

Université de Toulon

UFR Sciences et Techniques

Travaux Pratiques de Biochimie L1 SV

Travaux pratiques de Biochimie 6h

RECOMMANDATIONS GENERALES

- Il est recommandé de venir à la séance de TP en ayant pris connaissance du contenu de la séance.
- Vous devez prendre connaissance et remplir les parties adéquates de la fiche TP – apprentissage (organigramme, traitement et risques). Cette fiche doit être remplie, imprimée et présentée en salle de TP à votre enseignant.
- Le jour de la séance vous devez vous munir de votre polycopié de TP imprimé, une blouse blanche, un feutre - marqueur pour le verre, une calculatrice et des feuilles blanches format A4.
- Pour des raisons de sécurité, les cheveux doivent être attachés, les chaussures doivent protéger les pieds (pas de chaussures ouvertes).
- Rien ne doit être mis dans la bouche (pas de chewing gum...)
- Les téléphones portables sont éteints. Les téléphones ne peuvent donc être utilisés comme calculatrice, raison pour laquelle nous vous demandons de vous munir d'une calculatrice. De même le téléphone ne peut servir pour voir les polycopiés de TP d'où la nécessité de les imprimer.
- En outre, les étudiants présentant une allergie au latex doivent se procurer des gants de vinyle (en supermarché) pour pouvoir manipuler les produits dangereux.
-

CONNAISSANCE DES PRODUITS CHIMIQUES ET DES RISQUES

Actuellement, il existe des centaines de milliers de substances organiques et de produits minéraux. Parmi eux, près de 50 000 présentent, à divers degrés, un danger pour la santé et la sécurité des manipulateurs. Les risques associés aux produits chimiques sont essentiellement de deux ordres : d'une part ces produits peuvent avoir une action néfaste sur l'organisme et c'est alors leur toxicité qui intervient ; d'autre part ces produits sont souvent inflammables.

1) CONTAMINATION PAR LES SUBSTANCES DANGEREUSES

Les substances dangereuses peuvent :

1. contaminer la peau et les yeux par contact
2. contaminer l'air, sous forme de poussière, fumée, gaz, vapeur et aérosol
3. être portées à la bouche par méprise ou par les mains souillées.

2) VOIES DE PENETRATION DANS L'ORGANISME

Les substances dangereuses peuvent entrer dans l'organisme par plusieurs voies à la fois :

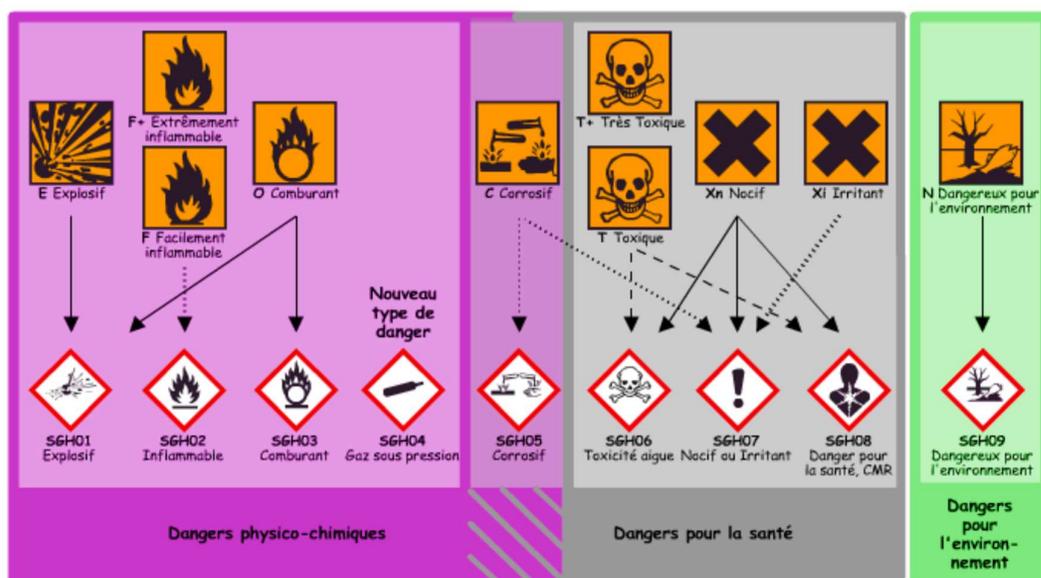
- la voie respiratoire : les gaz, poussières, vapeurs, fumées pénétrant par inhalation dans les poumons et de là dans le sang
- la voie digestive : les solides ou liquides sont avalés dissous et résorbés au niveau du tube digestif plus ou moins totalement
- la voie cutanée : les liquides ou les gaz pénètrent dans l'organisme à travers la peau.

3) RISQUES DES SUBSTANCES DANGEREUSES

Chaque substance dangereuse a ses risques particuliers. On peut classer ces risques en se basant sur la nature des effets. La réglementation classe les diverses substances en :

- Substances explosives E
- Substances comburantes O
- Substances inflammables F
- Substances toxiques T
- Substances nocives Xn
- Substances corrosives Co
- Substances irritantes Xi
- Substances dangereuses pour l'environnement D

10 pictogrammes



9 pictogrammes SGH (CLP)

© Kaptitude.com

selon le danger et la nature spécifique des risques. Cette classification a été récemment modifiée et remplacée par le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) élaboré au niveau international. L'acronyme « CLP » signifie en anglais, « **Classification, Labelling, Packaging** » c'est-à-dire « **classification, étiquetage, emballage** ». Le règlement CLP est l'instrument réglementaire permettant de faire appliquer les recommandations du SGH au sein de l'Union européenne. Ce texte européen définit les règles en matière de classification, d'étiquetage et d'emballage des produits chimiques pour les secteurs du travail et de la consommation.

