



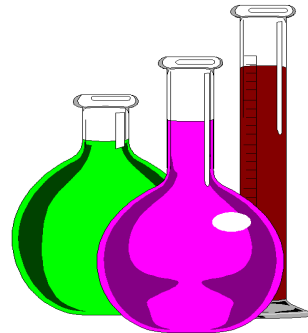
**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**  
**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE**  
**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MEDICALE**  
**Tél. / Fax : (221) 824 44 84 B.P. 5005 DAKAR – FANN SENEGAL**

Manuel de Méthodes d'Analyse

Et

De T.P. en Biochimie Clinique

Des Etudiants de L2S3 (2018-2019)



PRENOM .....

NOM.....

GROUPE .....

## SOMMAIRE

	Pages
Avertissement .....	3
Organisation des T. P de Biochimie.....	4
Méthodologies analytiques .....	5
Recueil et traitement des échantillons .....	10
Dosage de la glycémie .....	12
Dosage de la créatinine .....	15
Extraction de l'ADN.....	17
Annexes.....	20

## AVERTISSEMENT

### ▪ Concernant les échantillons

Les spécimens fournis durant les séances de travaux pratiques sont d'origine humaine et n'ont reçu aucun traitement pouvant permettre une inactivation d'éventuels agents infectieux (hépatite, Sida, etc....). Par conséquent il est conseillé :

- 1- De les manipuler avec soin.
- 2- De signaler toute blessure avant le début des séances.
- 3- De ne pas manipuler les tubes cassés ou ébréchés.
- 4- De porter des gants

### ▪ Concernant les réactifs

La plupart des réactifs sont corrosifs ou toxiques. Il faut donc éviter le contact avec les habits, la peau et les muqueuses.

### ▪ Concernant le matériel

Tout le matériel requis est fourni, avec charge à l'étudiant **de le rendre propre** avant de quitter la salle de TP.

Chaque étudiant doit être obligatoirement muni d'une **blouse blanche longue**.

Chaque groupe d'étudiants devra se munir d'un **marqueur** indélébile ou permanent.

### ▪ Concernant la notation

Les étudiants seront notés selon trois critères :

- 1- Notation de la manipulation sur 5.
- 2- Notation du compte rendu sur 5.
- 3- Notation de l'examen de TP sur 10

## **ORGANISATION DES TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE**

### **—→ SEANCE I**

- DOSAGE DE LA GLYCEMIE

### **—→ SEANCE II**

- DOSAGE DE LA CREATININE

### **—→ SEANCE III**

- EXTRACTION DE L'ADN

**Remarque : chaque séance fera l'objet d'un compte rendu individuel de la part de l'étudiant qu'il doit rendre à la fin de la séance.**

# METHODOLOGIES ANALYTIQUES

## I- Méthodes optiques

### I-1. Photométrie

La photométrie est l'étude des interactions entre la matière et les radiations lumineuses. Cette interaction se fait selon plusieurs modalités :

- absorption de photons
- émission de photons
- diffusion de photons

Chacun de ces phénomènes a conduit au développement de méthodologies qui fournissent des renseignements qualitatifs et quantitatifs sur la matière et en particulier sur les composés organiques.

### **Spectrophotométrie**

Si un faisceau de lumière monochromatique (à longueur d'onde fixe et définie) traverse une cuve contenant une solution, une partie de la lumière incidente est absorbée par les molécules de la substance dissoute.

Transmission (T)

Densité optique (D.O.) =  $\text{Log } I_0 / I$

De la loi de Beer-Lambert  $I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot C \cdot L}$  ou  $\epsilon$  = coefficient d'absorption moléculaire de la substance,

L = longueur du trajet optique.

C = concentration de la substance,

On tire  $D.O. = \epsilon \cdot I.C.$

La D.O. est donc directement proportionnelle à la concentration de la substance en solution.

En faisant varier la longueur d'onde de la lumière incidente, on observe, pour une substance donnée, une modification des densités optiques, avec apparition de pics à des longueurs d'ondes bien définies caractéristiques de la substance.

En se plaçant à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la substance, on mesure l'intensité de coloration qui est proportionnelle à la concentration de la substance dans le milieu.

