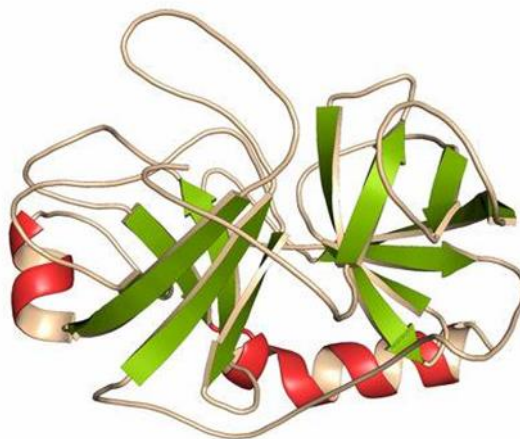
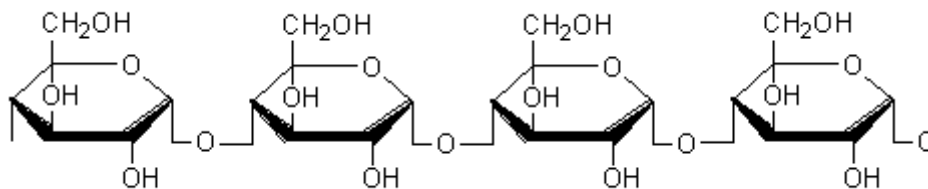


Université de Toulon

UFR Sciences et Techniques

Travaux Pratiques de Biochimie
L1 SV

Travaux pratiques de Biochimie 6h



RECOMMANDATIONS

Il est recommandé de venir à la séance de TP en ayant pris connaissance du contenu de la séance.

Pour les séances de Travaux pratiques, vous devez apporter:

Votre polycopié de TP, votre cahier de laboratoire, une blouse blanche, un feutre - marqueur pour le verre, une calculatrice et des feuilles blanches format A4.

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.

En outre, les étudiants présentant une allergie au latex doivent se procurer des gants de vinyle (en supermarché) pour pouvoir manipuler les produits dangereux.

I - CAHIER DE LABORATOIRE

Ce cahier doit permettre à l'étudiant de garder une trace écrite de ce qu'il fait en TP et d'acquérir la rigueur indispensable à la prise de notes lors d'un travail expérimental. Il permettra également de rédiger le compte rendu de TP correspondant.

Le cahier de laboratoire est un document de travail personnel dont le contenu doit pouvoir être utilisé par toute autre personne. A ce titre il doit être tenu sous une forme bien définie et être rédigé de manière claire et lisible.

Format et rédaction

Le cahier sera sans spirales et toutes les pages devront être numérotées.

Sur la première page (page 001), l'étudiant indiquera : nom, prénom, année d'étude, année universitaire. Les pages 002 à 005 seront réservées à l'écriture de la table des matières qui sera actualisée au fur et à mesure des séances. Ce cahier est un document de travail, **il doit donc être complété sur place et à chaque séance**, si besoin est.

Le cahier de laboratoire doit être suffisamment complet pour qu'on puisse s'y référer et réaliser à nouveau l'expérience décrite dans les mêmes conditions expérimentales et obtenir les mêmes résultats dans les limites d'erreur établies.

On pourra trouver dans ce cahier et pour chaque séance :

- le titre de l'expérience
- la démarche expérimentale
- les conditions expérimentales
- les observations
- les mesures
- un exemple de calcul et/ou un traitement préliminaire des données
- ainsi que tout commentaire ou appréciation utile au bon déroulement de la manipulation y compris les problèmes rencontrés et les solutions apportées.

Le cahier étant numéroté, aucune page ne pourra être arrachée. Une encre ineffaçable sera utilisée à la rédaction. Ecrire directement dans le cahier sans rien retranscrire, pas de feuilles volantes. Si une erreur est constatée, il faudra la rayer proprement sans la faire disparaître et écrire à côté la correction ainsi que le motif.

II - 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.

