gel ∇ Xllm

dialyse normalisée: chambre à 6 compartiments, entre les
automatisme. 2 amb de Φ .

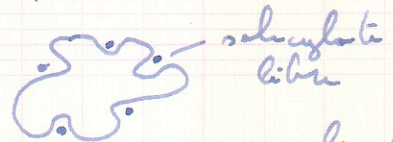
autres tes: la gel filtration.

PAA → fillet, rince



gel de dextrose → billes p pures.

+



solucylate
libre

+

+

solucylate
lié = Alb

$v_1 = \text{salicylate li}^{\bar{c}}$

$v_2 = \text{air}$

$v_3 = \text{salicylate li}^{\bar{c}}$

↳ 2 feuilles de sites. pour salicylate.
pour 6 feuilles en tout.

LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN PAR LE PHAGE M13

Narrateur :

Le séquençage d'un ADN est la détermination de la séquence de ses bases. Il permet de comprendre l'organisation et le fonctionnement de l'ADN. Le génome humain étant trop important (3 000 Millions de paires de bases), seules les séquences intéressantes, isolées dans des vecteurs phagiques ou plasmidiques seront étudiées. L'un de ces vecteurs est le phage M₁₃, et Steve BROWN nous explique comment il est utilisé.

S. BROWN :

Les méthodes chimiques de séquençage tendent à être abandonnées au profit de méthodes enzymatiques d'utilisation plus simple et plus sûre. L'une d'elles, la méthode de terminaison de chaîne, dite de SANGER, utilise des 2'3'-didéoxynucléotides et requiert l'emploi de clones d'ADN pur sous forme monocaténaire.

Le vecteur M₁₃ convient parfaitement à cette méthode.

Narrateur :

Le phage M₁₃ est un virus à ADN circulaire monocaténaire infectant spécifiquement les formes mâles d'E. coli, qui contiennent le facteur F. Lors de l'infection, son ADN appelé brin positif va répliquer un brin négatif pour former un ensemble bicaténaire appelé Replicative Form⁺ ou RF. Ce RF va répliquer en grande quantité des brins positifs monocaténaires capables de s'encapsider et de sortir de la cellule sans provoquer sa lyse. Donc, les vecteurs M₁₃ produisent toujours des brins positifs.

Pour faciliter la sélection des vecteurs recombinants, le chromosome d'E. coli est démuné de son opéron LAC (lactose), codant pour une activité β -galactosidase. Une partie incomplète de ce gène est greffée au facteur F, et son complément est incorporé au vecteur M₁₃. Ainsi, les cellules ayant intégré le vecteur pourront développer une activité β -galactosidase par complémentarité d'action des deux portions de gène... (α -complémentation des 2 fragments protéiques).

Les E. coli sont mis en culture en présence d'un substrat synthétique de la β galactosidase : le Gal-X qui est un dérivé halogéné d'un galactoside. Ce Gal-X, en se dégradant sous l'action de la β -galactosidase provoque l'apparition d'un précipité bleu halogéné, le bromo-chloro-indole.

Le vecteur M₁₃ possède aussi dans son ADN une séquence courte comportant de nombreux sites de restriction spécifiques appelés polylinkers. Si le vecteur bicaténaire et l'ADN à séquencer sont coupés par une même enzyme, les fragments obtenus ont les mêmes brins terminaux. Une ADN ligase peut alors relier les deux ADN, mais sans spécificité d'orientation puisque toutes les extrémités sont identiques. L'action simultanée de deux enzymes de restriction aboutit à la formation de deux extrémités différentes sur le même fragment. Ainsi, les fragments sont toujours insérés dans le même sens.

La présence d'un insert dans l'ADN du vecteur empêche l'expression

de son opéron Lac modifié. Aussi, les E. coli infectés par un vecteur M₁₃ recombiné ne possèdent pas l'information totale nécessaire à la synthèse de β galactosidase et ne dégraderont pas le Gal-X. Elles apparaîtront donc sans coloration sur la plaque de culture.

