



# **Dosage des réserves énergétiques chez les invertébrés d'eau douce et les échantillons biologiques de poissons**

Patrice Noury

## **► To cite this version:**

Patrice Noury. Dosage des réserves énergétiques chez les invertébrés d'eau douce et les échantillons biologiques de poissons. [Rapport Technique] INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes; Unité RIVERLY. 2022. <hal-03773845v5>

**HAL Id: hal-03773845**

**<https://hal.science/hal-03773845v5>**

Submitted on 16 Feb 2026

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0 - Attribution - Non-commercial use - ShareAlike - International License

## MODE OPERATOIRE/PROTOCOLE

# Dosage des réserves énergétiques chez les invertébrés d'eau douce et les échantillons biologiques de poissons

### AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation d'acides concentrés ( $H_3PO_4$  et  $H_2SO_4$ ) et de phénol. Il convient de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation de tels produits.

Le schéma ci-contre rappelle les Equipements de Protection Individuels (EPI) indispensables

Les produits et manipulations à risques ainsi que les moyens de protections spécifiques sont détaillés dans le contenu de ce document.

N° de version	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
1	Nom : NOURY Fonction : IE	Nom TUNTUNDJIAN Fonction : IR	Nom : CHAUMOT Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie

Mises à jour			
N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version
1.1	10/11/2022	PN	Précision des conditions d'application, détails de mode opératoire, corrections mineures
1.2	19/01/2024	PN	Détails de mode opératoire, corrections mineures
1.3	16/02/2026	PN	Préconisation pour échantillons biologiques de poissons (mucus, foie, cerveau), précision rédactionnelles (Titre)

## SOMMAIRE

1	INTRODUCTION .....	2
1.1	Objet et domaine d'application .....	2
1.2	Références .....	2
1.3	Conditions d'application .....	3
1.4	Définitions et abréviations .....	3
2	VOLET SECURITE .....	3
3	PROTOCOLES .....	4
3.1	Principes .....	4
3.2	Matériel et réactifs .....	4
3.2.1	Matériel .....	4
3.2.2	Produits utilisés .....	5
3.2.3	Solutions préparées .....	6
3.3	Mode opératoire .....	7
3.3.1	Préparation des extraits aqueux .....	7
3.3.2	Dosage des lipides .....	7
3.3.3	Dosage des glucides .....	9
3.3.4	Dosage des protéines .....	10
4	SYNTHESE DU DOCUMENT .....	11
	ANNEXES .....	12

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Objet et domaine d'application

L'analyse des réserves énergétiques comprend le dosage des trois ressources constitutives de la matière vivante : les protéines, les glucides et les lipides. La présente procédure décrit ainsi trois protocoles généralement appliqués ensemble pour les études écotoxicologiques en rapport avec le métabolisme. Les méthodes décrites sont des mesures globales de chaque catégorie chimique : protéines totales, glucides totaux et lipide totaux. Les protocoles sont appliqués sur organismes entier de larves d'insectes (chironomes) ou de micro crustacés (gammare) mais ont été adaptés à des échantillons biologiques de poissons tels que les œufs, larves, mucus, foie cerveau ou sérum sanguin.

## 1.2 Références

Les trois méthodes sont colorimétriques et adaptées aux micro-volumes pour des mesures en microplaque.

- Le dosage des protéines totales est directement issue de la méthode de Bradford (1976)<sup>1</sup> au bleu de coomassie.
- Les lipides totaux sont extraits selon Folch et al. (1957)<sup>2</sup> et dosé selon Van Handel (1985)<sup>3</sup> et de Cheng et al. (2011)<sup>4</sup> à partir d'une réaction décrite par Chabrol (1937)<sup>5</sup>
- Le dosage des sucres totaux (glycogène) s'inspire de la méthode Masuko et al. (2005)<sup>6</sup> adaptée de la méthode de Dubois (1956)<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Bradford, M. M. (1976); *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

<sup>2</sup> Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH.(1957); *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.*; *J Biol Chem.* 1957 May;226(1):497-509.