Pour connaître cette concentration, on rapporte la densité optique à l'étalonnage réalisé au préalable en faisant réagir, dans les mêmes conditions, des quantités

croissantes et connues de la substance à doser. Le zéro de l'appareil peut être réglé sur un tube contenant de l'eau ou sur un tube contenant le réactif ("blanc réactif").

### **Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert :**

- **lumière monochromatique,**
- **solutions très diluées**
- **Absence de réflexion, diffusion ou fluorescence du faisceau incident**

Pour mesurer les DO, deux types d'appareils sont utilisés :

- Les photomètres ce sont des appareils à filtres ne permettant la lecture qu'à certaines longueurs d'onde fixes.
- Les spectrophotomètres, munis de prismes ou de réseaux, capables d'opérer à toutes les longueurs d'onde du spectre UV/Visible.
- Lecture alternée des blancs et des dosages
- Précision 2 à 5 %

### **Photométrie d'émission atomique**

*La photométrie de flamme par émission atomique repose sur le principe de KIRCHNOFF : « la nature des raies émises est caractéristique de l'élément (spectre d'émission) et l'intensité d'une radiation émise par un élément est proportionnelle au nombre d'atomes excités (au moins dans certaines limites).*

Cette méthode d'analyse donne des renseignements qualitatifs (identification d'un élément) et quantitatifs (dosage d'un élément). En biochimie clinique, c'est ce deuxième aspect qui est utilisé pour le dosage des alcalins 'Sodium [Na<sup>+</sup>], Potassium [K<sup>+</sup>] et Lithium [Li<sup>+</sup> ]. Les éléments à analyser doivent être sous forme d'atomes qui vont être excités par un moyen thermique (flamme) et générer un spectre d'émission caractéristique de l'élément.

### **Photométrie des milieux troubles**

Les solutions colloïdales ou les suspensions de fines particules ont la propriété de diffuser la lumière qu'elles reçoivent. Cela a permis le développement de trois principes de mesure dans les milieux troubles :

- *la néphélométrie*
- *la turbidimétrie*
- *l'opacimétrie.*

Depuis quelques années, ce type de mesure a observé un regain d'intérêt du fait du développement récent des techniques immunochimiques (dosage des hormones, des enzymes, des apolipoprotéines, des lipoparticules etc.)

## **I -2 - Polarimétrie et réfractrométrie**

Dans la polarimétrie on se préoccupe de la direction des vibrations constituant l'onde lumineuse : certaines modifient cette direction ; on dit qu'elles sont optiquement actives.

En ce qui concerne la réfractrométrie, on étudie la direction de propagation de la lumière, qui donne des renseignements sur les différents milieux traversés ; la notion importante est alors l'indice de réfraction.

## **II Méthodes potentiométriques : potentiométrie et pH métrie**

La méthode potentiométrique étudie les différences de potentiel qui prennent naissance dans les solutions, entre deux électrodes qui y sont immergées. Leur application est basée essentiellement sur la relation de Nernst.

Soit  $Ox + N_e + N'H^+ = b Red$

$$E = E_o + \frac{RT}{NF} \ln \frac{[ox]^a [H]}{[Red]^b}$$

$R = 8,31 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$  (constante des gaz parfaits)

$T =$  Température absolue (en K)

$F =$  Faraday : charge transportée par une mole d'électrons ( $1 F = 96 500 \text{ c}$ )

$E_o =$  potentiel standard du couple, c'est à dire la valeur du potentiel lorsque toutes les concentrations molaires sont égales à 1 mol. Dm<sup>3</sup>

Cette relation de Nernst permet à partir du potentiel d'une électrode, de déterminer la concentration des espèces actives, présentes dans la solution. C'est une méthode statique, dans laquelle on ne recherche pas des réactions chimiques, mais des conditions d'équilibre. Il ne doit donc pas circuler de courant électrique au cours des mesures (mesures à intensité de courant nulle).

On distingue la méthode potentiométrique proprement dite où sont étudiées les phénomènes d'oxydoréductions, des méthodes potentiométriques dépendant du pH et permettant de mesurer celui-ci, c'est la PHmétrie.