S. BROWN :

Voici des cultures de contrôle après incubation. Ici les cellules ont été infectées par le vecteur non recombiné. Comme attendu, on voit de nombreux disques bleus. Ici, les cellules ont été infectées par le vecteur coupé et non recombiné. Comme attendu, on ne voit aucune colonie.

Le 3^{ème} contrôle est le plus important : les vecteurs ont été ouverts par une nucléase puis directement refermés par une ligase. Toutes les colonies obtenues doivent être bleues. La présence de colonies non colorées dans ce contrôle serait le témoin d'une contamination par un ADN étranger, ou d'une contamination par une nucléase de la solution de ligase utilisée, entraînant une dénaturation de l'ADN du vecteur. Par ce contrôle, on évite l'utilisation de clones faussement positifs.

Donc si tous les contrôles sont corrects, les colonies non colorées seront de vrais recombinants.

Narrateur :

L'ADN recombiné obtenu est alors utilisable pour le séquençage. Un oligonucléotide homologue à la région 3' terminale du polylinkers est hybridé à l'ADN RF. Il va agir comme initiateur d'extension de la chaîne ou amorce.

4 réactions de séquençage sont menées en parallèle à partir de l'ADN RF. Chacune met en présence l'ADN et les 4 déoxynucléotides dont l'un, le déoxyTP est marqué radioactivement. Enfin, on ajoute un didéoxynucléotide différent pour chaque réaction.

Lorsqu'on ajoute l'ADN polymérase, la synthèse d'un nouveau brin natif va commencer en partant du dernier codon 3' terminal du polylinker et en progressant tout au long de l'ADN RF jusqu'à ce que le mécanisme soit bloqué par l'intégration dans la chaîne d'un didéoxynucléotide spécifique de chaque réaction.

On aura donc pour chaque réaction une série de fragments d'ADN, de tailles différentes, tous terminés par le même nucléotide. On peut donc déterminer cette séquence de l'ADN après avoir séparé les chaînes selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

On rappelle pour compréhension que la polymérisation d'une chaîne d'ADN passe, à chaque étape, par une phosphorylation de la fonction 3'hydroxy du dernier 2'déoxynucléotide de la chaîne, réalisant ainsi la fixation d'un nouveau nucléotide. Les didéoxynucléotides ici utilisés ne possèdent pas de fonction hydroxyle en 3'. Ils ne peuvent donc être phosphorylés et bloquent l'extension ultérieure de la chaîne.

S. BROWN :

Deux chaînes, différant en longueur d'un seul nucléotide, peuvent être séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Plus

la longueur d'un fragment d'ADN est faible, plus il migre vite à l'électrophorèse. Le bleu de bromophénol migre en même temps que les chaînes courtes d'ADN. Sa migration maximum sur gel permet de déterminer les 150 ou 200 premiers nucléotides d'un ADN. Le cyanol xylène migre en même temps que les chaînes longues d'ADN et sa migration maximum dans le gel permet de déterminer la séquence d'une centaine de bases succédant à celles déjà lues.

Voici un exemple d'autoradiographies obtenues avec les chaînes terminées par les didéoxynucléotides Adénine... Cytosine... Guanine... et thymine. La séquence de l'ADN est déterminée par lecture de proche en proche des didéoxynucléotides terminaux, dans un ordre de migration décroissant. L'exemple donne une séquence de : G - G - C - G - T...

Voici l'autoradiographie d'un gel qui a été "électrophorésé" jusqu'à obtenir une migration maximum du bleu de bromophénol dans le gel. Elle permet de lire une séquence de 150 à 200 nucléotides correspondant au site de clonage et à une partie de l'ADN inséré.

Voici une autre ^{radio-}radiographie pour laquelle le cyanol xylène a été électrophorésé jusqu'à sa migration maximum. Le même principe de séquençage est utilisé, et nous pouvons alors déterminer la séquence d'une centaine de nucléotides supplémentaires.

