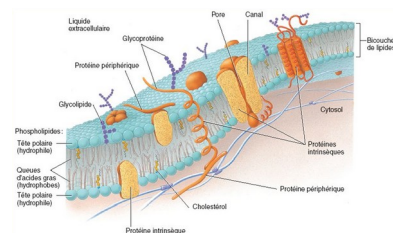
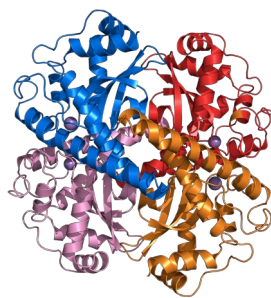
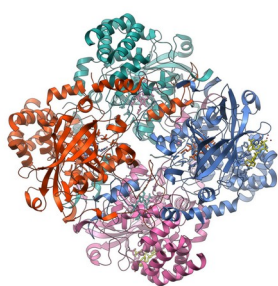


## Caractérisation biochimique de l'activité de biomarqueurs (CAT, GPx, SOD) et de la peroxydation lipidique (MDA)

Le Mans Université, avenue Olivier Messiaen, 72000 Le Mans



Dernière mise à jour: **03/07/2023**

par: Clément Baracchini

En général, on effectue les mesures d'activité au minimum sur 10 individus par lot expérimental.

- 1/ Préparation des solutions (Adapter si possible leurs volumes en fonction du nombre d'échantillons pour éviter de refaire les solutions)
- 2/ Réalisation de la gamme de BSA commune à tout le protocole
- 3/ Suivi du protocole expérimental

**Résumé :** Ce protocole décrit la méthode de dosage des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), ainsi que le taux d'oxydation protéique mesuré par les groupements carbonyles et le malondialdéhyde (MDA). Ces enzymes et biomarqueurs sont des indicateurs importants de l'état de stress oxydatif dans les cellules et les tissus. Le protocole commence par une étape d'extraction protéique afin d'obtenir les échantillons nécessaires pour les dosages enzymatiques et la mesure du taux d'oxydation protéique. Il est important de noter que le port d'une blouse et de gants est obligatoire tout au long de la manipulation pour assurer la sécurité et éviter toute contamination et accidents. Pour l'extraction protéique, des lunettes de sécurité sont obligatoires pour protéger les yeux, car elle peut impliquer l'utilisation de réactifs potentiellement dangereux. L'extraction est réalisée selon une méthode spécifique adaptée à l'échantillon biologique utilisé. Une fois les échantillons extraits, le dosage de l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT et de la GPx est effectué. Chaque enzyme est dosée individuellement, en utilisant des substrats spécifiques. Ces dosages permettent d'évaluer l'activité enzymatique des antioxydants cellulaires et leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène. En parallèle, le taux d'oxydation protéique est mesuré en utilisant la méthode des groupements carbonyles. De plus, le dosage du malondialdéhyde (MDA), un autre biomarqueur de l'oxydation lipidique, est réalisé. Cette étape doit être effectuée sous une hotte de sécurité complète pour minimiser les risques liés à la manipulation de substances potentiellement toxiques. En suivant ce protocole, il est possible de quantifier l'activité des enzymes antioxydantes, le niveau d'oxydation protéique mesuré par les groupements carbonyles, ainsi que le taux de malondialdéhyde (MDA) dans les échantillons biologiques. Ces mesures permettent de mieux comprendre le stress oxydatif et son impact sur les systèmes biologiques, ainsi que de comparer différents échantillons et conditions expérimentales.

## I. Traitement des échantillons et préparation du cytosol

Les tissus mous des individus (1/2 individu voire individu complet si petit) sont broyés à l'aide d'azote liquide (-196 °C) dans des mortiers. L'utilisation de protections individuelle (EPI) est nécessaire (lunette, gant, blouse). La manipulation s'effectue sur feuilles d'aluminium.

ainsi obtenus sont placés dans 2 mL de tampon TBS pH 7.4 (solution TBS) permettant d'imiter les conditions physiologiques (Tris-Buffered Saline pH 7.4 ; Tris-Cl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, HCl 1M). On utilise des ependorf de 15mL.