4) IDENTIFICATION DES SUBSTANCES DANGEREUSES

Une mesure importante qui permet de travailler en sécurité avec des substances dangereuses est la mise au point d'un système d'identification et d'information efficace qui doit permettre d'identifier rapidement les substances, de noter les risques dus à ces produits et de recommander des mesures préventives. On trouve des listes de substances dangereuses avec leurs noms, symboles de dangers éventuels, catégories de risques : phrases R (risques) et S (sécurité).

5) ETIQUETAGE

L'étiquette sur tout emballage ou récipient doit comporter les indications suivantes :

1. le nom de la substance
2. les mentions spécifiques de danger et/ou les symboles qui s'y rapportent
3. les phrases mentionnant les risques particuliers dérivant de ces dangers : Phrases R (risques)
4. les phrases mentionnant les conseils de prudence destinés à pallier tous ces risques : Phrases S (sécurité)
5. le nom et l'adresse du fabricant ou de toute autre personne qui met cette substance à la disposition des utilisateurs.

6) CONSIGNES GENERALES DE SECURITE

- Eliminer le risque.
- Circonscire le risque à la source.
- Prendre des mesures de prévention matérielle.
- Utiliser des moyens de protection.
- Au cours des manipulations, manipuler toujours au-dessus de la table : ***Les souliers ne résistent pas à l'action des produits chimiques !***

7) PRECAUTIONS NECESSAIRES

La manipulation des produits dangereux doit être entourée de toutes les précautions nécessaires :

- **Ne jamais pipeter à la bouche.**
- **Porter des gants** lors de la manipulation de produits corrosifs ou hautement toxiques par contact (produits allergisants).
- Travailler si possible sous une **hotte ventilée pour les produits volatils toxiques** par inhalation, ou pour toute réaction susceptible de dégager des gaz toxiques, et loin d'une source de chaleur ou d'électricité statique.
- **Se laver soigneusement les mains** après la manipulation des produits toxiques.
- **Ne jamais fumer, boire, manger, dans la salle de travaux pratiques.**

8) NETTOYAGE

A la fin ou au cours de la séance de manipulation, videz dans les « **bidons déchets** » réservés à cet effet tous vos récipients souillés et **nettoyez toute votre verrerie sans oublier d'enlever les inscriptions aux marqueurs.** Nettoyez soigneusement la **paillasse** ou la table quand des produits chimiques y sont tombés. Prenez un chiffon ou un papier, éventuellement tenu avec une pince pour protéger les doigts.

Ranger comme à l'initial **votre paillasse** et débrancher les appareils électriques.

LA CONNAISSANCE DES PRODUITS CHIMIQUES ET DES RISQUES ASSOCIES CONSTITUE UNE PARTIE FONDAMENTALE DE CET ENSEIGNEMENT ET SERA EVALUEE AU COURS DE CES TP.

UTILISATION DE MATERIELS DE PRECISION :

RAPPEL

- Les pipettes graduées :

Ne pas confondre les pipettes graduées et jaugées. Une pipette graduée permet de pipeter des volumes variables au sein d'une gamme de volumes possibles, par exemple pour une pipette de 5 ml il est possible de pipeter 4,3 ml par exemple. Une pipette jaugée permet de pipeter un volume fixe uniquement, par exemple une pipette de 10 ml ne permettra de pipeter que ce volume.

N'oubliez pas que les pipettes peuvent être à un trait ou deux traits : i) dans le cas des pipettes à deux traits, la pipette est vidée jusqu'à ce que le bas du ménisque atteigne le deuxième trait de jauge, ii) dans le cas d'une pipette à un trait, le liquide doit s'écouler jusqu'à la pointe de la pipette.

Les pipettes s'utilisent le plus souvent avec une propipette,



Figure : Photographie d'une propipette (Image Culture Sciences chimie)

La pipette est enfoncée doucement dans l'embout situé au bas de la propipette. La valve (A) permet de charger la propipette, le corps de la propipette est vidé de son air en appuyant simultanément sur la valve A et le corps. Une fois le corps vidé il est alors possible de remplir la pipette par aspiration en appuyant sur la valve (S). La pipette peut ensuite être vidée de son contenu en appuyant sur la valve (E).

- Les fioles jaugées



Figure : Photographie de fioles jaugées.

