**Biochimie TD (S4)**

ΔμδΣ

Une voie métabolique est possible si la voie est exploitable.

# La thermodynamique

La thermodynamique est la science qui va étudier l’énergie d’un système, et les échanges d’énergie avec le milieu extérieur. Un système est le lieu ou l’endroit où s’effectue la transformation. Il y a 3 types de systèmes :

* Isolé : n’échange ni énergie ni matière
* Fermé : n’échange que de l’énergie, pas de la matière
* Ouvert : échange énergie et matière (exemple : la cellule)

La thermodynamique va décrire le système, par le biais de fonctions mathématiques, que l’on va appeler des fonctions d’état (décrivent l’état du système). On citera pas exemple l’entropie, l’enthalpie, l’enthalpie libre. Ces fonctions ne dépendent que de l’état initial et de l’état final, pas des transformations, contrairement aux variables d’état qui varient en fonction de la transformation (température, pression, concentration, volume). L’échange d’énergie d’un système se fait sous 2 formes : la chaleur et le travail (E = q + w)

## Principes

1er principe : L’énergie de l’univers est constante. Les variations d’énergie (ΔE = E avant transformation – E après transformation = q + w = 0).

1. ΔH = enthalpie : chaleur à pression constante. C’est la chaleur échangée dans le système. En biologie, on travaille souvent à pression constante. Il découle directement de la pression constante.
2. Réaction exothermique : libère de l’énergie sous forme de chaleur.

Réaction endothermique : utilise de l’énergie sous forme de chaleur.

Par convention, un système qui gagne de l’énergie est supérieur à 0, un système qui en perd est inférieur à 0.

1. Non. ΔG = enthalpie libre. C’est l’énergie qui peut être libre d’être échangée. Ce n’est pas la chaleur, la chaleur est toujours perdue dans un système normal. C’est donc le travail qui peut être échangé. (réponse au 4))
2. Ergos en grec veut dire travail. Une réaction exergonique est susceptible de fournir un travail. Une réaction endergonique nécessite un travail. Une réaction exergonique a un ΔG<0, et est spontanée, dans l’autre cas, ΔG>0, l’énergie n’est pas spontanée.

2ème principe : L’état de désordre de l’univers ne cesse d’augmenter. Dans une transformation, on passe d’un état ordonné à un état désordonné. C’est ΔS qui donne l’état de désordre du système. ΔS est l’entropie. De ce principe découle la loi de Gibbs : ΔG = ΔH – TΔS

1. Potentiel chimique : μi = δG / δn ΔG = Σni μi nui° est le potentiel chimique dans les conditions standards. Conditions standards : 1 atm, 25°C, concentrations d’1M. aA 🡨🡺 bB

Rappels de mathématiques :

Xlny = lnyx lnx - lny = ln (x/y) logxy = lnx/lny logx = logx10 = lnx / ln10

Ici : *Voir feuille annexe*

pH=-log[H+]

*Voir feuille annexe 2*

1. Dans la cellule, on est à l’état d’équilibre, cet état est appelé état stationnaire. Il n’a rien à voir avec les conditions d’un système fermé. Dans un état stationnaire, le ΔG global est égale à 0. On ne s’intéresse qu’aux ΔG spécifiques.

*Feuille*

On va maintenant illustrer.

*Feuille*

On définit le potentiel de S dans les conditions S1 et dans les conditions S2, car elles sont différentes. En effet, quand on entre dans une pièce où c’est la fête, on n’a pas le même potentiel que dans une pièce avec un enterrement. On a plus envie de dégager de l’énergie dans l’une que dans l’autre. On sait que la molécule a le même potentiel chimique que le milieu, donc la molécule a le même potentiel que le milieu, donc muS1° et muS2° n’ont pas de raison d’être, puisqu’ils sont égaux

*Feuille*

Réponse à la dernière question de la partie 7) du polycopié :

La partie zF(psi1-psi2) est nettement supérieur à l’autre partie (F=96500C), donc c’est elle qui va donner le signe à ΔG : ΔG<0 si Psi2<Psi1 transport spontané

ΔG>0 si Psi2>Psi1 transport non spontané

1. Réaction d’oxydo-réduction

Rappels d’oxydo-réduction :

Oxydation : perte d’électrons, perte de H+. Une molécule réduite est une molécule riche en oxygène.

Réduction : gain d’électrons. Une molécule réduite est une molécule riche en hydrogène. Il y a un apport de protons (H+).

*Feuille*

Les potentiels redox tiennent compte de la charge, de RT, des conditions, et des concentrations.

*Feuille*

ΔG = -nF ΔE avec ΔE = E accepteur e- - E donneur e- (E : potentiel redox)

TD4

Les réactions sont réversibles, donc on ne doit pas avoir de couplage énergétique (ATP), ou d’intervention de coenzyme. Le sens de la réaction varie en fonction des concentrations. Dans les conditions standards, la réaction ne se fait pas. On regarde ici, dans les conditions physiologiques.

1. ΔG = ΔG°’ + RT Ln K = 1672 + 8,314 x 310 x 32/64 = -114,48 J.mol-1
2. ΔG = -534 J.mol-1

La réaction se fait d’elle-même tant qu’il y a plus de substrats que de produits. ΔG est positif ou négatif en fonction des concentrations. Les réactions dépendent de la faisabilité chimique : elles sont donc chimiquement favorables, donc propices à la cassure et à la formation de liaisons. Elles sont aussi propices aux mouvements d’électrons. Il faut donc dans la molécule des charges nettes supérieures ou inférieures à zéro (coenzyme). Quand elles ne sont pas nettes, on a simplement des différences d’électronégativité.

*Schéma A*

Groupement : groupe d’atomes (ex : carboxyle)

Fonction : groupement présentant des propriétés (ex : *schéma B*)

*Voir page 3*

Les radicaux libres sont des déchets métaboliques responsables du vieillissement cellulaire, des cancers, mais aussi de l’apoptose et de la nécrose.

Une insaturation se fait par double liaison, dans des systèmes conjugués.

Introduction d’insaturation :

### Par réaction d’oxydo-réduction.

*Schéma 1*

Page 6 polycopié

### Dans le cas d’élimination par déshydratation (H2O).

*Schéma 2*

### Dans le cas de réactions d’isomérisation

*Schéma 3*

### Dans le cas de transfert de groupements (-CH3, phosphate…).

Il faut pour cela des réarrangements, le déplacement en β d’un carbonyle.

### Dans le cas de la condensation d’aldool

Schéma 4

### Condensation de Claisen

*Schéma 5*

### Réaction de décarboxylation d’un βcétoacide

*Schéma 6*

Pour toutes les réactions qui ne seront pas favorables, la cellule va passer par des coenzymes

### Cas particulier de la fonction carboxylique

*Schéma 7*

Il est stable, on parle de prototropie, car la molécule est tout le temps entrain de faire les mêmes mouvements. Pour le déstabiliser, il faut bloquer la fonction, en enlevant le – du O, et il faut pour cela faire une liaison phosphate, mais il faut de l’ATP.

### Exemple à retrouver

*Schéma 8*

Pour casser, il faut se déplacer vers une condensation de Claisen ou d’aldool.