L'utilisation de gels à gradient de concentration permet de résoudre le problème des différentes propriétés électrophorétiques des brins d'ADN selon leur longueur. Ils sont formés par introduction de solutions de concentration croissante dans le gel en formation. Un gradient est ainsi créé qui permet de mieux répartir tout au long du gel les brins de tailles différentes. De cette manière, on peut lire jusqu'à 300 paires de bases sur un seul gel.

Une autre innovation consiste à marquer le déoxyCTP par le ^{35S} à la place du ^{32P}.

A gauche nous avons une autoradiographie typique obtenue avec le ^{32P}.

A droite, nous avons une autoradiographie typique obtenue avec le ^{35S}. Le ^{35S} a l'avantage de présenter des bandes plus étroites parce qu'il possède une énergie plus faible que le ^{32P} (et par ailleurs une période de 3 mois contre 15 j.).

Quelque soit le protocole utilisé, cette technique est limitée quant à la longueur des fragments que nous pouvons séquencer. Il nous faut d'autres méthodes pour séquencer des fragments d'ADN plus longs.

Des fragments de plusieurs kilobases peuvent être séquencés avec fiabilité par le "shotgun sequencing" (littéralement "coup de fusil").

Narrateur : L'ADN étudié est découpé au hasard par une nucléase ou par ultrasons. On obtient ainsi de nombreux fragments d'ADN à bouts francs, d'une longueur moyenne de quelques centaines de paires de bases. Ces fragments sont alors clonés dans des vecteurs M₁₃. Des

recombinants, choisis au hasard sont alors séquencés par la méthode des didéoxy. Quelques 300 paires de bases sont alors identifiées pour chaque recombinant.

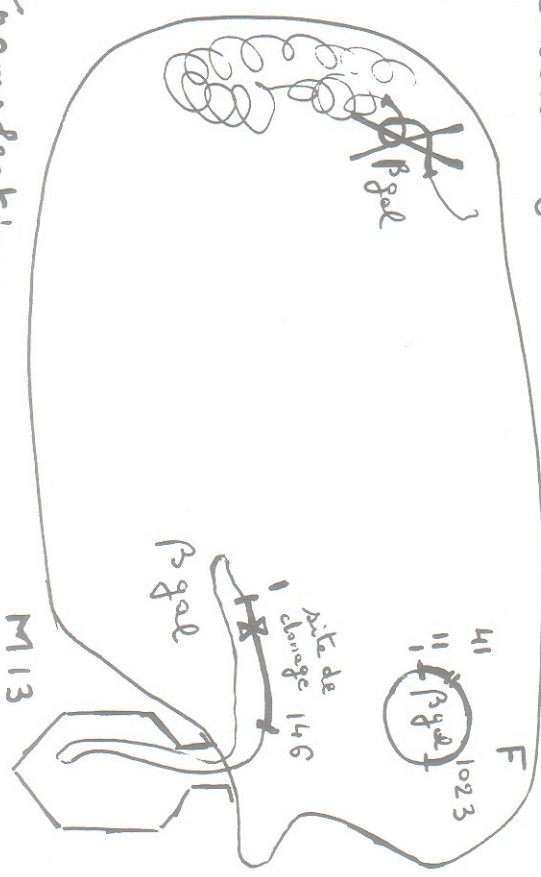
S. BROWN : Les résultats sont intégrés par un ordinateur qui établit la séquence totale de l'ADN par chevauchement des fragments ayant une partie commune.

Narrateur : Une autre variante du séquençage par le M₁₃ utilise des vecteurs M₁₃ dont les polylinkers sont insérés dans des sens opposés. Si l'échantillon d'ADN est digéré par 2 enzymes de restriction, produisant 2 extrémités monocaténaires différentes, les fragments d'ADN seront insérés dans un sens opposé selon le vecteur M₁₃ utilisé.

