

**UNIVERSITÉ DE NOUAKCHOTT
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**TRAVAUX PRATIQUES
DE BIOCHIMIE STRUCTURALE
DEUXIÈME ANNÉE BIOLOGIE-GEOLOGIE**

Elaboré par :

Ali O. Med Salem O. BOUKHARY

Ahmedou OULD HOUMEIDA

2007-2008

SOMMAIRE

- Recommandations importantes p.3

- Verrerie et Matériel de laboratoire p. 4

I. GLUCIDES page 5

TP N°1 Caractérisation chimique des glucides p. 7

Réactions furfuraliques

TP N°2 Pouvoir réducteur des glucides p. 9

Réduction de la liqueur de Fehling

TP N°3 Pouvoir rotatoire des glucides p.11

II. ACIDES AMINES & PROTEINES page 13

TP N°4 Détermination du pH de la glycine p. 14

TP N°5 Dosage colorimétrique des protéines p. 16

III. LIPIDES page 18

TP N°6 Indice de saponification d'un corps gras (huile de ricin) p. 20

IV. ACIDES NUCLEIQUES page 22

TP N°7 Extraction de l'ADN d'oignon p. 25

TP N°8 Propriétés physicochimiques des acides nucléiques
- Spectre d'absorption p. 28

I. Recommandations générales

- 1. les étudiants travaillent par binôme**
- 2. le port de la blouse pendant toute la séance de TP est obligatoire**
- 3. Il est indispensable de préparer la séance de TP : lire attentivement le texte du fascicule correspondant à la manipulation du jour.**
- 4. Chaque binôme est tenu de nettoyer sa paillasse à la fin de chaque séance.**

II. Précautions à prendre

- 1. Ne pas souffler les réactifs en introduisant dans les flacons des pipettes sales**
- 2. Reboucher les flacons immédiatement après usage et les remettre à leur place**
- 3. Ne jamais pipeter les réactifs toxiques ou corrosifs (acides et bases forts et solvants organiques) directement avec la bouche. Utiliser pour cela une propipette.**
- 4. Ne pas remplir les burettes directement avec les grands flacons de réactifs. Utiliser un petit becher.**
- 5. Ne pas fermer l'orifice de la pipette avec la pouce mais avec l'index.**
- 6. Réserver, à la fin de la séance, 10 minutes pour le rangement et le nettoyage de la paillasse.**
- 7. Rincer les pipettes à l'eau distillée et les poser inclinées sur le bord du plateau.**
- 8. Vider la burette et la remplir d'eau distillée.**
- 9. Laver la verrerie avec de l'eau savonneuse (béchers, erlens, tubes à essai...) et la rincer à l'eau distillée.**
- 10. Essuyer la paillasse avec une éponge propre.**
- 11. Ne pas jeter de papiers ni de réactifs dans les éviers.**

III. Recommandation pour la rédaction de votre compte-rendu

Le compte-rendu que vous devez obligatoirement remettre à l'enseignant à la fin de chaque séance constitue l'essentiel de ce sur quoi vous serez noté.