TD

# Rappels

L’ADN absorbe à 260 nm. Les protéines absorbent à 280 nm. Quand on prépare des ADN, ces solutions sont très concentrées. On doit donc les diluer au 50ème pour pouvoir obtenir de bonnes mesures. Les valeurs que l’on trouve pour des solutions 1, 2 et 3 sont les suivantes :

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 260 nm | 280 nm | 260/280 | [µg/mL] | Paires de bases | Molarité (mol.L-1) | Facteur de dilution |
| 1 | 1,2 | 0,58 | 2,07 | 3 000 | 3 000 | 3/2.106 = 1,5 µM | 9100 |
| 2 | 1,1 | 0,55 | 2,00 | 2 750 | 4 500 | 2,75/ (4 500x660) = 0,93 µM | 5600 |
| 3 | 1,2 | 0,62 | 1,94 | 3 000 | 15 000 | 3/ (15 000x660) = 0,3 µM | 1825 |

Quelles sont les concentrations de ces trois solutions ? Quelle est la qualité de la préparation ?

## La pureté est évaluée par le rapport 260/280.

*Voir colonne 4*

## A = E x C x L C = A / (E x L)

*Voir colonne 5*

1 D.O.260 = 50 µg/mL pour une cuve de 1 cm. A260 x 1 D.O.260 x dilution = [µg/mL]

## Calcul de la molarité ?

*Voir colonne 7*

**1 mole de paires de bases = 660 g 1 Da c’est le poids d’une mol d’hydrogène**

Dalton = molécule g.mol-1 = molarité

Une mole : 3000 x 660 = 2.106 g.mol-1

## Micro-injection d’un ADN dans un noyau

On veut injecter 100 molécules dans 1 pL. Les molécules sont elles suffisantes pour qu’il y ait 100 molécules par pL ? Si oui, quelle dilution faut-il faire ?

n = N x N N = 6,02.1023 n = nombre de mol N = nombre de molécules

n = 100 / 6,02.1023 = 1,66.10-22 mol

On veut 1,66.10-22 mol.pL-1 ce qui vaut 1,66.10-4 µmol.L-1

Facteurs de dilution : *voir colonne 8*

## Gène SUI

Le gène SUI se trouve chez l’homme et il a un facteur VIII. Il fait 186 000 paires de bases, mais il ne contient que 26 exons, qui représentent 5% du gène. Quel sera le poids moléculaire de la protéine ?

5% de 186 000 = 9300 paires de bases codant pour des acides aminés. 3100 acides aminés. 1 acide aminé fait **110 g.mol-1**, donc nos 3100 acides aminés font 341 000 g.mol-1, et donc 341 kDa.

## Taille des molécules d’ADN

On a 2 molécules A et B :

* A fait 647 paires de bases et résiste à l’exonucléase.
* B fait 647 paires de bases et est sensible à l’exonucléase.

Le poids moléculaire de ces ADN vaut 647 x 660 = 4,3.105 Da

La distance entre 2 paires de bases est de 0,34 nm. Donc pour calculer la taille en µm :

647 x 0,34.10-3 = 0,22 µm.

Les exonucléases rompent les liaisons phosphodiester en commençant par les extrémités libres 3’ ou 5 ». A est circulaire car il n’y a pas de rupture de liaisons. B est linéaire car il y a rupture des liaisons.

La molécule C est linéaire, elle fait 0,33 µm, son poids moléculaire est de 2,9.105 Da. Combien a-t-elle de nucléotides ? 0,33 / 0,34 = 970 paires de bases. Il y a 2 nucléotides par paire de base, il y a donc 1940 nucléotides.

Si l’on raisonne par le poids moléculaire, on ne trouve pas le même résultat, on prend 2,9.105 / 660 = 439,3939393939… et donc on a 878,7878787878 nucléotides.

On a un ADN plus léger, mais plus long que les ADN A et B. Donc l’ADN C n’est pas un ADN double brin, il est donc linéaire et simple brin. Et donc il y a 2,9.105 / 330 = 880 nt, ou 0,33 / 0,34 = 970. Or le résultat utilisant la longueur est faux, parce que l’ADN est simple brin, et qu’il n’a pas le même écart entre 2 nucléotides qu’une hélice B.

On va maintenant prendre ces 3 ADN A, B et C, les déposer sur un gel d’agarose :

- A B C

A est circulaire PM : 4,3.105 Da

B est linéaire PM : 4,3.105 Da

C est simple brin PM : 2,9.105 Da

+

Supposons que chacune des molécules possède un site pour une enzyme E, on les traite avec 3, et on fait une nouvelle électrophorèse.

- A B C

+

On prend la molécule B, on la chauffe à 100°C, puis on le met à 0°C, puis on le met en gel de polyacrylamide. On fait la même chose avec C.

- B C

Ca n’agit pas sur C, mais B devient simple brin.

B1

B2

+

On va prendre B1 et B2, les mélanger avec de l’ARNm isolé de cellule, on chauffe à 100°C et on refroidit lentement. On incube ces solutions avec une RNase qui dégrade les ARN simple brin. On dépose sur gel d’agarose, et l’on obtient ces produits :

- B1 B2

+

B2 s’apparie plus que B1, il a donc plus de séquences complémentaires que B1.

Intestin de rat

Graphe 1 : sur 30 secondes en conditions normales (aucun ajout)

Observation : la courbe augmente et redescend d’après un cycle régulier (environ un pic toutes les deux secondes) car 16 pics en 30 secondes.

Valeur à t=0 est de 0 et pic d’amplitude 10-15 mV

La courbe augmente légèrement au cours du temps et a une valeur de 20 mV à 20 secondes

Interprétation : Ce cycle décrit une contraction spontanée donc l’intestin garde son mouvement de péristaltisme (moyen pour faire progresser les nutriments le long de la paroi de l’intestin) dans les conditions « normales » dans le liquide physiologique plus glucose plus dioxygène à 37 degrés.

Graphe 2 : sur 3 minutes avec ajout d’Acétylcholine à t= 30sec

1 : 10-8 : Observation : allure de la courbe n’est pas modifiée au cours du temps, on observe simplement une succession de pics et de chutes d’amplitudes. Ils sont d’amplitude moyenne de 14mV.

De plus on remarque qu’à t=30sec au moment où on introduit l’Acétylcholine 10-8M, aucun changement ne se passe.

Interprétation : On peut en déduire que durant cette expérience les résultats sont les même qu’en conditions normales (graphe 1)

L’acétylcholine doit être en concentration trop faible pour agir sur la contraction de l’intestin.

Remarque : Nous avons donc refait cette expérience avec des concentrations de plus en plus fortes avec un facteur de 10 entre chaque. A une concentration de 10-4 nous avons obtenus des résultats convenables pour être exploités.

Graphe 3 : 10-4

Observation : amplitude : 103,05 mV

Écart : 5575,77 ms

Pente : -0,02 mV/min

Durant les 30 premières secondes, l’intestin a un mouvement de péristaltisme caractérisé par une courbe qui possède des pics à environ 20 mV et redescend vers 5 mV. A t=30sec, on introduit de l’acétylcholine. Cela entraîne une montée de façon très rapide de la contraction qui arrive à une valeur située entre 110 et 125 mV. L’amplitude entre les contractions avant l’injection et celles après est de 103,05 mV. Cette montée s déroule sur un temps de 5575,77 ms. Ensuite, de t= 30sec à t=30 min, les contractions reprennent un cycle régulier comparable à celles de départ.

Interprétation : il sagit d’un agoniste du récepteur. On peut déduire des observations que l’ augmentation dû à l’acétylcholine correspond à l’augmentation de la tension globale.

TP2 : Etude de l’activité de la β-galactosidase

# Généralités

Les organismes vivants sont le siège de nombreuses réactions chimiques ; ceci est dû à la présence de catalyseurs biologiques appelés enzymes. Comme pour les catalyseurs minéraux, les enzymes modifient la vitesse de la réaction chimique sans affecter l’équilibre final ; de plus, de faibles quantités suffisent à la transformation d’un grand nombre de molécules. Contrairement aux catalyseurs minéraux, les enzymes ont une spécificité très étroite, c'est-à-dire qu’elles catalysent seulement un nombre restreint de réactions et dans certains cas une réaction seulement. Elles agissent de façon optimale dans des conditions bien définies de pH, de température, de concentrations en substrats, et en cofacteurs. Ces propriétés des enzymes seront illustrées dans les manipulations suivantes.