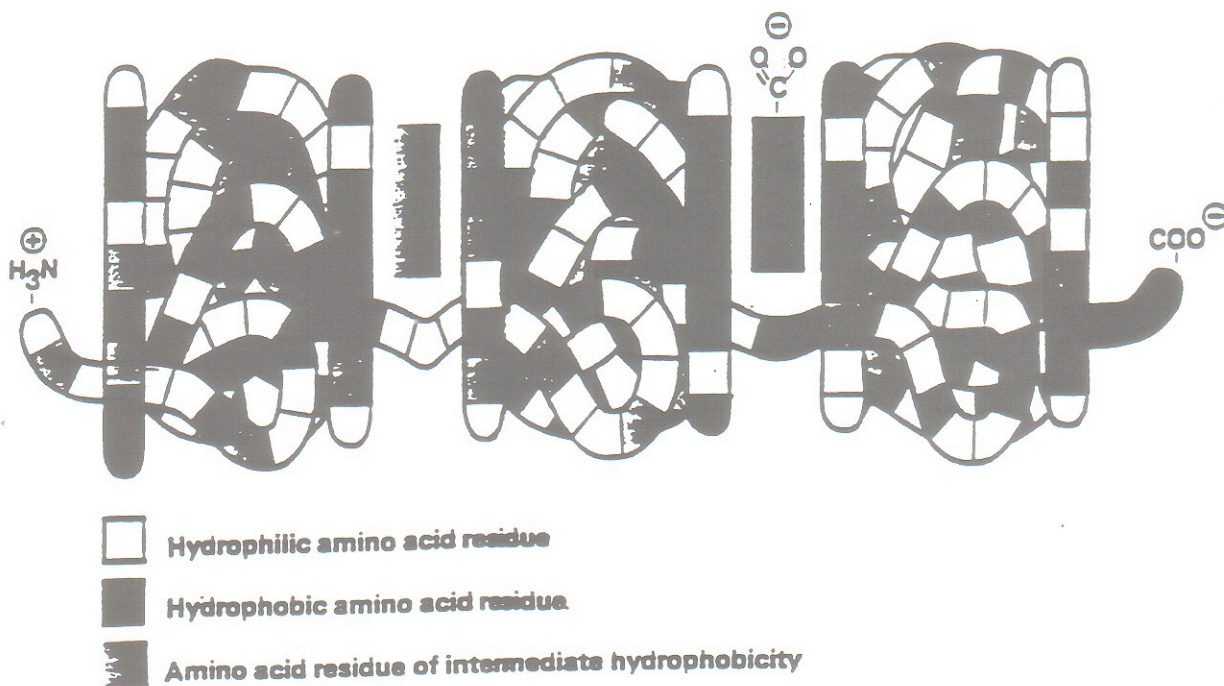
S. BROWN : De cette manière, nous pouvons séquencer le fragment d'ADN dans les deux sens, en lisant dans un sens le brin codant, et dans l'autre sens le brin non codant. Ceci nous permet d'éliminer les données issues de fragments longs d'ADN étrangers au séquençage. Après avoir déterminé la séquence de l'ADN génomique désiré, nous pouvons rechercher les séquences potentiellement codantes ou non, ainsi que les éventuelles séquences de contrôle, de transcription et de traduction.

Tous les jours, de nouvelles séquences du génome eucaryote sont répertoriées. Par conséquent, notre compréhension des principes de structure et de régulation des gènes s'améliore de plus en plus, s'accompagnant de l'évolution parallèle de notre aptitude à manipuler les gènes aussi bien in vitro qu'in vivo.