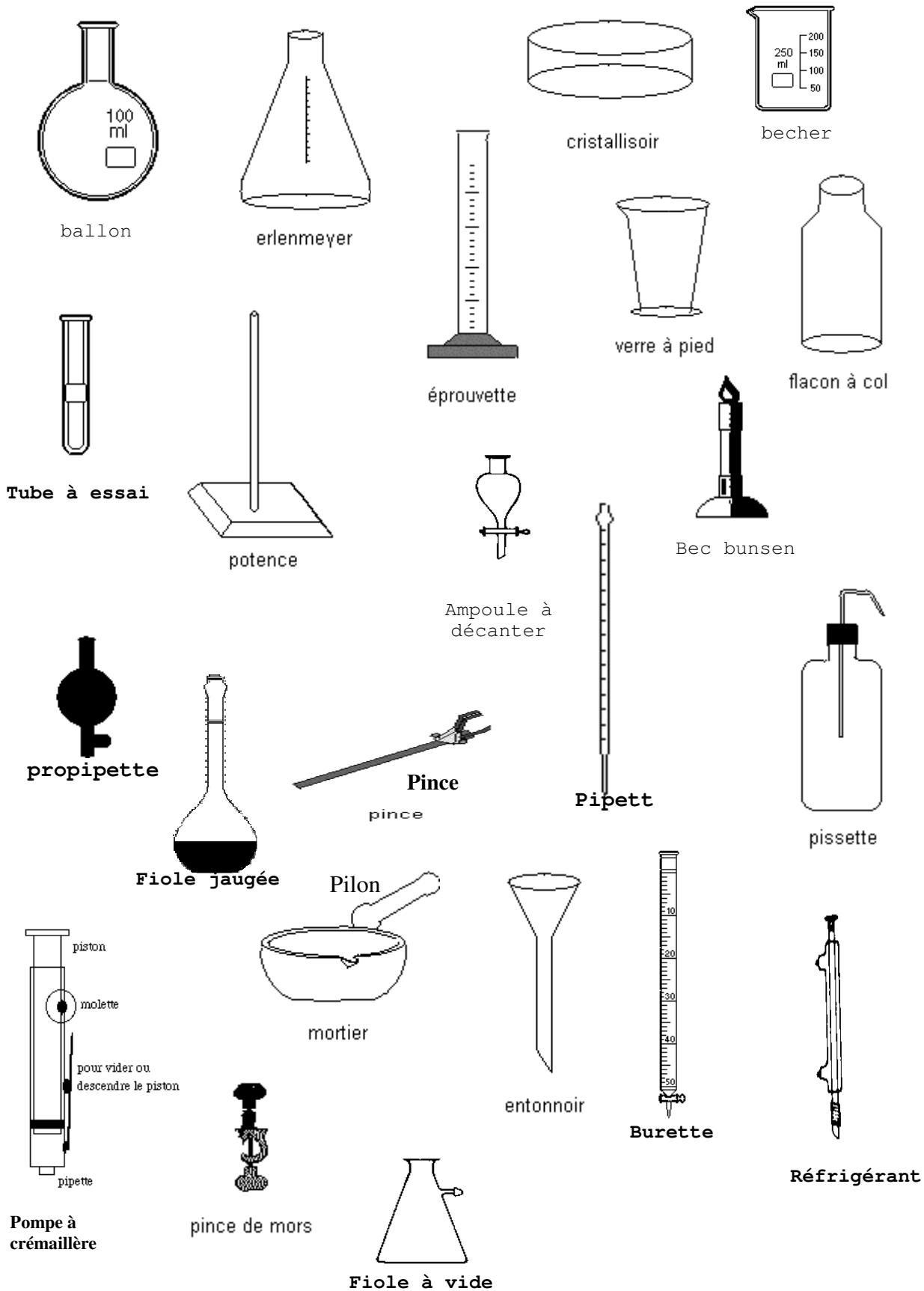
Il devra comporter en haut et à gauche de la première page les noms et prénoms, le numéro de la carte d'étudiant, l'année d'étude, le sous-groupe ainsi que la date et le titre de la séance.

Vous devrez également apporter un grand soin à la rédaction de votre compte-rendu, dont le plan est prédéfini par les questions que vous trouverez à la fin de chaque manipulation proposée.

L'évaluation du compte-rendu –matérialisée par la note/20- obéira aux critères suivants :

- 1. Répondre aux questions posées dans l'ordre proposé**
- 2. apporter des réponses précises, claires et concises (Ex. si on vous demande d'écrire le but et le principe d'une manipulation, vous rechercherez dans l'introduction ce qui répond exactement à cette question- tout autre détails superflus sera sanctionné !-**
- 3. Il sera tenu compte dans la note du soin que prendra l'étudiant pour manipuler et ranger sa paillasse ainsi que pour la présentation de son compte-rendu.**

Verrerie et matériel de laboratoire:

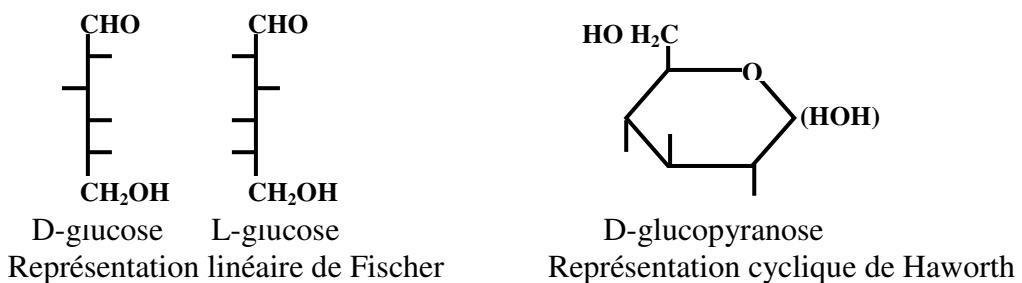


I. Glucides

Introduction :