### Solution TBS (Tris buffered saline) :

- Dissoudre 6.05g Tris + 8.76 g NaCl dans 800 ml d'H<sub>2</sub>O.
- Ajuster le pH à 7.4 avec du HCl 1M (sous agitation)
- Compléter le volume à 1L avec de l'eau ultrapure (ou de l'eau désionisée)

Une fois prêt le TBS peut se garder à 4°C pendant 3 mois

## II. Estimation des concentrations de protéines extraite

Les broyats sont centrifugés à 9000 g pendant 15 minutes à 4° C. Le surnageant, contenant le cytosol, est récupéré et conservé à -20° C. Le dosage des protéines est alors réalisé selon la **méthode de Lowry et al. (1951)** dans des tubes en plastique.

Protocole de la méthode de Lowry : (la faire en triplicate !)

- 200 µL de cytosol extrait
- 1 ml de mélange réactionnel (**solution de Lowry** = 50 ml sol. A+ 1 ml sol. B+ 1 ml sol. C).
- **Solution A : 2g NaCO<sub>3</sub> + 0.2g NaOH complété jusqu'à 50 ml avec de l'eau distillée**
- **Solution B : 0.5g CuSO<sub>4</sub> complété à 10 ml sous agitation.**
- **Solution C : 2g tartrate double Na et K complété à 100 ml d'eau distillée**

ATTENTION la solution de Lowry (mélange des 3 solutions A+B+C) se fait le jour même.

Après agitation brève (vortex), les tubes (cytosol+Lowry) sont mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 20 minutes (au minimum 10 min).

- Ajouter 0.2 ml de solution de réactif de Folin (couleur jaune) que l'on dilue au 1/6. ATTENTION à conserver à l'obscurité à 4°C.

Après agitation (vortex), les tubes (cytosol+Lowry+Folin) sont mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. Le réactif de Folin réagit avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane, cystéine) produit ainsi un complexe soluble, de couleur bleue, dont l'absorbance est mesurée à **700 nm**. La quantité de protéines, correspondant à chaque densité optique mesurée a été calculée en µg/ml, à partir d'une courbe étalon réalisée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0.5 mg/ml (3 mg BSA dans 3 ml d'eau distillée sans agitation et à garder à 4°C). La concentration en protéines des échantillons est alors estimée en µg/mL.

**Préparation de la gamme étalon de BSA : 5 dilutions en cascades (à partir d'un échantillon représentatif du groupe).**

Tube 1 = 200  $\mu$ L solution BSA = 1mg/ml BSA

Tube 2 = 200 $\mu$ L solution BSA + 200  $\mu$ L d'eau distillée = 0.5 mg/mL BSA

Tube 3 = 200 $\mu$ L prélevés dans tube 2 + 200  $\mu$ L d'eau distillée = 0.25 mg/mL BSA

Tube 4 = 200 $\mu$ L prélevés dans tube 3 + 200  $\mu$ L d'eau distillée = 0.125 mg/mL BSA

Tube 5 = 200 $\mu$ L prélevés dans tube 4 + 200  $\mu$ L d'eau distillée = 0.0625 mg/mL BSA

Tube de blanc = 200  $\mu$ L eau distillée

Transférer le volume du tube (200 $\mu$ L) dans une cuve en plastique et lire les DO à 700 nm puis faire la droite étalon : concentration (axe abscisse) = f(DO) (axe ordonnée). L'équation est  $Y = aX$  (avec coefficient corrélation  $R^2$  à noter) où X est la concentration en protéines.

### **III. Détermination de la dilution des extraits cytosoliques avant les mesures des activités enzymatiques**

Pour savoir la bonne dilution à retenir des extraits cytosoliques, on peut faire la petite expérience suivante (la faire en triplicata !) :

Tube 1 = 100  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 100  $\mu$ L d'eau distillée

Tube 2 = 50  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 150  $\mu$ L d'eau distillée

Tube 3 = 40  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 160  $\mu$ L d'eau distillée = dilution 5X

Tube 4 = 30  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 170  $\mu$ L d'eau distillée

Tube 5 = 20  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 180  $\mu$ L d'eau distillée = dilution 10X

Tube 6 = 10  $\mu$ L d'extrait de cytosol + 190  $\mu$ L d'eau distillée

- Ajouter dans chaque tube 1 ml de solution de Lowry. Après agitation brève (vortex), les tubes (cytosol+Lowry) sont mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 20 minutes.