E. coli "O"



transfection



Model of the serum albumin molecule with binding sites for bilirubin and fatty acid anions

Association constants for binding of some different types of substances to albumin at neutral pH. (HSA, human serum albumin; BSA, bovine serum albumin)

Substance	Number of binding sites	Association constant K_A	Type of albumin
Stearic acid	2 very strong	1.1×10^8	(HSA)
	5 strong	4.0×10^6	
Bilirubin	1 strong	1.5×10^6	(HSA)
	1 weak	2.5×10^4	
Chloride ion	1 weak	2.4×10^3	(HSA)
	8 very weak	$\times 10^2$	
Testosterone	3 weak	3.2×10^4	(HSA)
Tyrosine	1 strong	2.5×10^6	(HSA)
	5 weak	6×10^4	
Phenoxymethyl-penicillin	1 weak	2.3×10^3	(BSA)
Salicylic acid	1 strong	2×10^5	(BSA)
	5 weak	1.7×10^3	
Fluorescein	3 weak	2.8×10^4	(BSA)

Syndrome de Cushing

HYPERCORTICISME

EXPLORATION FONCTIONNELLE : TESTS DYNAMIQUES

	SUJET NORMAL	MALADIE DE CUSHING	TUMEUR SURRENALE
BASE			
ÉPREUVE DE FREINAGE A LA DEXAMÉTHASONE			
ÉPREUVE DE STIMULATION AU TÉTRACOSACTIDE			
	RÉPONSES +++	RÉPONSE FORTE	RÉPONSE NULLE

Test d'auto-évaluation (permettant à l'étudiant de faire le bilan de ses connaissances) et de compréhension (permettant à l'enseignant de voir si tout a bien été compris) ; durée 20 min. Répondre dans la marge de droite par V si vrai; une absence de réponse laissant supposer que la proposition est considérée erronée. Attention à bien peser le sens de chaque mot.

quel pénétration, substitut plasmique
 V?

- 1- Tous ces milieux peuvent servir de support pour électrophorèse : acétate de cellulose, gel de dextrane, gel d'agarose. ✓
- 2- Par électrophorèse sur gel d'agarose la résolution est telle que l'on peut différencier 2 ADN différant en taille d'un nucléotide. *non car migration capot.*
- 3- Le séquençage selon SANGER utilise des dihydroxy-nucléotides, encore appelés interrupteurs de réplication ou terminateurs de chaîne.
- 4- En électrophorèse sur acétate de cellulose les LDL (après coloration au Noir Soudan, colorant lipophile) sont des lipoprotéines qui migrent au même niveau que les β globulines (elles mêmes révélées par le rouge ponceau, colorant polaire).

5- Sur le plan métabolique, la transaminase ALAT fonctionne avec pour coenzyme NADH⁺ (qui se trouve oxydé en NAD⁺). → *Pole pyridinol*

6- L'ALAT (ou TGP) est une enzyme dont le rôle métabolique dans le plasma sanguin est de réaliser une transamination entre un L-amino-acide et un oxo-acide.

7- En biologie clinique, on mesure une activité ALAT plasmatique pour indiquer au clinicien si certains tissus comme le foie (ou dans une moindre mesure le muscle) ont subi une cytolysé anormalement élevée. ✓

8- Le cholestérol sérique est réparti en 2 compartiments : d'une part du cholestérol libre ; d'autre part du cholestérol estérifié dans les HDL, LDL, et VLDL.

9- On peut affirmer qu'une solution titrant 100 mg d'ADN d'aigues par litre (mesuré en UV à 260 nm) dans laquelle on a dosé le désoxyribose à 21.5 mg/l (diphénylamine) présente grossièrement un degré de pureté de 50 %. ✓

10- Pour faire un marquage froid d'une sonde nucléique, on peut par exemple, après avoir sulfoné les cytosines, fixer successivement 2 anticorps de façon à ce que le 2° Ac apporte une enzyme telle que la phosphatase alcaline ; la visualisation finale de l'hétéroduplex ADN cible - ADN sonde se fait alors en ajoutant un substrat phosphorylé, le plus souvent le phosphate de pyridoxal. *pas un substrat de*