Les sucres, encore appelés glucides ou hydrates de carbone $C_n(H_2O)_n$, sont des composés comportant de nombreux groupements hydroxyles (-OH) responsables de leur caractère très hydrophile. La présence de groupement carbonyle (-C = O), aldéhyde ou cétonique leur confère un caractère réducteur. Ils peuvent être divisés en deux groupes :

1. Oses ou monosaccharides : Ils ne peuvent être hydrolysés en sucres plus simples. Suivant le nombre de leurs atomes de carbone on trouve : trioses, tetroses, pentoses, hexoses. Tous les oses naturels sont de la série D. Ex. Hexoses : le D-glucose est l'énanthiomère de L-glucose

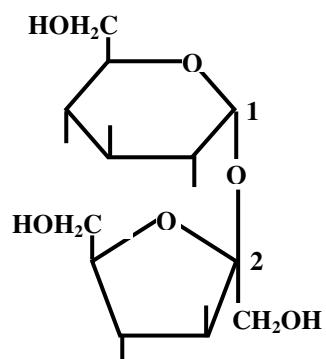


2. osides ou polysaccharides : Ils se forment par l'enchaînement de plusieurs oses. Selon le nombre d'oses on peut les diviser en :

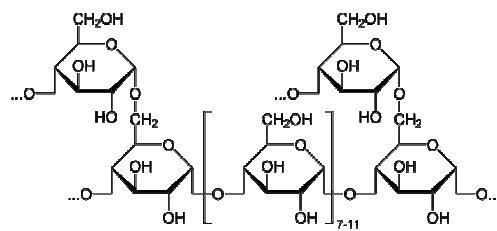
- **Holosides :** formés d'un nombre d'oses généralement inférieur à 10. Les plus importants sont les disaccharides exemple : maltose, saccharose, lactose.

Le raffinose est un trisaccharide

Le saccharose ou
 α -D-glucopyranosyl 1 → 2 β -D-fructofuranoside



- **Polyholosides :** constitués d'un nombre d'oses important pouvant atteindre les centaines. Exemple : Glycogène, amidon, cellulose.



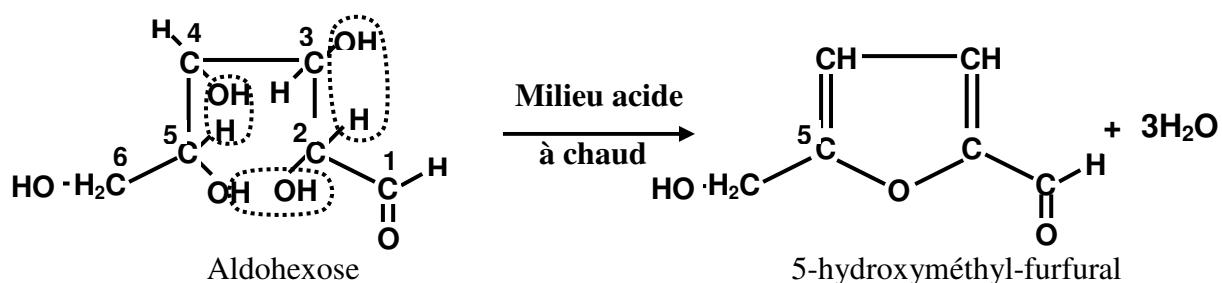
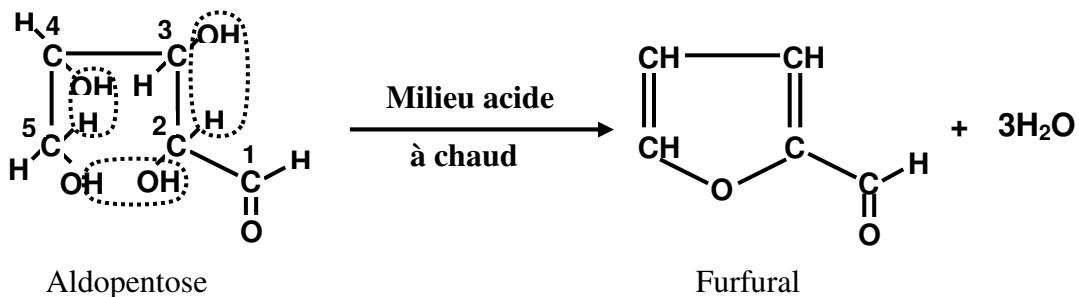
Structure du glycogène

TP N°1 : CARACTERISATION CHIMIQUE DES GLUCIDES

I. Réactions furfuraliques

1. Principe :

En milieu fortement acide et à chaud, les oses ayant au moins 5 atomes de carbones subissent une déshydratation et se transforment en furfural (si l'ose est un pentose) ou en un dérivé du furfural (si l'ose est un hexose).