### **III Analyse enzymatique**

#### **A. Notion d'enzymologie générale (cours PCEM-1)**

#### **B. Mesure de l'activité des enzymes.**

Le dosage des enzymes se fait en général de manière indirecte, en évaluant une propriété proportionnelle à la concentration d'enzyme

- soit une propriété physique ; c'est la méthode calorimétrique qui consiste à mesurer la quantité de chaleur dégagée lorsqu'on ajoute du substrat en excès à un milieu adéquat contenant l'échantillon d'enzyme à doser. Cette technique est très rarement utilisée.
- Soit une propriété cinétique : c'est la mesure de l'activité ; la mesure est faite dans les conditions où cette dernière est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

Déterminer l'activité d'une enzyme consiste à évaluer la quantité de substrat qu'elle transforme par unité de temps dans des conditions opératoires déterminées : pH, température, conditions initiales de substrat.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées : la technique de mesure de la vitesse moyenne dite "2 points" qui est le procédé classiquement utilisé en méthode manuelle.

Elle consiste à laisser l'enzyme catalyser la réaction pendant une durée fixe, à arrêter son action, puis à évaluer la quantité de substrat transformé ou de produit apparu.

La méthode cinétique ou mesure instantanée est le procédé qui s'adapte parfaitement à l'analyse automatique. Elle consiste à suivre l'évolution de la réaction en fonction du temps. La substance dont on mesure la vitesse de disparition ou d'apparition doit posséder une propriété spectrale spécifique dans l'UV ou le visible. L'enregistrement des variations d'absorbance en fonction du temps est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus spécifique. Le couple NAD/NADH ou NADP/NADPH<sup>2</sup> est habituellement employé. Cette méthode présente en outre l'avantage de pouvoir vérifier si la vitesse est constante durant la mesure.

## C- Dosage des substrats par voie enzymatique

Les enzymes sont d'excellents réactifs pour le dosage de leurs substrats ; leur spécificité autorise leur utilisation sur un milieu complexe comme l'est tout milieu biologique, sans purification préalable.

Les méthodes de dosage utilisées sont :

- **méthode au point final ("End point")**
- **méthode cinétique**

La méthode au point final consiste à mesurer la transformation totale du substrat en produit.

Les méthodes de mesure de la transformation du substrat en produit sont nombreuses et la plus courante est basée sur l'absorptiométrie moléculaire lorsque substrat ou produit possède un pic d'absorption spécifique.

La méthode consiste à mesurer la différence de densité optique entre le temps zéro, qui correspond au démarrage de la réaction et le temps  $t$  qui correspond à la fin de la réaction. Si la transformation est totale, la différence de D.O. est proportionnelle à la concentration du substrat.

En ce qui concerne la méthode cinétique, le principe est de mesurer la vitesse initiale de la réaction enzymatique dans les conditions de concentrations pour lesquelles la réaction est d'ordre 1 par rapport au substrat. La mesure se fait en enregistrant la D.O. en continu, sitôt la réaction déclenchée. La vitesse est alors proportionnelle à la concentration du substrat.

## RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

### **I PRELEVEMENT**

#### **I -1 CONDITIONS**

Les prélèvements se font sur des patients à jeun au moins 12h. Le malade doit être au repos et sans stress.

Le dosage de certains paramètres se fait obligatoirement sur les tubes avec anticoagulant. Le choix de l'anticoagulant adéquat se fera selon l'analyse (exemple le tableau ci-dessous)

<b>Anticoagulant</b>	<b>utilisation</b>
Fluorure d'oxalate	Glycémie
Héparinate de lithium	Biochimie générale, électrolytes sauf lithium
Héparine iodo acétate (sodium ou potassium)	Glycémie
EDTA	Hémoglobine glyquée Extraction d'ADN

<b>Pas d'anticoagulant (tube sec)</b>	<b>utilisation</b>
	Enzymes
	Marqueurs tumoraux et hormones
	Créatininémie et uricémie
	Bilirubinémie
	Cholestérolémie
	Triglycéridémie ...

**Tableau 1: Utilisation des anticoagulants**

En ce qui concerne le dosage de la glycémie, l'anticoagulant doit être associé à un antiglycolytique (fluorure).