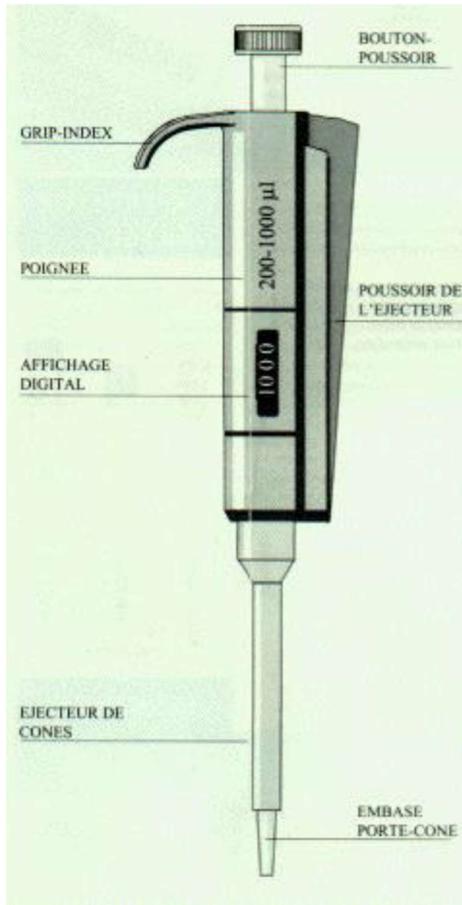
Les fioles jaugées sont utilisées pour mesurer des solutions dont le volume est fixe (10 ml, 25 ml, 100 ml ou 250 ml, comme dans la photo ci-contre). Elles sont particulièrement précises, plus précises qu'une éprouvette par exemple. Elles sont homogénéisées par retournement en utilisant les bouchons ou en utilisant du parafilm.

- Les balances

Attention les balances doivent être utilisées avec soin et délicatesse. Ne jamais poser de contenant trop lourd sur le plateau. Elles doivent être nettoyées après utilisation.

- Les micropipettes

sont du matériel de précision très onéreux, veillez à les utiliser de la façon suivante :



1/ Choisir le bon instrument en fonction du volume désiré (**limite de prélèvement !**)

- de 1 à 20 μL : utiliser une P 20
- de 20 à 200 μL : utiliser une P 200
- de 200 à 1000 μL : utiliser une P 1000

Souvent le bouton poussoir a une coloration jaune pour les P20 et P200 tandis que le bouton poussoir des P1000 a une coloration bleue.

2/ Regarder le cadran d'affichage numérique

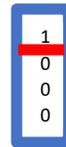
Pour les P20, P100, P200 :

Ex : P200, en général



Le trait indique la virgule après l'unité μL
Pour 1000 et P5000

Ex : P1000



Le trait indique la virgule après l'unité mL

3/ Débloquer la bague de maintien du volume si elle est présente

4/ Placer le cône convenable sur l'embout, les embouts sont parfois bleus pour les P1000 et jaunes pour les P20,

P100 et P200.

5/ Appuyer sur le bouton poussoir jusqu'au 1er cran en dehors de la solution à pipetter

6/ Introduire l'extrémité (et uniquement l'extrémité) du cône dans le bécher contenant la solution à pipeter

7/ Relâcher lentement le bouton pour faire entrer sans appel d'air le liquide

8/ Placer votre pipette cône collé sur la paroi du récipient où vous devez transférer la solution et à environ 60° par rapport au récipient.

9/ Presser sur le bouton lentement pour libérer le liquide, passer à travers le premier cran du poussoir pour évacuer une goutte résiduelle pouvant éventuellement rester dans l'embout.

II EST ABSOLUMENT INTERDIT D'UTILISER LES MICROPIPETTES EN DEHORS DES FOURCHETTES PRECISEES CI-DESSUS.

- **Aucun liquide ne doit pénétrer dans le corps de la micropipette.**

- **Les solutions prélevées ne doivent être en contact qu'avec les cônes de prélèvement**

- **La micropipette doit toujours être maintenue verticalement et l'extrémité inférieure vers le bas.**

ATTENTION A UTILISER LE MATERIEL APPROPRIE EN FONCTION DES VOLUMES A PRELEVER. Ainsi pour pipetter 1.4 ml il faut utiliser par exemple une pipette graduée de 2 ml et NE PAS utiliser les micropipettes (en pipettant deux fois n'importe quelle combinaison amenant à un total de 1400 μ l). Par contre pour pipeter 700 μ l, il conviendra d'utiliser une P1000 et non une pipette graduée de 2 ml par exemple, la micropipette se révélant plus précise dans cette gamme de volume.

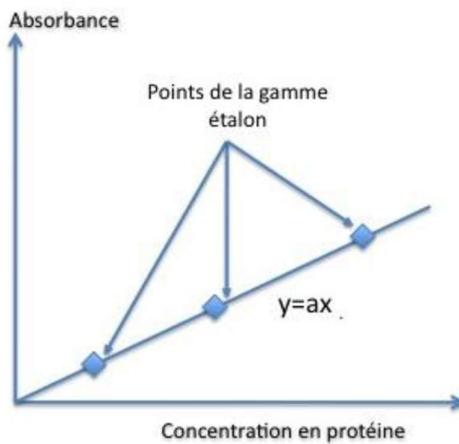
Après démonstration par l'enseignant référant, vous devez vous entrainer puis appeler l'enseignant pour qu'il vérifie (et note) votre utilisation correcte des pipettes et micropipettes.

Introduction

Au cours de ces travaux pratiques les étudiants apprennent à doser, à séparer et à identifier des biomolécules. Le dosage des biomolécules d'intérêt (glucides et protéines) est réalisé en utilisant des méthodes colorimétriques. La séparation ainsi que l'identification des biomolécules se font par l'utilisation de chromatographie sur couche mince (CCM). LE TRAVAIL DOIT ETRE PARTAGE. LA PREMIERE SEANCE UN ETUDIANT DU BINOME REALISE LE DOSAGE ET LE SECOND LA CCM. A LA 2E SEANCE LES ROLES SERONT INVERSES.