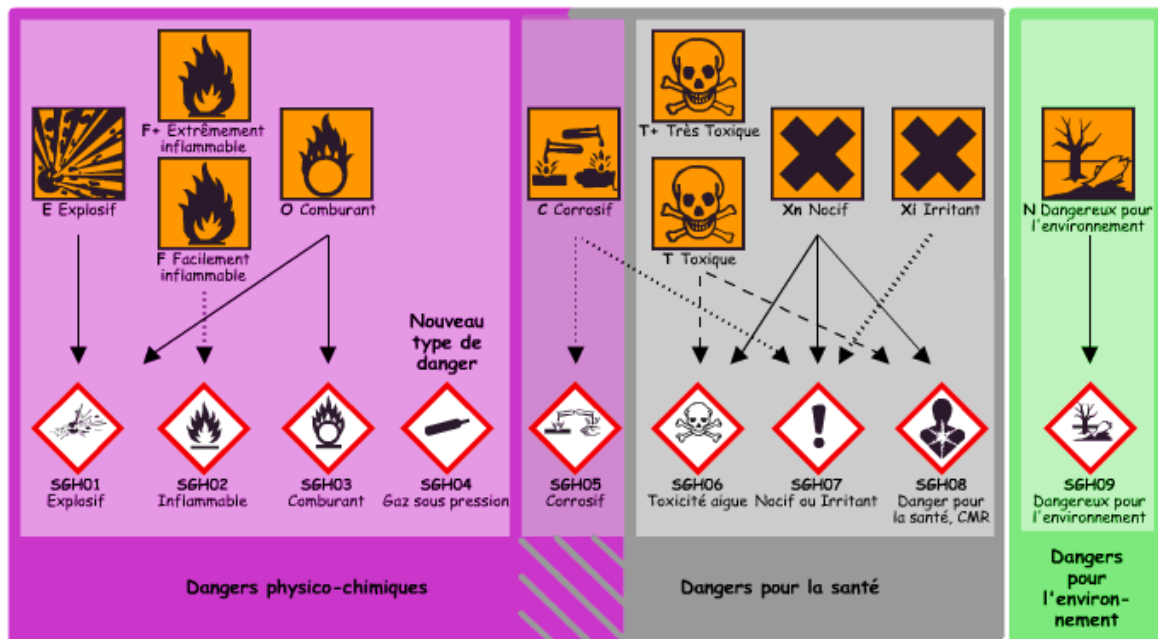
3) RISQUES DES SUBSTANCES DANGEREUSES

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
---	--

selon le danger et la nature spécifique des risques. Cette classification a été récemment modifiée et remplacé 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.

10 pictogrammes



9 pictogrammes SGH (CLP)

© Kaptitude.com

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.
- Circonscrire le risque à la source.
- Prendre des mesures de prévention matérielle.
- Utiliser des moyens de protection.
- Au cours des manipulations de chimie, manipuler toujours au-dessus de la table :

Les souliers ne résistent pas à l'action des produits chimiques !

1. 7) PRECAUTIONS NECESSAIRES

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

- **Porter des lunettes de protection.**

- **Indiquer au marqueur indélébile, sur chaque récipient la nature de la substance qu'il contient.**
- **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.
- **Ne jamais jeter à l'évier des solvants toxiques ou inflammables.**
- **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 de la séance de manipulation, videz dans les « **bidons déchets** » réservés à cet effet tout vos récipients souillés et **nettoyez toute votre verrerie sans oublier les inscriptions aux marqueurs.**