#### **I - 2 MATERIEL**

Aiguilles avec dispositifs sous vide

Tubes secs ou avec anticoagulant seul ou associé à un antiglycolytique,

Antiseptique,

Compresse ou coton,

Sparadraps,

## I – 3 PROCEDURE TECHNIQUE DE PRELEVEMENT

### **a) Vérification de l'identité du patient**

Vérification du bulletin d'analyses

### **b) Choix du matériel**

Choisir le ou les tubes appropriés,

### **c) Choix du site de ponction**

Pli du coude le plus souvent

Demander au patient de maintenir l'avant-bras en extension et de bien serrer le point

Recherche de la veine par palpation

### **d) Pose du garrot**

Placer le garrot au-dessus du pli du coude.

Ne pas trop serrer

### **e) Mettre les gants**

Bien désinfecter le site de ponction

Ne plus toucher à ce site

### **f) Pratiquer la ponction**

-libérer l'aiguille au dernier moment

- stabiliser le bras

-piquer dans le sens de la longueur de la veine, le biseau orienté vers le haut.

-faire desserrer le point

-défaire le garrot, le sang coule lentement (si veine),si artère le sang gicle.

### **g) Remplissage**

-homogénéiser sang et anticoagulant immédiatement par quelques 4 ou 5 retournements.

-Si tube sec ne pas homogénéiser

### **h) Fin du prélèvement**

-Retirer l'aiguille de la veine et ne pas capuchonner pour éviter de blesser.

Comprimer le site de ponction avec du coton pendant quelques minutes.

-Eliminer l'aiguille ou le dispositif dans le conteneur adapté.

-pose d'un pansement

- Transmission des tubes étiquetés (nom et prénom du patient) accompagnés de la fiche de prélèvement ou bulletin d'anal

# DOSAGE DU GLUCOSE SANGUIN

## I. INTRODUCTION

La glycémie peut se définir comme étant le taux de glucose sanguin. Ce taux est variable suivant les conditions d'alimentation ; c'est ainsi qu'on peut mesurer la glycémie à jeun (après 12h de jeun), la glycémie post prandiale (2h après un repas), l'hyperglycémie provoquée par voie orale ou veineuse (après administration orale ou parentérale de glucose pur).

Chez l'homme, la glycémie normale varie entre 0,75g/l et 1,10g/l. En dessous de 0,6 g/l on a une hypoglycémie et au-dessus de 1,26g/l on a une hyperglycémie ou diabète sucré. (cf critères OMS)

## II. METHODES DE DOSAGE

### 1. Conditions de prélèvement

Quelque soit la méthode de dosage, le prélèvement doit se faire dans un tube contenant un anticoagulant et un inhibiteur de la glycolyse (fluorure de sodium). Selon le type de glycémie qu'on veut doser, le prélèvement se fera après un jeun de 12h (glycémie à jeun), 2h après le repas (glycémie post prandiale) ou après administration de glucose (HGPO)

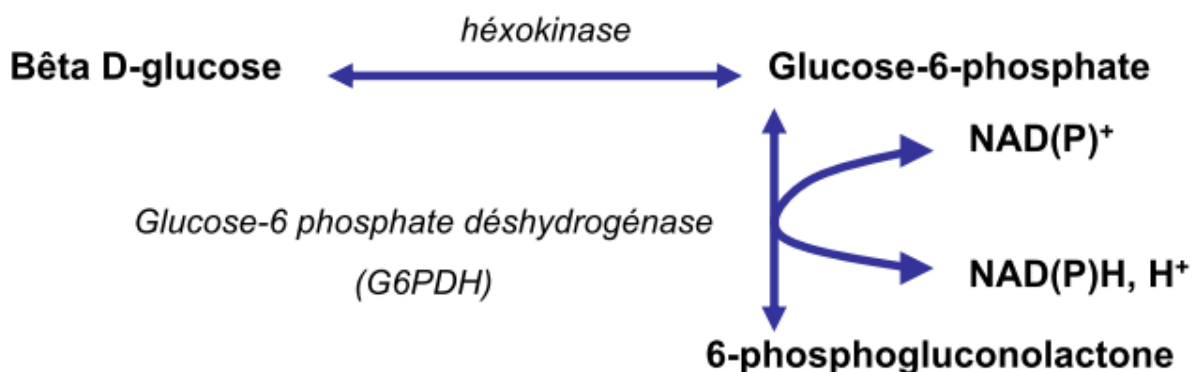
Il existe des méthodes colorimétriques et des méthodes enzymatiques, ces dernières sont plus spécifiques du glucose et sont les plus utilisées.