- Ajouter 0.2 ml de solution de réactif de Folin diluée au  $\frac{1}{2}$ . Après agitation (vortex), les tubes (cytosol+Lowry+Folin) sont mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. Le réactif de Folin produit un complexe de couleur bleue. On conserve la dilution qui montre la plus claire couleur. Attention, Il faudra par la suite prendre en compte dans les calculs d'activités enzymatiques ce facteur de dilution.

## IV. Dosage des SOD

La méthode spectrophotométrique utilisée permet une mesure de l'activité de la SOD d'une manière indirecte, en utilisant le complexe riboflavine/méthionine producteur des anions superoxydes et la NBT. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde  $O_2^-$  est mesurée à 560 nm. La SOD issue des extraits entre en compétition pour l'utilisation de  $O_2^-$  et donc limite l'oxydation de la NBT. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre (Beauchamp and Fridovich, 1971).

La réaction bilan est :  $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

Le milieu réactionnel pour le dosage de l'activité de la SOD comprend : 1000 $\mu$ L d'EDTA-Met 1mM, 892  $\mu$ L de tampon sodium phosphate 50mM pH 7.8, 50 $\mu$ L d'échantillon dilué avec du tampon phosphate 50mM au 1/80<sup>ème</sup>, 85.2 $\mu$ L de NTB (nitro-bleu de tétrazolium) 1mM et 22.6 $\mu$ L de riboflavine 1mM.

Ce dosage est une mesure indirecte de l'activité de la SOD. En effet, la riboflavine et la méthionine produisent l'anion superoxyde  $O_2^-$  : la méthionine est un donneur d'électrons permettant la réaction de la riboflavine et de l'oxygène à la lumière. Cet anion va ensuite oxyder le NBT qui passe alors du jaune au bleu : l'oxydation est donc mesurée à **560 nm**. Lorsque la SOD est présente dans le milieu, elle va transformer l'anion  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  et donc limiter l'oxydation du NBT.

**Solution Tampon sodium phosphate** 0.1 M à 25 °C pH 7.8 :

- 15.95g [ $Na_2HPO_4, 2H_2O$ ]
- 1.623g [ $NaH_2PO_4, 2H_2O$ ]
- On complète à 1L d'eau distillée. Diluer la solution 0.1M à  $\frac{1}{2}$  pour avoir solution 0.05M (soit 50 mM), soit 0.5 L de solution 0.1 M + 0.5L d'eau distillée.
- Vérifier ensuite le pH pour qu'il soit à 7.8

**Solution EDTA-met 1 mM :**

- 0,05g  $Na_2$  EDTA dans 50 mL de tampon sodium phosphate, soit une solution à 2.69 mM. Chauffer pour faciliter la dissolution.
- Ajouter 0,58 g méthionine et compléter à 100 ml avec du tampon sodium phosphate.

➤ **Chauffer pour faciliter la dissolution.**

Autre possibilité : si on a acheté directement de la EDTA-met pour avoir une solution à 1 mM on met 14.6 mg dans 50 ml de tampon sodium phosphate

**Solution NTB 1 mM : 22 mg compléter à 10 ml**

**Solution riboflavine 1mM : 0.2 mg compléter à 2ml d'eau distillée**

Pour le milieu réactionnel, nous procédons selon le protocole expérimental suivant (dans des tubes de 15 mL) :

	Cuve de référence	Cuve illuminée		Echantillon <b>Non dilué</b>
	(B, <b>blanc, zéro du spectrophotomètre</b> ) (1 cuve)	<b>DO<sub>T</sub> totale</b> (1 cuve) (T)	<b>DO<sub>E</sub> Echantillon</b> Dilutions 1/10 ou 1/20 ou 1/30 (1 cuve)	
EDTA-Met (1mM)	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µL
Tampon phosphate (50mM)	892.2 µl	892.2 µl	892.2µl	892.2 µL
Echantillon	_____	_____	<b>50 µl</b>	50 µL
Tampon Phosphate (50mM)	1000 µl	1000 µl	<b>450 µl ou 950 µL ou 1450 µL</b>	_____
NBT 1mM	85.2 µl	85.2 µl	85.2 µl	85.2 µL
Incuber les tubes à 25 °C au bain marie pendant 5 min				
Riboflavine	22.6 µl	22.6 µl	22.6 µl	22.6 µL

	<b>20 min Obscurité</b> (aluminium placard)	+	20 min à la lumière (lampe de bureau sur les échantillons)
--	--	---	---

Après incubation à la lumière (Lampe) ou à l'obscurité pendant 20 min faire la lecture de la DO à 560 nm.