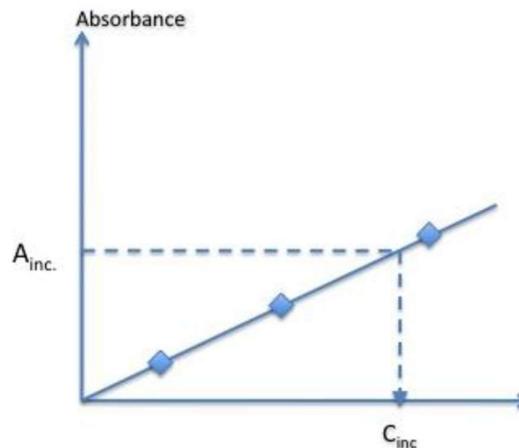
I. Principe d'une gamme étalon

La solution à doser (concentration inconnue) ainsi que des solutions de la biomolécule d'intérêt (glucide, protéine ou acide nucléique) de concentration connue sont colorées en parallèle. A partir des solutions de concentration connue, on réalise une gamme étalon : absorbance en fonction de la concentration en biomolécule. La relation entre la concentration et l'absorbance est linéaire et suit la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon l C$, où A est l'absorbance en unités arbitraires, C la concentration en protéine en mol.L^{-1} , l la longueur de la cuve en cm et le coefficient d'extinction molaire des protéines en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A partir de cette droite, on peut déterminer la concentration de notre biomolécule d'intérêt dans la solution inconnue soit graphiquement en utilisant l'absorbance mesurée, soit en calculant l'équation de la droite.



Obtention d'une gamme étalon et méthode par le calcul

L'équation de la droite est : $y = ax$; on mesure A_{inc} , l'absorbance de la solution de concentration inconnue, en posant $y = A_{\text{inc}}$, on trouve $C_{\text{inc}} = A_{\text{inc}}/a$



Obtention d'une gamme étalon et méthode graphique

On reporte la valeur mesurée A_{inc} sur l'ordonnée graphique, on trace une ligne jusqu'à la droite étalon, puis une ligne de la droite étalon à l'axe des abscisses : la valeur pointée est la concentration recherchée C_{inc}

L'équation de la droite est obtenue en tenant compte de chacun des points de la gamme: la plupart du temps, les imperfections expérimentales entraîne l'obtention de points qui ne sont pas parfaitement alignés. Pour obtenir une droite moyenne qui tient compte de tous les points il faut :

- calculer la pente moyenne : a . Pour cela, pour chaque couple de point A, B, on calcule la pente :

$$a_x = \frac{y_b - y_a}{x_b - x_a} \quad \text{puis on fait la moyenne des pentes obtenues}$$

Alternativement vous pouvez calculer la pente en utilisant différents tableurs.

- Pour calculer les coordonnées d'un point théorique : on pose $x=1$ par exemple, on a donc un point de coordonnée $x=1$ et $y=a*1$.

La qualité de la gamme étalon obtenue est estimée par une valeur statistique appelée coefficient de corrélation et noté r^2 . Cette valeur est comprise entre 0 et 1, la valeur 1 correspondant à une droite parfaite. On considère que les résultats obtenus correspondent bien à une droite si le coefficient de corrélation est supérieur à 0,95, ce qui correspond à un écart moyen des points de 5% par rapport à la droite moyenne. Cette valeur est obtenue en utilisant la fonction régression linéaire de votre calculatrice.

Nota Bene : En théorie, à concentration en biomolécule nulle, l'absorbance est nulle. En pratique, nos biomolécules ne sont pas seules en solution et les ions ainsi que les réactifs de dosage peuvent absorber un peu en présence des biomolécules. Afin de palier à cette absorbance non due à la concentration en biomolécule, une expérience témoin est réalisée, dans laquelle la biomolécule est omise. L'absorbance de ce témoin A_0 sera retirée de l'absorbance mesurée pour les points de la gamme étalon ou de la solution inconnue. On obtiendra un $\Delta A_n = A_n - A_0$ pour chaque mesure. C'est cette valeur corrigée qui sera utilisée pour le graphique.

2. Principe de fonctionnement du spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est un instrument qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée (pour une couleur donnée).

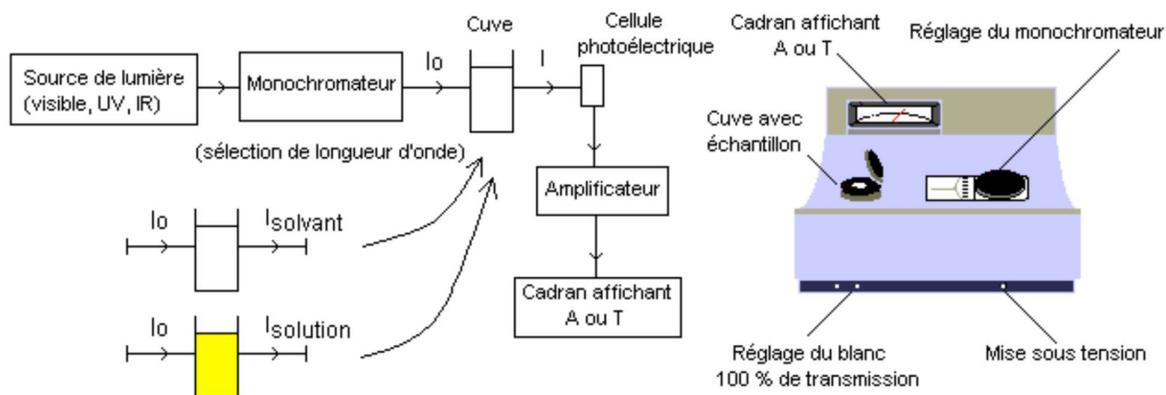


Figure : Principe du spectrophotomètre

Pour mesurer l'absorbance, le spectrophotomètre envoie sur une cuve contenant la solution à mesurer un faisceau à la longueur d'onde voulue avec une intensité I_0 . Selon le milieu traversé, cette intensité va être absorbée partiellement par l'échantillon et donc l'intensité va diminuer. Cette nouvelle valeur, notée I , est mesurée par un détecteur. L'absorbance est donnée par $A = \log(I_0/I)$, c'est donc une valeur sans unité.

