Kit synthèse de la mélanine

Réf. MELA

A RECEPTION DU COLIS :

☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
☑ 🌡 **Stocker** l'ensemble du kit à 4°C 🌡. Les produits se conservent jusqu'à 6 mois.
☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION (pour 10 binômes)

- Un tube de pyrocatéchol
- Un sachet de tyrosine
- Un µtube de tyrosinase

MATERIEL NECESSAIRE

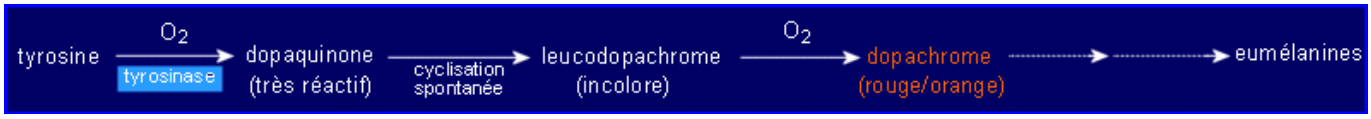
- Eau distillée
- Bécher
- Tubes à hémolyse
- Poires ou pipettes et cônes
- Plaque chauffante
- Champignons de paris frais
- Colorimètre et cuves
- Chronomètre

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit permet de réaliser une synthèse de mélanine in vitro à partir de réactifs naturels (extrait de champignons) et de réactifs artificiels (pyrocatéchol).

RAPPELS

Le rôle principal de la mélanine est la protection pigmentaire contre les radiations UV. Chez certains animaux, les mélanophores, chromatophores porteurs de mélanine, contribuent au camouflage ou signalent par leurs transformations l'émotion, le stress ou un changement de l'environnement (température etc.). Chez certains invertébrés, les agents pathogènes sont encapsulés dans de la mélanine, qui contribuerait donc chez eux à la défense contre les infections.
Les **mélanines** sont parmi les pigments principaux responsables de la coloration des téguments dans le règne animal. La couleur de la peau, des cheveux et des yeux chez l'humain dépendent principalement de son type et de sa concentration. Les mélanines biologiques sont des macromolécules produites pour la plupart par les mélanocytes, formés à partir de la tyrosine (eumélanine) ou de la tyrosine et de la cystéine (phéomélanine), avec le concours de l'enzyme tyrosinase.
La tyrosinase catalyse plusieurs étapes de la synthèse des mélanines à partir de tyrosine.



PREPARATION

Les solutions peuvent être préparées 1 à 2 jours avant le TP.

Les conserver au réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE CHAMPIGNON :

- Broyer 100g de champignons frais.
- Mélanger à 100 ml d'eau distillée.
- Filtrer et transférer dans 10 tubes de 10ml propres et notés « extrait champignon ».

Le filtrat contient l'enzyme tyrosinase. Il peut être conservé 48 heures au réfrigérateur ou 1 mois au congélateur.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE TYROSINASE DE SYNTHESE :

- Ajouter 1 ml d'eau distillée dans le tube de tyrosinase.
- Transférer dans un tube propre 5 ml.
- Ajouter 4 ml d'eau distillée supplémentaire.
- Répartir 0.5 ml dans 10 tubes de 1.5ml notés « tyrosinase ».

PREPARATION DE LA SOLUTION DE TYROSINE :

- Transférer le contenu du sachet de tyrosine dans un bécher propre.
- Ajouter 100ml d'eau distillée.
- Faire chauffer doucement en agitant.
- Filtrer si nécessaire.
- Après dilutions complète de la tyrosine, transférer dans 10 tubes de 10ml et notés « tyrosine».

PREPARATION DE LA SOLUTION DE PYROCATECHOL :

- Diluer le sachet de pyrocatéchol dans 100ml d'eau distillée.
- Après dilutions complète de la tyrosine, transférer dans 10 tubes de 10ml et notés « pyrocatéchol».

MANIPULATION

SYNTHESE DE MELANINE A PARTIR D'EXTRAIT DE CHAMPIGNONS :

- Dans un tube propre, mettre 2 ml de la solution de tyrosine et noter « tube 1 »
- Dans un tube propre, mettre 2 ml de l'extrait de champignon et noter « tube 2 »
- Dans un tube propre, mettre 1 ml de la solution de tyrosine et 2 ml de l'extrait de champignon et noter « tube 3 »
- Dans un tube propre, 1 ml de l'extrait de champignon et faire bouillir quelques minutes.
- Laisser refroidir et ajouter 1 ml de la solution de tyrosine.
- Noter ce tube « tube 4 ».
- Laisser reposer les solutions quelques minutes. Pendant ce temps, préparer la synthèse de mélanine à partir de réactifs de synthèse.

SYNTHESE DE MELANINE A PARTIR DE REACTIFS DE SYNTHESE :

- Préparer deux tubes contenant 5ml de la solution de pyrocatéchol.
- Ajouter dans l'un d'eux 2 gouttes (soit 100 µl) de solution de tyrosinase.
- Agiter et laisser reposer quelques minutes.
- Pendant ce temps, observer les résultats de la synthèse de mélanine à partir d'extrait de champignon.