Comment choisir la bonne dilution à retenir (totale, 1/10, 1/20 ou 1/30) : si DO totale T (0 µL cytosol en lumière) = 0.300 il faut retenir la dilution qui donne 50% d'inhibition soit DO ~0.150.

L'absorbance est mesurée à 560 nm et l'**activité SOD est calculée selon la formule** :

$$Activité_{SOD} = \frac{\left( \frac{DO_T - DO_{ech}}{DO_T} \right) * 100 * 20}{\frac{[Protéines]}{50}} * Fd$$

Avec DO<sub>ech</sub> : la densité optique de l'échantillon, DO<sub>T</sub> : la densité optique du total (T), Fd : facteur de dilution des échantillons



## V. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) toxique pour la cellule en eau et en dioxygène (Aebi, 1984 ; Nicholls, 2012).

La réaction bilan est :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

L'activité catalase CAT se mesure à **240nm** à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible selon la méthode de Najjar et al (2017).

### **Solution Tampon sodium phosphate 0.1 M (100 mM) à 25 °C pH 7.5 :**

- **15.95g [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ]**
- **1.623g [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ]**
- **Compléter à 1L d'eau distillée**
- **Vérifier ensuite le pH pour qu'il soit à 7.5 et l'ajuster si besoin avec de l'HCl.**

Pour le milieu réactionnel, les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase sont résumés dans le tableau suivant.

	Essai (μl)	Blanc (μl)
➤ Tampon phosphate (100mM, pH 7.5)	780	800
➤ cytosol (1 à 1.5mg protéine/ml)	20	0
Laisser agir 20 min T° ambiante		
➤ $\text{H}_2\text{O}_2$ (50mM)	200	200
2 lectures : à 15 sec (AI) puis 1 min après (AF)		

On note que le zéro de l'appareil a été ajusté au préalable par du tampon phosphate pH 7.5.

Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme qui décompose 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 1 minute (Najjar et al., 2017). L'activité de la CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta DO * d}{\epsilon * l * X * 0.02}$$

Avec :

- $\Delta DO$  : variation de la densité optique par minutes c'est -à- dire pour :  
 $(AI - AF) \times 4/3 = \Delta DO$
- AI (Absorbance initiale) : 15 secondes
- AF (Absorbance finale) : 1 minute
- d : dilution de l'échantillon au début ;
- $\epsilon$  : Coefficient d'extinction  $0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 0,043 \text{ } \mu\text{mole cm}^{-1}\text{ml}^{-1}$
- l : Largeur de la cuve (longueur du trajet optique) en cm ;
- X : Quantité des protéines en mg/ml.

K : constante de vitesse de disparition de l' $\text{H}_2\text{O}_2 = (2.303/T) \times \log (AI/AF)$

T = intervalle de temps (min) entre AI et AF soit  $1 - 0.25 = 0.75$

## VI. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase a été mesurée selon la **méthode de Flohe et Gunzler (1984)**, modifiée en utilisant  $\text{H}_2\text{O}_2$  comme substrat car l'enzyme GPx transforme le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  en utilisant le GSH. Cette activité est exprimée en  $\mu\text{moles}$  de GSH oxydé/min/mg de Protéines.

Pour cela, 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont mélangés avec 400  $\mu\text{L}$  de GSH 0.1 mM et 200  $\mu\text{L}$  de tampon sodium phosphate 50mM pH 7.8. Le mélange est incubé à  $25^\circ \text{C}$  pendant 5 minutes, puis 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.3mM sont ajoutés. Le mélange est alors laissé au repos pendant 10 minutes pour que la réaction enzymatique ait lieu. Ensuite, 1 mL de TCA 1% (acide trichloroacétique) est ajouté et le mélange est placé dans la glace (30 min) pour stopper la réaction. Ensuite, une centrifugation a lieu (1000g) pendant 10 minutes : 480  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés et 2.2 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.32M) y sont ajoutés, ainsi que 320  $\mu\text{L}$  de DTNB 1 mM (réactif d'Ellman) qui va réagir avec le GSH présent en solution.

