

TP: le stockage du glucose dans les muscles et foies

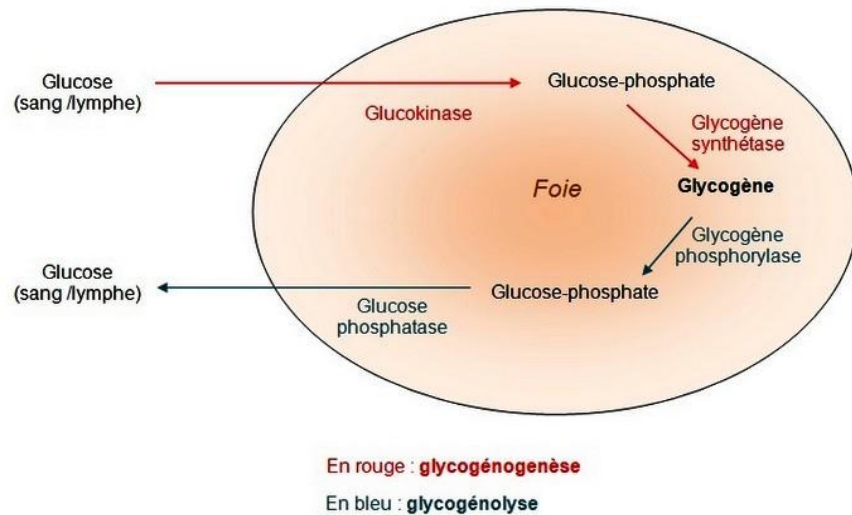
Mise en situation et recherche à mener

La glycémie varie au cours de la journée, selon des apports de glucose et de son utilisation, mais elle est maintenue stable dans une gamme étroite de valeurs, autour de 1 g. L^{-1} ; c'est donc un paramètre régulé.

On cherche à déterminer si la régulation de la glycémie peut s'effectuer par stockage de glucose dans différents organes

Ressources :

Document 1 : Régulation du glucose dans l'organisme



Document 2 : Représentation des molécules de glucose et de glycogène

Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation-problème

Concevoir une démarche d'investigation permettant de déterminer si certains organes peuvent stocker du glucose.

Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Mettre en œuvre le protocole fourni pour déterminer si certains organes ont la capacité de stocker du glucose sous la forme de glycogène. Dans ce cas essayer de montrer que c'est le foie et le muscle qui stockent le glycogène. Cependant lequel d'entre eux qui régule la glycémie et expliquer par quel mécanisme ?

Etape 3 : Présenter des résultats obtenus pour les communiquer

Sous une forme de votre choix, traiter les données obtenues et les intégrer dans votre compte-rendu.

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats pour montrer que différents organes ont la capacité de stocker du glucose sous la forme de glycogène. Comment le taux de glucose sanguin peut-il être maintenu dans la fourchette 0,80-1,20g/l.

EXTRACTION ET DOSAGE DU GLYCOGENE DANS UN ORGANES

Matériel par séance de TP.

Matériel	
5 g de foie de veau, 5g de foie de poulet et 5 g de muscle de bœuf et de veau, 5g de rein ou 5g tissu adipeux	1 micro pipette de 50 μ L 1 micro pipette de 100 μ L
1 bécher de 250mL	Mixer
2 spatules- 1 marker- 1 chronomètre	Balance
Portoir 4 tubes à essais	Na ₂ SO ₄
+ 4 tubes à centrifuger	Spatule
1 plaque électrique + pince en bois+ grille	Acide acétique à 4% ou acide trichloracétique
1 pipette en verre de 5mL + poire	Lugol
2 pipettes plastiques de 3mL	Ethanol 95°
1pipette 2mL	Centrifugeuse
Entonnoir et papier filtre	

L'échantillon est broyé à l'aide d'un mixer, à raison de 5 g d'organe + 17,5mL d'eau déminéralisée/binôme.

NB. Broyer le muscle dans un mortier.