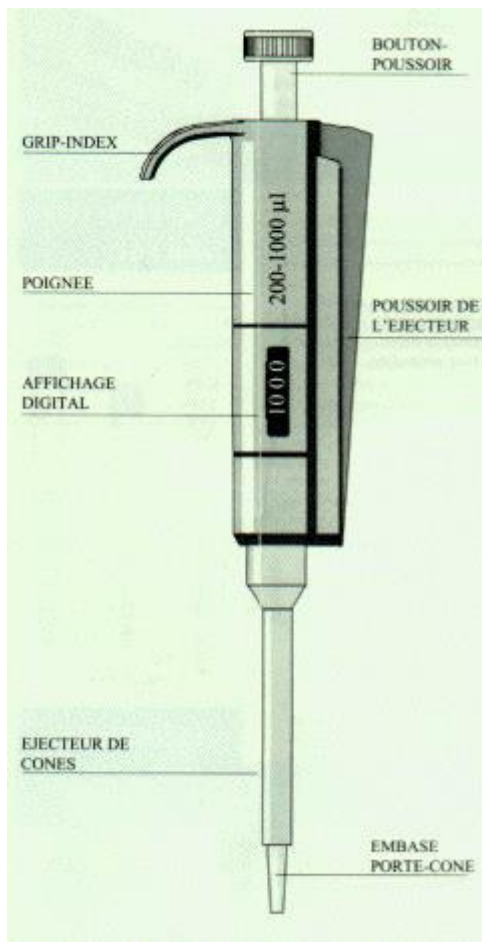
Nettoyez soigneusement la paillassse ou la table quand des produits chimiques y sont tombés. Prenez un chiffon ou un papier, éventuellement tenu avec une pince pour protéger les doigts.

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

III – UTILISATION DU MATERIEL DE PRECISION

- Les pipettes en verre graduées s'utilisent entre deux graduations.
- Les fioles jaugées sont homogénéisées par retournement.
- Les balances doivent être nettoyées après utilisation.
- **Les micropipettes sont du matériel de précision très onéreux, veillez à les utiliser de la façon suivante :**

LA MICROPIPETTE



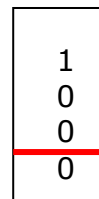
1/ Choisir le bon instrument en fonction du volume désiré (**limite de prélèvement !**)

- 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
- de 1000 à 5000 μL : utiliser une P 5000

2/ Regarder le cadran d'affichage numérique

Pour les P20, P100, P200 :

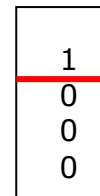
Ex : P200



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

4/ Placer le cône convenable sur l'embout

5/ Appuyer sur le bouton poussoir jusqu'au 1^{er} cran

5/ Introduire l'extrémité du cône dans le bécher contenant la solution à pipeter

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

7/ Essuyer l'extérieur du cône

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

Il est **ABSOLUMENT INTERDIT** d'utiliser les P20, P200 et P1000 en dehors des "fourchettes" précisées 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.**

RAPPEL SUR LA REDACTION D'UN COMPTE RENDU DE TRAVAUX PRATIQUES

TOUS LES RAPPORTS DOIVENT ETRE DACTYLOGRAPHIES

LES RAPPORTS ECRIS A LA MAIN NE SERONT PAS ACCEPTEES

Le compte rendu doit obligatoirement être rédigé et traité dans l'ordre des différents points énoncés ci-dessous.

Nom et prénom du ou des auteurs ; Date de la manipulation

Titre du TP

I –Résumé (MAXIMUM 1/2 PAGE)

Doit comporter l'objectif de l'étude, les méthodes utilisées et les résultats principaux.

II-Introduction (MAXIMUM 1 PAGE)

L'introduction doit contenir trois éléments :

- Amener le sujet : Replacer les travaux dans un contexte bibliographique plus général
- Présenter le but et les objectifs de l'étude.
- Principe des expériences réalisées.

II I– Matériel et Méthode (MAXIMUM 1,5 PAGES)

La partie Matériel et Méthode consiste à décrire le matériel spécifique utilisé en travaux pratiques et en la description des protocoles utilisés. **Vous devez rédiger et non établir des listes.**

A. Matériel

La partie 'matériel' n'est pas indispensable, elle sert à décrire le matériel biologique utilisé (anticorps, lignées cellulaires, enzymes) quand celui-ci est conséquent. Elle ne doit en rien être une liste exhaustive de la verrerie utilisée et doit être rédigée sous forme de phrases.

B. Méthodes

Dans cette sous-partie vous décrivez vos manipulations en **rédigeant**. Vous devez impérativement indiquer **les concentrations des solutions mères** que vous utilisez et les **temps d'incubation**. Si vous réalisez plusieurs fois le même type d'expérience, ne la décrivez qu'une fois et faites un tableau pour résumer les conditions particulières à chaque expérience. Vous devez être concis et nous devons être capables de refaire la manipulation à partir de votre compte rendu.