COLORIMETRIE ET CINETIQUE DE LA SYNTHESE DE MELANINE IN VITRO :

On se propose ici de mesurer le début de la synthèse de la mélanine grâce à la mesure de la densité optique du composé intermédiaire ; le dopachrome (DO mesurée à 475nm)

- Préparer 9 tubes contenant 0,5ml d'extrait de champignon chacun et noter les tubes de 1 à 9.
- Préparer un tube de tyrosine diluée 10 fois : ajouter 9ml d'eau distillée à 1ml de la solution initiale de tyrosine. Noter ce tube « tyrosine /10 ».
- Préparer un tube de tyrosine diluée 100 fois : ajouter 9ml d'eau distillée à 1ml de la solution « tyrosine /10 ». Noter ce tube « tyrosine /100 ».
- Dans les tubes numérotés 1, 2, 3 ajouter 0,5ml de tyrosine
- Dans les tubes numérotés 4, 5, 6 ajouter 0,5ml de tyrosine/10
- Dans les tubes numérotés 7, 8, 9 ajouter 0,5ml de tyrosine/100
- Déclencher le chronomètre.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 1, 4, 7 immédiatement.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 2, 5, 8 après 5 minutes.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 3, 6, 9 après 15 minutes.

- Préparer 9 tubes contenant 0,5ml de pyrocathécol chacun et noter les tubes de 11 à 19.
- Préparer un tube de tyrosinase diluée 2 fois : ajouter 0.5 ml d'eau distillée la solution initiale de tyrosinase restante. Noter ce tube « tyrosinase /2 ».
- Préparer un tube de tyrosinase diluée 10 fois : ajouter 4.5 ml d'eau distillée à 0.5 ml de la solution « tyrosinase /2 ». Noter ce tube « tyrosinase /10 ».
- Préparer un tube de tyrosinase diluée 100 fois : ajouter 1ml d'eau distillée à 1 ml de la solution « tyrosinase /10 ». Noter ce tube « tyrosinase /100 ».
- Dans les tubes numérotés 11, 12, 13 ajouter 0,5ml de tyrosinase
- Dans les tubes numérotés 14, 15, 16 ajouter 0,5ml de tyrosinase/10
- Dans les tubes numérotés 17, 18, 19 ajouter 0,5ml de tyrosinase/100
- Déclencher le chronomètre.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 11, 14, 17 immédiatement.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 12, 15, 18 après 5 minutes.
- Mesurer l'absorbance des mélanges 13, 16, 19 après 15 minutes.

RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

SYNTHESE DE MELANINE A PARTIR D'EXTRAIT DE CHAMPIGNONS :

Tubes	Contenu	Résultats
1	4,5 ml solution de tyrosine	Pas de mélanines
2	4,5 ml extrait de champignon	Pas de mélanines
3	1,5 ml sol. de tyrosine 3 ml extrait de champignon	Mélanines surtout près de la surface produit intermédiaire rouge-orangé
4	1,5 ml sol. de tyrosine 3 ml extrait bouilli de champignon	Pas de mélanines

Lorsqu'on fait bouillir l'extrait de champignon, les protéines, notamment les enzymes, sont détruites. La tyrosinase présente dans l'extrait de champignon frais est donc détruite dans le tube 4 ; la synthèse de mélanine à partir de son substrat la tyrosine ne peut dons plus se faire.

SYNTHESE DE MELANINE A PARTIR DE REACTIFS DE SYNTHESE :

Le tube dans lequel la tyrosinase a été ajoutée prend une couleur brune qui fonce au fur et à mesure du temps. Il est possible d'observer une légère coloration de la solution de pyrocatéchol seul puisque celui-ci s'oxyde à la lumière. Cependant, la vitesse de coloration est bien plus lente : la tyrosinase est nécessaire pour catalyser cette réaction.

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

Produit	Pictogramme et risques normalisés	Actions à mener en cas			
		De contact avec la peau	d'inhalation	de projection dans les yeux	d'ingestion
Pyrocatéchol pur (en poudre)	Irritant	Rincer abondamment à l'eau claire. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	Donner de l'air frais. Assistance respiratoire si nécessaire. Si les troubles persistent, consulter un médecin.	Lavage avec de l'eau en écartant les paupières plusieurs minutes. Si les troubles persistent, consulter un médecin.	Rincer abondamment la bouche avec de l'eau. Ne pas faire boire. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.

FICHE CONSERVATION

Les poudres de tyrosine et pyrocatéchol se conserve 6 mois à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les solutions se conservent 1 mois à -20°C à l'abri de la lumière.

FICHE TRI ET RECUPERATION

L'ensemble des solutions peuvent être jetés à l'évier avec de grands volumes d'eau.