Considérer que dans 25 g du mélange: eau + organe: il y a 5 g d'organe.

Protocole

1. Mettre en marche la plaque chauffante.
2. Dans le bécher de 250mL, prendre de l'organe mouliné : 25g à peser (tare de la balance) du mélange eau + organe.
3. Ajouter une spatule de Na₂SO₄, 2mL d'acide acétique à 4% (à défaut d'acide trichloracétique); mélanger rapidement pendant 10s.
4. Porter à ébullition en remuant avec la spatule pendant 3mn, lorsque l'ébullition débute baisser la température.
5. Poser le bécher avec la pince en bois sur la grille sur la paillasse, attendre de pouvoir le tenir à la main.
6. Remplir en versant délicatement 2à 4 tubes à centrifuger au même niveau (équilibre de la centrifugeuse) et Boucher les tubes puis Centrifuger à 4200tours/mn pendant 5mn
7. Récupérer le surnageant sans prélever du culot avec 1 pipette de 3mL en plastique des tubes dans un tube à essai en notant le volume final de surnageant.



Dosage

Dans 2 tubes à essais, introduire dans l'ordre:

	Tube 1: témoin	Tube 2: organe (muscle veau, bœuf, foie de veau, bœuf ou poulet)
Eau déminéralisée (ml)	4	3,9
Surnageant (μL)	0	100
Lugol (μL)	50	50

Noter les résultats visuels de la coloration dans les tubes.

Transvaser le tube 2 dans des cuves de colorimétrie.

Sur le spectrophotomètre à 470nm, le zéro a été réalisé. Lire la DO (densité optique) sur l'écran ou sur le colorimètre, et avec l'outil pointeur, trouver la valeur du taux de glycogène en g/L (2 décimales) sur la droite d'étalonnage.

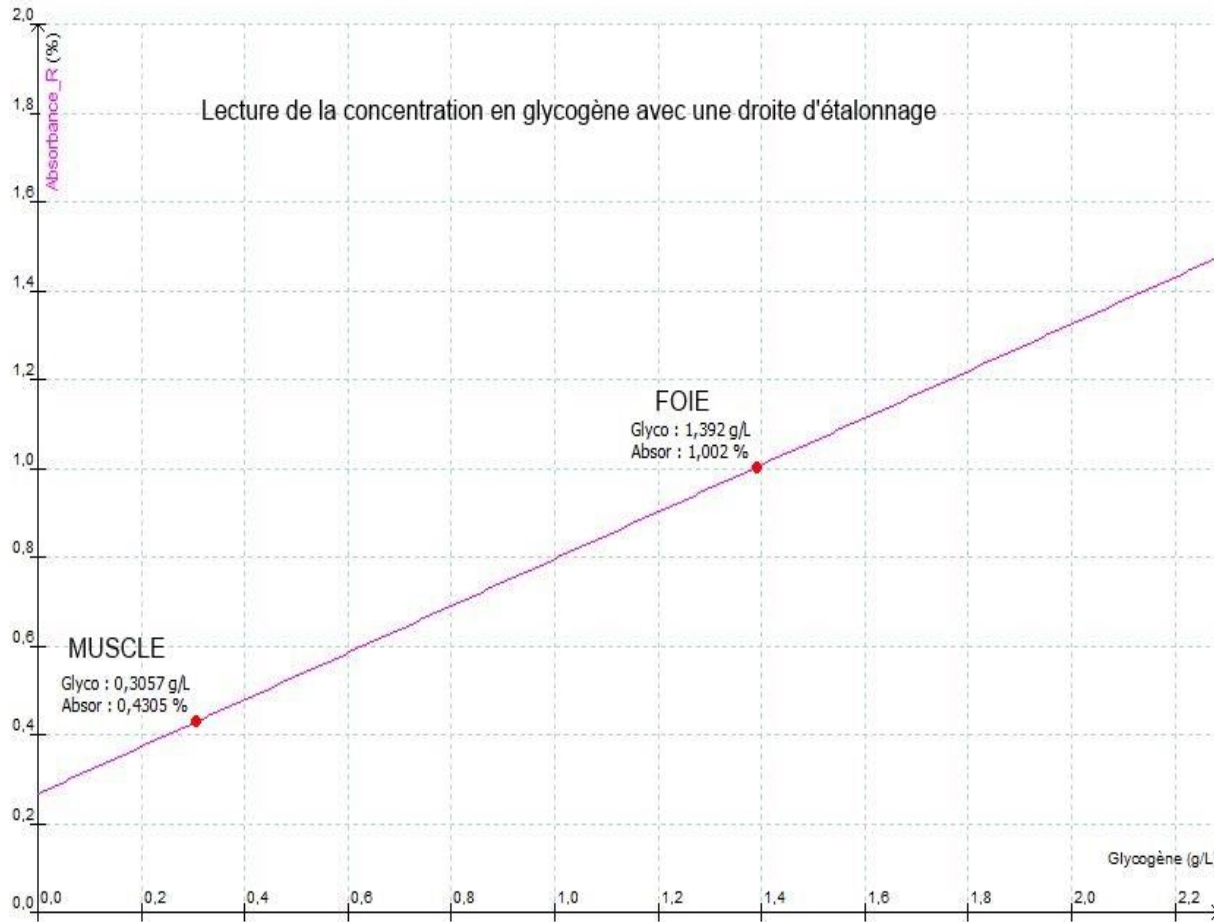
Calculer la masse de glycogène dans les 5 g d'organe.