Il ne faut surtout pas recopier le photocopié! (Si c'est le cas, c'est du plagiat)

IV- Résultats et discussion

Si le TP a donné lieu à plusieurs expériences, **chacune d'entre-elles** doit être décrite de la façon suivante :

- Titre de l'expérience (clair et précis pour présenter le but de l'expérience)
- Introduction

En une phrase ou deux vous devez présenter l'objectif de l'expérience et son principe.

- Présentation des résultats

Les résultats doivent être présentés sous forme de figure, incluse dans le texte ou donnée en annexe. Pour les figures de résultat, vous devez :

- Graphique : titre, échelle, équation de la courbe, coefficient de corrélation, légende
- Tableau : titre
- Figures imagée (photo, dessin ou autre) : titre, une légende qui permette de comprendre la figure

Une figure doit se suffire à elle-même sans nécessiter de lire le texte à côté. Si vous avez fait des calculs pour obtenir votre figure vous devez donner un exemple de calcul.

- Analyse des Résultats :

Vous devez décrire vos résultats d'un point de vue qualitatif (ce que vous observez) et d'un point de vue quantitatif. Vous devez être rigoureux sur cette analyse.

- Discussion :

Tout résultat obtenu doit être discuté soit en analysant la qualité de votre manipulation soit en le comparant à la littérature. Cette discussion peut se faire progressivement au cours de l'analyse des résultats.

Vous devez aller chercher dans la littérature et comparer vos résultats à des résultats théoriques. En cas de différence avec les données théoriques, vous devez expliquer pourquoi en vous basant sur les principes des techniques que vous avez utilisés.

- Conclusion :

Il faut absolument faire une phrase de conclusion sur vos résultats. Si vos résultats ne vous paraissent pas suffisamment clairs pour répondre à la problématique, vous devez le dire à ce stade.

V – Conclusion et Perspectives

Pour cela, vous réalisez deux paragraphes distincts :

- un paragraphe de synthèse des diverses expériences mises en œuvres et voir si vous avez répondu avec vos résultats à l'objectif de départ des travaux pratiques.
- Un paragraphe d'ouverture dans lequel vous proposerez des expériences complémentaires ou des expériences à réitérer.

LES COMPTE-RENDUS SONT RENDUS À LA SÉANCE SUIVANTE. ILS SERONT NOTES EN TENANT COMPTE DE TOUS CES CRITERES MAIS AUSSI DE LA QUALITE DE VOS MANIPULATIONS. DES AIDES À LA REDACTION DE LA PARTIE RESULTAT DE CHAQUE TP SONT DONNÉES DANS LE DESCRIPTIF DE LA SEANCE.

NB : Ce n'est pas la peine de gâcher des kilomètres de papier. Soyez concis et précis, vous ne serez pas notés au poids.

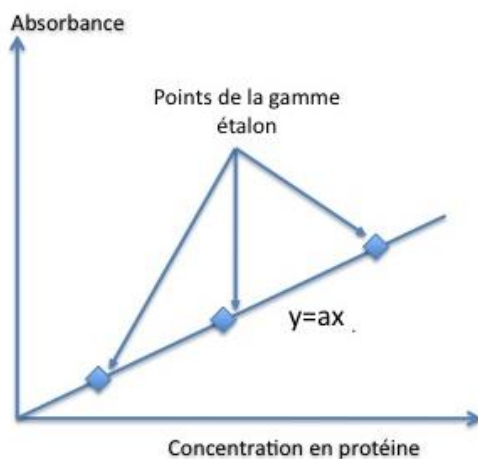
VI – Références

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 2^E SEANCE LES ROLES SERONT INVERSES.**