Une réaction enzymatique peut être schématisée de la façon suivante :

k1 k2

E + S ES E + P

k-1

k1, k-1 et k2 sont les constantes de vitesse, E = enzyme, S = substrat, P = produit

On appelle « équation de Michaelis-Menten », l’équation qui représente correctement les données de la réaction enzymatique :

ν0 = Vmax [S]0 / (KM + [S]0)

ν0 est la vitesse de disparition du substrat ou de formation du produit dans les conditions initiales.

D’après cette équation, lorsque [S]0 tend vers l’infini, ν0 = Vmax (vitesse initiale maximale). Quand ν0 = Vmax / 2 , la valeur de [S]0 est égale à KM, la *constante de Michaelis*.

Etude le l’activité de la β-galactosidase (suite)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| T= | Tube | Action |
| 0 minutes | 11 | Mettre 0,1 mL de solution enzymatique et agiter |
| 0’ 30 | 12 |
| 1’ | 13 |
| 1’ 30 | 14 |
| 2’ | 15 |
| 2’30 | 16 |
| 3’ | 17 |
| 3’ 30 | 18 |
| 4’ | 19 |
| 7’ | 21, 22, 23, 24 | 0,1 mL de substrat + 1,8 mL de tampon pH 4,8 |
| 10’ | 25, 26, 27, 28 | 0,1 mL de substrat + 1,9 mL de tampon pH 4,8 |
| 15’ | 21 et 25 | Mettre en bain marie à 0°C pendant 2 minutes |
| 17’ | 21 et **22** | Mettre 0,1 mL de solution enzymatique |
| 18’ | 23 et 27 | Mettre en bain marie à 55°C pendant 2 minutes |
| 20’ | 23 | Mettre 0,1 mL de solution enzymatique |
| 21’ | 24 et 28 | Mettre en bain marie à 70°C pendant 2 minutes |
| 23’ | 24 | Mettre 0,1 mL de solution enzymatique |
| 30’ | 11 | Mettre 1 mL de Na2CO3 1 M et agiter |
| 30’ 30 | 12 |
| 31’ | 13 |
| 31’ 30 | 14 |
| 32’ | 15 |
| 32’ 30 | 16 |
| 33’ | 17 |
| 33’ 30 | 18 |
| 34’ | 19 |
| 47’ | 21, 22, 25 et 26 | Mettre 1 mL de Carbonate de Sodium molaire |
| 50’ | 23 et 27 |
| 53’ | 24 et 28 |
| 63’ | Tous | Prélever 200 µL pour mettre dans les puits |

Biochimie

TECHNIQUES D’ETUDE DES PROTEINES

# I. Dosage des protéines :

* Les protéines du sérum sont dosées avec le réactif de Gornali (réaction du biuret : bleu-violet). Le taux est plus faible chez les enfants que chez les adultes (en particulier chez les prématurés)
* D’autres liquides biologiques (exemple : liquide céphalo-rachidien) peuvent être dosés grâce :
* Au rouge de pyrogaliol-mobyldate.
* Au bleu de Coomassie.
* Dans ces liquides les concentrations sont beaucoup plus faibles ce qui explique l’utilisation d’autre techniques. Exemple : LCR

# II. L’électrophorèse

* C’est une technique qui permet de séparer sous l’action d’un courant électrique continu les différents constituants plus ou moins ionisés d’un mélange.
* Les molécules chargées positivement (les cations) se déplacent vers une électrode négative (la cathode) tandis que les molécules chargées négativement (les anions) migrent vers une électrode positive (l’anode).
* Les protéines présentent une extrémité NH2 et une extrémité COOH susceptibles d’être ionisées : NH3+ ou COO-.
* Dans la composition des protéines il y a généralement des acides aminés basiques :
* Arginine, histidine, lysine.
* Ils permettent d’apporter d’autres fonctions amines qui peuvent également être ionisées.
* On peut également retrouver des acides aminés acides :
* Acide aspartique, acide glutamique.
* Ils permettent d’apporter d’autres fonctions acides qui peuvent être ionisées.
* On peut trouver des fonctions phénoliques :
* Pour les acides aminés tels que tyrosine.
* Sous forme ionisé : O-.
* Ou des fonctions thiol (SH):
* Pour la cystéine.
* Sous forme ionisé : S-.
* Le point isoélectrique est la valeur du pH par laquelle la dissociation acide est égale à la dissociation alcaline.

SCHEMA

* Si une protéine se trouve dans un tampon dont le pH est égale à son point isoélectrique, elle passe d’une forme alcaline à une forme acide, et n’a pas de raison de migrer ni vers une électrode ni vers l’autre.
* Si une protéine se trouve dans tampon dont le pH est supérieur au point isoélectrique, elle passe majoritairement sous dissociation acide (déplacement l’anode).
* Inversement, si le milieu a un pH inférieur au point isoélectrique, la protéine est sous une dissociation alcaline (déplacement vers la cathode).
* On peut utiliser différents **supports** pour la migration des protéines :
* Le papier.
* La gélose.
* Le gel d’amidon.
* Différents gels de synthèse.

Tous ces gels sont des supports poly-osidiques.

On cherche à obtenir un support le plus neutre possible.

* Il faut également colorer les protéines pour les mettre en évidence :
* Le noir amide.
* Le rouge ponceau.
* Le bleu acide.
* On doit enlever le surplus de colorant. Après la décoloration on obtient :
* SCHEMA
* Ici on voit apparaitre 5 migrations (milieu pH = 9,2) :
* Une bande correspondant à l’albumine (la plus proche de l’anode).
* Quatre autres bandes α1 α2 β et γ correspondant encore à des mélanges de protéines.
* On peut aussi faire la migration dans un milieu dont le pH est moins élevé :
* SCHEMA
* Il est également possible de séparé β1 et β2.
* On cherche ensuite a mettre en évidence l’importance de chacune des fractions afin d’identifier des pathologies.
* Cette quantification est obtenue par spectrophotométrie.

## 2. Spectrophotométrie

* SCHEMA
* Le spectrophotomètre réalise la courbe et détermine l’aire sous la courbe.
* Cela permet ainsi de donner une estimation en pourcentage de chacune des fractions selon leur surface sous la courbe.
* Il n’est pas possible de faire une interprétation correcte sans connaitre le résultat du dosage des protéines.
* Comme n’importe quel dosage, les variations mettent quelques jours ou mois pour évoluer.
* ALEX

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Hydragel (%)** | **Bleu acide (g/L)** | **Agarose (%)** | **Bleu acide (g/L)** |
| **Albumine** | 55,8 – 65,0 | 39.0-46,0 | 53,6-65,6 | 37,0-48 |
| **α1** | 1,8-3,3 | 1,2-2,4 | 1,7-4,1 | 1,2-2,9 |
| **α2** | 9,0-14,0 | 6,5-10,0 | 6,2-11,7 | 4,5-8,4 |
| **β1** | 8,7-14,0 | 6,0-10,0 | 1 6,3-9,8 | 4,6-7,1 |
| **β2** | 3,4 – 7,2 | 2,5-5,2 |
| **γ** | 9,7-18,0 | 6,5-14,0 | 9,9-20,4 | 6,0-15,6 |

* Chez les personnes dénutries on observe une diminution d’albumine et de protéines.
* Les infections il y a synthèse d’anticorps et ces immunoglobuline migrent essentiellement JUST

Cette augmentation est dite poly-clonale ALEX

Le pic est constitué d’un grand nombre de protéines qui sont en augmentation.