ATTENTION : La mesure du spectrophotomètre ne donne une valeur d'absorbance correcte uniquement en dessous de 1. Au-dessus de $A=1$, nous sommes au-dessus des limites de mesure de l'appareil.

Cet instrument a besoin d'être calibré : il faut lui faire mesurer avant chaque expérience la valeur I_0 , c'est ce qu'on appelle le zéro du spectrophotomètre ou le blanc.

Pour cela, on peut notamment ne rien mettre dans l'instrument, appuyer sur le bouton « zéro ». Dans ce cas, on dit qu'on fait le zéro sur l'air.

Il est également possible de faire le « zéro » sur la solution ne contenant pas la molécule active.

ATTENTION : Le spectrophotomètre est un appareil onéreux il conviendra donc de le manipuler avec délicatesse ! Il est absolument interdit de manipuler au dessus d'un spectrophotomètre afin d'éviter

tout renversement sur un appareil électrique. Autrement dit vous devez préparer vos cuves sur la paillasse « loin » des spectrophotomètres puis les introduire dans l'appareil. Tout renversement devra être nettoyé consciencieusement avec du papier absorbant puis avec torchon humidifié afin d'enlever tout liquide résiduel puis séché. L'état général des spectrophotomètres sera vérifié en fin de séance par l'enseignant.

3. Chromatographie de partage sur couche mince (CCM)

Lorsqu'une substance est mise en présence de solvants non miscibles A et B, elle se répartit en solution entre ces deux solvants avec des concentrations C_a et C_b telles que : $C_a/C_b = \text{constante}$. Cette constante est appelée coefficient de partage de la substance considérée entre les deux solvants. A une température donnée et un système de solvants donné, cette constante est une caractéristique de la substance étudiée et indépendante de la concentration de la substance et n'est pas affectée par la présence d'autres solutés. Les chromatographies sur papier, sur couche mince et sur colonne sont basées sur le principe de la chromatographie de partage.

La phase stationnaire utilisant dans les TP de biochimie sera une couche mince de gel de silice sur plaque d'aluminium et la phase mobile des solvants non miscibles.

Les composants constitutifs du soluté se distribuent le long du parcours du solvant, selon leur coefficient de partage, entre le solvant organique et la phase aqueuse qui imprègne le support de silice. La chromatographie est ascendante, le solvant migrant du bas vers le haut du support. La distance parcourue par chaque substance depuis l'origine (ligne de base) par rapport au front du solvant, est définie par le R_f :

$$R_f = \text{Distance parcourue par le composé} / \text{Distance parcourue par le solvant}$$

La R_f est caractéristique d'une substance dans des conditions expérimentales données. Pour identifier une substance inconnue, il faut analyser par chromatographie simultanément une substance connue, présumée identique à celle qu'on étudie.

4. Sécurité

Produit	Etiquetage
Butanol	Inflammable ; Corrosif
Acide acétique	Inflammable ; Corrosif
Ninhydrine	Nocif ; Irritant
Réactif de folin Nocif	Irritant
3,5-dinitrosalicylate (DNS)	Nocif ; Irritant ; Inflammable ; Corrosif

Travail Pratique 1 : Protéines

Partie I : Etude de la structure d'un tripeptide

Les acides aminés sont les constituants essentiels des protéines. Ils sont liés les uns aux autres par une liaison peptidique de façon à former des enchaînements polypeptidiques. L'agencement spatial de chaque chaîne et de l'ensemble des chaînes les unes par rapport aux autres, confèrent à la protéine une conformation dont dépend son rôle biologique. La composition quantitative et qualitative en acides aminés et leur séquence dans les chaînes polypeptidiques confèrent la structure primaire d'une protéine.

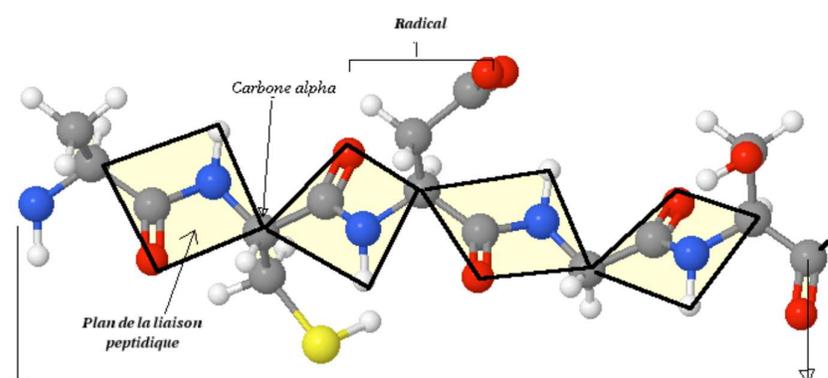


Figure : Structure primaire d'un peptide

Nous disposons d'un tripeptide d'intérêt biologique dont nous cherchons à déterminer la structure. Nous devons donc déterminer sa composition en acides aminés ainsi que l'ordre de ces acides aminés dans la séquence.