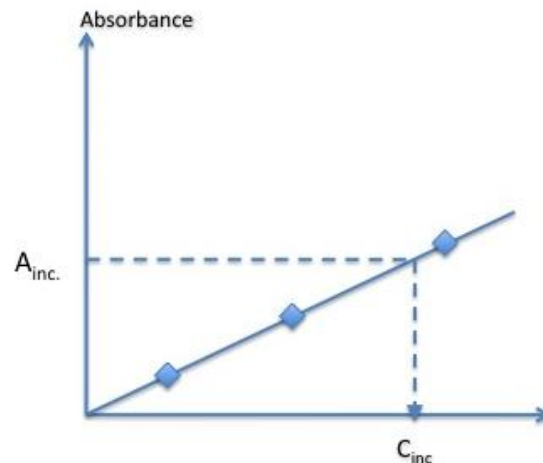
I. Principe d'une gamme étalon

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 entraînent 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 : \bar{a} . Pour cela, pour chaque couple de point A, B, on calcule la pente : $a_n = \frac{y_b - y_a}{x_b - x_a}$ puis on fait la moyenne des pentes obtenues : $\bar{a} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$

- Calculer les coordonnées d'un point théorique : on pose $x=1$ par exemple, on a donc un point de coordonnée $x=1$ et $y=\bar{a} \cdot 1$. On place ce point sur le graphique et on trace la droite entre l'origine et celui-ci.

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.

II. 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).

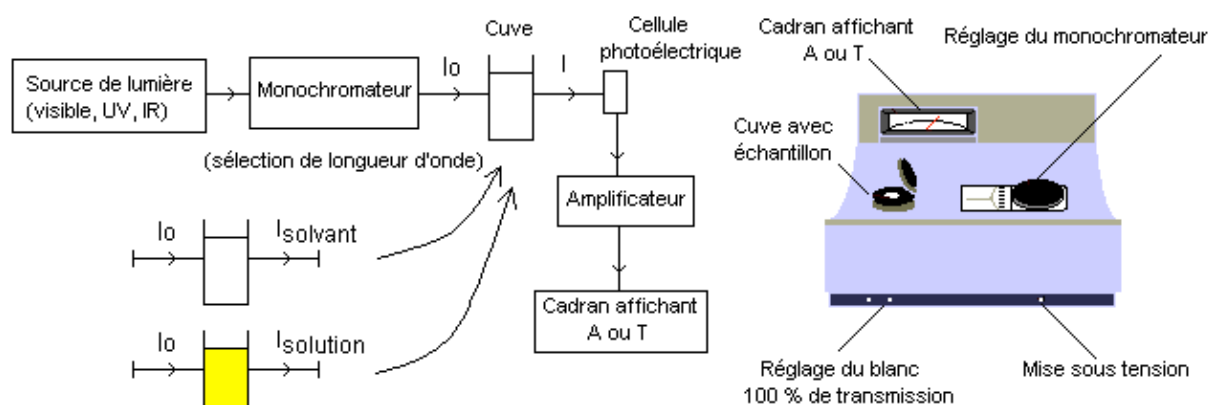


Figure 1 : Principe du spectrophotomètre

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. La mesure du spectrophotomètre ne donne une valeur d'absorbance correcte 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. C'est ce qui sera réalisé ici.

III. 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 front du solvant, définit R_f :

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

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.

IV. SECURITE

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 : 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.

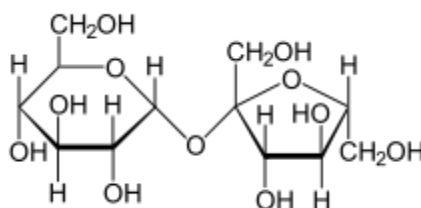


Figure 4 : Structure d'un diholoside (saccharose)

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

1. Protocole CCM

- Tracer la ligne de base au crayon à papier à 2cm du bord de la plaque de silice et un point tous les 1,4cm sur cette ligne à partir de l'extrémité.
- Déposer les échantillons : trois oses témoins (glucose, fructose et galactose) ainsi que les solutions expérimentales a,b,c,d sur ces points à l'aide d'une pipette Pasteur. 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/ethanol/eau (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
- Révéler en pulvérisant une solution de KMnO_4 (0.5%) dans 0.1 M NaOH.
- Sécher à l'étuve à 110°C 15 à 20 min.
- 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.

