

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ENDOCRINIENNE ET MOLÉCULAIRE
(Professeur A. REVOL)

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE

3ème ANNEE

B. CLAUSTRE - B. MATHIAN

1993 - 1994

Objectifs : Le but des TP est d'utiliser (parfois de voir en démonstration) quelques techniques d'extraction, de fractionnement ou de quantification appliquées à des structures biochimiques protéiques, nucléiques ou apparentées.

L'étudiant, qui travaille individuellement, s'attachera à mettre en pratique les recommandations de l'enseignement des Bonnes Pratiques de Laboratoire ; il devra être apte à exposer le principe et l'intérêt des techniques proposées ; il devra connaître le type de structure, la réactivité et le rôle métabolique des molécules étudiées; la mise en oeuvre de techniques ou l'exploitation des résultats seront détaillées en ED; enfin l'étudiant doit discuter ou interpréter les résultats obtenus.

Thèmes des manipulations : L'étudiant doit réaliser par rotation 6 manipulations (décomptées I à VI) en 3 séances de 4 heures, soit une manipulation par demi-séance de 2 heures, ce qui implique un changement de poste de travail à mi-séance. La 1^o manipulation sera tirée au sort lors de l'ED n°1.

I/ Séparation de macromolécules par électrophorèse.

- a- Protéines sériques sur acétate de cellulose et lipoprotéines circulantes sur gel d'agarose.
- b- Fragments de restriction d'ADN sur gel horizontal d'agarose.
- c- Séquençage d'ADN sur gel vertical de polyacrylamide.

II/ Les enzymes : deux exemples d'implications analytiques.

- a- Etude cinétique pour la détermination d'une activité enzymatique (ex. : activité de l'aminotransférase ALAT plasmatique).
- b- Mesure de la concentration en un métabolite par réaction enzymatique (ex. : cholestérolémie par la cholestérol oxydase).

III/ Extraction d'ADN.

IV/ Analyse de deux constituants de l'ADN.

- a- Dosage du déoxyribose.
- b- Dosage du phosphate.

VI/ Etude de deux produits de dégradation des protéines.

- a- Dosage de l'urée (réaction à la DiAcétylMonoxime)
- b- Dosage de la Bilirubine (réaction de diazotation de Hijman Van Den BERGH)

VII/ Etude de l'affinité d'une protéine pour un ligand (capacité de transport de la sérum albumine pour un médicament : le salicylate de sodium)

Appendice :

- Annales de sujets d'examen
- Comment faire un **compte-rendu**.

N.B L'étudiant doit AVANT la séance avoir pris connaissance de l'ensemble des 2 manipulations qu'il aura à réaliser (préparation des réactifs, principe des dosages,établissement d'un plan de travail éventuellement minuté, précautions...) ainsi que des conseils et modes de calculs donnés en enseignement dirigé. Du papier millimétré sera à votre disposition en salle de TP. Une copie double vous sera remise avant les TP sur laquelle vous rédigerez l'ensemble de tous les COMPTE-RENDUS ; elle sera soit ramassée en fin de séance accompagnée de votre fiche d'étudiant de TP, soit annotée au cours de la séance.

comment conduire ses études - Quelques idées essentielles.

Vous avez choisi de faire des études de pharmacie pour recevoir une formation scientifique et professionnelle. La caractéristique des études de pharmacie est la pluridisciplinarité scientifique.

Vous n'êtes pas à la faculté pour passer des examens, et oublier ensuite ce que vous avez appris, mais pour acquérir des connaissances et apprendre à les utiliser.

L'enseignement supérieur nécessite un effort de formation personnelle ; ce ne peut être un gavage passif, vous devrez apprendre à vous former par vous-même.

Tout ce qui vous est enseigné peut vous servir pour comprendre un enseignement ultérieur : ne jetez pas vos cours ou vos notes prises lors des premières années d'études, vous aurez sûrement à vous rafraîchir la mémoire ultérieurement.

Vous pourrez d'ailleurs être interrogé à un examen sur des notions acquises lors des années précédentes.

Apprenez à apprendre : l'évolution rapide des connaissances et la technologie dans le domaine de la santé est telle que vous aurez à vous recycler continuellement lors de votre carrière.

Il y a deux sortes de conditions d'acquisition des connaissances : d'un côté ce que les étudiants apprennent des enseignants qui sont pour la plupart des pharmaciens spécialisés dans leur discipline et dans sa pédagogie et, d'autre part, ce qu'ils apprennent des professionnels, pharmaciens ou non, qui doivent les aider à faire une synthèse entre les différentes connaissances et leur apprendre à se comporter dans des situations complexes.

Ce qu'on demandera aux jeunes professionnels à la fin de leurs études et qu'ils doivent apprendre par eux-mêmes, c'est savoir mais aussi savoir faire et savoir être.

Cultivez la pratique des langues vivantes écrites et parlées, à commencer par le français.

La réussite de vos études dépend de vous. C'est par votre effort que vous pourrez devenir un cadre de la nation compétent et responsable.

Cela signifie en particulier dans le cas des TP de BIOCHIMIE que vous serez certes jugés sur les compte-rendus que vous rédigerez mais également sur :

- la pertinence de vos réponses aux questions qui vous seront posées tant en ED qu'en TP aussi bien dans le cadre strict de ce qui est enseigné que dans les applications du milieu professionnel ou de la vie de tous les jours.
- votre soin et votre application dans un sens large (organisation du travail dans l'espace et dans le temps, propreté...)
- votre intégration dans le groupe tout en sauvegardant l'aspect personnel (par opposition à collectif) du travail .

I/ Séparation de macromolécules par électrophorèse.Introduction :

L'électrophorèse est une technique mettant à profit la faculté d'un courant électrique continu à faire migrer plus ou moins vite une molécule selon sa charge, sa taille, sa forme ... sur divers types de supports (acétate de cellulose, gel d'agarose, gel de polyacrylamide ...) Lors de cette séance deux types de molécules vont être étudiés: d'une part des protéines et lipoprotéines, d'autre part des acides nucléiques.

Chaque étudiant dispose d'un **sérum** dont il effectue un dépôt à la fois :

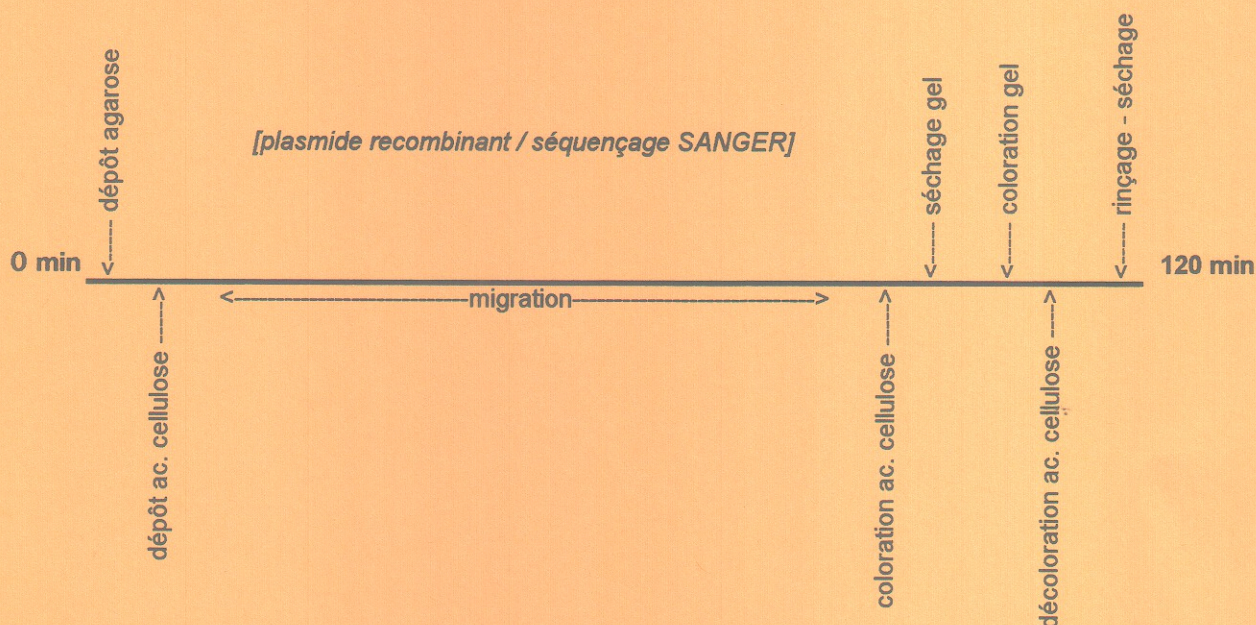
*sur une bande d'acétate de cellulose sur laquelle un colorant hydrophile révélera les protéines et glycoprotéines

*sur un gel d'agarose coulé sur feuille de plastique sur lequel un colorant lipophile révélera les lipoprotéines

la migration des deux dépôts s'effectuera simultanément .

ATTENTION le facteur TEMPS doit être ici particulièrement pris en considération, car de la durée suffisante de la migration, et dans une moindre mesure des révélations, dépendra la qualité des résultats.

L'organigramme des opérations à réaliser peut conduire à un minutage de ce type en gardant en mémoire qu'au bout de deux heures vous êtes dans l'obligation absolue de quitter votre poste avec votre bande et votre gel (de préférence sec) :



Il sera par ailleurs présenté en démonstration d'une part un dispositif permettant le contrôle de structure d'un plasmide recombinant ou la séparation de fragments d'ADN sur un gel d'agarose horizontal épais, et d'autre part un dispositif permettant la séparation de polynucléotides lors du séquençage selon SANGER d'un fragment d'ADN sur un gel de polyacrylamide.

I ELECTROPHORESE DE PROTEINES ET LIPOPROTEINES SERIQUESMatériel et réactifs

- *générateur de courant continu
- *cuves ontenant 300ml de tampon tris-barbital pH 8.8 force ionique 0.05
- *plasma humain (de sang prélevé sur EDTA de manière à éviter des oxydations de lipides)
- *pochoir de dépôt à fentes, micro-pipette, pincette
- *plateau d'agitation pour révélation, décoloration

protéines

*bande d'acétate de cellulose conservée dans le méthanol à 30%

*porte-bande à tendeurs

*colorant= rouge Ponceau S à 5g/l dans une solution à 5% (m/v) d'acide trichloroacétique; NE PAS JETER.

*décolorant du fond= acide acétique à 5% (v/v); bain à renouveler autant de fois que nécessaire

lipoprotéines

*gel mince d'agarose coulé sur support plastique souple

*porte-gel de contrainte à dos d'âne

*colorant= noir Soudan IV à 1g/l dans une solution d'éthanol à 50% (v/v); NE PAS JETER

*décolorant du fond= éthanol à 50%; bain à renouveler éventuellement

*sèche-cheveux, four

en option:

*lame de microscope

*nacelle d'immersion

*solution de transparisation= dioxane/isobutanol (7;3)

Mode opératoire

Le même échantillon de plasma doit être déposé à la fois sur une bande d'acétate de cellulose propre à chaque étudiant et sur un gel d'agarose commun à quatre étudiants.

protéines

Si cela n'a pas été réalisé avant votre arrivée à votre poste, les bandes d'acétate de cellulose doivent être équilibrées environ 5 minutes dans un bain de tampon tris-barbital pH 8.8.

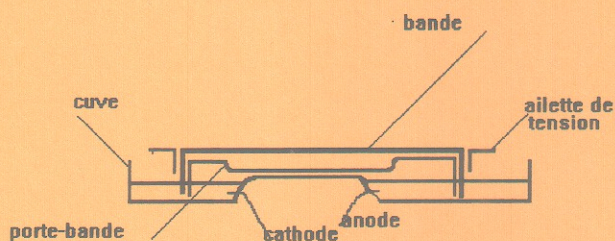
lipoprotéines

Saisir entre deux index la bande de plastique supportant le gel d'agarose et la placer sur du papier filtre; attention le gel étant fragile éviter le contact des doigts avec sa surface.

dépôt: la bande d'acétate de cellulose étant placée avec une pincette sur une bande de papier filtre, éponger les flaques de tampon éventuelles à la surface.

dépôt: appliquer sur le gel le pochoir à fentes en orientant ces dernières dans la direction de la flèche.