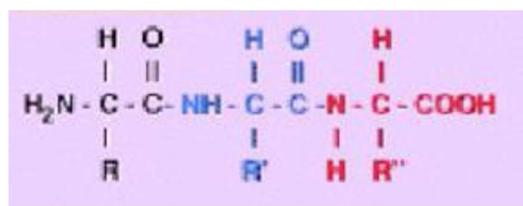


Figure : Structure primaire d'un tripeptide

Pour cela, nous allons réaliser une chromatographie de partage sur couche mince afin d'identifier les acides aminés constituant le tripeptide d'intérêt.

Les solutés à tester seront issus d'un tripeptide qui aura subi différents traitements :

- le tripeptide sans traitement
- le tripeptide hydrolysé par HCl 5,7 M à 110°C pendant 18h
- l'acide aminé N-terminal purifié après digestion à l'aminopeptidase.
- l'acide aminé C-terminal purifié après digestion à la carboxypeptidase.

Protocole CCM :

- Tracer la ligne de base au crayon à papier à 2 cm du bord de la plaque de silice. Vous réaliserez 7 dépôts. Il conviendra de répartir équitablement ces 7 dépôts le long de votre ligne de base en évitant les points sur les bords de la plaque de silice.
- Déposer les échantillons : trois acides aminés témoins et quatre échantillons traités du tripeptide sur ces points à l'aide d'un capillaire. Les dépôts doivent être de petits points et non de grosses taches. Sécher au sèche-cheveux immédiatement après le dépôt.
- Déposer la plaque (échantillon en bas) dans la cuve de chromatographie contenant le mélange de solvant : Butanol/acide acétique/H₂O : 4 :2 :1.
- Laisser migrer le solvant jusqu'au deux tiers de la hauteur de la plaque.

PENDANT LA MIGRATION FAIRE LA PARTIE II

- Tracez la ligne de solvant à l'aide d'un crayon à papier puis séchez la plaque au sèche-cheveux sous la sorbonne
- Révéler en pulvérisant une solution de ninhydrine à 0,2% dans du butanol (sous une hotte chimique).
- Sécher la plaque à l'aide d'une plaque chauffante
- Tracez le contour des points obtenus au crayon gris et mesurer la distance de chaque point et du front de solvant par rapport à la ligne de base.
- Notez les résultats des autres binômes à l'aide d'un dessin à l'échelle de leur plaque.
- Jeter la plaque dans le contenant prévu à cet effet.

Analyse des résultats :

Suivre les consignes données précédemment sur l'analyse des CCM
Donner un chromatographe complet (comprenant toutes les conditions du tripeptide traité)
correctement légendé
Donner un tableau de R_f des points de tous les chromatogrammes
Déduire la séquence du tripeptide

Partie II : Méthodes de dosage des protéines

Différentes méthodes existent pour déterminer la concentration en protéine d'une solution inconnue. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer les dosages colorimétriques. Ces dosages consistent à colorer spécifiquement les protéines en solution. Il existe trois méthodes de dosage colorimétriques qui diffèrent par les réactifs utilisés mais aussi par la sensibilité du dosage :

- Méthode du biuret : la zone d'utilisation est située entre 1 et 20 g.L⁻¹. Les protéines sont dosées par la formation en milieu alcalin d'un complexe entre le cuivre et la liaison peptidique.
- Méthode de Folin-Ciocalteu : la zone d'utilisation est située entre 0,1 et 1 g.L⁻¹ de protéines. Le réactif de Folin (acide phosphotungstique et phosphomolybdique) donne une coloration bleue avec la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et d'autres acides aminés. La coloration varie selon la composition en acides aminés des protéines.
- Méthode de Folin-Lowry : La zone d'utilisation est située entre 5 et 100 mg.L⁻¹. En combinant le réactif de Folin avec le réactif de biuret, Lowry a réalisé un dosage très sensible. Cependant, ce dosage fait intervenir non seulement les liaisons peptidiques mais aussi certains acides aminés spécifiques tels que les acides aminés aromatiques et la coloration varie d'une protéine à l'autre.

Protocole expérimental du dosage par la méthode de Folin-Lowry

Pour réaliser le dosage d'une solution de concentration inconnue de protéine par la méthode de Folin-Lowry, vous disposez de:

- réactif de folin commercial
- réactif A : Na_2CO_3 0,1% ; NaOH 0,4%
- réactif B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%
- réactif C : Tartrate de Na et K 2%
- Protéine standard : solution de sérum albumine bovine (SAB) à 40 mg.L^{-1}

ATTENTION : Vous devez préparer vos calculs de concentration de la solution standard avant d'arriver en TP et les indiquer dans la fiche TP – apprentissage.

- Protéine inconnue : solution de protéine de concentration inconnue.

NB : Le poids moléculaire de la SAB est de 66.5 kDa

Préparation de la gamme étalon et dilution de la solution à doser

Afin d'obtenir une gamme étalon, différentes dilutions de la solution de protéine standard seront réalisées. Pour cela, différents volumes V_i (0-0,1-0,2-0,3-0,4-0,6-0,8-1 mL) de la solution standard seront utilisés et complétés avec de l'eau jusqu'à un volume final de 2 mL.