**Solution GSH 0.1 mM** : 0,0153 g compléter à 500 mL avec de l'eau distillée

**Solution TCA 1%** : 1.5g compléter à 150 mL avec de l'eau distillée. Agitation sous 30°C pendant 10 minutes. Faire le jour même.

**Solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32M)** : 2,848g compléter à 50 mL avec de l'eau distillée  
chauffer + Agiter sous hôte

**Solution Tampon sodium phosphate (50mM, pH 7.8)** : dilution ½ du tampon phosphate 0.1 M, pH 7.8 préparé dans les activités précédentes (voir début du fichier)

**Solution DTNB 1 mM** : 0,0118 g compléter à 30 mL avec de tampon sodium phosphate (50mM, pH 7.8)

	Echantillon (E)	Blanc (B)
Extrait cytosol	200 µL	-
GSH (0.1 mM)	400 µL	400 µL
Tampon sodium phosphate (50 mM, pH 7.8)	200 µL	400 µL
Incubation au bain marie 25 °C pendant 5 min		
H2O2 (1.3 mM) initiation de la réaction	200 µL	200 µL
Laisser agir 10 min au repos T° ambiante		
TCA 1% pour initier l'arrêt de la réaction	1 mL	1 mL
Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min (arrêt de la réaction)		
Centrifugation 1000 g pendant 10 min		
Surnageant	480 µL	480 µL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O (0.32M)	2.2 mL	2.2 mL
DTNB 1 mM	320 µL	320 µL

Mesurer la DO B avec un blanc à l'eau distillée.

L'absorbance de la solution est alors mesurée à **412 nm**, 5 minutes après la réaction. L'activité est calculée par la diminution du taux de GSH par rapport à la réaction non enzymatique (blanc) :

$$Activité_{GPx} = \frac{0.04 * (DO_E - DO_B) * 5}{DO_B * 10 * X}$$

Avec :  $DO_E$  la densité optique de l'échantillon,  $DO_B$  la densité optique du blanc,  $X$  la quantité de protéines dans l'échantillon, 0.04 la quantité initiale de GSH, 5 pour convertir l'activité en mL et 10 le temps de la réaction en minute

## VII. Dosage du taux de peroxydation lipidique (déstabilisation des lipides)

### Tout le protocole est à réaliser sous hôte (+EPI obligatoire)

La peroxydation lipidique est évaluée par le dosage des aldéhydes (dont le MDA) réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Le dialdéhyde malonique ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Le MDA libre n'est pas ou peu mesurable car il disparaît rapidement par formation d'adduits. La méthode de mesure repose donc sur une libération en milieu acide du MDA fixé. Lors d'un traitement à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA est une molécule de MDA. L'absorption intense de cet adduit (mesure à **532 nm**) rend cette mesure très sensible (Niehaus and Samuelsson, 1968 ; Esterbauer, 1993).

Pour faire cela, il est nécessaire de faire les solutions suivantes :

#### **Solution TBS (pH=7.4) (déjà faite en I) :**

- 3,025 g Tris
- 4,38 g NaCl compléter à 50 ml avec de l'eau distillée

#### **Solution HCl (0.6 M) :**

- 51.569 mL de HCl (36%)
- compléter avec 1L d'eau distillée

#### **Solution Tris-TBA :**

- 0,300 g de TBA (120 mM)
- Compléter avec 20 mL de Tris (26 mM)
- Ajout une goutte EtOH pour dissolution
- Chauffer et agiter jusqu'à dissolution complète

#### **Solution TCA-BHT :**

- 1g de BHT (Butyl Hydroxytoluene)
- Compléter avec 100 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 20%

- Pour le milieu réactionnel, nous avons procédé le protocole expérimental suivant :

	Tube Blanc	Tubes à Essai
Extrait cytosolique	0 µl	375 µl
TBS (pH=7.4)	525 µl	150 µl
TCA-BHT	375 µl	375 µl

Les tubes sont vortexés puis centrifugé à 1000 tours/ min pendant 10 minutes. Quatre cents microlitres de surnageant sont prélevés, puis 80 µL de HCl (0.6 M) et 320 µl d'acide thiobarbiturique (Tris-TBA) sont ajoutés. Le contenu est vortexé de nouveau puis incubé à 80 °C pendant 10 min.