<sup>3</sup> Van Handel E.(1985); *Rapid determination of total lipids in mosquitoes.* *J Am Mosq Control Assoc. Sep;1(3):302-4.* PubMed PMID: 2906672.

<sup>4</sup> Cheng, Yu-Shen et al. (2011); *Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format.* *Lipids* Volume: 46 Issue 1 ISSN: 0024-4201 Online ISSN: 1558-9307

<sup>5</sup> Chabrol EC, Charonnat R. (1937) ; *Une nouvelle reaction pour l'études des lipides: l'oleidemie.* *La Presse Medicale.* 1937;45:1713–1714

<sup>6</sup> Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. (2005); *Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format.* *Anal Biochem.*; Apr 1;339(1):69-72. PubMed PMID: 15766712.

<sup>7</sup> *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*  
Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred. Smith (1956)  
*Analytical Chemistry* 28 (3), 350-356  
DOI: 10.1021/ac60111a017

## 1.3 Conditions d'application

Les organismes sont généralement réunis par pool d'individus dans des micro-tubes de broyage et pesés à la balance de précision. Pour une bonne réactivité l'application des trois méthodes de dosage nécessite un minimum de 10 à 15 mg d'échantillon de matière fraîche ou congelée et 3 échantillons au minimum par groupe expérimental. Avant traitement les échantillons peuvent être conservés à -20°C quoiqu'un stockage à -80°C est conseillé pour une longue période.

Chez une majorité d'auteurs, les protéines sont dosées dans un surnageant de centrifugation, les lipides sont dosés dans l'homogénat brut et le glycogène est précipité chimiquement avant lavage, redissolution et dosage. Dans le présent protocole toutes les mesures sont réalisées directement dans le surnageant de centrifugation (S9) : d'une part l'utilisation d'un tensio actif dans le tampon broyage renforce l'extraction des lipides permettant d'en réunir plus de 90% dans la fraction S9 (Cf. Annexe) ; d'autre part la méthode en microplaque à l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/phénol utilisée pour les glucides apparaît suffisamment sensible en réaction directe avec un aliquote de 10 µl de S9.

Les protocoles présentés peuvent néanmoins être adaptés à tous types de matrices.

## 1.4 Définitions et abréviations

Pour les besoins du présent mode opératoire, les définitions et abréviations suivantes sont nécessaires :

**Fraction S9** : surnageant obtenu après centrifugation 15 minutes à 9000g des homogénats de gammarès.

**BHT** : 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol **ou** 3,5-Di-tert-4-butylhydroxytoluene

**BSA** : Bovine Serum Albumine

**FCR** : Force Centrifuge Relative

**QSP** : quantité suffisante pour

## 2 VOLET SECURITE

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Réactif de Bradford	Chloroforme, Méthanol	Ethanol	Phenol	BHT

## 3 PROTOCOLES

### 3.1 Principes

#### Protéines

La méthode de Bradford est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. L'intensité de la coloration bleue est mesurée à 595 nm et étalonnée au moyen d'une courbe étalon d'albumine sérique de bovin. Cette méthode présente comme avantage d'être simple et rapide mais comme inconvénient d'être peu sensible aux acides aminés, aux petites protéines ainsi que d'interférer avec les détergents.

#### Glucides

L'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, la déshydratation des osides et des polyosides (glycogène) en formant un hydroxy-méthylfurfural dans le cas de l'hexose et d'un furfural dans le cas du pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés orangés. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la concentration en oses, est mesurée en microplaque à 490 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent glucose au regard d'une gamme étalon réalisée parallèlement.

#### Lipides

Les lipides sont extraits d'un homogénat aqueux au moyen d'un mélange de solvants organiques. Après évaporation du solvant, les lipides sont hydrolysés en milieu acide et les acides gras formés réagissent avec la vanilline pour former un composé coloré rose dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent cholestérol au regard d'une gamme étalon traitée selon la même procédure.