Pour plus de précision dans les mesures, on réalise également plusieurs dilutions de la solution inconnue. Pour cela, différents volumes V_i de cette solution inconnue (0-0,5-1-2 mL) seront utilisés et complétés avec de l'eau afin d'obtenir un volume final de 2 mL. Chaque dilution de la solution inconnue sera réalisée deux fois (en *duplicata*).

Vous disposerez ainsi de 16 tubes numérotés et identifiés (numéros et initiales du binôme).

Coloration des protéines

Vous devez d'abord préparer le réactif D à partir des réactifs A, B et C. Pour cela, ajouter dans une fiole jaugée de 50 mL ajouter 0,5 mL de B, 0,5 mL de C et compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution A.

Dans chaque tube :

- Ajouter 3 mL de la solution D
- Vortexer
- Attendre 10 minutes
- Ajouter 0,1 mL de réactif de Folin
- Vortexer
- Incuber 30 mn à l'obscurité (placard)

Nota bene : Pour une bonne qualité de vos mesures, vous ne devez pas changer de manipulateur au cours de l'ajout d'un réactif. Par exemple, la personne qui ajoute la protéine dans le tube 1, l'ajoute dans tous les tubes. De cette façon ; l'erreur potentiellement réalisée est la même dans tous les tubes.

Mesure de l'absorbance

Pour chaque tube, vous devez mesurer l'absorbance. Pour cela :

- faites le zéro du spectrophotomètre sur l'air.
- Transférer un peu de l'échantillon du tube 0 dans une cuve de mesure LOIN DU SPECTROPHOTOMETRE.
- Placer la cuve dans le spectrophotomètre avec le côté transparent de la cuve face au faisceau
- Mesurer l'absorbance à 750 nm
- Vider TOUT le contenu de la cuve dans son tube d'origine
- Recommencer avec le tube 1.

Si vous mesurez l'absorbance, en prenant vos tubes dans l'ordre des concentrations croissantes en protéine, vous n'avez pas besoin de laver la cuve entre deux mesures. Vous aurez besoin de deux cuves : une pour la gamme étalon et une pour les échantillons.

ATTENTION :

- Vos valeurs ne sont valables que si l'absorbance est inférieure à 1
- Les valeurs d'absorbance des échantillons doivent être inférieures à la valeur d'absorbance la plus forte de la gamme étalon. Cette gamme n'est pas extrapolable aux plus fortes concentrations.

Analyse des résultats

Vous devez vous appuyer sur les consignes données au début du polycopié.

Vous devrez :

- Présenter un graphique avec la droite étalon (courbe standard) avec l'équation de la droite, le r^2 et les légendes appropriées
- Déterminer la concentration en protéine inconnue dans chaque tube par la méthode graphique et par le calcul.
- Utiliser ces valeurs pour en déduire la concentration en protéine dans la solution inconnue mère (avant dilution). Si vos données le permettent effectuer une moyenne et un écart type de vos valeurs.

Dans la partie traitement de la fiche expérience, vous ajouterez votre version du tableau donné ci-dessous. Justifiant vos calculs en prenant un tube pour exemple.

Tube	gamme étalon								échantillons tests							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Solution Standard (ml)																
Solution inconnue (ml)																
H ₂ O																
Solution D																
Folin																
Volume total																
Abs 750 nm																
Abs 750 nm corrigée																
Concentration standard mol.L ⁻¹																
Concentration inconnue mol.L ⁻¹																

ATTENTION AUX UNITES EMPLOYEES : les concentrations sont demandées en mol/L et la concentration standard est donnée en g/L ...

Travail Pratique 2 : Glucides

Partie I : Etude de la structure d'un disaccharide

Les glucides sont les biomolécules les plus abondantes sur terre. Les glucides peuvent avoir un rôle structural, énergétique ou fonctionnel. Les disaccharides résultent de la condensation de deux oses *via* une liaison O-osidique.

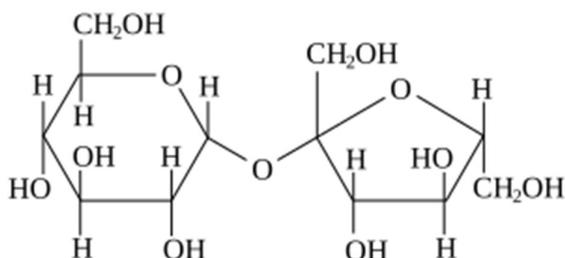


Figure : Structure d'un diholoside (le saccharose)

Nous disposons d'un diholoside d'intérêt biologique dont nous cherchons à déterminer la structure. Nous devons donc déterminer sa composition en oses ainsi que le type de liaison les unissant.

Pour cela, nous allons réaliser une chromatographie de partage sur couche mince après différents traitements afin d'identifier les oses constituant le diholoside d'intérêt.

Chaque binôme aura un diholoside à caractériser (A, B ou C). Plusieurs échantillons de ce diholoside seront traités de la manière décrite ci-dessous avant d'être séparé par CCM.