* Le syndrome inflammatoire est marqué par une augmentation des α1 et/ou α2. Il ne faut pas confondre inflammation et infections.
* La cirrhose correspond à une atteinte hépatique. Le foie est responsable de la synthèse de la plupart des protéines à l’exception des immunoglobulines produites par les plasmocytes. Lorsqu’il y a atteinte hépatique il y a alors baisse de la production des protéines (en particulier l’albumine). Dans le cas de la cirrhose il y a une production accru d’IgA. Ces IgA migrent à la fois en position β et position γ. Dans la cirrhose on retrouve un bloc β-γ : il n’y a pas de séparation entre les pics β et γ.
* Le syndrome néphrotique est le passage de protéines dans les urines au niveau du rein. Il en existe deux grands types :
* Le syndrome sélectif : les protéines passent dans les urines en fonctions de leur taille (les petites passent facilement, les grandes restent dans la circulation).
* Le syndrome non-sélectif : les protéines passent quelque soit leur taille.
* Dans les deux cas, il y a une fuite de protéine dans les urines ce qui signifie que le dosage des protéines dans les urines est abaissé.
* Quand le syndrome est sélectif on a :
* Une diminution important de l’albumine.
* Une diminution plus faible des γ.
* Une augmentation des α2. Cette augmentation est due à la synthèse en plus grande quantité de l’α2-macro-globuline (qui ne passe pas dans les urines).
* Quand le syndrome est non-sélectif on a :
* Une augmentation α2 moins conséquente.
* Diminution moins importante de l’albumine.
* Les protéogrames des syndromes néphrotiques sélectifs sont complémentaires des protéogrames des sérums.
* Les protéogrames des syndromes néphrotiques non-sélectifs sont presque pareil que ceux du sérum.
* Les dysprotéinémie monoclonale : myélome : maladie de Kahler, et maladie de Waldenström. Une des protéines (exemple une des IgA) est produite en très grande quantité. Cela donne un pic pointu d’importance variable à un endroit précis. Elle n’est pas à confondre avec l’augmentation polyclonale (de cirrhose ou d’infections).
* Si cette portion pointue est en β elle est plus difficile a identifier (car β est moins étalé que γ à l’état physiologique).

# III. Dosage spécifique d’une protéine

## 1. Immunoprécipitation

### a. En milieu félifié : immunodiffusion radiale – technique de Mancini

* Elle repose sur deux principes :
* La spécificité de la réaction antigène-anticorps.
* L’effet de zone.
* Les molécules sont des protéines antigéniques.
* L’effet de zone : ... n’est un soluble que pour certaines proportions d’antigène. Dans certaines proportions (d’antigène par rapport à la concentration d’anticorps) on arrive à un complexe antigène-anticorps qui est stable et qui précipite. Cet effet de zone permet le dosage.
* On met le sérum dans ces puits de gélose. Ce sérum va diffuser dans gélose qui est tout autour.
* La concentration en antigène s’abaisse et on arrive à un moment où les proportions sont correctes pour .... Autour de chaque puits on voit apparaitre un anneau de précipitation de complexe antigène-anticorps.
* Il reste a mesurer le diamètre de chaque anneau.

### b. En milieu liquide

**Opacimétrie**

* Le détecteur photoélectrique mesure la quantité de lumière qui a traversé la cuve. Il mesure donc indirectement la concentration des complexes anticorps-antigène.

**Néphélémétrie**

* Avant on mesurait la lumière renvoyée à 90° par les particules en suspension dans la cuve.
* Maintenant on mesure une quantité de lumière diffusée de 7 à 8°, autour du cache.

## 2. Electroimmunodiffusion – technique de Laurell

* On ajoute une électrophorèse. Ce dosage se passe en milieu gélifié et est plus rapide que le Mancili.
* Les dépôts sont situés à une des extrémités de la plaque. On dépose des sérums d’étalonnage : ce sont des sérums dont on connait la concentration pour la protéine correspondant à des anticorps.
* Les protéines vont commencées à migrer dans la gélose. Dans la gélose elles rencontrent l’anticorps correspondant. Le complexe se dissocie et la protéine peut commencer d’avancer. En continuant d’avancer la concentration d’antigène diminue.
* On peut observer à la fin de la migration des pics de complexes antigène-anticorps visibles. On comporte la hauteur des pics obtenus avec les pics des étalons.

# IV. Caractérisation d’une dysprotéinémie

## 1. Electroimmunofixation

* Permet de reconnaitre la protéine présente sur l’électrophorèse.
* La manipulation se passe sur un support cellogel qui comporte six pistes. On utilise un plaque par malade : le même échantillon est déposé 6 fois.
* ...
* Sur les autres pistes on dépose des solutions d’antisérum qui reconnaissent les chaines lourdes : α, gamma, mu et les chaines légères lambda et kappa.

METABOLISME DU FER

* C’est un oligo-élément : un adulte de 100kg possède 4,5g de fer.
* Le fer est essentiellement lié aux protéines, il ne se trouve que minoritairement sous forme libre.
  + Le fer est classé en deux grands groupes
  + Le fer héminique.
  + Le fer non-héminique.
* Le fer héminique(ferreux Fe2+) représente 60 à 66% du fer de l’organisme. On le retrouve dans :
* Hémoglobine
* Myoglobine
* Le fer présent dans les enzymes (peroxydase, catalases) et cytochromes.
* Le fer non-héminique (ferrique Fe3+). On le retrouve dans :
* Transferrine (transport).
* Ferritine (réserve) : 12 à 13% du fer total.
* Hémosidérine (réserve) : 13 à 13% du fer total.
* Le fer de réserve est contenu essentiellement dans le foie et la rate (éventuellement les macrophages).
* Le fer dosé est toujours celui de la transferrine.
* Le fer est indispensable à la vie : constituant de l’hémoglobine protéine de transport de l’oxygène.
* Elément toxique : exécute la réaction de Fenton produisant des radicaux libres : H2O2 🡪 2OH°. Il y aura alors un risque de peroxydation des lipides qui fera apparaitre d’autres radicaux libres, etc.

# Métabolisme

* Le fer est retrouvé dans les nourritures animales (myoglobine, transferrine, ferritine, hémosidérine, etc.).
* Il subit une protéolyse partielle par l’action des enzymes gastriques. Il y aura libération du fer et de la cystéine. La cystéine permet la réduction du fer ferrique en fer ferreux.
* Puis le fer se retrouve dans la lumière intestinale :
* Récepteur HCP1 est capable de fixer l’hème et permet son absorption dans l’entérocyte.

Une fois dans l’entérocyte l’hème est dégradé pour récupérer du Fe2+.

* Récepteurs SFT permet le passage du fer ferreux (Fe2+) dans l’entérocyte.
* Un récepteur Int-Mob permet la fixation de Fe3+-mucines, le tout forme un complexe internaliser dans l’entérocyte.

Une fois dans l’entérocyte le Fe3+ est réduit en Fe2+.