2. Compte rendu partie CCM

Pour la rédaction du compte-rendu vous devez suivre les consignes données au début du polycopié.

Pour la partie résultat, 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. Comment confirmer vos résultats ?

Partie II : 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 5. L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration de l'ose dans la solution.

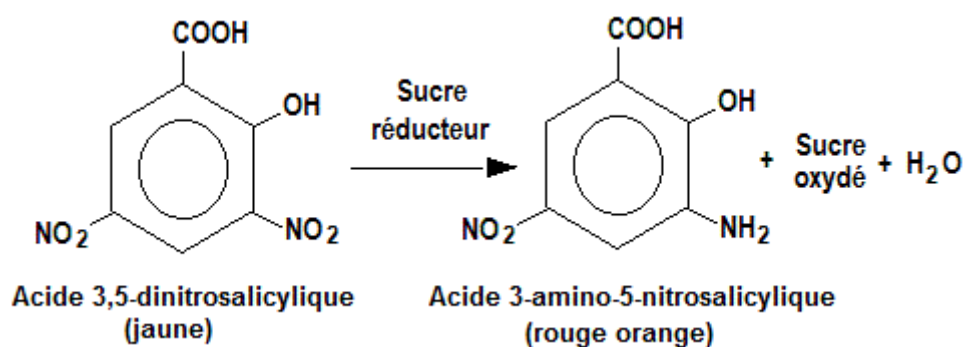


Figure 5 : Réaction de réduction du DNS.

3. Protocole expérimental.

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 mmol/L
- Solution de glucose de concentration inconnue.
- H₂O

4. Préparation de la gamme étalon et dilution 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 0-0,2-0,4-0,6-0,8 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 :

- identifier 2 tubes à essai de la façon suivante (E1a, E1b, E2a, E2b et initiales du binôme).
- introduire 0,5 mL et 1 mL de la solution inconnue.

Traitement commun :

- ajuster chaque tube à 2mL avec de l'eau distillée
- ajouter 2 mL de réactif (DNS)
- boucher chaque tube avec du papier aluminium.

- vortexer.
- incuber 5min au bain-marie bouillant.
- refroidir dans de la glace
- compléter le volume de chaque tube à 10mL avec de l'eau distillée.
- laisser reposer 15 minutes à température ambiante.
- lire les absorbances à $\lambda = 530 \text{ nm}$ après avoir fait le zéro avec le blanc (sans glucose).

5. Compte rendu partie dosage

Pour rédiger cette partie du compte rendu, vous devez vous appuyer sur les consignes données au début du photocopié.

Dans la partie résultats, vous devrez :

- Donner la droite étalon avec l'équation, le r^2 et les légendes appropriées
- Vous devrez utiliser ces valeurs pour en déduire la concentration en glucose dans la solution inconnue (avant dilution).

En annexe à votre compte rendu, vous ajouterez le tableau contenant les données brut (densité optique pour chaque dosage) ainsi que le détail des calculs.

Travail Pratique 2 : 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.

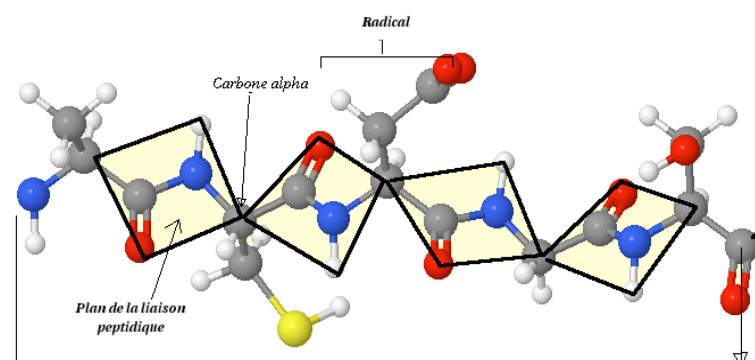


Figure 2 : Structure primaire d'un peptide

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.