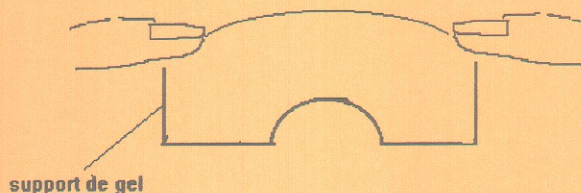
Appliquer le pochoir à fentes à environ 5 cm d'une des extrémités et déposer à la micropipette 3 microlitres de plasma en les répartissant le plus uniformément le long de la fente; identifiez votre bande (n'écrivez pas sur le portoir) mettre la bande sur le porte-bande puis l'ensemble dans la cuve selon le dessin ci-dessous



mettre le porte-bande et sa bande dans la cuve de migration "protéines"

Appliquer 3 microlitres de plasma en les répartissant au mieux le long de la fente; il faut au gel 5 minutes pour qu'il absorbe la totalité du plasma

Effectuer la mise en place de la plaque sur le porte-gel en contrainte selon le dessin ci-dessous:



mettre le porte-gel et son gel dans la cuve de migration "lipoprotéines"

La migration sous une tension de 160 volt doit durer 60 minutes au minimum (une durée de 80 minutes est idéale). En fin de migration, arrêter le courant, débrancher les fiches

Révélation de la bande : immerger aussitôt la bande dans le bain de rouge ponceau; les plages de protéines apparaissent en 5 à 10 minutes.

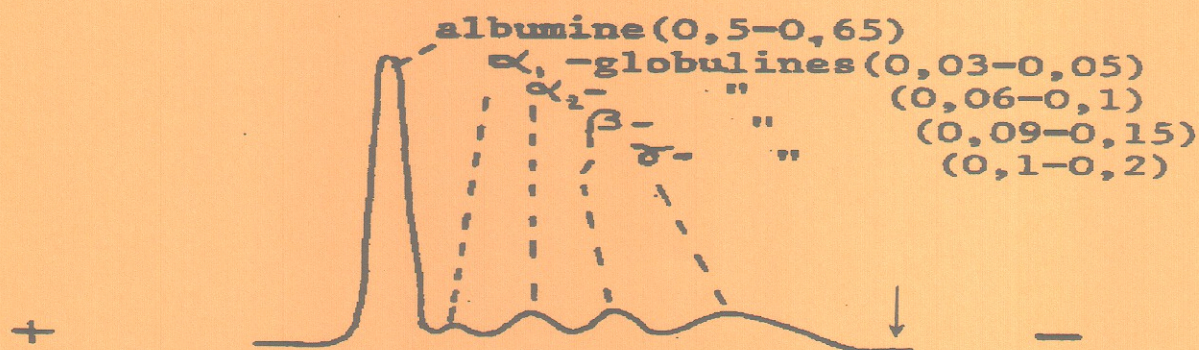
Décolorer le fond, en renouvelant le bain d'acide acétique si nécessaire; une agitation du bain accélère le processus.

option (si vous disposez du temps nécessaire): si on voulait faire une mesure d'absorbance de chaque fraction, on devrait appliquer la bande encore humide sur une lame de microscope en rabattant les extrémités sous la lame, puis immerger l'ensemble à l'aide d'une nacelle dans un bain de transparisation (environ 5 minutes; une durée excessive dans le solvant la fragilise, de même éviter de remuer trop brusquement la bande d'acétate en cours de transparisation)

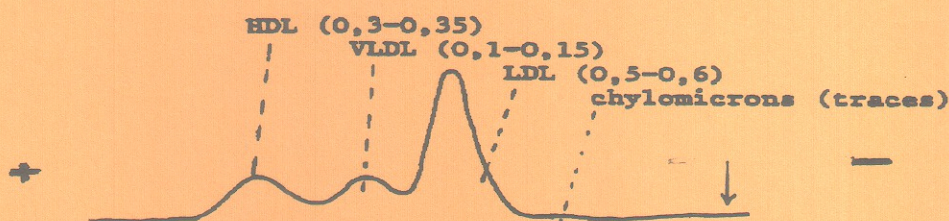
Révélation du gel: après l'avoir séché au sèche-cheveux, immerger le gel sec dans le bain de noir soudan pendant une dizaine de minutes; transférer le gel coloré, avec les pincettes, dans un bain de d'éthanol à 50 % pour enlever le surplus de colorant; le séchage du gel à l'air, au sèche-cheveux ou à l'étuve en assure la stabilisation définitive.

Résultats

La migration électrophorétique d'un plasma (ou d'un sérum) sanguin, puis la révélation par un colorant peut être exploitée à l'aide d'un densitomètre enregistreur; les profils obtenus ont dans un échantillon normal les aspects suivants:



Profil de l'électrophorétogramme d'un sérum normal obtenu à l'aide d'un densitomètre enregistreur ; entre () le % sous forme décimale de chaque fraction.



Profil des lipoprotéines sériques.

Compte-rendu :

Rechercher et relever dans un catalogue de produits chimiques, la structure des deux colorants utilisés (Ponceau S et noir soudan IV) et expliquer pourquoi ils ont des affinités pour des molécules différentes. Vous poser la question de savoir si l'utilisation d'un plasma ou d'un sérum conduit au même résultat. En ce qui concerne le profil des lipoprotéines, la fraction des HDL se situant au niveau des α_1 -globulines, comment expliquer la présence d'une très faible bande parfois observable en avant des HDL ?

Une fois que les bandes sont sèches les coller et les annoter en mentionnant le sens de migration.

II ELECTROPHORESE D'ACIDES NUCLEIQUES

Comparer les deux dispositifs installés et leurs performances respectives

Electrophorèse de fragments de restriction d'ADN:

A l'aide de la documentation fournie:

*dire comment en biotechnologie on peut contrôler la structure d'un vecteur recombinant, ou encore

*prévoir l'aspect de l'électrophorèse que l'on doit obtenir à partir du plasmide bactérien pBR 322 soumis préalablement à l'action de l'endonucléase de restriction BamHI ou RsaI

Rappeler la nature du dispositif électrophorétique, du mode de révélation...;

Electrophorèse des polynucléotides néosynthétisés lors du séquençage d'un fragment d'ADN par la technique de SANGER:

En dépouillant la documentation mise à votre disposition vous assurer que vous êtes apte à déterminer la séquence d'un fragment d'ADN à la simple observation d'une auto-radiographie; rappeler les particularités de l'incubation enzymatique, du dispositif électrophorétique, de la révélation...

II/ Les enzymes : deux exemples d'implications analytiques.

Introduction :

Les enzymes, macro molécules biologiques, sont impliquées à divers titres en analyse.

- elles peuvent être elles-mêmes quantifiées dans un milieu ; on détermine alors leur activité, c'est à dire non pas leur nombre mais leur potentiel catalytique à dégrader un substrat exogène, parfois synthétique.
- elles peuvent être utilisées en tant qu' "outil" pour doser leur substrat ; on mesure le plus souvent la quantité d'un produit apparu.
- elles peuvent être utilisées pour visualiser une réaction immunologique (E.I.A).
- etc...

Le plus souvent l'activité catalytique est non pas appréciée par disparition de substrat mais apparition de produit ou encore par transformation du produit par une oxydo réductase ; et c'est la modification de concentration d'un coenzyme nicotinique ajouté qui rend compte de la quantité de produit apparu.

En effet les coenzymes nicotiniques présentent l'avantage de voir leur absorbance très modifiée selon qu'ils sont oxydés ou réduits et dans un domaine de longueur d'onde (340 nm) où peu d'interférences interviennent (voir schéma) ; c'est le cas de la détermination de l'activité ALAT.

Dans les mesures de concentrations de substrats il est fréquemment utilisé des oxydases ; ces enzymes libèrent du peroxyde d'hydrogène ; le peroxyde d'hydrogène formé permet en présence d'une peroxydase la coloration d'un chromogène ; c'est ce qui se passe lors du dosage du glucose par la glucose oxydase ou du cholestérol par la cholestérol oxydase.

Le cholestérol sera donc dosé selon ce processus d'une part globalement c'est à dire pour l'ensemble des lipoprotéines d'un sérum, et d'autre part sur l'une des fractions lipoprotéiques.

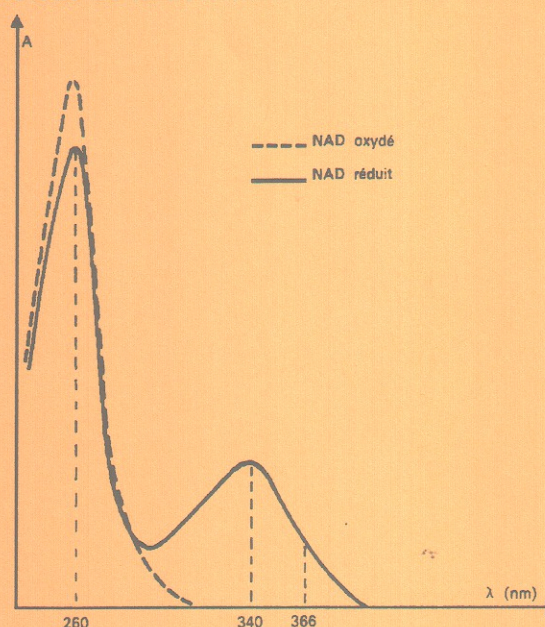


Figure : Courbes d'absorption du NAD(P) et du NAD(P)H.

1/ Détermination de l'activité de l'Alanine Aminotransférase (ALAT ou TGP).

Principe :

Le rôle de transfert d'un groupe amine sur un oxo-acide est assumé par deux enzymes essentiellement. L'étude porte sur l'une d'entre elles : l'Alanine Aminotransférase (E.C.2.6.1.2) encore appelée Transaminase Glutamo-pyruvique (TGP).

Les réactions mises en jeu pour déterminer l'activité dans le plasma sont les suivantes :



La TGP utilise comme coenzyme du phosphate de pyridoxal ; une pré-incubation de sérum avec ce coenzyme permet de s'assurer qu'il n'existe pas d'apoenzyme libre (comme c'est le cas dans la carence en vit. B6, dans la cirrhose, ou après hémodialyse, ou chez la femme enceinte).

Le pyruvate, au fur et à mesure de son apparition est transformé en Lactate par la déshydrogénase lactique (LDH) ; à l'apparition du Lactate est associée la disparition du coenzyme réduit (NADH) ; c'est donc la diminution d'absorbance de ce dernier à 340 nm qui rend compte de l'activité de transamination.

Réactifs :

- réactif 1 : enzyme, coenzymes, alanine, tampon Tris pH 7,5
- réactif 2 : 2-oxo-glutarate

Les concentrations finales dans le milieu réactionnel sont les suivantes :

- Tampon Tris pH 7,5 (à 30° C).....	100 mmol/l
- L-Alanine	500 mmol/l
- 2 oxo-glutarate.....	15 mmol/l
- Pyridoxal phosphate	0,1 mmol/l
- NADH.....	0,18 mmol/l
- LDH	1200 UI/l

Mode opératoire :

- Dans un tube à essai court introduire 1 ml de réactif 1 et 0,1 ml de sérum, mélanger et laisser incuber environ 10 minutes à 30° C pour permettre la fixation du phosphate de pyridoxal et d'atteindre l'équilibre thermique.
- Après vous être assuré que la cuve thermostatée du spectrophotomètre est libre et propre et que vous possédez la manière de régler l'absorbance de départ, ajouter au milieu d'incubation 0,1 ml de réactif 2 (déclenchant), agiter et verser aussitôt dans la cuve.
- Au bout d'une minute puis toutes les minutes pendant 3 minutes lire l'absorbance à 340 nm.