Le furfural et ses dérivés peuvent se condenser avec des substances telles que les phénols, les amines aromatiques pour former des produits colorés caractéristiques.

2. Matériel

- tubes à essais
 - bain marie bouillant
 - pipettes
 - propiettes ou poires d'aspiration

3. Réactifs

- solutions de glucose, fructose, mannose, ribose, saccharose et lactose à 1% dans l'eau distillée.
 - HCl concentré
 - HCl 1N
 - H_2SO_4 concentré
 - Lugol (mélanger 1g d'iode avec 2g d'Iodure de potassium dans 100 ml d'eau distillée)
 - Réactif de Molisch (2 g α -naphthol + 100 ml Ethanol)
 - Réactif de sellivanoff (2 g résorcinol + 0,5 ml H_2SO_4 concentré + 100 ml H_2O)
 - Réactif de Bial (0,2 g d'orcinol + 100 ml HCl concentré + 5 gouttes FeCl_3 à 10%)

4. Modes opératoires :

4.1- Réaction de Molish :

C'est une réaction générale à tous les sucres (oses ou osides). En présence d'acide sulfurique, les sucres forment un dérivé furfural qui se condense avec l'alpha –naphtol pour donner un produit coloré en violet.

Mode opératoire (manipuler sous la hotte).

1. Préparer 4 tubes à essai : mettez dans le premier tube 2 ml d'une solution de glucose, dans le deuxième tube 2 ml de solution de fructose, dans le troisième tube 2 ml de solution de saccharose et dans le quatrième tube 2 ml d'eau distillée.
2. ajouter à chaque tube 2 à 3 gouttes de réactif de Molish
3. Agiter les tubes pour mélanger le contenu
4. Couler doucement le long de la paroi de chaque tube 2 ml de H_2SO_4 concentré
5. Observer et noter la coloration obtenue

4.2-Réaction de Selivanoff :

Cette réaction est caractéristique des cétooses qui, en présence d'acide chlorhydrique concentré et à chaud, se condensent avec le résorcinol pour former un composé rouge.

Mode opératoire. (Manipuler sous la hotte).

1. Préparer 4 tubes à essai : mettez dans le premier tube 2 ml d'une solution de fructose, dans le deuxième tube 2 ml de solution de mannose, dans le troisième tube 2 ml de solution de saccharose et dans le quatrième tube 2 ml d'eau distillée.
2. Ajouter à chaque tube 2 ml du réactif de Selivanoff
3. Ajouter à chaque tube 1 ml d'HCl concentré
4. Chauffer les tubes pendant 5 min au bain marie bouillant et laisser refroidir
5. Observer et noter les colorations obtenues.

4.3- Réaction de Bial

Cette réaction est spécifique des pentoses. En milieu HCl concentré et en présence d'ions Fe^{+3} , les pentoses se condensent avec l'orcinol pour former un composé de coloration verte.

Mode opératoire.

1. Préparer 3 tubes à essai : mettez dans chaque tube 1 ml de réactif de Bial (sous hotte).
2. Ajouter dans le premier tube 1 ml de solution de mannose, dans le deuxième tube 1 ml de solution de ribose et dans le troisième 1 ml d'eau distillée.
3. Porter les tubes à ébullition
4. Observer et noter les colorations obtenues

4.4- Réaction à l'iode :

Le lugol ou l'eau iodée (I_3^-) se fixe sur les chaînes polysaccharidiques pour donner des complexes colorés. La réaction du lugol avec le glycogène donne une coloration brune alors qu'on obtient une coloration bleue-noir avec l'amidon.

Mode opératoire.

1. Préparer 4 tubes à essai : mettez dans le premier tube 2 ml d'une solution inconnue A, dans le deuxième tube 2 ml de solution de mannose, dans le troisième tubes 2 ml de solution inconnue B et dans le quatrième 2 ml d'eau distillée.
2. Ajouter 1 ml d'HCl 1N à chaque tube

3. Ajouter 1 à 2 gouttes du lugol dilué
4. Observer et noter les colorations obtenues

Questions :

Justifier vos observations dans chacun des tests 1, 2 et 3 :

Coloration de l'anneau dans la réaction de Molisch (rouge violace)

Coloration obtenue dans la réaction Selivanoff.