### 2. Méthodes enzymatiques

#### a. méthode à l'hexokinase : méthode de référence

➤ Principe :

Il est basé sur un système enzymatique (hexokinase, G6P deshydrogénase) catalysant les réactions suivantes :



La formation de NADPH, suivie à 340nm sera proportionnelle à la quantité de glucose

## b. Méthode à la glucose oxydase

C'est la plus utilisée

### ➤ Principe :

Sous l'action de la glucose oxydase, le glucose est transformé en gluconate et en  $H_2O_2$ . Ce dernier réagit avec un chromogène en présence de peroxydase pour former un complexe coloré (rose).

L'intensité de la coloration par application de la loi de Beer Lambert est proportionnelle à la concentration de glucose.

### ➤ Matériel et réactifs nécessaires

- glucose oxydase
- étalon
- contrôle
- échantillons à doser
- tubes à essai
- gants
- portoirs
- micropipettes (1000 $\mu$ l, 10 $\mu$ l )
- embouts bleus et jaunes
- poubelles

### ➤ Mode opératoire :

- pipeter dans des tubes à essai

	Tube Blanc	Tube Etalon	Tube Contrôle	Tube Dosage
Eau distillée	10 $\mu$ l			
Etalon		10 $\mu$ l		
Contrôle			10 $\mu$ l	
Echantillon				10 $\mu$ l
Réactif (glucose oxydase)	1ml	1ml	1ml	1ml

- homogénéiser puis laisser à la température ambiante pendant 10mn puis lire les absorbances à 510nm au spectrophotomètre.

### **III. RESULTATS**

#### **a. Calcul des résultats**

$$C \text{ échantillon} = A \text{ échantillon} / A \text{ étalon}$$

#### **b. Valeurs normales**

- glycémie à jeun : 0,7-1,15g/l
- glycémie post prandiale : < 1,40g/l

#### **c. Variations physiopathologiques**

- glycémie à jeun < 0,5g/l = hypoglycémie
- glycémie à jeun  $\geq$  1,26g/l et/ou glycémie post prandiale > 1,40g/l = diabète

## DOSAGE AVEC LES BANDELETTES URINAIRES

### A. Généralités

La recherche et la quantification de certains paramètres dans les urines se font en général à l'aide des bandelettes réactives en présence des réactifs spécifiques de dosage. On obtient ainsi une coloration qui sera comparée à une gamme de référence.

### B. Prélèvement

Le dosage se fait de préférence sur des urines fraîches du matin.

### C. Mode opératoire

1. Tremper l'extrémité de la bandelette dans les urines pendant 2 secondes.
2. Tapoter légèrement la bandelette au bord du récipient pour éliminer l'excès d'urine.
3. Faire la lecture après 60 secondes
4. Comparer la coloration obtenue à la gamme de référence du kit.



#### 1. Dosage du glucose dans les urines (Glycosurie)

##### a. Principe

La glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose pour former un peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé oxyde un chromogène situé sur la zone réactive par l'action de la peroxydase

##### b. Résultats

Le glucose est normalement absent dans l'urine mais une concentration de 50 mg/dl ou plus est positive. La glycosurie est demandée dans la surveillance des acidocétoses diabétiques en complément avec la cétonurie.

## **2. Dosage des protéines dans les urines (Protéinurie)**

### **a. Principe**

Il repose sur l'erreur protéique des papiers indicateurs de pH. Lorsque le pH est maintenu constant en système tampon, l'indicateur de pH libère l'ion  $H^+$  en présence de protéines ce qui va faire virer la couleur du jaune au bleu-vert.

### **b. Résultats**

L'urine contient habituellement des protéines à faible concentration (20 mg/dl). Seule la présence persistante et élevée de protéines urinaires indique une pathologie rénale ou une infection urinaire.