Résultats :

- Calculer la variation d'absorbance moyenne par minute: $\Delta A/\text{min}$.
L'activité exprimée en UI/l s'exprime alors : $\Delta A/\text{min} \times 1905$.
- Effectuer comme cela a été expliqué en ED une conversion du résultat en nanokatal/l

2/ Mesure de la concentration en un métabolite par réaction enzymatique (ex : cholestérolémie par la cholestérol oxydase).

Principe :

Le cholestérol circulant est l'un des constituants des diverses lipoprotéines. Il peut être dosé soit globalement soit dans l'un ou l'autre type de lipoprotéines. En effet son devenir métabolique est étroitement lié aux apoprotéines auxquelles il est associé*. Le plus souvent on a recours à une précipitation assez sélective des LDL et VLDL grâce à l'acide phosphotungstique et au chlorure de magnésium ; après centrifugation le cholestérol associé aux HDL est dosé dans le surnageant.

* Diverses méthodes peuvent être utilisées pour réaliser un fractionnement des lipoprotéines donc du cholestérol qui leur est associé. Si l'ultra-centrifugation préparative reste la méthode de référence, elle est de mise en oeuvre délicate et exige un gros volume de sérum ; l'électrophorèse peut être réalisée facilement sur acétate de cellulose (cf TP 1) ou sur gel de polyacrylamide. Des méthodes par précipitation font intervenir des polyanions (héparine), des détergents (SDS) et des cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++}).

Dosage du cholestérol :

Principe :

Le dosage du cholestérol total est effectué sur le sérum ; le dosage de la fraction HDL du cholestérol est effectué sur le surnageant obtenu après action d'un réactif précipitant.

Les réaction enzymatiques mises en jeu sont les suivantes :

cholestérol estérifié cholestérol estérase > cholestérol + acides gras

cholestérol cholestérol oxydase > cholestène-4-one-3 + 4 H₂O₂

2 H₂O₂ + phénol + amino-antipyrine péroxydase > quinone-imine

Pourquoi l'expression "acides gras" est-elle écrite au pluriel?

Réactifs :

- réactif précipitant :

* acide phosphotungstique 13,9 mmol/l
* chlorure de magnésium pH 6,15 490 mmol/l

- réactif de dosage (concentration finale dans le milieu réactionnel) :

* cholestérol estérase 150 UI/l
* cholestérol oxydase 70 UI/l
* peroxydase 1000 UI/l
* cholate de sodium 2,3 mmol/l
* amino-4-antipyrine 0,25 mmol/l
* tampon phosphate pH 6,5 100 mmol/l
* phénol 16 mmol/l

- cholestérol étalon à 5,17 mmol/l (2 g/l)

Mode opératoire :

- Dans un tube à centrifuger introduire 1 ml de sérum et 100 µl de réactif précipitant ; mélanger et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes (environ 5000 tours/min) ; le cholestérol HDL sera dosé sur le surnageant.
- Pour le dosage réaliser la galerie suivante (µl) :

	T	Etalon	C _T	C _{HDL}
Sérum	-	-	10	-
Surnageant	-	-	-	10
Etalon	-	10	-	-
Eau	10	-	-	-
Rf. de dosage	1000	1000	1000	1000

Mélanger et incuber 3 minutes à 37° C.
 Mesurer l'absorbance dans des cuvettes "semi-micro" à 500 nm.

Résultats :

Calculer la concentration en cholestérol total et la concentration de la fraction HDL.

III/ Extraction d'ADN.

Introduction :

Bien que l'ADN existe dans tous les tissus à cellules nucléées (donc pas les G.R.), on est conduit à effectuer son extraction à partir de tissus bien différents selon sa destination :

- soit on veut réaliser une extraction "industrielle" portant sur de très grosses quantités d'ADN dont les degrés de pureté et d'intégrité sont relativement modestes ; on utilise alors comme source des tissus abondants, très riches en ADN et à activité déoxyribonucléase faible, tels que le tissu lymphoïde (thymus ou rate d'animaux d'abattoir), le sperme de poissons, des algues etc...
- soit on réalise un isolement d'ADN dans un but analytique, diagnostique ou de production par biotechnologies ; dans tous les cas où cet ADN est destiné à des techniques de biologie moléculaire, il doit posséder une pureté et une intégrité très élevées ; on a alors recours aux leucocytes, à des cellules foetales, des biopsies, des pièces opératoires etc...

Principe :

Le tissu est homogénéisé dans une solution saline isotonique tamponnée avec du citrate de sodium à pH 7,4. Dans ces conditions la déoxyribonucléoprotéine est insoluble et se sépare bien des autres protéines, de plus le citrate de sodium inhibe l'activité déoxyribonucléase en liant les ions calcium ou magnésium qui sont des co-facteurs de cette enzyme. Le procédé d'extraction doit être pratiqué au froid ce qui limite l'activité de la déoxyribonucléase non neutralisée. Des récipients en verre et en plastique sont utilisés tout au long de la manipulation afin d'éviter la dégradation de l'ADN. L'ADN est finalement précipité sous forme fibreuse blanchâtre par addition d'éthanol, après avoir été solubilisé dans du NaCl 2 M.

Matériel :

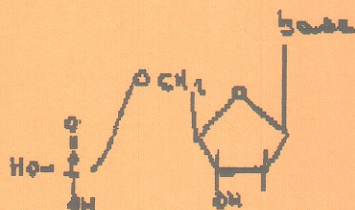
- homogénéiseur à couteaux coaxiaux
- centrifugeuse réfrigérée

Réactifs :

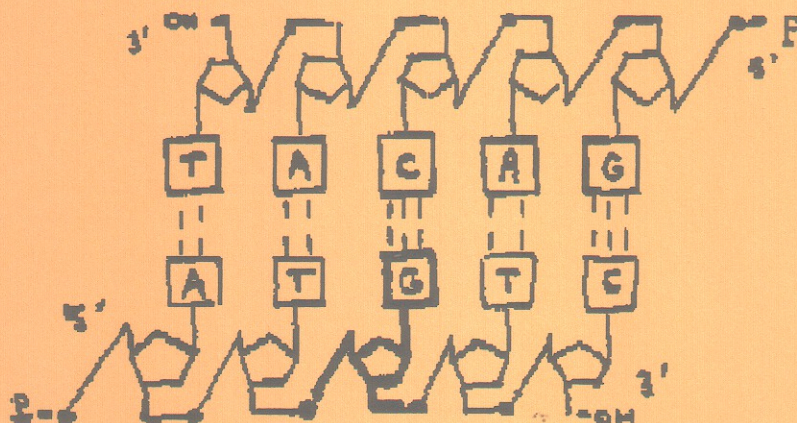
- tissu humain prépesé.....4 g
- solution de chlorure de sodium 0,14 M tamponnée à pH 7.4
avec du citrate de sodium (0,02 M)
- solution de chlorure de sodium.....2 M
- éthanol à.....95 %

Mode opératoire :

- Homogénéiser le tissu dans un tube à centrifuger en polyéthylène contenant 8 ml de solution saline tamponnée pH 7.4.
- *- Centrifuger 5 minutes à 5 000 G.
- Eliminer le surnageant par retournement et homogénéiser à nouveau le précipité dans 8 ml de solution saline tamponnée pH 7.4.
- *- Centrifuger 6 minutes à 6 000 G ; éliminer le surnageant.
- Dissoudre le précipité dans 20 ml de solution de chlorure de sodium 2 M.
- Mettre au réfrigérateur (freezer) pendant 30 minutes.
- Centrifuger au froid pendant 10 minutes à 40 000 G.
- Verser le surnageant dans une éprouvette contenant 40 ml d'éthanol en agitant continuellement à l'aide d'une baguette de verre. L'ADN précipite sur la baguette sous forme de fines fibres ; s'il n'est pas suffisamment blanc et fibreux le laver à nouveau dans 40 ml d'éthanol propre.
- Faire glisser l'ADN sur une coupelle .
- Ne pas jeter l'alcool dans l'évier mais dans un flacon de récupération de solvants.



Un nucléotide



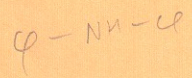
Fragment d'ADN bicaténaire

IV/ Analyse des constituants de l'ADN.Introduction :

..... Une fois l'ADN extrait différents contrôles peuvent être effectués :

- la mesure d'absorbance différentielle à 260 nm et 280 nm; elle permet de mettre en évidence une éventuelle contamination protéique.
- l'analyse des bases par chromatographie en couche mince après hydrolyse; elle permet en l'absence d'uracile d'écartier la présence d'ARN.
- les dosages colorimétriques du phosphate et de déoxyribose permettent pour des préparations "industrielles" d'ADN d'apprécier le degré de pureté d'un lot, selon qu'il y a similitude ou discordance entre les pourcentages pondéraux attendus et observés.

C'est la concentration du déoxyribose que nous nous proposons de mesurer.

1/ Dosage du déoxyribose.Principe :

La condensation en milieu acide du déoxyribose et de la diphénylamine conduit à une coloration bleue. Il est à noter que la partie réactive du sucre semble être ici le groupe méthylène, ce qui implique qu'une hydrolyse préalable de l'ADN n'est pas nécessaire.

Réactifs :

- solution étalon de déoxyribose à 80 mg/l
 - ADN préparé en TP titrant selon les lots de D_2 2.5 à 3.5 g/l
 - ADN préparé en milieu industriel titrant D_1 7.5 g d'ADN/l
 - réactif de DISCHE :
 - * diphénylamine 10 g
 - * acide acétique cristallisable 1000 ml
 - * acide sulfurique 100 ml
- (se conserve à 4°C et à l'obscurité; réactif toxique à manipuler avec précaution. L'acide acétique cristallisant au froid il est indispensable d'homogénéiser le réactif avant prélèvement).

Mode opératoire :

1 → 24 + 1
4/100
40 + 360 → 1000

- On dilue chacune des 2 solutions d'ADN industriel et préparé en TP au 1/25 dans l'eau distillée ; (appelons les solutions obtenues respectivement D_1 et D_2).
- Réaliser les dosages de la façon suivante (en tubes vissés):

Réactifs (ml)	T (BR)	Etalon	Ind.	TP
Solution étalon de déoxyribose	0	1	0	0
Solution d'ADN Ind: D ₁ (...mg/l)	0	0	1	0
Solution d'ADN _{TP} D ₂ (...mg/l)	0	0	0	1
Eau distillée	1	0	0	0
Rf. de DISCHE	2	2	2	2

- Porter 10 minutes au bain-marie bouillant.
- Photométrer à 600 nm, le zéro d'absorbance étant fait sur le tube T.

Résultats :

- Après avoir déterminé la concentration en déoxyribose dans D₁ et D₂, la calculer dans les solutions d'origine.
- Etablir un rapport de concentration pondérale entre déoxyribose et ADN.

2/ Dosage des phosphates.

Principe :

En milieu acide et en présence d'un réducteur (le sulfate ferreux), les ions phosphates inorganiques forment avec le molybdate d'ammonium un complexe bleu-vert dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en ions phosphates. Une hydrolyse préalable de l'ADN est nécessaire qui va réaliser une minéralisation des phosphates.