### 3.2 Matériel et réactifs

#### 3.2.1 Matériel

- Microtubes Eppendorf 1,5ml
- Tubes 2 ml en polypropylène bouchon à vis
- Micro tubes en verre fond plat
- Bille acier 4 mm + billes de verre 2 mm
- Broyeur à bille muni d'un carrousel 24 tubes 2 ml
- Congélateur -80°C
- Spectrophotomètre à microplaques
- Centrifugeuse réfrigérée.

- Machine à glace
- Verrerie courante de laboratoire
- Pipettes automatiques monocanal (10µl, 200µl 1000 µl et 5000 µl) et multicanaux (8 canaux - volumes 50-300µl)
- Embouts pour pipettes
- Pipette automatique multi coup + réservoirs 1 ml (10µl/coup)
- Microplaques 96 puits sans couvercle (Greiner)
- Bain à sec chauffant thermostaté

### 3.2.2 Produits utilisés

**Tableau I** : Liste des produits utilisés pour le dosage des réserves énergétiques

Nom	N° CAS	Ref. Fournisseur	Localisation
Disodium Hydrogenophosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O)	10039-32-4	Sigma # 71650	Armoire 1 (E9)
Potassium dihydrogenophosphate, (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7778-77-0	Sigma # P5655	Armoire 1 (C7)
Triton X 100	9002-93-1	Sigma # 234729	Armoire 1
Acide Sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	7664-93-9	Aldrich # 320501	Armoire ventilée
Acide Ortho Phosphorique (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	7664-38-2	Fluka # 79623	Armoire ventilée
Vanilline	121-33-5	Sigma # V1104	Armoire 1 (D45)
Réactif de Bradfod (bleu de coomassie)	(6104-58-1)	Sigma # B6916 Biorad # 5000006	Réfrigérateur
Serum Albumine Bovine (BSA)	9048-46-8	Sigma # A7906	Réfrigérateur
Cholestérol	57-88-5	Sigma # C8667	Congélateur - 20°C
Glucose monohydrate (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O)	14431-43-7	Fluka # 4959	Armoire 1 (A53)
Potassium Chlorure (KCL)	7447-40-7	Sigma # P9333	Armoire 1 (E6)
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)	128-37-0	Acros #219830500	Armoire 1 (A 58)
Phénol	108-95-2	Sigma # P1037	Réfrigérateur
Ethanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	64-17-5	Carlo Erba #4146082	Armoire ventilée
Méthanol (CH <sub>3</sub> OH)	67-56-1	Sigma # 34860	Armoire ventilée
Chloroforme	67-66-3	Sigma # A7906	Armoire ventilée

### 3.2.3 Solutions préparées

#### Tampon phosphates (100 mM, pH 7,8)

- solution A : 35,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $358 \text{ g.mol}^{-1}$ ) dans 1l d'eau ultra pure.
- solution B : 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $136 \text{ g.mol}^{-1}$ ) dans 250ml d'eau ultra pure

La solution A est ajustée à pH 7,8 avec la solution B. Se conserve au frais (3-7°C) jusqu'à 6 mois. Verrerie spécifique.

#### Tampon de broyage

Le tampon de broyage est du tampon phosphate (100mM, pH7,8) additionné de 0,1 % de Triton X100 (exemple pour 50  $\mu\text{l}$  + 50 ml). Bien agité à l'aide d'un barreau aimanté.

#### Solvant d'extraction des lipides

Réaliser un mélange chloroforme/méthanol (2v/1v) + BHT 0,45 mM ( $220,35 \text{ g/mole}$ ) soit 10 mg pour 100 ml de mélange. Le BHT est ajouté directement ou bien sous forme d'aliquote d'une solution concentré dans de l'éthanol. Le mélange peut être conserve plusieurs mois au congélateur

#### Solution étalon de cholestérol

Préparer le jour même 10 ml de solution mère (SM) à 1,6mg/ ml dans le solvant d'extraction (chloroforme-méthanol -BHT)