* Une réductase Dcytb1 est retrouvée à la surface des entérocytes (Fe3+🡪Fe2+).
* Un récepteur DMT1 peut alors permettre le passage de ce fer ferreux (Fe2+) dans l’entérocyte.
* Pour un sujet en bonne santé on considère que 10% du fer apporté par l’alimentation est absorbé.
* Une petite partie du Fe2+ est stocké dans l’entérocyte avec de la ferritine sous forme de Fe3+.
* Une grande partie du Fe2+ passe dans la circulation sanguine grâce à la Ferroportine (FPN).
* Au pôle basal des entérocytes on retrouve une Héphaestine qui oxyde le fer ferreux (sorti de l’entérocyte grâce à FPN) en fer ferrique. Ce fer ferrique est fixé sur l’apo-transferrine (qui devient donc la transferrine).
* La quantité de fer qui passe dans la circulation tous les jours est de 1mg/jour (homme) à 2mg/jour (femme).
* Pendant la grossesse on peut augmenter à 6 pour 10mg/jour.
* Les besoins sont aussi accrus lors de l’allaitement.
* Le but principal du fer est de permettre la synthèse de l’hème au niveau des érythroblastes.
* A la surface des érythroblastes on retrouve :
* Récepteur à la transferrine.
* La DMT1.
* Ferriréductase Steaps 3.
* Le récepteur à la transferrine est formé :
* De deux chaines protéiques reliées par des ponts disulfures.
* Elle peut fixer deux molécules de transferrine a son extrémité.
* Ces trois éléments sont endocytés et forment un endosome à l’intérieur de l’érythroblaste.
* Il y a une pompe a protons qui permet le passage d’H+ à l’intérieur de l’endosome qui a alors un pH de 5,5.
* Le fer se détache spontanément de la transferrine en milieu acide.
* Le Fe3+ libéré est réduit par la ferriréductase steaps 3 en Fe2+.
* Ce Fe2peut passé dans le cytoplasme grâce à l’action de la DMT1.
* Une fois dans le cytoplasme il rentre dans la mitochondrie grâce à la mitoferrine. Une fois dans la mitochondrie :
* 80% est utilisé pour la synthèse de l’hème.
* 20% est stocké avec la ferritine.
* Il y a un recyclage des trois éléments vers la surface membranaire des érythroblastes. L’apo-transferrine est libérée dans le sang.
* La durée de vie d’une hématie est d’environ 120jours.
* Les hématies vieillissantes :
* Sont directement phagocytées par les macrophages.
* Eclatent dans la circulation et libère l’hémoglobine qui se complexe avec l’haptoglobine pour former le complexe Hb-Hp qui est phagocyté par le macrophage.
* Une fois dans le macrophage l’hémoglobine est dégradée par l’hème-oxydase pour libérer du Fe2+.
* Ce Fe2+ est oxydé en Fe3+ par la DMT1 pour :
* Être stocker dans le macrophage avec la ferritine (30%).
* Sortir dans la circulation sanguine grâce à la ferroportine (70%).
* Une fois dans la circulation sanguine il est réduit en Fe3+ et se lie à l’apotransferrine (qui devient la transferrine) pour circuler dans le sang.
* Recyclage de 30mg par jour.
* Au niveau de l’hépatocyte on retrouve trois types de récepteurs :
* RTf1
* RTf2 sont beaucoup plus nombreux mais 30 fois moins d’affinité que les RTf1.
* Il y a formation d’un endosome 🡪 acidification 🡪 sortie du fer dans le cytoplasme (grâce à Cyrdb1 et DMT1) 🡪 stocké dans la ferritine.
* Ce stockage est réversible :
* Fe2+ sort grâce à la ferroportine.
* La ceruléoplasmine l’oxyde en Fe3+.
* Le fer peut alors se complexer avec la transferrine pour circuler dans le sang.

# Régulation

## Hepcidine

* Ce peptide est codé par le gène HAMP. Le fonctionnement de ce gène HAMP est lui-même régulé par la protéine HFE.
* L’hepcidine :
* Limite l’absorption du fer au niveau intestinal.
* Régule la sortie de fer du macrophage.
* Carence en fer ou anémie ou hypoxie.

🡪 Synthèse d’hepcidine diminuée.

🡪 Augmentation de l’absorption du fer et libération des macrophages.

* Surcharge en fer ou infection ou inflammation (IL6 et IL1β).

🡪 Synthèse d’hepcidine augmentée.

🡪 Augmentation de l’absorption du fer et libération des macrophages.

## Système IRE-IRP

* IRE : Iron Responsive Elément (motif de l’ARNm).

IRP : Iron Regulatory Protein.

* Ce système intervient pour réguler la synthèse :
* Du RTf 1.
* De la ferritine.
* De la ferroportine.
* Du DMT1 (entérocyte).
* Pour la régulation de RTf1 :

Quantité de fer intracellulaire élevée

* Absence de formation d’un complexe IRP-IRE qui stabilise l’ARNm
* Dégradation des ARNm des RTf1.

Quantité de fer intracellulaire faible :

* Formation d’un complexe IRP-IRE qui stabilise l’ARNm.
* Stabilisation des ARNm du RTf1.
* Pour la régulation de la ferritine et de la ferroportine :

Quantité de fer intracellulaire élevée :

* Absence de formation d’un complexe IRP-IRE qui normalement empêche la traduction.
* Traduction réalisée : ferritine et ferroportine augmentent.

Quantité de fer intracellulaire faible :

* Formation d’un complexe IRP-IRE qui empêche la traduction.
* Inhibition de la traduction : ferritine et ferroportine diminuent.

Remarques :

* Les hormones thyroïdes et les cytokines pro-inflammatoires augmentent aussi la synthèse de la ferritine par dissociation du complexe IRE-IRP.
* Dans l’entérocyte lorsque la concentration en fer est faible :
* L’interaction IRP-IRE stabilite l’ARNm du DMT1.
* La synthèse de la ferrotportine n’est pas diminuée (contrairement à ce qui se passe pour les autres cellules).

Le fer alimentaire sera davantage utilisé.

Lorsque la concentration redevient normalement : l’ARNm du DMT1 est dégradé.

# Ferritine

* PM = 450 000.
* Formé de 24 chaines protéiques de deux types :
* H.
* M.
* Les formes les plus abondantes sont les formes les plus homogènes (H24 ou M24).
* Lorsqu’il est à l’intérieur de la ferritine le fer est stocké sous forme de cristaux de fer.
* La ferritine peut stocker 3000 atomes de fers.
* C’est un stockage réversible.

# Dosage du fer

* Avant de le doser il faut le libérer de la transferrine.

Cette libération ce fait par acidification : tampos actétate, phosphate, formiate, etc.

* Réduction à l’efat ferruex sulfite, dithionite, acide ascorbique, thioglycolique, etc.
* Coloration : TBTZ, bathophénanthroline, ferrozine, férène.
* Les concentrations de fer dans le sang :
* Chez l’homme : 11,6 à 31,3 μmol/L.
* Chez la femme : 9,1 à 30,4 μmol/L.
* La concentration en fer n’est pas stable au cours des 24heure : elle suit un cycle nycthéméral :
* Pic à 12h.
* Légère descente jusqu’à 4h (minimum).
* Puis augmentation entre 4 et 8h.
* Ce rythme nycthéméral s’adapte au rythme de vie de chacun.

## Capacité totale de fixation de la transferrine

1ère méthode :

* Saturation de la transferrine.
* Séparation de l’excès de FeCl3 par :
* Précipitation par oxycarbonatede magnésium.
* Chromatographie sur résine.
* Dosage du fer de la transferrine saturée.

2ème méthode :

* Surcharge en milieu acide et dosage par le bleu de chromazyrol B puis alcalinisation et dosage du fer qui n’a pu se fixer, par différence : fer fixé sur la transferrine saturée.
* CTF 44,6 à 4μmol/L 🡪 1,79 à 3,23 g/L : transferrine.
* % de saturation = FER/CTF = 20 à 40%
* Dans la plupart des pathologies fer et capacité totale de fixation varie en sens inverse.
* A ne pas confondre avec la capacité latente de fixation de la transferrine : CFT – FER

## Ferritine

* La ferritine est le premier paramètre qui varie lorsqu’il y a une carence en fer. Il n’y a pas d’autre explication d’une diminution d’une carence en fer (voir une anémie).
* Ordre de grandeur :
* Chez l’homme entre 20 et 350 μg/L.
* Chez la femme non ménopausée entre 10 et 120μg/L.
* Chez la femme ménopausée entre 10 et 240μg/L.