Réactifs :

- solution étalon de phosphates :
 - * phosphate monopotassique (KH₂PO₄; M_r=136.1) : 440 mg/l 3.23 mol/l
 - réactif réducteur :
 - * polyvinyl pyrrolidone 500 µmol/l
 - * acide sulfurique 500 mmol/l
 - * sulfate ferreux 540 mmol/l
 - réactif molybdique :
 - * molybdate d'ammonium 2.8 mmol/l
 - * acide sulfurique 500 mmol/l
- Le réactif de travail est obtenu par mélange au moment de l'emploi à parties égales de réactif réducteur et de réactif molybdique.
- acide sulfurique 10 N (dilué au 1/4)
 - acide perchlorique concentré (70 % ou 12 N)

Mode opératoire :

- + Ind*
- Hydrolyse: dans un tube vissé introduire 2 ml de solution d'ADN puis 2 ml d'acide perchlorique 12 N. Laisser le tube 1 heure dans un bain-marie bouillant ; refroidir ; ajouter 8 ml d'eau déminéralisée et écraser le précipité charbonneux ; porter le tube 5 minutes au bain- marie bouillant puis filtrer.
- Dosage: réaliser le dosage sur 3 tubes à essais (volumes ml)

	<i>ml</i>	T(BR)	Etalon	ADN _{TP}	ADN _{Ind}
Hydrolysate ADN _{TP}		-	-	0,1	-
Hydrolysate ADN _{Ind}		-	-	-	0,1
Etalon phosphate à 440 mg/l		-	0,1	-	-
Eau déminéralisée		0,1	-	-	-
Réactif de travail		2,5	2,5	2,5	2,5

Au bout de 10 minutes, mesurer l'absorbance à 690 nm (coloration stable mais dépendant de la température).

Résultats :

Exprimer pour la solution d'ADN préparée en TP et pour la solution d'ADN industriel la concentration en phosphates en pensant de faire intervenir dans vos calculs la dilution réalisée lors de l'hydrolyse.

V/ Etude de deux produits de dégradation des protéines :
Mise en oeuvre d'une réaction colorimétrique.

Introduction :

Il vous a été expliqué en 2^è A (Bonnes Pratiques de Laboratoire / Spectrophotométrie) que pour quantifier par spectrophotométrie un métabolite en solution 3 cas peuvent se présenter :

- le métabolite absorbe suffisamment sans interférence notable du milieu biologique (plasma, urine, cellules ...), dans le domaine de l'UV ; on mesure alors l'absorbance de la solution à une longueur d'onde située entre 190 et 400 nm.
- le métabolite absorbe suffisamment sans interférence notable du milieu biologique, dans le visible (en d'autres termes, il est coloré) ; on mesure alors l'absorbance de la solution native à une longueur d'onde (le plus souvent complémentaire de celle du composé) située entre 400 et 800 nm.
- les 2 cas précédents étant toutefois exceptionnels, on est le plus souvent amené à envisager une autre approche ; le métabolite n'absorbe pas ou trop peu dans l'UV ou le visible, ou subit trop d'interférences de la part du milieu ; on réalise un dérivé qui absorbe dans l'UV ou le visible, éventuellement en se libérant d'une interférence avec le milieu.

C'est ce 3^è cas qui se trouve illustré par la transformation par réaction chimique d'une part de l'UREE, d'autre part de la BILIRUBINE, qui sont tous deux des produits de dégradation de protéines.

Dosage de l'urée plasmatique :

Principe :

On rencontre dans le plasma divers composés azotés non protéiques tels que urée, aminoacides, créatinine, ammoniacque, acide urique ... Le catabolisme protéique peut être apprécié par celui qui est quantitativement le plus important : l'urée. L'urée donne avec la diacétylmonoxime une diazine rose ; la réaction est sensibilisée et stabilisée par le fer et le thiosemicarbazide. Cette méthode présente l'avantage de permettre un microdosage de l'urée sanguine sans déprotéinisation préalable du plasma. La coloration rose apparue est stable et photométrable à 525 nm.

remarques:

- noter que des métabolites cellulaires possédant un groupement fonctionnel d'urées substituées R-NH-CO-NH-R' tels que par exemple la citrulline réagissent également avec la D.A.M. pour donner une diazine
- il vous sera développé en ED un protocole de dosage utilisant une méthode enzymatique (technique à l'uréase).

Réactifs :

- solution de chlorure de sodium à9 g/l
- réactif 1 (conservation 3 mois) :
 - * diacétylmonoxime 1 g
 - * eau distillée 100 ml
- réactif 2 :
 - * thiosemicarbazide 0,18 g
 - * eau distillée 1000 ml

- réactif 3 :
 - * chlorure ferrique 100 mg
 - * acide sulfurique à 25 % (v/v) 1 l
- réactif 4 ; à préparer extemporanément par l'étudiant en réalisant le mélange suivant :
 - * réactif 1 20 ml
 - * réactif 2 10 ml
 - * réactif 3 70 ml
- solution étalon d'urée à 40 mmol/l (stock) :
 - * urée 0,24 g
 - * eau distillée 100 ml
- solution étalon d'urée à 400 μ mol/l
(cette solution est réalisée par dilution au 1/100 de la solution stock, dans de l'eau distillée).

Mode opératoire :

- diluer le plasma dans un tube à essai dans les proportions
 - * plasma (pipette autom. 200 μ l) 0,2 ml *0,2 → 10*
 - * solution de chlorure de sodium à 9 g/l 9,8 ml *1/500*
- réaliser dans des tubes vissés les mélanges selon les volumes indiqués ci-dessous (en ml) :

Tubes	T	1	2	3	DA	DB
Solution étalon d'urée 400 μ mol/l	0	0.1	0.2	0.4	0	0
Sol. NaCl à 9 g/l	0.5	0.4	0.3	0.1	0.4	0
Plasma dilué	0	0	0	0	0.1	0.5
Réactif 4	5	5	5	5	5	5

↳ 0 ↳ 80 ↳ 160 ↳ 320 ↳ 1/5 x 50 ↳ 1/500
↳ 1/2500

- le dosage est fait sur deux prises d'essai différentes : la prise d'essai A est utile pour des plasmas dont la prise de 0,5 ml conduit à une absorbance dépassant la gamme d'étalonnage.
- homogénéiser parfaitement tous les tubes sans mettre le mélange en contact avec les doigts : boucher les tubes et les porter dans un bain-marie bouillant 8 minutes.
- refroidir sous l'eau froide et photométrer à 525 nm.

Résultats :

Tracer la courbe Absorbance = f (concentration en urée). En déduire la concentration en urée de l'échantillon en mmol/l.

Dosage de la bilirubine plasmatique totale :

Principe :

La bilirubine doit son origine essentiellement à la dégradation du pigment porphyrinique de l'hémoglobine.

La bilirubine est normalement biglucurono-conjuguée au niveau hépatique et devient alors hydrosoluble et éliminée par voie biliaire ; libre elle est non hydrosoluble et transportée essentiellement par la sérumalbumine, tant que la capacité de cette dernière n'est pas dépassée.

Des molécules ayant une affinité pour le même site de fixation que la bilirubine déplacent cette dernière du transporteur, c'est le cas du benzoate de sodium, de la caféine, mais des produits chimiques comme le diméthylsulfoxyde réalisent aussi une bonne dissociation du complexe protéine-ligand.

Que ce soit directement pour la bilirubine conjugquée ou après addition d'un "dissociant" pour la bilirubine libre, il est possible de condenser le -CH₂- médian de la molécule avec un sel de diazonium, et par mesure spectrophotométrique de la coloration rouge apparue en milieu acide d'apprécier la concentration de la bilirubine.

Réactifs :

- réactif 1 :
 - * acide sulfanilique (ac. amino-4-benzène sulfonique) 4,3 g
 - * acide chlorhydrique 10 N 7,4 ml
 - * DMSO (diméthylsulfoxyde) 546 g
 - * eau déminéralisée Q.S.P 1000 ml
- réactif 2 :
 - * solution de nitrite de sodium à 0,14 g dans 100 ml d'eau
- plasma étalon titré.

Mode opératoire :

- préparer chaque jour le réactif de diazotation par mélange de 20 ml de réactif 1 et 1 ml de solution de nitrite de sodium.
- réaliser la galerie de dosage suivante :

	BR	Etalon	Dosage
Plasma à doser	-	-	100 µl
Plasma titré	-	100 µl	-
Eau	100 µl	-	-
Réactif 1	1 ml	-	-
Réactif de diazotation	-	1 ml	1 ml

- mélanger et lire à 550 nm au bout de 5 minutes, sinon placer les tubes en attente à l'obscurité ; veiller à bien faire la mesure spectrophotométrique dans des cuves semi-micro ; pour des plasma de nouveaux ou très ictériques la prise d'essai sera limitée à 20 µl. → 1/5^e

Résultats :

Calculer la concentration en bilirubine totale du plasma à doser. Sous quelle forme moléculaire doit-elle être ? Comment pourrait-on apprécier la proportion de bilirubine conjugquée ?

VI/ Etude de l'affinité d'une protéine pour un ligand.

Introduction :

Dans la plupart des disciplines de biologie il est nécessaire de quantifier les capacités de liaison entre protéines et ligands. Citons quelques exemples de couples fréquemment étudiés :

- une protéine de transport plasmatique vis à vis d'une molécule endogène (ex. hormone), d'un xénobiotique (médicament, etc...).
- une enzyme et un substrat ou un inhibiteur.
- un récepteur et une hormone ou une anti hormone.
- etc...

Ces protéines sont caractérisées vis à vis d'un ligand par leur spécificité, leur affinité et leur capacité; ces caractéristiques peuvent être mesurées par différentes techniques.

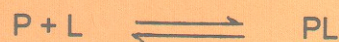
Un arsenal de techniques très variées est disponible dont la caractéristique est d'isoler dans un compartiment la macro molécule ayant fixé le ligand et éventuellement du ligand libre, et dans un autre compartiment exclusivement du ligand non lié.

Citons comme techniques : l'ultra-filtration, la gel-filtration, le partage entre phases liquides non miscibles, la dialyse à l'équilibre etc... Cette dernière technique à l'avantage d'être la moins perturbatrice vis à vis de l'équilibre entre formes liée et non liée.

Principe :

Nous nous proposons d'étudier l'affinité d'un ligand exogène tel que le salicylate de sodium pour une protéine de transport plasmatique la sérum-albumine, par la technique de dialyse à l'équilibre.

La protéine P est mise en présence d'un excès de ligand L on obtient l'équilibre :



Avec :

- constante d'équilibre d'association :

$$K_A = \frac{[PL]}{[P] \otimes [L]}$$

- constante d'équilibre de dissociation :

$$K_D = \frac{1}{K_A}$$

Nous déterminons par la méthode de SCATCHARD une constante d'affinité, K_A dans le sens de l'association, K_D dans le sens de la dissociation (on peut rapprocher cette dernière de K_m régissant l'affinité entre enzyme et substrat).

Une capacité de transport exprimée en nombre de sites potentiels par molécule transporteuse sera également estimée.

Manipulations :Technique de la dialyse à l'équilibre.

Disposer dans 4 sacs de dialyse le même volume de sérum-albumine (5 à 10 ml) ; les bains tamponnés dont le volume doit être de dix fois celui du sac doivent avoir une concentration initiale de médicament de 500, 1000, 2000, 4000 $\mu\text{mol/l}$; fermer les récipients de bain pour éviter l'évaporation après y avoir placé des barreaux magnétiques pour en assurer l'homogénéité ; l'équilibre est atteint en 20 heures à 20 ° C.

Réactifs :

- membrane tubulaire de dialyse en cellulose régénérée de porosité ≤ 3 nm (perméabilité moléculaire ≤ 13000 D).
- solution de sérum-albumine placentaire humaine ($M_r = 69000$) à 34,5 g/l.
- solution tampon Tris, HCl (0,1 M ; pH 7,4).
- Solution stock de salicylate de sodium ($M_r = 160$) à 16 g/l.

Technique de dosage du salicylate de sodium libre.

Doser dans chaque bain en fin de dialyse le salicylate de sodium libre selon la technique de TRINDER (sur 1 ml de prélèvement) ; en milieu acide les salicylates forment avec le fer trivalent un complexe pourpre-violacé photométrable à 540 nm. Parallèlement sera mesurée l'absorbance d'une partie aliquote des bains avant dialyse : cette série fera office de gamme d'étalonnage ; volume de réactif par tube : 3 ml.