#### Réactifs à la vanilline

- Préparer 20 ml d'une solution de vanilline à 4 mg/ml dans de l'éthanol pur
- Ajouter ces 20 ml à 80 ml l'acide ortho phosphorique concentré (85%) = 800mg/l vanilline et 68% d'acide (conservation 2 à 3 mois à 4°C).
- Diluer cette préparation au  $\frac{1}{4}$  au moment de l'emploi soit une solution à 200 mg/l de vanilline et 17% d'acide

#### Solution de Chlorure de potassium (KCl) à 8,8 g/l dans de l'eau pure

Environ 3 ml sont nécessaire pour une microplaque, soit 24 échantillons. Cette solution peut être préparée à l'avance et se conserver plusieurs mois à 4°C

#### Solution étalon de Glucose monohydrate

Préparer 10ml d'une solution de Glucose ( $198,17 \text{ g.mol}^{-1}$ ) à 1 mg /ml d'eau pure. Conserver au froid dans la glace. 1 ml de cette solution sont nécessaire pour la réalisation d'une gamme étalon. Le reste peut être aliquoté et congelé pour un usage ultérieur.

#### Solution de phénol

Environs 3 ml d'une solution à 5 % (m/m) sont nécessaire à la réalisation d'un plaque 96 puits. Pour cela peser 150 mg et ajouter 2,85 ml d'eau pure. Cette solution peut aussi être préparer en plus grande quantité, aliquotée et congelée à -20°C

#### Solution étalon de sérum albumine bovine (BSA)

Préparer 10ml d'une solution de BSA à 1 mg /ml de tampon phosphate. Conserver au froid dans la glace. 1 ml de cette solution sont nécessaire pour la réalisation d'une gamme étalon. Le reste peut être aliquoté et congelé pour un usage ultérieur



### 3.3 Mode opératoire

#### 3.3.1 Préparation des extraits aqueux

- Allumer et régler la centrifugeuse (4°C, FCR= 9000, 15 min)
- Sortir les échantillons du congélateur par petit nombre (4 à 6) en les maintenant en bain de glace et au fur et à mesure transférer dans chaque tube une bille d'acier + 3 billes de verre ainsi qu'un volume de tampon (0,1% triton) à la proportion de 1/ 25 (m/V) voire 1/50 pour le chironome, 1/10 pour le gammare.
- Placer ensuite les tubes dans le broyeur à bille et lancer le premier broyage (vitesse 6 – 20 secondes)
- Sortir les tubes du broyeur et les placer 5 minutes dans la glace avant de lancer le deuxième broyage (même réglage)
- Centrifuger l'homogénat à 4°C pendant 15 min à 9000 g
- Transférer en micro tube un aliquote du surnageant (S9).

**Note :** pour une plus grande exhaustivité dans le dosage des lipides, leur extraction pourra s'effectuer sur un aliquote de l'homogénat brut et non du surnageant de centrifugation. Dans le cas du gammare nous avons vérifié que la majeure partie des lipides (90%) se retrouve dans la fraction cytosolique obtenue après extraction dans du tampon phosphate pH 7,8 additionné d'un tensio-actif (Triton 0,1%). Un blanc « tampon d'extraction » doit alors être dosé parallèlement car il présente une absorbance plus élevée que le blanc de la gamme étalon. En annexe est disponible une gamme de calibration de la prise d'essai de S9 utilisée pour l'extraction organique.

#### 3.3.2 Dosage des lipides

##### Préparer le réactif à la vanilline

- Diluer le réactif vanillique au ¼ au moment de l'emploi soit une solution à 200 mg/l de vanilline et 17% d'acide