La lecture des densités optiques a été faite à **532 nm** dans une cuve en quartz. Cette densité optique, qui correspond à la formation du complexe (TBA–MDA), est directement proportionnelle à la concentration de MDA, et donc de lipides peroxydés. La loi de Beer – Lambert ( $DO = E.C.L$ ) est appliquée. La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

$$C = DO. 10^6 / (E \times L \times X \times Fd)$$

Avec:

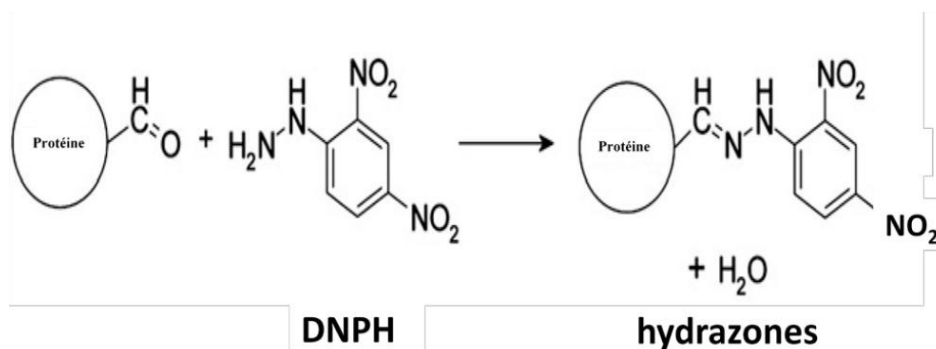
- C : concentration de MDA en nmoles par milligramme de protéines.
- Do : densité optique lue à 532 nm.
- E : coefficient d'extinction molaire du MDA ; ( $E = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).
- L : longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- X : concentration du cytosol en protéines (mg /ml).
- Fd : facteur de dilution :  $Fd = (Ve \times Vs) / (Vf \times VF)$  avec :
  - Ve : volume de prise de l'échantillon (375 µl)
  - Vs : volume prélevé du surnageant (400 µl)
  - Vf : volume final : Une fois que l'on a précipité les protéines à chaud (95-100°C pendant 30 min). on vortexe les tubes puis on les centrifuge. A cette étape on a bien 900 µL de Vf.

VF : volume final à l'incubation. Après la centrifugation on récupère 400µL du surnageant et l'on ajoute 80 µL HCl et 320 µL Tris-TBA.

Le Fd est donc de 0.2083.

## VIII. Dosage du taux de oxydation protéique (taux de groupement carbonyles)

La mesure du taux de groupement carbonyles est réalisée selon la méthode de Reznick *et* Packer (1994). Les groupements carbonyles sont des produits de l'oxydation des protéines, ils réagissent avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former un composé jaune–orange (hydrazones) qui absorbe à une longueur d'onde de **370 nm**.



Dans un premier temps, une solution de TCA à 50% a été ajoutée aux échantillons de l'homogénat cellulaire de façon à précipiter les protéines. Ensuite, le culot a été récupéré et incubé avec une solution de DNPH (10 mM) (Merck, code D199303-25G, 30 euros) solubilisé sous agitation dans du HCl (2M) à température ambiante pendant 1 heure. Le mélange est centrifugé à 4 °C pendant 15 minutes à 4000 g. Le culot est ensuite incubé avec un mélange éthanol à l'acétate d'éthyle 3:1 (v/v) (Fisher Scientific code 15582024, 4L, 123 euros). Cette opération de lavage du DNPH non fixé est répétée 3 fois. Après le dernier lavage, les tubes sont placés sous hotte aspirante afin de sécher le culot qui est ensuite solubilisé dans une solution de guanidine-HCl 6M (sigma/Merck, code SRE0066-100ML, 270 euros) à 37 °C pendant 15 min sous agitation. Le contenu en groupement carbonyles est mesuré à 370 nm contre un blanc de guanidine-HCl 6M.

Les résultats sont exprimés en µmoles de groupements carbonyles par mg de protéines en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 22 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

La concentration des protéines est calculée selon la formule suivante :

$$[PC] = \frac{DO}{\epsilon l [P] \times 10^6 \times fd} \quad (\mu\text{mol/mg de protéine})$$

DO : Densité optique

ε : Coefficient d'extinction de DNPH (ε = 2.2 10<sup>4</sup> cm<sup>-1</sup>)

l : Largeur de la cuve

[PC] : Concentration des protéines mg/ml