## **3. Recherche de sang dans les urines (hématurie)**

### **a. Principe**

Le test repose sur l'activité pseudo-péroxydasique de l'entité hémique de l'hémoglobine ou de la myoglobine. Le chromogène est oxydé par un hydroperoxyde en présence d'hème et entraîne un changement de couleur de jaune à bleu.

### **b. Résultats**

Normalement aucune trace d'hémoglobine n'est détectable dans les urines à l'exception des femmes en période de menstrues. Sa présence traduit une pathologie rénale ou un trouble de l'appareil urinaire.

## **DOSAGE DES TRANSAMINASES**

### **A. Aspartate amino-transférase (ASAT) ou TGO**

#### **1. Introduction**

Les TGO sont des enzymes ubiquitaires présentes au niveau du foie, du muscle squelettique, du cœur, du globule rouge essentiellement.

#### **2. Echantillon**

Sérum ou plasma prélevé sur héparine, EDTA, oxalate:

Les prélèvements sont stables 7 jours à 2-8°C.

L'hémolyse et certains médicaments interfèrent.

#### **3. Principe**

La glutamate oxaloacétate transférase (TGO) encore appelée aspartate aminotransférase (ASAT) catalyse le transfert réversible du groupe aminé de l'aspartate vers l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate.

L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase et le NADH, H<sup>+</sup>. On voit la cinétique de disparition du NADH, H<sup>+</sup> mesurée par spectrophotométrie à  $\lambda = 340$  nm en mesurant l'absorbance initiale puis toutes les minutes pendant 3 minutes. Le pourcentage de diminution de la concentration de NADH est proportionnel à la concentration de TGO présent dans l'échantillon.

L'activité enzymatique sera déterminée par la formule :  $\Delta DO \times F$

(F = facteur dépendant du protocole opératoire du Kit utilisé).

#### **4. Réactifs**

- R1 : tampon composé de TRIS à pH 7,8 et de L-aspartate
- R2 : substrat composé de NADH, lactate déshydrogénase (LDH), malate déshydrogénase (MDH),  $\alpha$ -cétoglutarate

**NB : préparation du réactif de travail en fonction de la proposition du kit utilisé**

## 5. Mode opératoire

- ✓ Régler le spectrophotomètre à 340nm
- ✓ Pipetter dans un tube à essai selon le tableau suivant

<b>Solutions</b>	<b>Tubes</b>	<b>Contôle</b>	<b>Echantillon</b>
<b>Sérum de conrole (C)</b>		50µl	---
<b>Échantillons</b>		----	50µl
<b>Réactifs</b>		500µl	500µl

- ✓ Mélanger, incuber 1 minute
- ✓ Lire l'absorbance initiale (A0) de l'échantillon, puis à 1 minute (A1), deux minutes (A2) et 3 minutes (A3).

## 6. Résultats

Calculer la variation d'absorbance par minute

$$\Delta A/\text{min} = [(A0 - A1) + (A1 - A2) + (A2 - A3)] / 3$$

La concentration catalytique de TGO est déterminée pour le sérum de contrôle et les échantillons par la formule:

$$C = \Delta A/\text{min} \times \text{facteur (1746)}.$$

## 7. Interprétation

### i. Valeurs normales

Les résultats sont exprimés en unités internationales par litre U/L.

La valeur de référence doit être inférieure à 35 UI/l à 37°C

### ii. Valeurs pathologiques

Toute valeur > 35 UI/l est considérée comme pathologique.

Sa signification sémiologique est variable. Il pourra s'agir de lésion cardiaque, musculaire ou hépatique....

C'est pourquoi, la valeur sémiologique des TGO est réellement exploitée si le dosage des TGO est couplé à celui des TGP.

## **B. Alanine amino-transférase (ALAT) ou TGP**

### **1. Introduction**

Il s'agit d'une enzyme d'origine essentiellement hépatique, plus spécifique du foie que les TGO.

### **2. Echantillon**

Sérum ou plasma prélevé sur héparine, EDTA, oxalate: stable 7 jours à 2-8°C. L'hémolyse et certains médicaments interfèrent.