##### Mode opératoire

1. En Eppendorf de 1,5 ml disposer la prise d'essai d'échantillon : **100 µl** de S9 de gammare au 1/10 m/v, de chironome 1/30 m/v de 5 larves d'aloise/400 µl ; **60 µl** de S9 de foie extrait au 1/10 m/v
2. Ajouter 30 µl d'une solution de KCl à 8,8 g/l
3. Ajouter 500 µl d'un mélange chloroforme méthanol (2v/1v) + BHT 0,45 mM
4. Agiter au broyeur à bille (6m/sec - 20 sec)
5. Vortexer 5 secondes chaque tube
6. Centrifuger 5 min à 3000 g
7. Récupérer 200 µl de la phase organique et l'introduire dans un vial de verre
8. Mettre à évaporer sous Sorbonne 10 min à 90°C
9. Ajouter 200 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - attendre 20 min à 90°C
10. Refroidir 10 minutes au réfrigérateur
11. Ajouter 100 µl de réactif Vanilline (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 17% + vanilline 200 mg/l) –
12. Vortexer 5 secondes chaque vial puis attendre 20 min à température ambiante
13. Transférer 200 µl en plaque 96 puits

14. Toutes étapes accomplies, pour une quarantaine d'échantillons, la lecture de la plaque à 540 nm a lieu environs 40 minutes après introduction du réactif vanillique (étape 11).

#### Blanc extraction

Réaliser un blanc extraction selon la même procédure en remplaçant la prise d'essai de S9 par un volume équivalent du tampon d'extraction (tampon phosphate pH 7,8 + triton 0,1%)

#### Etalonnage au cholestérol.

- Solution mère (SM) à 1,6mg/ ml de solvant (chloroforme/methanol/bht)
- Réaliser la gamme suivante en microtubes à partir d'une solution de travail (ST = SM/5)
- Transférer en vials de verre 200 µl de chaque microtube
- Continuer à partir de **l'étape 7** ci-dessus

**Tableau II : Gamme d'étalonnage de cholestérol**

	0	1	2	3	4	5	6	ST
Concentration (mg/ml)	0	0,028	0,042	0,063	0,095	0,142	0,213	0,320
Volume solution mère (µl)	0	800 de 2	800 de 3	800 de 4	800 de 5	800 de 6	800 de 7	300 de SM
Volume chloroforme/methanol (µl)	400	400	400	400	400	400	400	1200

#### Calculs

- Moyenner les valeurs des triplicats en éliminant éventuellement la donnée excentrique
- Soustraire la valeur du blanc d'extraction (tampon + Triton) aux valeurs des échantillons et soustraire le blanc solvant (point 0 de la gamme) aux valeurs de la gamme
- Déterminer avec la gamme le facteur de conversion entre absorbance et mg par ml d'extrait organique (relation linéaire)
- La conversion entre la concentration dans l'extrait organique et la teneur en lipide par mg de matière fraîche est la suivante :

$$\text{Lipide (mg/mg frais)} = (C_{\text{orga}} * VT_e / PE_h) / C_{\text{frais}}$$

- $C_{\text{orga}}$  = teneur en équivalent cholestérol de l'extrait organique (mg/ml)
- $VT_e$  = Volume total d'extrait organique (500 µl)
- $PE_h$  = Prise d'essai d'homogénat (60 à 100 µl)
- $C_{\text{frais}}$  = Concentration en matière fraîche de l'homogénat (40 mg/ ml pour 1/25 m/V)

### 3.3.3 Dosage des glucides

#### Mode opératoire

1. Placer 40 µl de tampon phosphate en triplicat dans une plaque 96 puits
2. Ajouter en triplicat la prise d'essai\* : 10 µl de S9 de gammare 1/10m/v.
3. Ajouter 150 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sous Sorbonne)
4. Mélanger à l'agitateur de plaque (1 min, vitesse 1200)
5. Ajouter 30 µl de phénol à 5 % (sous Sorbonne)
6. Mélanger à l'agitateur de plaque (1 min, vitesse 900)
7. Couvrir la plaque avec un film adhésif
8. Mettre la plaque dans un bain-marie à 90°C<sup>8</sup> durant 5 minutes
9. Refroidir la plaque 15 min au réfrigérateur ou dans la glace.
10. Lecture à 490 nm après avoir retiré le film plastique