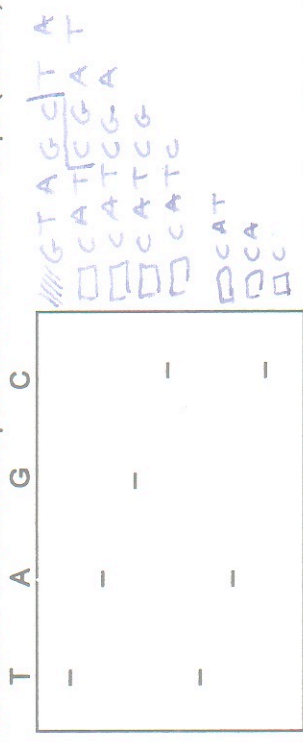
11- Le dosage de la bilirubine commence par l'action soit de la bilirubine-estérase soit du DMSO qui transformeront l'un et l'autre la bilirubine conjuguée en bilirubine libre. *substrat de PAL.*

12- Si la bilirubine, métabolite de dégradation de l'hème, voit sa concentration plasmatique multipliée par un facteur de 10 ou plus (c'est-à-dire dépassant 200 μmol/l) on parle d'une cytolysé aigüe. → *cholestérol ou bilirubine*

13- La forme réactive du diacétyle monoxime se fixe sur l'urée (technique parfois encore utilisée pour son dosage) comme pourraient parfois également le faire la L citrulline : NH₂-CO-NH-(CH₂)₃-CH(NH₂)-COOH, ✓

14- voire l'antiépileptique qu'est le phénacétamide C₆H₅-CH₂-CO-NH-CO-NH₂. Dans les études d'affinité, la dialyse est un dispositif qui permet, après équilibre, de répartir des molécules en deux compartiments : dans l'un exclusivement une macromolécule (protéine, ADN ... etc.) ayant fixé un ou plusieurs ligands, dans l'autre exclusivement du ligand libre (hormone, médicament, répresseur ... etc.).

15- Ce fragment heptanucléotidique d'ADN monobrin, néosynthétisé lors du séquençage selon la technique de SANGER, correspond à un domaine contenant un site de restriction pour l'endonuclease Taq I (T/CGA)



16- La bilirubine plasmatique non liée à la sérum albumine est, dans la plupart des cholestases, un métabolite qui a subi dans l'hépatocyte une glucuronidation conjugaison la rendant hydrosoluble, puis un reflux des voies hépatobiliaires vers le sang.

17- Une technique de dosage de la bilirubine conjuguée consiste à la condenser à un sel de diazonium puis à faire une mesure spectrophotométrique dans le visible; l'addition d'un dissociant tel que le DMSO est inutile. *non visible. = rôle de solvant.*

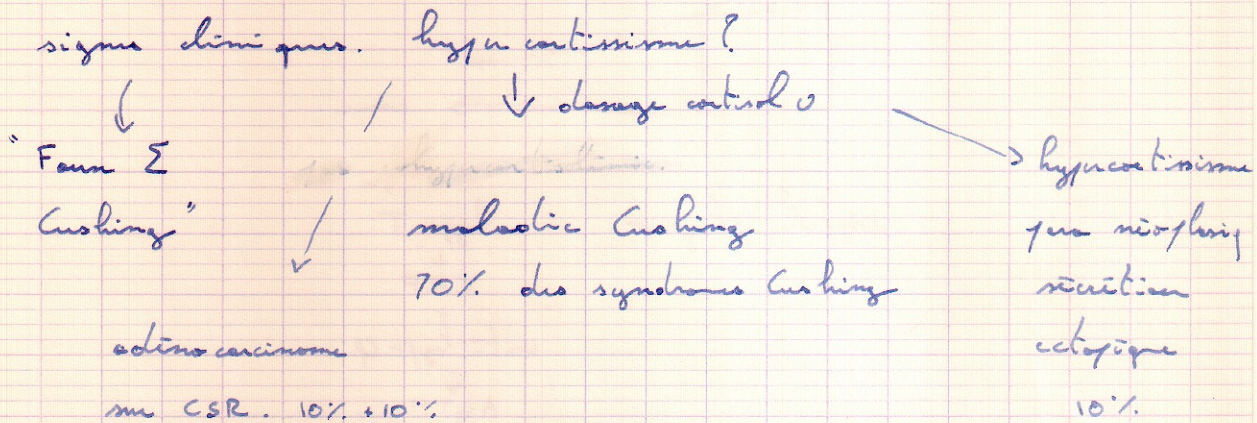
18- On peut affirmer que la protéine plasmatique qui, en électrophorèse sur acétate de cellulose, est appelée alpha-2-globuline, est d'une taille inférieure à celle de la β-globuline.