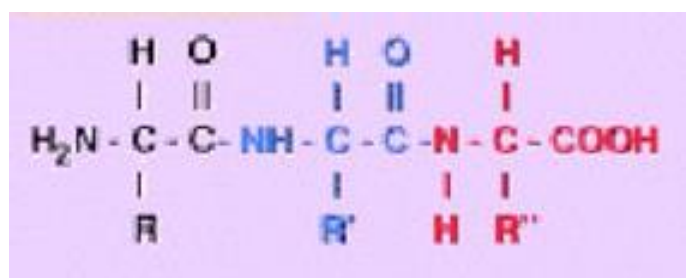


Figure 3 : Structure primaire d'un tripeptide

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.

6. Protocole CCM

- Tracer la ligne de base au crayon à papier à 2cm du bord de la plaque de silice et un point tous les 1,4cm sur cette ligne à partir de l'extrémité.
- Déposer les échantillons : trois acides aminés témoins et deux fois l'échantillon que vous testez (un des quatre présentés ci-dessus) sur ces points à l'aide d'une pipette Pasteur. 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
- Révéler en pulvérisant une solution de ninhydrine à 0,2% dans du butanol (sous une hotte chimique).
- Sécher à l'étuve à 110°C
- 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.

7. Compte rendu partie CCM

Pour la rédaction du compte-rendu vous devez suivre les consignes données au début du polycopié.

Pour la partie résultat, sur la chromatographie sur couche mince, vous devez :

- donner votre chromatogramme légendé et faire un dessin des autres chromatogrammes
- donner les R_f (sous forme de tableau) des points de tous les chromatogrammes.

Vous en déduirez la séquence de ce 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.

8. 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 : Na₂CO₃ 0,1% ; NaOH 0,4%
- réactif B : CuSO₄, 5H₂O 1%
- réactif C : Tartrate de Na et K 2%
- Protéine standard : solution de sérum albumine bovine (SAB) à 40mg.L⁻¹
- Protéine inconnue : solution de protéine de concentration inconnue.

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

Afin d'obtenir une gamme étalon, on va réaliser différentes dilutions de la solution de protéine standard. Pour cela, on va mettre différents volumes V_i (0-0,1-0,2-0,3-0,4-0,6-0,8-1 mL) et compléter avec de l'eau jusqu'à 2mL.

Pour plus de précision dans les mesures, on réalise également plusieurs dilutions de la solution inconnues. Pour cela, on met différents volumes V_i de cette solution (0-0,5-1-2 mL) et on complète à 2mL avec de l'eau. Chaque dilution sera réalisée deux fois (en *duplicata*).

10. 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 50mL : 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 3mL de la solution D

- Vortexer
- Attendre 10 minutes
- Ajouter 0,1mL de réactif de Folin
- Vortexer
- Incuber 30mn à l'obscurité

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.

11. 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.

12. Compte rendu partie dosage

Pour rédiger cette partie du compte rendu, vous devez vous appuyer sur les consignes données au début du polycopié.

Dans la partie résultats, vous devrez :

- Présenter un graphique avec la droite étalon (courbe standard) avec l'équation, le r^2 et les légendes appropriées
- Vous devrez déterminer la concentration en protéine inconnue dans chaque tube par la méthode graphique et par le calcul.
- Vous devrez utiliser ces valeurs pour en déduire la concentration en protéine dans la solution inconnue mère (avant dilution).

En annexe à votre compte rendu, vous ajouterez le tableau donné en fin de polycopié en justifiant chaque calcul en prenant un tube pour exemple.

	Gamme étalon								Echantillons						
Tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b	10a	10b	11a	11b
Solution Standard (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1	0	0	0	0	0	0	0
Solution inconnue (mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1	1	2	2
H ₂ O (mL)															
Solution D (mL)	3mL														
Folin (mL)	0,1mL														
A _{750nm}															
ΔA _{750nm}															
C _{p,stand} mol.L ⁻¹															
C _{p,inc} mol.L ⁻¹															

Tableau 1 : Tableau du dosage de protéine à reproduire et à remplir.