*Selon l'organisme et le rapport m/V d'extraction le S9 la prise d'essai sera ajustée + tampon phosphate qsp 50 µl :*

- 20 µl (30 µl tampon) S9 de Chironome extrait au 1/30 m/v ;
- 5 µl (45 µl de tampon) un S9 de foie de poisson extrait au 1/10 mV
- 30 µl (20 µl tampon) S9 d'extrait d'œufs d'aloise (5 œuf/400 µl)

#### Etalonnage au glucose monohydrate.

- Décongeler un aliquote de solution étalon de glucose (1mg/ml)
- Préparer une solution de travail (ST) en diluant la solution étalon au ½
- Réaliser une gamme étalon de raison 2/3 en microtubes (tableau III)
- Transférer 50 µl en de chaque tube en triplicat dans une microplaque puis continuer à partir de l'**étape 3** ci-dessus

**Tableau III** : Gamme d'étalonnage de glucose

	0	1	2	3	4	5	6	ST
Concentration (mg/ml)	0	0,044	0,065	0,099	0,148	0,222	0,333	0,5
Volume solution mère (µl)	0	800 de <b>2</b>	800 de <b>3</b>	800 de <b>4</b>	800 de <b>5</b>	800 de <b>6</b>	800 de <b>ST</b>	750 de SM
Volume tampon (µl)	400	400	400	400	400	400	400	750

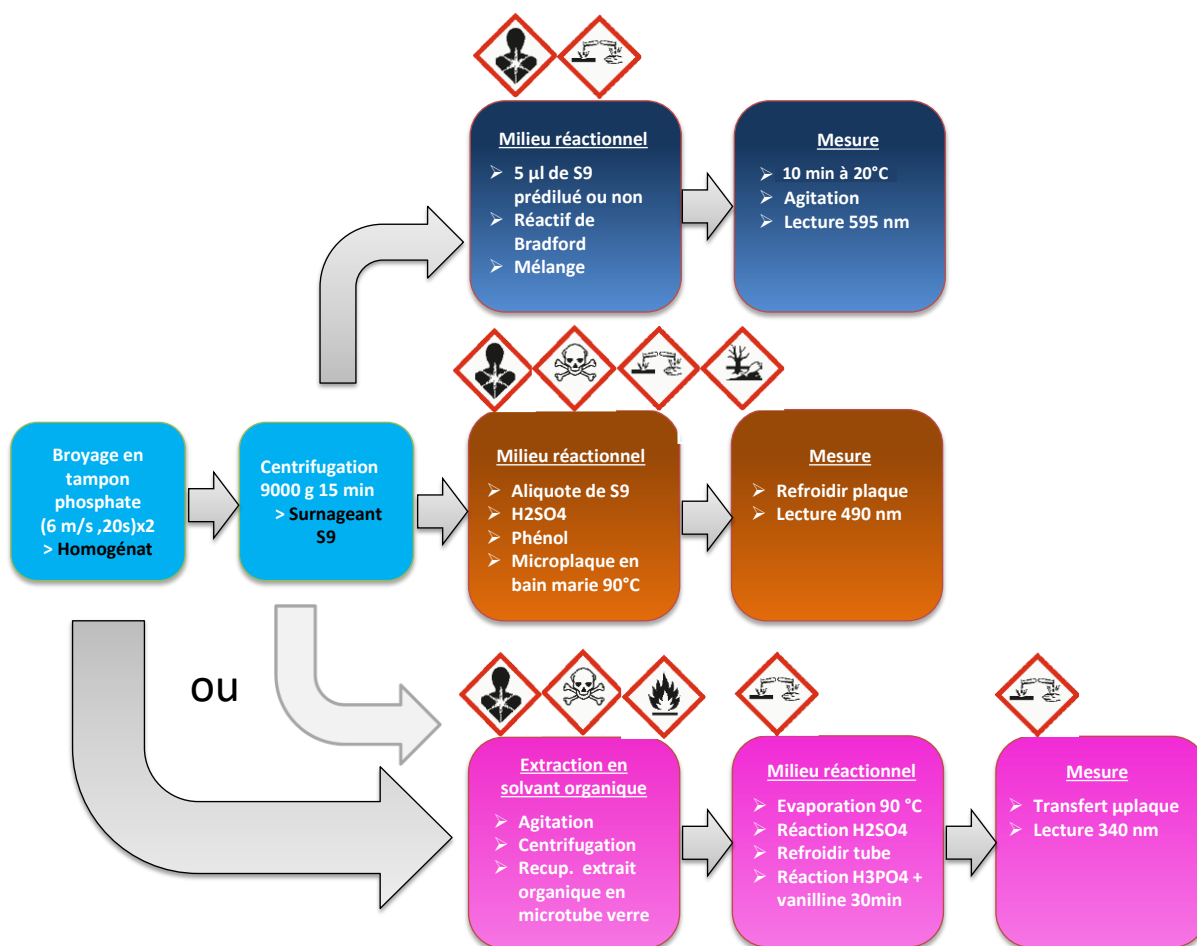
<sup>8</sup> Cela peut être de l'eau bouillante en cristalliseur sur plaque chauffante que l'on débranche au moment de l'immersion de la microplaque.