Réactif de TRINDER :

- | | |
|--|---------|
| - acide chlorhydrique concentré | 10 ml |
| - nitrate ferrique, 9 H ₂ O | 40 g |
| - chlorure mercurique | 40 g |
| - eau Q.S.P | 1000 ml |

Exploitation des résultats selon la méthode de SCATCHARD.

- Tracer la courbe d'étalonnage: $\text{absorbance} = f([\text{salicylate}]_{\text{initiale}})$.
 - Tracer la courbe de saturation en coordonnées directes : $[\text{ligand lié}]^* = f([\text{ligand}]_{\text{initiale}})$.
 - Etablir un tracé selon SCATCHARD : $\frac{[\text{ligand lié}]}{[\text{ligand libre}]} = f([\text{ligand lié}])$
- * cf ED pour les calculs de fraction liée

Résultats :

- Estimer la concentration "saturante" en médicament et la valeur approximative de la constante de dissociation K_D correspondante.
- Par le procédé de SCATCHARD déterminer la (ou les) constantes d'association K_A et le nombre de sites potentiels du ligand sur la protéine.

COMMENT FAIRE UN COMPTE-RENDU

Pourquoi faire un compte rendu :

Une séance d'enseignement pratique a pour but de montrer l'interaction permanente entre travail mental (c'est-à-dire acquisition des connaissances) et le travail pratique (c'est-à-dire utilisation de l'expérience pour expliquer ou pour faire progresser ces connaissances). Pour mettre en évidence cet aspect, il est nécessaire de rendre compte de l'expérience conduite lors d'une séance d'enseignement pratique.

Pour être tout-à-fait profitable, toute séance demande un minimum de préparation :

- lire le protocole dans son INTEGRALITE ;
- dresser un PLAN DE TRAVAIL à partir de ce protocole. Cela assure un gain de temps et une baisse des causes d'erreur lors des séances ;
- penser à vérifier que le matériel est propre à l'emploi (au sens propre et au sens figuré) ;
- essayer de retrouver les éléments du cours qui ont servi de support à la manipulation ou inversement, ce qui, dans le travail pratique aide à la compréhension du cours.

A partir de là, il convient à l'étudiant de dégager pour tout travail pratique les éléments suivants :

I Une identification précise (de l'opérateur et de l'échantillon):

- date
- nom (en majuscule)
- numéro de poste
- référence complète du ou des échantillons : il paraît aberrant de rendre le résultat d'un échantillon non identifié.

II Le but de l'expérimentation :

Ce but peut être défini dans le TITRE ou L'INTITULE :

ex : "Extraction d'ADN", "Recherche de sucres dans l'urine", mais il peut être également explicité : dans quel(s) but(s) pourrait être effectuée une extraction d'ADN ?

III Le principe

Il expose succinctement quelle loi, quelle réaction chimique, quelle méthode physico-chimique ... va être utilisée. Attention, il ne s'agit en aucun cas de recopier un protocole opératoire ;

IV Les résultats

Un résultat est un témoin de ce qui a été réalisé ; rendre ses résultats signifie donner tous les éléments permettant de les analyser de façon critique selon le but recherché; Il faut donc écrire tous les résultats bruts observés ou mesurés. Puis, à partir de là, il faut éventuellement :

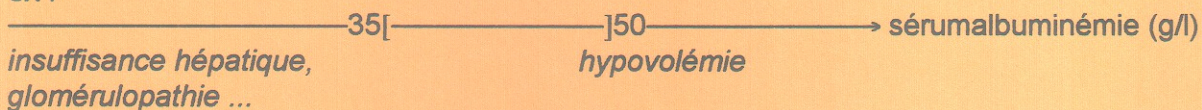
- établir des tableaux (ex : concentration et absorbance) ;
- faire des CALCULS dont la validité ne peut être vérifiée que si on a les éléments de base (signaler les dilutions effectuées autres que celles prescrites)
- faire des CALCULS D'ERREUR qui mesurent la valeur du travail ;
- concrétiser et illustrer les résultats par des COURBES qui, pour être utilisables, doivent être lisibles, sans ambiguïté (penser au titre), sans oublier les unités pour éviter les erreurs ; elles doivent être intégrées dans le texte et collées (pas de trombonne) ;
- faire des SCHEMAS :
 - ex :
 - schéma d'une plaque de chromatographie en couche mince révélée ;
 - positionner sur un axe ou dans un histogramme la concentration obtenue pour un métabolite en la replaçant dans un intervalle physio-pathologique.
- donner des TRACES ou SUPPORTS DIVERS :
 - ex :
 - rendre les bandes ou les gels séchés d'électrophorèse ; ils doivent être soigneusement collés et commentés (penser de les orienter au moyen de la polarité).

V L'interprétation des résultats

L'interprétation des résultats consiste à faire le bilan ou critique du travail réalisé, c'est-à-dire qu'il faut comparer ce qu'on cherche à obtenir et ce qu'on a obtenu, en rappelant la norme fixée.

Un résultat de biochimie clinique pourra faire apparaître diverses étiologies correspondant à des valeurs anormales du paramètre mesuré.

ex :



VI La conclusion

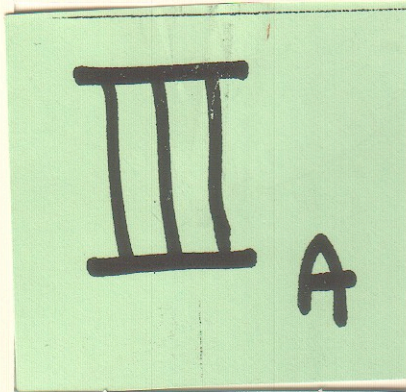
Elle consiste en une prise de position claire et précise par rapport au résultat obtenu et doit dire si l'objectif qu'on s'était donné dans le BUT de la manipulation est atteint :

ex :

- la marge d'erreur obtenue est acceptable ou non ;
- le résultat de l'analyse biologique est normal ou pathologique : dans ce type d'analyse où l'opérateur engage sa responsabilité, celui-ci doit faire apparaître son nom en toute lettre suivi de sa SIGNATURE.
- le résultat est conforme à la norme légale ou non ;
- le produit analysé peut être utilisé ou doit être rejeté (selon qu'un ADN est destiné à la cosmétologie ou à faire une sonde, les critères de pureté seront différents).

Cette partie peut être aussi l'occasion de faire des suggestions visant à améliorer un protocole, simplifier des opérations ...

PROTEINOGRAMME D'UN PATIENT PRESENTANT UN SYNDROME INFLAMMATOIRE

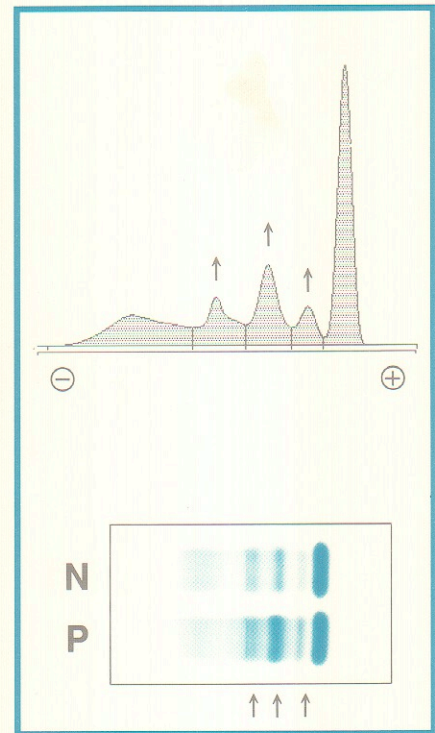


DOSSIER CLINIQUE

Malade (30 ans) consulté pour fièvre élevée et douleurs abdominales avec absence de traumatisme.

BILAN BIOLOGIQUE

Vitesse de sédimentation augmentée (40 mm en 1^{re} heure).
Protidémie subnormale (70 g/l).



RESULTATS

Le profil électrophorétique montre une importante augmentation des zones $\alpha 1$, $\alpha 2$, et β . Conjointement aux données cliniques, ces résultats sont caractéristiques d'un état inflammatoire dont la nature aigüe reste à confirmer.

DIAGNOSTIC

Etat inflammatoire de type aigü, probablement dû à une infection bactérienne, suite à une intoxication alimentaire.

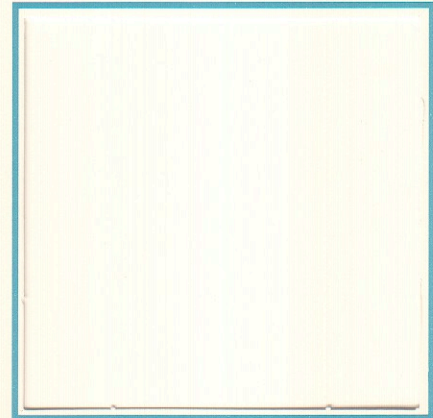
HYDRAGEL-DIAGNOSTIC

PROTEINES

APPLICATIONS CLINIQUES

Principales anomalies du protéinogramme

PATHOLOGIES	PROTEINOGRAMME - Variations en valeurs pondérales				
	Alb	$\alpha - 1$	$\alpha - 2$	$\beta 1 - 2$	γ
Hypoprotidémie Profil exudatif (brûlures, gastroentéropathies).	↓	N ou ↑	N ou ↑	N ou ↓	N ou ↓
Insuffisance hépatocellulaire Hépatites Cirrhoses	N ou ↓ ↓	N ou ↓ ↓	↓ ↓	N ou ↑ (N ou ↑ — ↑) Bloc	N ou ↑
Maladie inflammatoire Aigüe (RAA) Chronique (maladies infectieuses, néoplasiques, allergiques, rhumatismales).	N ou ↓ N ou ↓	↑ ↑	↑ ↑	N ou ↑ N ou ↓	N ↑
Syndrome néphrotique	↓	N ou ↑	↑	↑ (β lipo)	↓
Hypergammaglobulinémies Polyclonales (pathologies hépatiques, infectieuses, maladies autoimmunes). Monoclonales (maladies de Kahler, Waldenström, L.L.C., maladies autoimmunes).	↓ N ou ↓	N ou ↑ N	N ou ↑ N ou ↑	N N ou ↑	↑ ↑ (Présence d'un pic monoclonal).