Calcul

Concentration lue sur la droite d'étalonnage	C (g/L)
Volume total de la cuve	V (L)
Quantité de glycogène dans la cuve	C x V (g)
Volume total de surnageant recueilli	V1 (L)
Volume de surnageant introduit dans la cuve	V2 (L)
Quantité de glycogène dans l'échantillon	Q=C x V x V1/V2 (g)

Le volume du Lugol n'est pas compté, surcharge les calculs en décimales de façon insignifiante, j'ai considéré le volume de la cuve à 4mL soit 0,004L.
La méthode n'est pas précise: il n'est pas évident de récupérer tout le volume de cuisson pour l'introduire dans les tubes de centrifugation, le volume de surnageant récupéré n'est pas précis.

Avantage: les quantités utilisées permettent de faire seulement 2 tubes/organe/binôme: on gagne du temps dans la centrifugation.



Mise en évidence du glycogène sans dosage.

Dans un autre tube, placer 2 mL (pipette plastique) du surnageant et ajouter 4 mL (pipette plastique) d'alcool à 95°: le liquide se trouble, flocons blanchâtres = présence de glycogène.

Transvaser dans un tube à centrifuger et Boucher.

Centrifuger à 4200 tours/mn pendant 5mn.

Eliminer le surnageant par renversement dans l'évier, le glycogène est dans le culot: blanc sous forme de grain.

Dissoudre le glycogène en ajoutant 4mL d'eau, puis ajouter 1 goutte de Lugol.

Faire un témoin sur de l'eau.

La présence de glycogène se traduit par une coloration acajou.