19- Dans la mesure où des techniques de dosages pratiquées par les laboratoires de biologie clinique font intervenir des enzymes, peu importe la température utilisée puisqu'on s'arrange toujours pour que le substrat soit en concentration saturante et que l'on ait ainsi des réactions à vitesse linéaire en fonction du temps (ordre 0). → *pour faire étude cinétique*

20- Sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide il n'est pas du tout ridicule de prétendre qu'on pourrait séparer un ADN de 45.3 kdalton d'un autre ADN dont la taille serait de 45.6 kdalton.

total du nombre de réponses conformes (sur 20) :

cc : syndrome de Cushing.



→ pb étiologie, à résoudre par la thèse.

formes stéroïdes de plasma.

- libre
- fixé sur CBG, Alb.

dis que conc > 400 nmol/l, nature \ominus CBG.

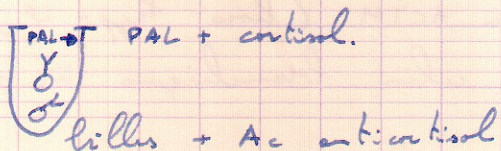
↳ \uparrow cortisol libre. \rightarrow conséquences sur tissu cible.

dosage cortisol.

cycle nyctéméral, variable en stress ($\pm 10\%$)

fluctuation corrélée à ACTH.

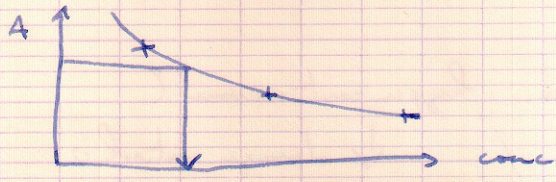
dosage cortisol. méth. enz immuno EIA.



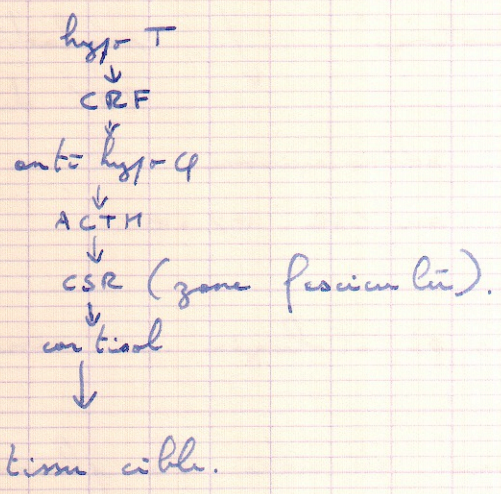
ajout plasma (avec cortisol L, +Alb, +CBG).

- 1) compétition.
 - 2) lavage
 - 3) révélation par substrat phosphoré.
- conc cortisol = f(% intensité).

même spectre



rappl physi.



testes potential métréisme ?
autonomie ? indépendance ?

ACTH $\hat{=}$ fragment pro H = pro opiomélanocortine.
on utilise stimulés par ACTH ou homologue
synthétique = synacthine (ne comporte que partie
tétracosé = 24. active.)
dexaméthasone ("Decanoyl" "Decadron").

révél ectopique ACTH (hors hyp-φ) : provient
par cancer ex: celui bronchique à petite φ.