ELECTROPHORESE

sebia

23, rue Maximilien Robespierre - 92130 Issy-les-Moulineaux - France

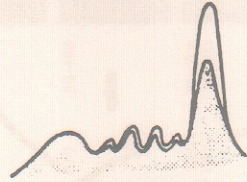
PRAXIS ♦

sebia

TRACES CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX SYNDROMES

AFFECTANT L'ELECTROPHOREGRAMME

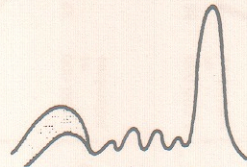
D' UN PLASMA SANGUIN



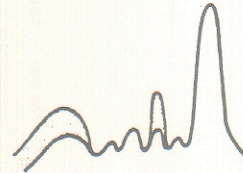
dénutrition (alb. ↓)



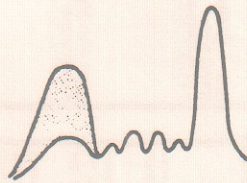
syndrome inflammatoire (α_2 glob ↑)



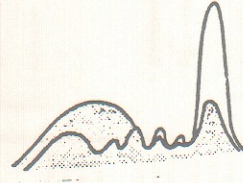
réponse immunitaire (γ glob ↑)



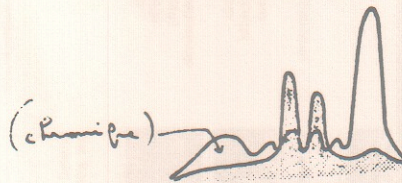
syndr. infectieux-inflamm. (α_2 γ glob ↑)



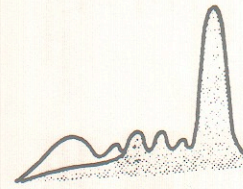
parasitose (γ glob ↑↑)



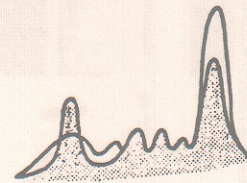
cirrhose (↑ IgA γ glob rapides, ↓ alb)



syndrome néphrotique



syndr. agammaglobulinémique



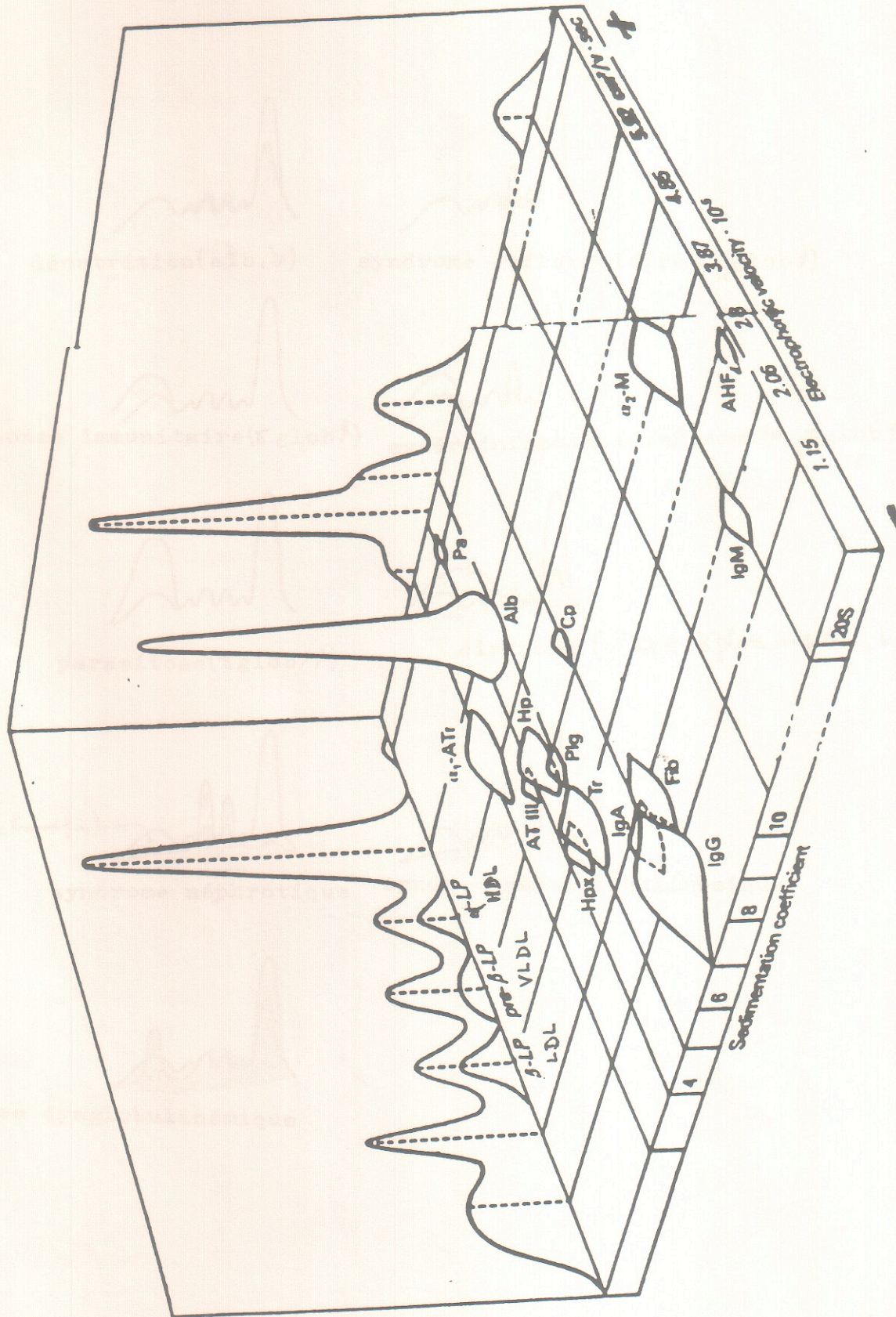
syndrome dysglobulinémique

Protéines (synonymes)	Poids moléculaire	Teneur en peptides %	mg/100 ml de sérum (plasma) valeurs moyennes limites	Fonction biologique (allotypies)	Variations pathologiques (déficit héréditaire)
Préalbumine	61 000	99%	25	fixation de la thyroxine 1, 2, 3, 4	- diminution dans les affections hépatiques graves
Albumine	69 000	100%	4400	fonction osmomotique; réserve protéique, transport d'ions, de pigments, etc. (bisalbuminémie)	- diminution dans les cirrhoses et les néphroses, etc.
α_1 -glycoprotéine acide (orosomucoïde; α_1 -sérummucoïde)	44 100	62%	90	(génotypes: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L)	- augmentation dans les états inflammatoires chroniques, la polyarthrite chronique évolutive, les tumeurs malignes
α_2 -lipoprotéine (lipoprotéine de haute densité) H ₂ L	200 000	45%	360	transport de lipides, d'hormones, etc.	- diminution dans les affections hépatiques (maladie de Tangier)
β_1 -antitrypsine (α_1 -3,5 glycoprotéine)	45 000	86%	290	protection	- augmentation dans les affections inflammatoires (hypo- α_1 -antitrypsinémie, diminution dans l'emphysème)
Prothrombine (facteur II de coagulation)	~ 60 000				- diminution au cours des affections hépatiques et du traitement anticoagulant
β -globuline (group-specific component)	50 800	96%	40	(génotypie à l'électrophorèse)	- diminution dans les affections hépatiques graves
Inhibiteur de l'inter- α -trypsine	50	91%	50		
Cérotoplasmine	160 000	89%	30	propriétés oxydatives	(diminution dans la maladie de Wilson)
Zn- α_2 -glycoprotéine	41 000	85%	5		
α_2 -HS-glycoprotéine (Ba- α_2 -glycoprotéine)	49 000	87%	60		
β -lipoglobuline	(100 000)	81%	160	combinaison avec l'hémoglobine propriétés peroxydases (génotypes: Hp 1-1, 2-1, 2-2)	- diminution dans les affections hépatiques et l'anémie hémolytique - augmentation dans les états inflammatoires
α_2 -macroglobuline	820 000	92%	240 290	inhibiteur (plasmine), fixe proenzymes de la plasmin (fibrinolyse, proactivateur)	- augmentation dans les affections hépatiques la néphrose, le diabète
Fibrinogène (prothrombino) (prothrombino)	143 000	~ 91%	30	transport de lipides (cholestérol, hormones, etc.) (génotypes: Ag, Lp, Ld)	- diminution au cours des fibrinolyse thérapeutiques
β -lipoprotéine (lipoprotéine de faible densité) L ₂ L	3 200 000	~ 19%	530	fixation de l'hème	- augmentation dans la néphrose (abétalipoprotéinémie)
Hémopexine (B, B-globuline)	80 000	77%	100	facteur du complément (est converti dans le sérum en β_1 , A + α_2 D-globuline)	- diminution dans l'anémie hémolytique
β_2 -C-globuline (constituant du complément C3)	S 20 w 9.5 S	97%	110	facteur du complément	- diminution dans les maladies autoimmunes (glomérulonéphrite, lupus érythémateux, etc.)
E-globuline (constituant du complément C4)	230 000	30	20-40	fixation et transport du fer (génotypie à l'électrophorèse)	- diminution dans les néphroses et tumeurs malignes
Transferrine (sidérophiline)	90 000	95%	295	facteur de coagulation	- diminution en cas d'atteinte du parenchyme hépatique et dans l'hyperfibrinolyse (athrombogénémie)
Fibrinogène (facteur II de coagulation)	341 000	97%	(300)		

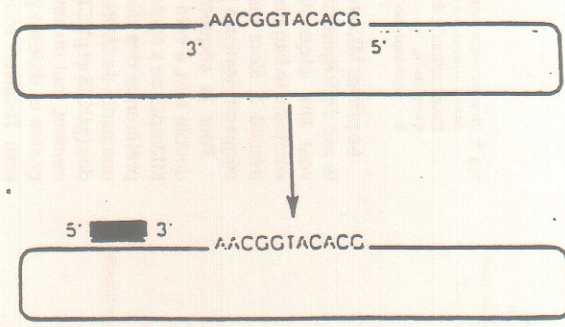
Protéines (synonymes)	Poids moléculaire	Teneur en peptides %	mg/100 ml de sérum (plasma) valeurs moyennes limites	Fonction biologique (allotypies)	Variations pathologiques (déficit héréditaire)
Facteur de stabilisation de la fibrine (facteur XIII de coagulation)	290 000	95%	(1-4)		- diminution dans les retards de cicatrisation
Protéine C réactive		< 1			- augmentation dans les états inflammatoires aigus
β_2 -glycoprotéine I	40 000	81%	20		- (déficit familial en β_2 -glycoprotéine I)
β_2 -glycoprotéine II	~ 60 000	94%	18		
β_2 -glycoprotéine III	35 000	90%	10		
γ -G-globuline (IgG; γ_1 ; γ_2 ; γ_3 -globuline)	160 000	97%	1250		- augmentation dans les affections hépatiques, les infections chroniques, les myélomes - diminution dans les syndromes de carence en anticorps
γ -A-globuline (IgA; γ_4 ; β_4 -globuline)	160 000	92%	210		- augmentation dans la cirrhose, les infections chroniques, les myélomes - diminution dans les syndromes de carence en anticorps (ataxie-télangiectasie)
γ -M-globuline (IgM; β_1 M-; 19S- γ -globuline)	1 000 000 et polymères	88%	125 160		- augmentation dans les infections chroniques (trypanosomiase, etc.) - macroglobulinémie de Waldenström, affections hépatiques - diminution dans les syndromes de carence en anticorps, les myélomes
γ -D-globuline	150 000		3		
γ -E-globuline	190 000	89%			

[= facteurs de coagulation et de fibrinolyse]
 = protéines de transport
 = constituant du complément
 = enzymes

Répartition des protéines plasmatiques en 5 familles électrophorétiques (répartition sur alectate de cellulose coloration au rouge foncé) : albumine, α_1 , β_2 , γ -globulines.



TP 1 PRINCIPE DE SEQUENCAGE SELON LA METHODE DE SANGER EN UTILISANT LE PHAGE M13 COMME VECTEUR .