## Dosage du récepteur soluble de la transferrine

* Le récepteur soluble correspond aux chaînes de la transferrine à la surface des cellules qui sont coupées par des protéases de manières physiologique.
* Concentration normale entre 0,83 et 1,76mg/L.
* En cas de carence en fer il y a une augmentation de leur concentration.
* On peut retrouver une augmentation de concentration aussi lors d’une érythropoïèse accrue ou inefficace. Effectivement il y a une augmentation du nombre d’érythroblaste donc du nombre de récepteur total (présent à la surface des érythroblastes).

# Pathologies

## Tableau récapitulatif

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Ferritine | fer | Transferrine |
| Carence martiale récente | ↘ | N | N |
| Carence martiale installée | ↘↘ | N | N↗ |
| Anémie ferriprive | ↘↘↘ | ↘ | ↗↗ |
| Syndrome inflammatoire | N↗ | ↘ | ↘ |
| Thalassémie | ↗N | N↗ | N↘ |
| Anémie sidéroblastique | ↗ | N↗ | N↘ |
| Anémie hémolytique | N | ↗ | ↘ |
| Cytolyse hépatique | ↗↗ | ↗ | ↘ |
| Hyperthyroïdie | ↗ | N | N |
| Hémochromatose(s) | ↗↗↗ | ↗ | ↘ |

## Hémochromatose type 1

Mutation (C282Y) du gène HFE.

↓

Déficit en protéine HFE.

↓

Nonctivation du gène HAMP.

↓

Diminution de la synthèse des ARN codant pour l’hepcidine.

↓

Diminution de l’hepcidine.

↓

Surcharge en fer.

↓

Hémochromatose.

## Autres surcharges héréditaires

* Hémochromatose juvénile : type 2 (sévère) :
* Type 2a : mutation du gène HAMP.
* Type 2b : mutation du gène pour l’hémojuvéline (intervient sur l’activation du gène HAMP).
* Type 3 : mutation du gène pour le récepteur 2.
* Mutation du gène pour la ferroportine.
* Acéruléoplasminémie (sévère).
* Atransférinnémie (très sévère).

## Autres pathologies

* Hémosidérose : surcharge en fer non génétique.
* Hépatosidérose dysmétabolique.
* Cirrhose.
* Syndrome néphrotique.

ED4

* Marqeurs de l’insufisance cardiaque :
* Il en existe deux :
* BNP : natriurétique peptide B.
* NT-pro BNP.
* Ce qui est synthétisé en réalité est un préproBNP :
* Première protéolyse qui permet le passage vers un proBNP.
* Une deuxième protéolyse le clive en deux peptides : BNP + NT-proBNP
* Cette protéine est synthétisée par les cardiomyocytes.
* Elles possèdent des propriétés :
* Vasodilatatrices.
* Diurétriques.
* Natri-diurétiques.
* C’est un marqueur de l’insuffisance ventriculaire gauche.
* Son dosage se fait par des techniques d’amplification.
* Leur demie vie :
* 20minutes pour le BNP.
* 120 minutes pour le NT-pro BNP.
* Leur concentration :
* 100 mg.L-1pour la BNP
* 300 mg.L-1 pour le NT-pro BNP.
* En cas d’insuffisance rénale le NT-proBNP est retenu ce qui fausse les résultats de dosage.

## Marqeurs de pathologie cérébrale

* Protéines S110β.
* Ce sont des protéines de types dimérique :
* αα.
* αβ.
* ββ.
* les protéines appellées S100βsotn des protéiens qui possèdent au moins une chaine β (αβ ou ββ).
* Ces protéines spont synthétisées par les cellules gliales et les cellules de la gaine de schawnn.
* La concentration est très faible : < 0,8g.L-1
* On l’observe une augmentation de sa concentration dans diverse maladies :
* Mélanome.
* Alzeihmer.
* Trisomie 21.
* Souffrance du tissu cérébral de type :
  + Traumatique.
  + Vasculaire (ischémie ou hémorragie).
* Son augmentation reflète assez bien l’improtance des dégâts subis par le cerveau.

EXPLORATION ANORMALE LIPIDIQUE

* Lipoprotéine :
* Cœur lipidique : TG et ester de cholestérol.
* Périphérie : cholestérol, phospholipides.
* Il existe différents types de lipoprotéines :
* Chylomicrons (d< 1000).
* Lipoprotéines de très basse densité VLDL (d<1.006).
* Lipoprotéines de densité intermédiaire IDL (1,006<d<1.019).
* Lipoprotéines de basse densité LDL (1.019<d<1.063).
* Lipoprotéines de haute densité HDL (1.063<d<1.21).
* Ces lipoprotéines sont différenciées selon :
* Leur taille.
* Leur densité.
* Leur composition lipidique et protéique.
* Leur mobilité électro-phorétique.

# Quand pratiquer une exploration du bilan lipidique ?

* Chez l’adulte qui présente des facteurs de risque cardiovasculaire.

Facteur de risque : tout élément physiologique ou pathologique, ou de mode de vie associé à une incidence accrue de maladie.

* Chez tout sujet qui présente un antécédent de maladie cardiovasculaire.
* Chez tout sujet qui présente :
* Des antécédents familiaux.
* Des dépôts extravasculaires de cholestérol (Exemples : xanthomes tendineux, xanthélasma, arc cornéen).
* Devant une maladie métabolique, d’un organe ou générale (diabète, HTA, maladie inflammatoire, etc.).
* Avant certaines prescriptions médicamenteuses (contraceptifs oraux, etc.).

# Conditions de prélèvement pour un bilan lipidique

* Le prélèvement est un prélèvement de sérum.
* A jeun depuis 12heure : pour éliminer l’apport exogène de cholestérol.
* 24h sans alcool.
* A distance d’un épisode infectieux ou inflammatoire aigu.
* Sans interférence médicamenteuse.

# EAL (Exploration d’un anomalie lipidique)

* Bilan de base (très général : TG total, cholestérol total).
* Bilan d’orientation (quelle lipoprotéine en particulier l’anomalie touche).
* Bilan de recherche (plus rare, recherche de mutation).

## 1. Bilan de base

* Aspect du sérum.
* Cholestérolémie totale.
* Triglycéridémie.

### Aspect du sérum

* Prélèvement après 12heures de jeûne.
* On observe le sérum qui peut avoir plusieurs aspects :
* Limpide (clair).
* Ou opalescent (légèrement trouble).
* Ou lactescent (ressemble à du lait).
* En cas de sérum opalescent ou lactescent on effectue un test de décantation 24h à 4°C : on laisse le temps au chylomicrons de remonter au dessus du plasma (car moins dense).
* Première indication d’une éventuelle dyslipoprotéinémie.
* Valeur des triglycérides selon l’aspect du plasma :
* 0,91mM de TG pour le clair.
* 4,24mM pour opalescent.
* 12,59mM pour uniformément trouble (excès de VLDL).
* 13,67mM pour trouble avec crémage (excès de VLDL et présence de chylomicrons).