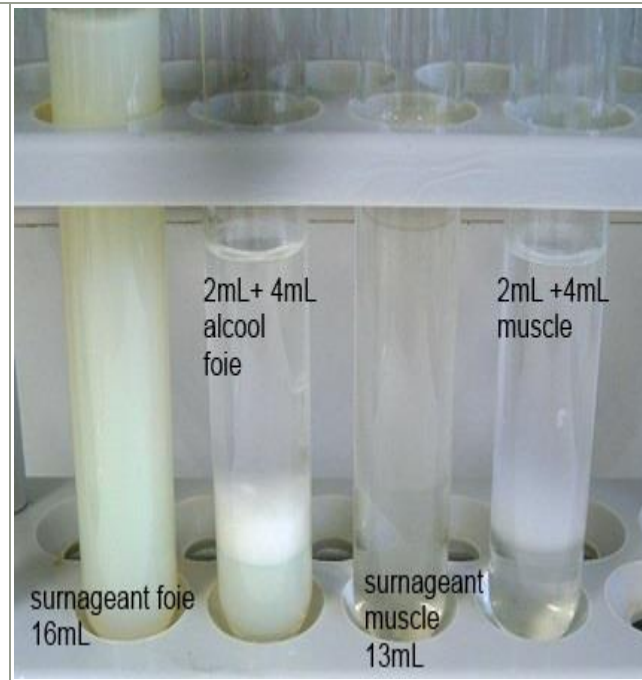
Les culots de centrifugation peuvent être séchés au four pendant 24h et ensuite pesés si on prend soin de peser les tubes vides.

On peut déduire la masse de glycogène dans l'échantillon.

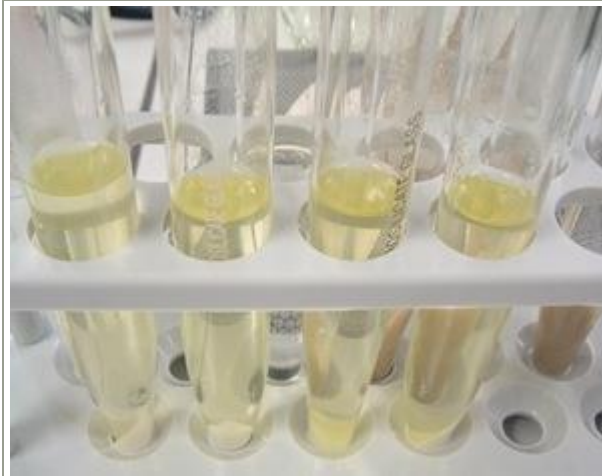
Le glycogène récupéré est conservé au frigo à +4°C pour les TP : activité enzymatique



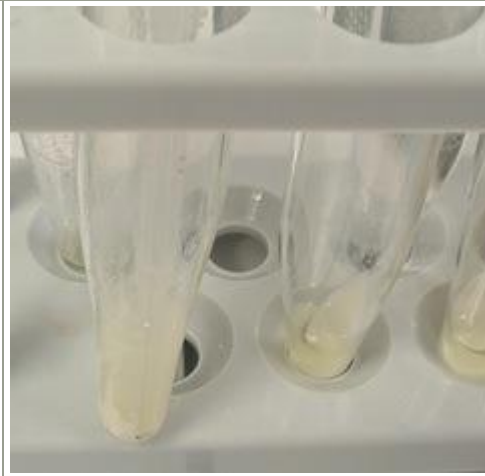
tubes pour le dosage en colorimétrie



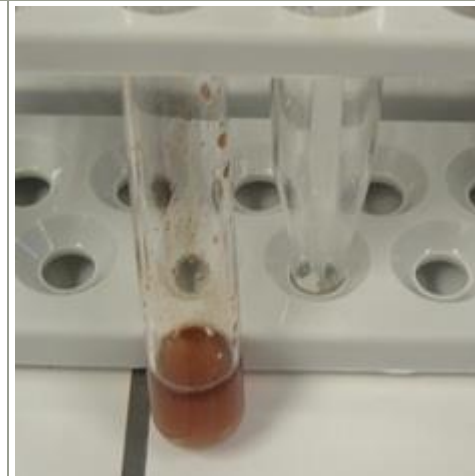
mise en évidence du glycogène avec l'alcool



2ème centrifugation, le glycogène est dans le culot



dissolution du glycogène avec de l'eau



coloration au Lugol

Etudier les résultats obtenus ensuite en déduire lequel des organes stocke beaucoup plus de glycogène tout en mettant en évidence le mécanisme par lequel la glycémie est régulée sans oublier de discuter l'hyper et l'hypoglycémie et par quelles hormones sont –elles régulées ?