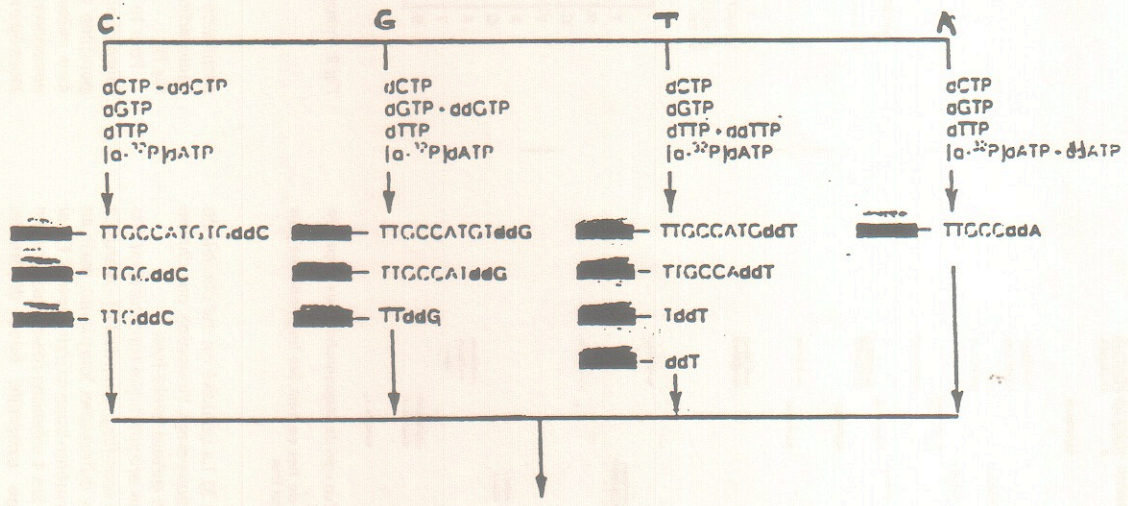


ADN de M13 simple brin contenant l'insertion à séquencer (utilisée en fait comme matrice)

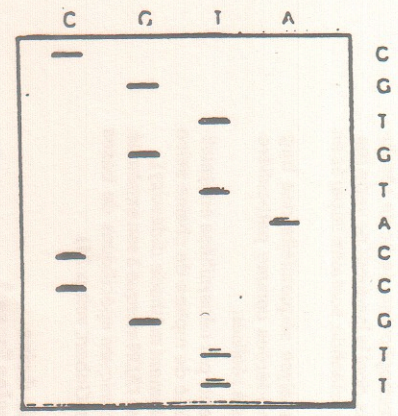
hybridation avec l'amorce en 5'

polymérisation avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I

4 REACTIONS DE SEQUENCE incubées en parallèle



ELECTROPHORESE ET AUTORADIOGRAPHIE



la séquence se lit :
 5' TTGCCATGTGC 3'
 (brin complémentaire du brin inséré)

Analyse de la séquence de fragments d'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est, comme chacun sait, le porteur des informations héréditaires de la cellule. L'analyse séquentielle des fragments d'ADN est par conséquent une étape essentielle vers l'interprétation de l'information génétique d'un être vivant. Après la découverte de ce que l'on appelle les endonucléases de restriction, il est devenu possible de décomposer les molécules d'ADN - de par nature extrêmement longues - en fragments plus courts et bien définis, et d'obtenir leur prolifération grâce aux techniques de clonage d'ADN. Pour déterminer la séquence, la portion d'ADN ainsi obtenue et développée est alors décomposée encore une fois en un mélange de tous les sous-fragments possibles à l'aide de techniques de travail établies décrites ci-après, puis séparée sur gel polyacrylamide par électrophorèse de haute résolution. Les sous-fragments, dont la longueur ne varie respectivement que d'un nucléotide, sont ainsi séparés en bandes discrètes.

Deux méthodes d'analyse séquentielle des fragments d'ADN sont considérées comme particulièrement fiables et simples à réaliser :

- l'analyse des fragments par néosynthèse enzymatique partielle (procédé de rupture de chaîne selon Sanger, appelé également méthode didésoxy),
- la séquentialisation de l'ADN marqué à son extrémité, par dissociations chimiques spécifiques de bases (procédé de Maxam-Gilbert, voir p. 24).

Procédé de rupture de chaîne (Méthode didésoxy selon Sanger)

Cette méthode repose sur la néosynthèse enzymatique partielle d'une copie complémentaire - marquée radioactivement - d'un brin isolé prédéfini (matrice), qui doit être séquentialisé. Dans un premier temps, on forme d'abord un «hybride» à partir du brin de matrice et d'un court oligonucléotide initiateur complémentaire, appelé «primer». A l'aide d'enzymes spéciales (polymérase) et en présence d'éléments structuraux appropriés, la copie complémentaire de la séquence à analyser est synthétisée comme la suite du primer. La rupture de chaîne est obtenue par insertion d'un didésoxynucléoside triphosphate auquel il manque le groupe hydroxyle-3', qui serait nécessaire à la continuation de la chaîne (voir fig. 3).

Après formation de l'hybride matrice-primer, la solution réactionnelle est divisée en 4 parties. En plus des 4 désoxynucléosides triphosphates (dNTP, l'un d'eux est marqué au phosphore radioactif), et des constituants naturels de l'ADN, on ajoute encore respectivement l'un des quatre didésoxynucléosides triphosphates

G C A T



Fig. 1. Autoradiographie d'un «gel de séquentialisation» d'après le procédé de Sanger. On lit la séquence de bas en haut, les fragments les plus courts migrant le plus loin.

(ddNTP) (voir fig. 2 et 3). La quantité en est choisie de telle sorte que, statistiquement, l'insertion par chaîne d'ADN ne se produise qu'une seule fois.

Une fois la synthèse enzymatique terminée, on dispose d'un mélange de sous-fragments d'ADN - marqués radioactivement - de différentes longueurs, mais se terminant tous avec la même base à l'extrémité 3'. Etant donné que chacune des 4 solutions réactionnelles est caractérisée par une extrémité base différente, chaque position base est établie et identifiée respectivement par une seule longueur de chaîne définie.

Les doubles brins sont ensuite dédoublés et les sous-fragments des quatre portions séparés simultanément selon leur longueur, les uns à côté des autres sur un gel de séquentialisation polyacrylamide. La

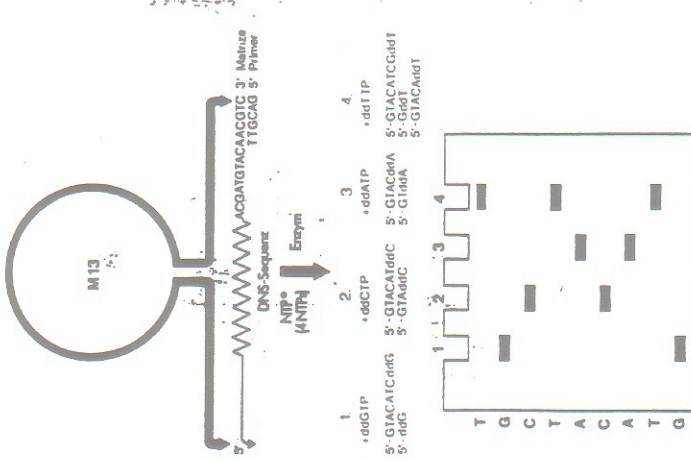


Fig. 2. Principe du procédé de rupture de chaîne selon Sanger.

séquence peut alors être lue directement à partir de l'autoradiogramme du gel de séquentialisation (voir fig. 1).

Pour le clonage des ADN à séquentialiser, les vecteurs-phages M13mp18 et M13mp19 sont à présent disponibles dans notre gamme de produits et peuvent être utilisés pour infecter des bactéries. Partant des nouveaux phages ainsi formés, l'ADN simple brin peut alors être isolé dans la quantité nécessaire à la séquentialisation.

Les oligonucléotides-initiateurs (primer M13 et primer M13 «reverse») nécessaires pour former le double brin-initiateur mais qui ont une utilisation universelle, ont également été introduits dans notre gamme de produits, de même qu'un primer d'hybridation M13.

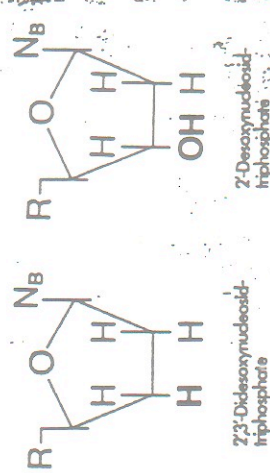


Fig. 3. Structure des désoxynucléosides triphosphates et des didésoxynucléosides triphosphates. Bases: adénine, thymine, guanine et cytosine, elles sont abrégées en N_x. R = triphosphate⁺ 5'.

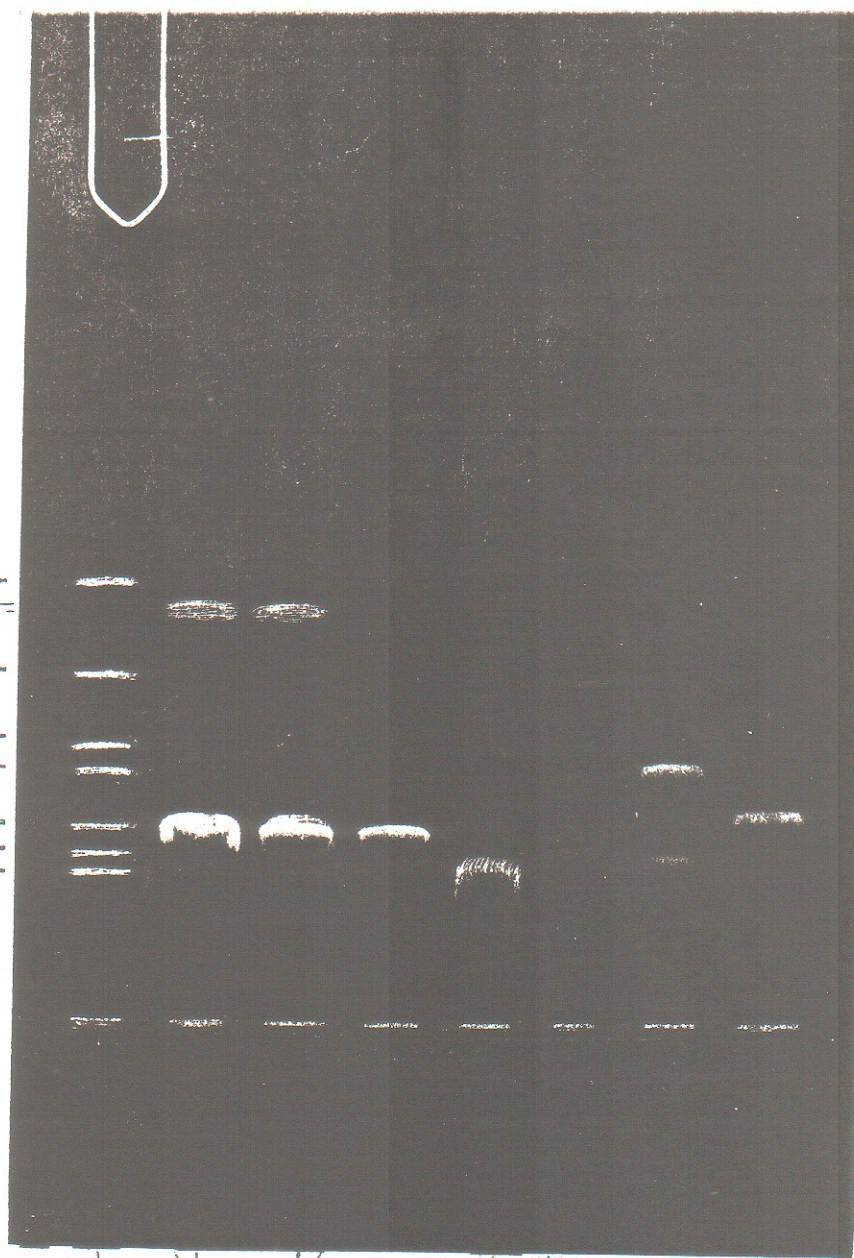
Le primer M13 «reverse» est employé lorsque, dans le cas de fragments d'ADN longs, les deux brins doivent être séquentialisés. A l'aide du primer M13 «normal», le fragment est séquentialisé à partir de l'extrémité 3', alors que le primer reverse permet une séquentialisation à partir de l'extrémité 5'.

Pour la séquentialisation des molécules d'ADN double brin, à côté des vecteurs phages M13mp18 et M13mp19, on a également recours à des plasmides, de préférence des dérivés de pBR322, qui contiennent une partie de l'ADN M13mp18 et M13mp19. Ces plasmides (pUC18 et pUC19) seront disponibles très prochainement, tout comme les désoxynucléosides triphosphates et didésoxynucléosides triphosphates requis pour l'analyse séquentielle d'après le procédé de rupture de chaîne.