### Cholestérolémie totale

* Prélèvement après 12heures de jeûne, sur tube sans anticoagulant.
* Réaction enzymatique colorimétrique : après la réaction enzymatique on obtient la quinonéimine qui est dosée par son absorbance à 500nm.
* La quantité d’absorbance de quinonéimine est proportionnelle à la quantité de cholestérol de départ.
* Les taux sériques de cholestérol varient en fonction de l’âge :
* Augmente au cours de la vie.
* Est supérieur chez les hommes jeunes que chez les femmes jeunes.
* Est supérieur chez les femmes vieilles que chez les hommes vieux.
* Valeurs usuelles : cholestérol < 5,5mM (2g/L).
* Hypercholestérolémie :
* Isolée (augmentation LDL).
* Mixtes avec hypertryglycéridémie (augmentation LDL et VLDL).
* Hypocholestérolémie (< 3,3mM) :
* Familiales : rares et sévères.
  + Syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO) : déficit en apoB, retard mental et dysmorphie faciale.
  + Maladie de Tangier : amygdales gonflées et oranges. Mutation du récepteur nécessaire à la sortie du cholestérol des cellules (transporteur ABC1) à l’origine d’une accumulation de cholestérol dans les organes.
* Secondaires : hyperthyroïdie, malabsorption, malnutrition, insuffisance hépatique, cancer.

### Tryglycéridémie

* Prélèvement se fait après 12heure de jeûne, sur tube sans anticoagulant.
* Le dosage se fait par une réaction enzymatique colorimétrique (réaction de Trinder) : le taux de TG est proportionnel à l’absorbance de la quinonémie de la solution à la fin de la réaction.
* Valeurs usuelles : triglycérides < 1,95mM (< 1,0g/L).
* Hypertriglycéridémie :
* Augmentation de la synthèse hépatique.
* Diminution ...
* Le taux sérique de TG varie en fonction de l’âge.
* Augmentation avec l’âge.
* Supérieur chez les hommes que chez les femmes.

### EAL (Exploration d’une anomalie lipidique)

* Bilan de base :
* Normal 🡪 signes cliniques.
* Cholestérol ou TG augmenté 🡪 bilan d’orientation.

## 2. Bilan d’orientation

* HDL-Cholestérol.
* LDL-Cholestérol.
* Lipidogramme.
* Apolipoprotéines (AI, B).
* Lipoparticules Lp-AI.
* Lipoprotéine (a) : Lp(a).

### HDL-Cholestérol

* Précipitation sélective des lipoprotéines de base densité. Après centrifugation, dosage cholestérol dans la fraction HDL (surnageant).
* Valeurs usuelles :
* Homme 0,50-2,20mM.
* Femme : 0,80-2,60mM.
* Le LDL-Cholestérol entre 2,88 et 4,87mM.
* La formule de Friedwald (pas valable en cas d’hyperTG) :

LDL = CT – JDL – TG/5

### HDL-cholestérol / LDL-cholestérol

* Technique de dosage direct.
* HDL-cholestérol : précipitation des VLDL et LDL puis dosage du HDL (surnageant).
* LDL-cholestérol : précipitation de toutes les lipoparticules non LDL puis dosage du surnageant (LDL).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | HDL-cholestérol | LDL-cholestérol |
| sexe | H < F | F < H |
| Age (après 50ans) | Diminue | Augmente |
| Corrélation avec risque cardiovasculaire | --- | +++ |

* Indice d’athérogénécité :
* CT/HDL 🡪homme <4,9 et femme < 4,4
* LDL-C/HDL-C 🡪 ...

### Lipidogramme

* Intérêt :
* Déterminer la répartition des lipoprotéines HDL, LDL, VLDL.
* Détecter les dyslipidémies (Classification Fredreckson). Permet de donner au patient un traitement adapté.
* Technique : gel agarose avec migration de sérum.
* Du plus vers le mois ; HDL, Lp(a), VLDL, LDL.
* Le dépôt se fait au niveau du moins.
* Détermine les modifications quantitatives des lipoprotéines par comparaison avec un sérum normal.
* Classification de Fredrickson : classification des dysprotéinémie.
* Type I : hyperTG exogène (augmentation des chylomicrons).
* Type IIa : hypercholestérolémie pure (augmentation LDL).
* Type IIb : Hypercholestérolémie mixte (augmentation LDL et VLDL).
* Type III : dys-beta-lipoprotéine (augmentation IDL).
* Type IV : hyperTG endogène (augmentation VLDL).
* HyperTG endogène et exogène (augmentation VLDL et chylomicrons).

### Surveillance d’un traitement hypolipémiant

* Traitement au long cours 🡪 réévaluations périodiques.
  + 1 à 3 mois après la mise sous traitement.
  + Bilan lipidique + appréciation de la tolérance (effets secondaires).
  + Patient stabilisé : contrôle 1 à 2 fois par an.

### Apo AI/ ApoB

* Technique : immunéphélémétrie : anticorps spécifiques pour ApoAI ou ApoB. Gamme étalon.
* Valeurs usuelles :
* ApoAI : homme entre 1,10 et 2,00g/L et femme entre 1,20 et 2,20g/L.
* Apo B : homme entre 0,55 et 1,35g/L et femme entre 0,55 et 1,25g/L.
* ApoA1 rôle protecteur : rapport B/A1 < 1.

### LpAI

* Classification selon Aloupovic : on différencie les lipoparticules AI (ne contiennent que AI) et les lipoparticules AI AII (qui contiennent AI et AII).
* Seules les LpAI jouent un rôle dans le transport inverse au cholestérol ( = mécanisme protecteur contre l’athérosclérose.
* Dosage de LpAI permet d’affiner l’évaluation du risque cardiovasculaire.
* Technique : electro-immuno-diffusion (milieu gélifié).
* Une LpAI < 0 ?42g/L 🡪 pathologie.

### Lp(a)

* Lp(a) a des propriétés thrombogénique et athérogénique (très mauvaise).
* Technique : immunonéphélémétrie.
* Le dosage de la Lp(a) n’évolue pas au cours de la vie.

## 3. Bilan de recherche

* Mutation sur récepteur LDL.
* Mutation de l’apoB.
* Intervention donc de techniques de biologie moléculaire.

### Mutation sur récepteur LDL

* Le gène qui code pour le récepteur au LDL se trouve sur le chromosome 19.
* Il existe 5 classes de mutations :
* Classe I : défaut de synthèse des récepteurs.
* Classe II : défaut de transport du récepteur (dégradation).
* Classe III : défaut de liaison au LDL.
* Classe IV : défaut d’internalisation du récepteur.
* Classe V : défaut de recyclage du récepteur.

### Mutation de l’apolipoprotéine B

* Deux tyeps de mutations :
* Familial hypo-beta-lipoprotéinémie : troncation des molécules, défaut de structure ou catabolisme accéléré.
* Familial ligan défective apoB : mutation dans le domaine de liaison ou LDLR 🡪 hypercholestérolémie.

# Conclusion

* Bilan lipidique :
* Sur sérum.
* A jeun.
* Dosage CT et TG.
* Répartition des lipides dans lipoprotéines.
* Intérêt du bilan lipidique : évaluer le risque cardiovasculaire.

# Exemple fait en cours

* CT < 5,2
* TG < 1,95
* LDL < 1,87
* LDL < 2,20-2,60

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Aspect | Clair | Opalescent | Clair | Clair | Lactescent |
| Tg | 0.76 | 2.83 | 2.99 | 1.12 | 6.50 |
| CT | 6.22 | 9.72 | 5.89 |  | 4.35 |
| HDL-C | 2.72 | 0.84 | 0.96 |  | 0.60 |
| LDL-C | 3.08 | 7.55 |  |  | 1.89 |

* Patient 1 : hypercholestérolémie LDL. A NE PAS TRAITER.
* Patient 2 :
* TG : augmentés.
* CT : augmenté.
* HDL : augmenté.
* LDL : diminué.
* Patient 3 : avant hypoférrèse.
* Patient 4 : après hypoférrèse.
* Patient 5 :
* Tg : augmenté.