### Calculs

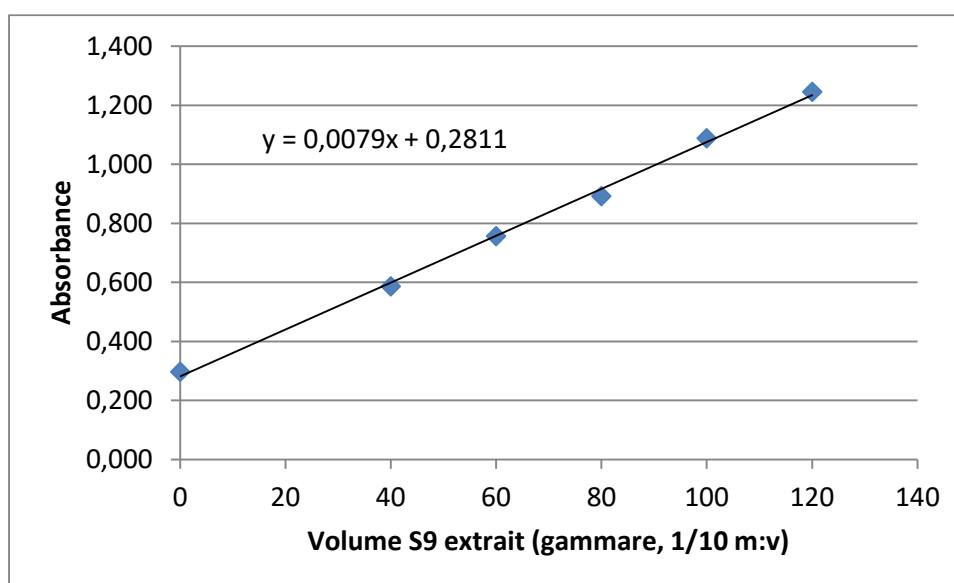
- Moyenner les valeurs des triplicats en éliminant éventuellement la donnée excentrique
- Soustraire la valeur du blanc aux valeurs de la gamme et des échantillons
- Déterminer avec la gamme le facteur de conversion entre absorbance et mg par ml (relation linéaire)
- Déterminer ainsi la concentration en protéines des échantillons (mg/ml) et diviser le résultat par la concentration en matière fraîche de l'homogénat pour un résultat en mg prot / mg eq matière fraîche (exemple : 40 mg/ml pour un extrait au 1/25 m/v)

## 4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT



## ANNEXES

**Dosage des Lipides** : Variation d'absorbance (quantité de lipides) en fonction de la prise d'essai (µl) de S9 extrait avec 500 µl de mélange chloroforme/méthanol



**Dosage des Lipides** : Dosage sur extraits d'homogénats de gammaré *versus* dosage sur extraits de S9 ; résultats exprimés en absorbances