- le diholoside sans traitement
- le diholoside hydrolysé par HCl 0.1 M à 60°C pendant 1h
- et d) deux échantillons du diholosides digérées par des glycosidases, selon le diagramme ci-dessous :

Diholoside	Condition « c »	Condition « d »
A	α -glucosidase	β -glucosidase
B	β -fructosidase	β -glucosidase
C	β -galactosidase	β -glucosidase

Protocole CCM :

- Tracer la ligne de base au crayon à papier à 2 cm du bord de la plaque de silice. Vous réaliserez 7 dépôts. Il conviendra de répartir équitablement ces 7 dépôts le long de votre ligne de base en évitant les points sur les bords de la plaque de silice.
- Déposer les échantillons : trois oses témoins et quatre échantillons traités du diholoside sur ces points à l'aide d'un capillaire. Les dépôts doivent être de petits points et non de grosses taches. Sécher au sèche-cheveux immédiatement après le dépôt.
- Déposer la plaque (échantillon en bas) dans la cuve de chromatographie contenant le mélange de solvant : nButanol/éthanol/H₂O : 3 :2 :1.
- Laisser migrer le solvant jusqu'au deux tiers de la hauteur de la plaque.

PENDANT LA MIGRATION FAIRE LA PARTIE II

- Tracez la ligne de solvant à l'aide d'un crayon à papier puis séchez la plaque au sèche-cheveux sous la sorbonne
- Révéler en pulvérisant une solution de KMnO_4 (0.5%) dans 0.1 M NaOH.
- Sécher à l'aide d'une plaque chauffante
- Tracez le contour des points obtenus au crayon gris et mesurer la distance de chaque point et du front de solvant par rapport à la ligne de base.

Analyse des résultats

Suivre les consignes données au début du polycopié.

Pour votre analyse, sur la chromatographie sur couche mince, vous devez :

- donner votre chromatogramme légendé.
- donner les R_f (sous forme de tableau) des points de tous les chromatogrammes.

Vous en déduirez la structure de ce diholoside.

Partie 2 : Dosage des oses par le 3,5-dinitrosalicylate (DNS)

Le dosage des oses par le DNS repose sur le pouvoir des oses à réduire les complexes organiques. La réaction s'effectue à chaud et en milieu alcalin. Il y a réduction de l'acide 3, 5-dinitrosalicylique (composé jaune) en acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrobenzoïque (3-amino-5-nitrosalicylique) (composé rouge- orangé), voir figure. L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration de l'ose dans la solution.

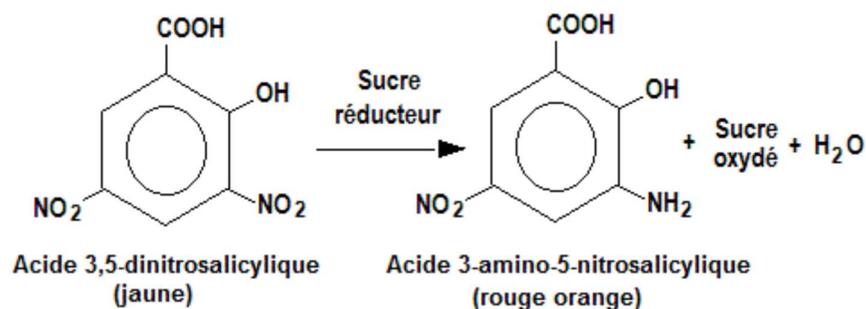


Figure : Réaction de réduction du DNS

Protocole

Pour réaliser le dosage d'une solution de concentration inconnue de glucose en utilisant le DNS, vous disposez:

- Réactif au 3,5-dinitrosalicylate (DNS).
- Solution de glucose standard à 5 mmoles/L

ATTENTION : Vous devez préparer vos calculs de concentration de la solution standard avant d'arriver en TP et les indiquer dans la fiche TP – apprentissage.

- Solution de glucose de concentration inconnue.
- H₂O

ATTENTION : Vous devez préparer vos calculs de concentration de la solution standard avant d'arriver en TP et les indiquer dans la fiche TP – apprentissage.

Préparation de la gamme étalon et dilutions de la solution à doser

Afin d'obtenir une gamme étalon, différentes dilutions de la solution standard seront réalisées dans des tubes à essai selon la procédure suivante :

- numéroté et identifier 6 tubes à essai (numéros 1 à 6 et initiales du binôme)
- introduire 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mL d'une solution de glucose à 5 mmol/L

Préparation en *duplicata* des tubes expérimentaux, contenant la solution de glucose de concentration inconnue :

- numéroté et identifier 4 tubes à essai (tubes 7 à 10 et initiales du binôme).
- introduire 0,5 mL et 1 mL de la solution inconnue.

Traitement commun :

- ajouter de l'eau distillée de telle sorte à obtenir 2 ml de volume final
- ajouter 2 mL de réactif (DNS)
- boucher chaque tube avec du papier aluminium.
- vortexer.
- incuber 5 min au bain-marie bouillant, ATTENTION AUX RISQUES DE BRULURES.
- refroidir dans de la glace
- compléter le volume de chaque tube avec de l'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 10 ml.
- laisser reposer 15 minutes à température ambiante.
- lire les absorbances à 530 nm après avoir fait le zéro avec le blanc (sans glucose).

Analyse des résultats

Vous devez vous appuyer sur les consignes données au début du photocopié.

Vous devrez :

- Présenter un graphique avec la droite étalon (courbe standard) avec l'équation de la droite, le r^2 et les légendes appropriées
- Déterminer la concentration en glucose inconnue dans chaque tube par la méthode graphique et par le calcul.
- Utiliser ces valeurs pour en déduire la concentration en glucose dans la solution inconnue mère (avant dilution). Si vos données le permettent effectuer une moyenne et un écart type de vos valeurs.

Dans la partie traitement de la fiche expérience, vous ajouterez votre version du tableau récapitulatif les données obtenues ainsi que les calculs effectués. Justifiez vos calculs en prenant un tube pour exemple.