PROFIL PROTEIQUE SERIQUE

# ...

Cancer particulièrement les cancers des lignées B.

# I. Electrophorèse des protéines sériques

* Sérum : prélèvement sur un tube sec et on laisse coaguler. Le fibrinogène est transformé en fibrine. Le sérum correspond donc au plasma moins le fibrinogène.
* Plasma : prélèvement sur un tube avec anticoagulant puis centrifugation.
* ...
* Séparation électrophorétique des principales protéines du sérum :
* Albumine : protéine de synthèse hépatique. Protéine majeur du sérum.
* Globulines :
* Synthétisés par le foie : globulines de mobilité α1, α2 globulines (inflammation), β2 globulines.
* Synthétisés par les cellules B : γ globulines (surtout immunoglobulines).
* La quantification et rendu des résultats des protéines sont donnés en pourcentage des protéines totales dans le sérum (exemple : albumine représente 60%).

# II. Pathologie non-tumorale

## 1. Les protéines de la réponse inflammatoire

* Peuvent être retrouvé :
* Infections.
* Néoplasies.
* Sous l’effet de cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, et TNFα) le foie synthétise les protéines de la réponse inflammatoire (PRI).
* Trois examens de bases permettent d’évoquer le syndrome inflammatoire :
* La vitesse de sédimentation (VS). On estime à quelle vitesse les éléments figurés du sang sédimente. En cas de syndrome inflammatoire la VS est très élevée.
* La numération de formule : polynucléose neutrophiles (augmentation des polynucléaires dans le sang), thrombocytose, anémie.
* La mise en évidence et le dosage des PRI : CRP, orosomucoïde, haptoglobine.
* Le profil électrophorétique du syndrome inflammatoire :
* Hyper-α1-α2-globulinémie : le foie synthétise plus de protéines de la réponse inflammatoire.
* Le diagnostic biologique et suivi syndrome inflammatoire : à l’électrophorèse, les PRI essentiuellemetn dans la zone des α-gloublines. UYne hyper-α-globulinémie évoque donc un syndrome inflammatoire.
* Le diagnostic et suivi du syndrome inflammatoire ce fait par le dosage de la CRP (C-Reactive-Protein) constitue le dosage de référence. Le CRP est activateur du complément.
* CRP est un marqueur :
* Précoce : déversé dans le sang 5h après
* Sensible : si CRP-négative le patient n’a pas de syndrome inflammatoire.
* Spécifique.
* De plus sa concentration augmente proportionnellement à la réponse inflammatoire.

## 2. Le syndrome néphrotique

### a. Définition et étiologie

* Pathologie rénale qui est traduit par:
* Une protéinurie élevée (>3g/j).
* Une hypo-albuminémie (<30g/L).
* Le syndrome néphrotique est la traduction clinique d’anomalies rénales très différentes, fonctionnelles ou anatomiques : amylose, diabète, glomérulonéphrites, pathologie auto-immune, altération idiopathiques notamment.
* Il y a des degré de gravité du syndrome néphrotique :
* Sélectif (moins grave) : parfois seul l’albumine passe.
* Non sélectif (plus grave) : toutes les tailles de protéines passent même celle plus grosse que l’albumine.
* ...

### b. Traduction clinique

* Hypoprotéinémie à l’origine d’œdèmes.
* Fuite d’immunoglobulines et de protéines du complément à l’origine d’une vulnérabilité vis-à-vis des infections.
* Perte de protéines anticoagulantes favorise les thromboses.
* Altérations métabolisme hépatique : dyslipidémies (hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie (sérum trouble)).

### c. Aspect de l’électrophorèse des protéines sériques

* Hypo-albuminémie.
* Hyper α-globulinémie : distorsion du pic α2.

## 3. Hépatopathies chroniques

### a. Les hépatopathies chroniques

* Consommation chronique d’alcool favorise l’apparition d’états fibrotiques du foie.
* A stade évolué, cirrhose hépatique : bloc β-γ.
* A un stade évolué, la cirrhose peut se traduite par une insuffisance hépatocellulaire : cirrhose décompensée.
* Défaut de synthèse de l’albumine : hypoalbunémie.

### b. Profil électrophorétique des hépatopathies chroniques

...

## 4. Autres variations d’origines non tumorales

* Hypoalbuminémies liées aux états de dénutrition sévère (exemple : personnes âgées).
* β : augmentation de la transferrine dans anémies ferriprives.
* Déficits génétiques : déficit en α1-antitrypsine.

# III. Pathologie tumorale

* Pour l’essentiel, les immunoglobulines migrent dans la zone des gammas.
* Un pic détecté dans cette zone doit faire évoquer une gammapathie monoclonale, c'est-à-dire la prolifération anormale d’un clone lympho-plasmocytaire. Trois principales pathologies qui s’accompagnent d’un pic gamma anormal :
* LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique).
* Waldenström.
* Myélome.
* L’électrophorèse des protéines sériques constitue un examen clé pour le dépistage et le diagnostic de ces pathologies.

## 1. Rappels sur les immunoglobulines

* Il existe 5 types d’anticorps chez les mammifères : IgA, ...
* ...
* Les réponses immunoglobulines sont de nature clonale. Dans l’organisme on possède un répertoire de cellules B, chaque cellule B produit un seul type d’immunoglobuline.
* Chaque cellule B possède un gène d’immunoglobuline qui lui ai propre.
* La production d’une immunoglobuline en grandes quantités signe donc l’expansion du clone lymphocytaire produisant cette immunoglobuline : donc faire évoquer et rechercher une néoplasie B !

## 2. Les gammapathies monoclonales

* Le myélome est fréquent chez le sujet âgé. Typiquement le patient se pleins qu’il a des douleurs osseuses (car le plasmocytes a tendance à se localiser au niveau osseux).
* Dans la maladie de Waldenström le tableau clinique n’est pas le même du fait qu
* Hyperviscosité expliquée par le fait que l’IgM est déversée en très grande quantité (presque autant que l’albumine). A l’origine de phosphène et d’acouphène au niveau du cerveau (tableau neurologique).

### Les gammapathies monoclonales de signification indéterminée

## 3. Diagnostique des gammapathies monoclonales

* Pour le biologiste, la difficulté essentielle consiste à affirmer l’origine monoclonale d’une immunoglobuline détectée en grande quantité dans le sérum.
* L’affirmation du caractère monoclonale repose sur :
* ...
* ...

### a. Exemple de la gammapathie monoclonale

* Pic des γ-globulines.

b.

* Gammapathie débutante.

### c. Particularité des immunoglobulines d’isotype IgA

* Toutes les immunoglobulines ont tendance à migrer en gamma.
* Sauf les IgA qui ont tendance à migrer en β2.

### d. Cas particulier des chaines légères libres

* Proliférations monoclonales de cellules B productrices de chaines légères libres (kappa ou lambda) posent des problèmes de diagnostic biologique : étant petites elles peuvent passer dans les urines. Passage urinaire rapide des CLL (protéines de Bence-Jones).
* L’électrophorèse apparait souvent noramle dans le sérum.. on teste également les urines ...

### e. Principe et application de l’immunofixation au diagnostic des gammapathies monoclonales

* Permet d’affirmer la clonalité et de type immunoglobuline monoclonale.
* L’immunofixation est une technique plus sensible que l’électrophorèse
* Profil oligoclonal permet le diagnotic différentiel d’un profil monoclonale. Il est retrouvé dans :
* Les infections....