Références commerciales

Art. n°	Désignation	Conditionnement
7319	Primer M13 pour séquentialisation (GTAAACCCAGCCGCAAT)	50 mA.u./tube
7318	Primer M13 pour séquentialisation reverse (CAGAAACACACTATGAC)	50 mA.u./tube
7316	Primer M13 pour essais d'hybridation (GTCATAGCTTTTCCTG)	50 mA.u./tube
8586	Vecteur (phage) M13mp18	10 µg/tube
8587	Vecteur (phage) M13mp19	10 µg/tube

Kb
1.4
1.7
2.1
3.1
4.4
5.4
6.3



marqueur de masse moléculaire

vecteur plasmide + ADN à insérer
(pBR322)

plasmide ayant inséré un ADN →

ELECTROPHORESE sur GEL D' AGAROSE :

révélation : intercalation de bromure d'éthidium, fluorescence UV, photographie
but : vérifier si un plasmide a intégré un brin d'ADN qu'on a voulu y insérer

- quelle est la taille du plasmide (en Kb) ?

- quelle est la longueur de l'insertion ? pour combien d'acides-amino code-t-elle ?

24/2/59

manipulation III

Extraction de DNA.

échantillon A

but: extraction de DNA humain en vue (d'un dosage) d'un usage industriel, à partir d'un fragment d'organe.

principe: l'extraction se fait par précipitations fractionnées: dans un premier temps, on sépare les deux nucléoprotéines des autres constituants par insolubilisation du DNA/histones en milieu salin isotonique, on solubilise ensuite le DNA/histones en milieu salin hypotonique, et en fin on précipite le DNA dans l'éthanol.
Les manipulations sont effectuées en tenant compte des nucléases présentes dans le matériel: on agit à froid, avec un agent chélateur des cofacteurs de ces nucléases.

résultat: On obtient un précipité blanc et fibreuse.

24/2/59

manipulation IV

Analyse de DNA.

but: dosage du d. ribose et appréciation de la qualité du DNA extrait par comparaison avec une valeur théorique. (prélevement industriel + du TP).

échantillons: industriel ([DNA] = 7,5 g/l) + TP n° 46 ([DNA] = 3,2 g/l)

principe: on réalise une condensation chimique entre le dioxyribose (du DNA non hydrolysé) et la diphenylamine. La réaction donne un produit chromogène dosable par spectrophotométrie (méthode d'étalonnage).

résultats:

	blanc	étalon	Ind (Yes)	TP (Yes)
A	0	0,131	0,133	0,032
c (mg/l)	0	80	58,2	38,5

pourcentages du d. ribose calculé contenu dans le DNA.

$$R_{TP} = \frac{363}{3200} = 30\%$$

$$R_{ind} = \frac{1455}{7500} = 19,4\%$$

(rapports pondéraux)

$R_{théorique} = 43\%$ si le DNA est totalement pur.

indices de qualité:

$$P_{TP} = \frac{30}{43} = 70\%$$

$$P_{ind} = \frac{19,4}{43} = 45\%$$

TP	n° 46	363	mg/l
industriel		1455	mg/l

concentrations en dioxyribose obtenues.

conclusion: L'indice de qualité doit être discuté en fonction de la méthode d'extraction du DNA (et de sa mise en forme optimale pour l'industriel). Pour le TP: l'indice semble être bon pour une méthode rudimentaire, Pour l'échantillon industriel,

La méthode de contraction industrielle peut diluer un DNA très pur, mais il y a souvent addition d'excipients, d'où l'absence de l'indice.

24/3/94

manipulation Va

métabolites des protéines

but: dosage de l'urée plasmatique par l'exploration hépatique et rénale.

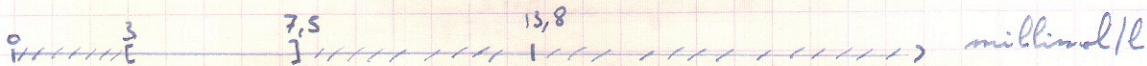
principe: microdosage (sans déprotéinisation) par colorimétrie à 525 nm après une réaction de condensation avec le DAP (diacétyl monoxime) en diazote.

échantillon: 59

résultats:

	BR	1	2	3	DA	DB	
A	0	0,13	0,38	0,70	0,53	0,6	sans unité
concentration	0	80	160	320	244	276	en $\mu\text{mol/l}$

par rapport à l'échantillon, DA est dilué en $1/50$: $0,244 \times 250 \rightarrow 61$ millimol/l
 DB " " $1/50$: $0,276 \times 50 \rightarrow 13,8$ millimol/l.
 concentration plasmatique en urée : 13,8 millimol/l



conclusion: la teneur est en dessous des valeurs normales, il y a sans doute insuffisance rénale. l'absorbance du DA ne convient pas, il y a eu erreur de manip. Un faux positif peut survenir si la concentration en citrulline est grande.

manipulation Vb

but: dosage plasmatique de la bili totale pour l'exploration hépatique (ou sanguine)

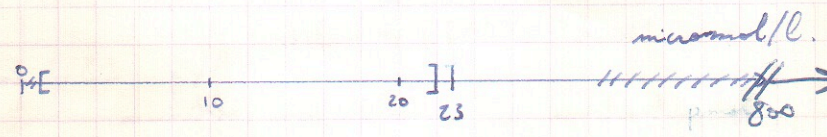
principe: formation d'un produit coloré après condensation chimique avec un sel de diazonium préparé extemporanément, en présence d'un dissociant protéique albumine - bilirubine libre. puis photométrie à 550 nm.

échantillon 59

résultats:

	BR	EE	D (μm)
absorbance	0	0,574	0,454
concentration	0	50	23 $\mu\text{mol/l}$

calcul: $C_D = C_{EE} \frac{A_D}{A_{EE}} = 50 \cdot \frac{0,454}{0,574} = 23 \mu\text{mol/l}$



concentration en bilirubine totale : 23 micromol/l.

conclusion: la valeur est normale. la bilirubine est sous les 2 formes (libre + conjuguée), on pourrait doser la bili conjuguée en ne mettant pas de dissociant protéique - bili libre, la réaction étant beaucoup plus lente si elle est complexée de l'albumine.

manipulation II

Protéines ligands.

but: étude de l'affinité du salicylate de sodium pour le sérum albumine.

principe: dialyse à l'équilibre: sur des sacs semi perméables contenant une même quantité de sérum albumine, plongés dans différentes solutions de salicylate de concentrations croissantes. Avant et après l'équilibre, la solution externe est dosée en salicylate par photométrie après une réaction de coloration au sal ferrique.

résultats:

tube	B	1	2	3	4
absorbance initiale	0	0,32	0,62	1,4	72
absorbance après 20h	/	0,12	0,34	0,85	72
concentration initiale c_i	0	500	1000	2000	4000
concentration libre après 20h L	/	200	550	1300	/
concentration liée après 20h PL	/	2800	3950	5700	/

} en micromol/l
avec $PL = 10 \cdot c_i - 11 \cdot L$

calcul = partir des points (2800; 200) et (5700; 1300) pour (PL; L)
pour le tracé de Scatchard, on a (2800; 44) et (5700; 44) pour (PL; $\frac{PL}{L}$)
on trouve $K_D = 300 \mu\text{mol/l}$ $K_A = 3,3 \cdot 10^3 \text{ l/mol}$
 $PL_{max} = PL = 6600 \mu\text{mol/l}$ nombre de site par molécule:
quantité de albumine: $\frac{34,5}{69000} = 500 \mu\text{mol/l}$ $\frac{6600}{500} = 13 \text{ sites / molécule}$

conclusion: la constante de dissociation K_D du complexe est de l'ordre des millimol/l (0,3 millimol/l) → l'affinité est donc faible.
la molécule comporte une dizaine de sites pour le salicylate.
 $K_D = 10^{-3} (\square)$

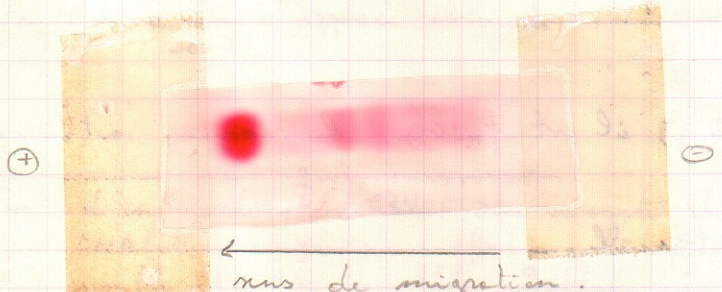
manipulation I

électrophorèse

but: séparation des constituants protéiques et lipoprotéiques d'un sérum pour l'exploration fonctionnelle.

principe: migration de molécules chargées dans un champ électrique, sur un support approprié et révélation par un colorant spécifique.

résultats: protéines | support: acétate de cellulose
colorant: rouge Ponceau
lipoprotéines | agarose
noir Soudan IV



conclusions: et discussions:

Sorden IV: Cc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(C)cc2
 est une molécule liposoluble.
 complexation avec les lipides.

Ponceau rouge: NaSO3c1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(S(=O)(=O)[Na])cc2
NaSO3c1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(O)c(S(=O)(=O)[Na])c2

molécule hydrosoluble, va se complexer avec les protéines du fait de leurs charges \oplus (histidine, arginine).

Un plasma est un sérum qui contient toutes les protéines de la coagulation le plasma aura donc des tâches plus importantes α_1 (prothrombine) β (fibrinogène et facteur VIII) au niveau de l'électrophorèse.

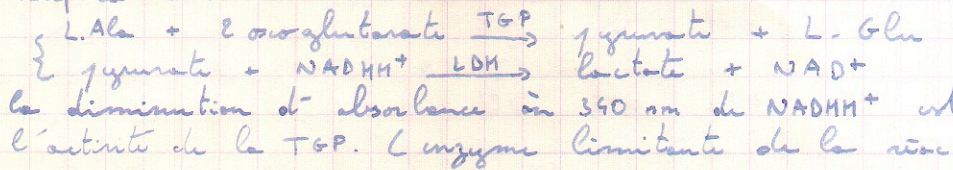
manipulation IIa

Enzymes

15/09/96

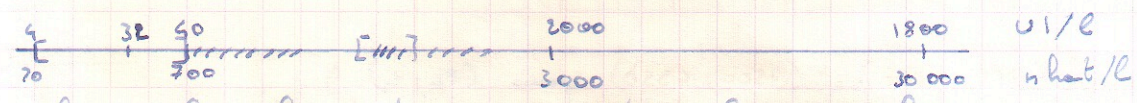
but: dosage de la TGP (c'est la détermination de son activité).

principe: étude de la consommation de $NADH^+$, avec tous les produits suivants sauf la TGP.



résultat: $-\Delta A = 0,017$ pour 1 minute.

$$\text{activité} = -\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot \frac{1}{6300} \cdot \frac{1}{12} \cdot 10^4 = 32 \text{ U/l} = 533 \text{ nkat/l}$$



conclusion: la valeur est comprise dans les normales. (pour l'échantillon 230)

manipulation IIb

but: dosage du cholestérol sérique (total et des HDL).

principe: on effectue le dosage du cholestérol des HDL après précipitation des autres lipoprotéines par un réactif phosphotungstique.

puis: $\text{chol. E} \xrightarrow{\text{cholestérase}} \text{chol libre} + \text{AGs}$ (il y en a plusieurs sortes).
 $\text{chol L} \xrightarrow{\text{chol oxydase}} \text{cholestérol} + \text{one 3} + 2H_2O_2$
 $2H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxydase}} \text{iminoquinone colorée (rouge)}$
 + phénol + aminoantipyrine observable par photométrie. $\approx 500 \text{ nm}$.

résultats:

	A	blanc	étalon	CT	C_{HDL}
concentration	0	0	0,135	0,085	0,062
			3,88	1,69	1,23

g/l

$$\begin{aligned} [chol \text{ total}] &= 1,69 \text{ g/l} \\ [chol \text{ HDL}] &= 1,23 \text{ g/l} \\ \text{rapport: } \frac{CT}{C_{HDL}} &= 1,4 \end{aligned}$$

conclusion: le rapport $CT/C_{HDL} \leq 5$, il est faible, le risque athérogène est donc peu élevé. (pour l'échantillon 230).

par contre, les valeurs sont trop faibles, il y a insuffisance hépatique