### **3. Principe**

La glutamate pyruvate transférase (TGP) encore appelée alanine aminotransférase (ALAT) catalyse le transfert réversible du groupe aminé de l'alanine vers l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactate deshydrogénase (LDH) et le NADH

Comme dans le cas du dosage des TGO on suit au spectrophotomètre à 340 nm, la disparition du NADH H<sup>+</sup>.

On voit la cinétique de disparition du NADH, H<sup>+</sup> mesurée par spectrophotométrie à  $\lambda = 340$  nm en mesurant l'absorbance initiale puis toutes les minutes pendant 3 minutes. Le pourcentage de diminution de la concentration de NADH est proportionnel à la concentration de TGP présent dans l'échantillon.

L'activité enzymatique sera déterminée par la formule :  $\Delta DO \times F$   
(F = facteur dépendant du protocole opératoire du Kit utilisé).

### **4. Réactifs**

R1 : tampon composé de TRIS à pH 7,8 et de L-alanine

R2 : substrat composé de NADH, lactate déshydrogénase (LDH),  $\alpha$ -cétoglutarate

**NB : préparation du réactif de travail en fonction de la proposition du kit utilisé**

## 5. Mode opératoire

- ✓ Régler le spectrophotomètre à 340nm
- ✓ Pipetter dans un tube à essai selon le tableau suivant

<b>Solutions</b>	<b>Tubes</b>	<b>Controles</b>	<b>Echantillons</b>
<b>Sérum de contrôle (C)</b>		50µl	---
<b>Échantillons</b>		----	50µl
<b>Réactifs</b>		500µl	800µl

- ✓ Mélanger, incuber 1 minute
- ✓ Lire l'absorbance initiale (A0) de l'échantillon, puis à 1 minute (A1), deux minutes (A2) et 3 minutes (A3).

## 6. Résultats

Calculer la variation d'absorbance par minute:

$$\Delta A/\text{min} = [(A0 - A1) + (A1 - A2) + (A2 - A3)] / 3$$

La concentration catalytique de TGO est déterminée pour le sérum de contrôle et les échantillons par la formule:

$$C = \Delta A/\text{min} \times \text{facteur (1746)}.$$

## 7. Interprétation

### i. Valeurs normales

Les résultats sont exprimés en unités internationales par litre U/L.  
La valeur de référence doit être inférieure à 45 UI/l

### ii. Valeurs pathologies

Toute valeur de TGP > 45 UI/l sera pathologique.  
Elle est le plus souvent témoin d'une atteinte du foie. La signification séméiologique est d'autant plus importante que son taux élevé est associé à d'autres perturbations concernant les marqueurs biologiques que sont les TGO, la 5-Nucléotidase entre autre.

## EXTRACTION DE L'ADN

### I. INTRODUCTION

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage.

### II. TECHNIQUES D'EXTRACTION

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Élimination des protéines (déprotéinisation)
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)
- Précipitation de l'ADN

#### a. La lyse des cellules

Elle est réalisée par ajout de détergent (SDS) et de tensioactif qui permettent la dissolution des lipides et leur solubilisation, d'une enzyme (protéinase K) qui hydrolyse les protéines et d'agents chélateurs qui capturent les ions pour faciliter leur élimination ultérieure.

#### b. L'élimination des protéines

Du phénol et du chloroforme sont ajoutées à la solution afin de précipiter les protéines.

#### c. L'élimination des autres acides nucléiques

Réalisée par l'ajout d'une RNase qui va hydrolyser spécifiquement les acides ribonucléiques laissant l'ADN intact. L'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation. La solution obtenue est en général très visqueuse

#### d. La précipitation de l'ADN

A la phase aqueuse obtenue est ajoutée de l'alcool pur (éthanol 100%) qui précipite l'ADN sous la forme d'une « pelote » récupérée par centrifugation. L'ADN obtenu est lavé à plusieurs reprises avec de l'alcool (éthanol 70%) qui solubilise toutes les impuretés. L'ADN ainsi purifié est mis en suspension afin d'être conservé avant d'être analysé.

N B : IL est possible de contrôler l'extraction par électrophorèse sur gel d'agarose. Ainsi on peut analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium

(BET), un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN.

La pureté de l'ADN est aussi appréciée par la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm.

L'ADN est pur si  $1,8 < A_{260} / A_{280} < 2$

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Exemple kit **Nucleon™** pour l'extraction de l'ADN à partir du sang total

C'est un kit développé pour une extraction rapide et efficace de l'ADN génomique de haut poids moléculaire à partir de sang.

➤ Principe :

Le principe repose sur la solubilité différentielle des molécules (ADN/contaminants) à travers deux phases non miscibles.

➤ Matériel et réactifs nécessaires

- réactif A
- réactif B
- RNAse
- perchlorate de sodium
- chloroforme
- Nucleon resin
- éthanol
- échantillon de sang (tube EDTA)
- gants stériles
- tube conique
- micropipettes
- embouts

➤ Protocole : (travailler en asepsie)

○ **Préparation des cellules**

1. collecter le sang sur tube EDTA

○ **Lyse cellulaire**

2. mettre 4 V de réactif A à 1V de sang total dans un tube conique; agiter pendant 4 mn à température ambiante

3. centrifuger à 1300g pendant 5 mn ; éliminer le surnageant

4. ajouter au culot 2ml de réactif B ; vortexer brièvement pour remettre le culot en suspension

○ **Traitement par la RNase**

5. transférer 2,5µl de la suspension précédente dans un tube propre ; ajouter 15 µl de solution de RNase et incuber le tube à 37°C pendant 30 mn

○ **Déprotéinisation**

6. ajouter 500µl perchlorate de sodium ; bien mélanger en inversant le tube bouchonné pendant au moins 7 fois

○ **Extraction de l'ADN**

7. ajouter 2ml de chloroforme ; bien mélanger en inversant le tube bouchonné pendant au moins 7 fois

8. sans mélanger les 2 phases ajouter 300µl de Nucleon resin ; centrifuger à 1300g pendant 3mn

○ **Précipitation de l'ADN**

9. tenir le tube verticalement pour éviter le mélange des 2 phases et transférer environ 2,5 ml de la phase supérieure sur un tube conique

10. ajouter 5ml d'éthanol à froid ; mélanger en inversant le tube jusqu'à apparition de précipitation

○ **Lavage de l'ADN**

11. Centrifuger à 4000g pendant 5 mn ; verser le surnageant

12. ajouter au culot 2ml d'éthanol à froid ; mélanger plusieurs fois en inversant le tube

13. centrifuger une nouvelle fois et verser le surnageant (répéter cette étape si nécessaire)

14. sécher le culot à l'air pendant 10 mn

15. redissoudre l'ADN dans un volume approprié de tampon TE (1 à 2ml)

16. laisser incuber jusqu'au lendemain ; lire l'absorbance à 260nm puis à 280 nm

## ANNEXES

### VALEURS USUELLES DE QUELQUES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

PARAMETRES	VALEURS USUELLES
Acide urique	30 à 70 mg/l
Albumine	35 à 45g/l
Bilirubine directe	< 2mg/l
Bilirubine totale	< 10mg/l
Calcium	80 à 104 mg/l
Chlores	102 à 106 mEq/l
Cholestérol total	1,4 à 2,7 g/l
Créatinine	6 à 13 mg/l
Fer	0,8 à 1,5 mg/l
Glucose	0,7 à 1,1g/l
Magnésium	16 à 23 mg/l
Phosphore	30 à 40 mg/l
Potassium	4,1 à 4,7 mEq/l
Protides	60 à 70 g/l
Sodium	138 à 145 mEq/l
Triglycérides	0,6 à 1,65 g/l
Urée	0,15 à 0,45 g/l

**FICHE DE COMPTE RENDU TP DE BIOCHIMIE 2018-2019**

Date.....

GROUPE.....

NOM.....

PRENOM.....

**DOSAGE DE LA GLYCEMIE PAR LA METHODE A LA GLUCOSE OXYDASE**

Principe

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Mode opératoire

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Résultats

Absorbance Etalon .....

Concentration Etalon.....

Absorbance Contrôle.....

Concentration Contrôle.....

Absorbance Echantillon.....

Concentration Echantillon.....

NB : La concentration du contrôle doit être compris entre..... pour que les résultats soient valides.

Conclusion

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