Coloration observée dans la réaction de Bial

En précisant pour chaque test s'il s'agit d'un pentose ou hexose, d'un cétose ou aldose.

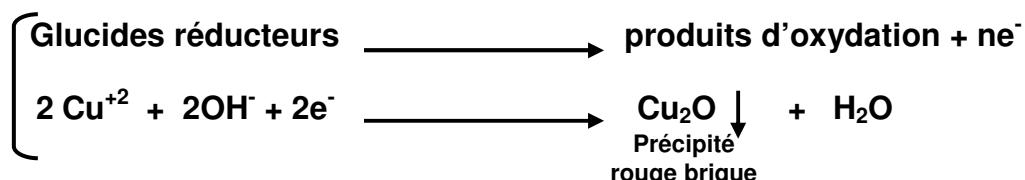
Dans le test 4, Identifiez la nature du polysaccharide dans les solutions A et B. Justifier.

TP N°2. Pouvoir réducteur des glucides (Réduction de la liqueur de FEHLING)

1. Principe :

En milieu alcalin et à chaud, les oses et dans certaines conditions les polyholosides peuvent s'oxyder et en même temps réduire des substances telles que les sels métalliques. On parle alors de pouvoir réducteur des sucres. Cette propriété, qui est due à la présence de fonction hémi-acétalique libre, peut être mise en évidence par exemple grâce au réactif de Fehling qui est une solution alcaline d'ions cuivreux de coloration bleue (les ions Cu^{+2} sont maintenus en solutions grâce au double tartrate de Na^+ et K^+).

Si la réaction est positive, on obtient un précipité rouge brique dont la quantité est proportionnelle à celle du sucre réducteur présent.



Si le sucre n'est pas réducteur, la coloration reste bleue.

2. Matériel :

- Tubes à essai, pipettes, propipettes, papier indicateur de pH, bain marie bouillant.

3. Réactifs :

- **Liqueur de Fehling** : La liqueur de Fehling est obtenu en mélangeant V:V deux solutions A et B dont la composition est la suivante :

Solution A : 35 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 5 ml H_2SO_4 concentré + H_2O compléter à 1L.

Solution B : 150 g tartrate de K et Na + 300 ml NaOH pure + H_2O compléter à 1L

- Solutions de Glucose, fructose, ribose, saccharose et maltose à 1%
- NaOH à 10%
- H_2SO_4 concentré

4. Mode opératoire

1. Préparer 6 tubes à essai : mettez dans chaque tube 1 ml de la solution A puis 1 ml de la solution B. (A+B forment la liqueur de Fehling).

2. Ajoutez au premier tube 2 ml d'une solution de glucose, au deuxième 2 ml de solution de ribose, au troisième 2 ml de solution de fructose, au quatrième 2 ml de

solution de saccharose, au cinquième 2 ml de solution de maltose et au sixième 2 ml d'eau distillée.

3. Agiter pour bien mélanger le contenu des tubes
4. Porter les tubes à ébullition pendant 3 min
5. Observer et noter le résultat obtenu.

– Pouvoir réducteur du produit d'hydrolyse chimique du saccharose :

▪ Mode opératoire

Mettre 5 ml de saccharose dans un tube à essai.

Ajouter 3 gouttes de H_2SO_4 concentré (sous la hotte). Agiter et porter à ébullition pendant 2 min. Le saccharose est ainsi hydrolysé.

Ajouter 5 gouttes d'une solution de soude à 10% jusqu'à réaction nettement alcaline (utiliser papier indicateur de pH).

Réaliser alors le test suivant : prendre deux tubes et les marquer 1 et 2.

Dans le tube 1 mettre 2 ml de la solution de saccharose hydrolysé.

Dans le tube 2 mettre 2 ml de la solution de saccharose non hydrolysé.

Dans les deux tubes 1 et 2 ajouter :

1 ml de la solution A

1 ml de la solution B

Agiter et porter les deux tubes au bain marie bouillant pendant 3 min.

Observer la coloration obtenue dans chaque tube.

Questions :

Comparer et justifier la différence des résultats obtenus avec les tubes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 dans la partie.

Comparer et justifier les résultats obtenus avant et après l'hydrolyse chimique du saccharose.

Citez un autre protocole d'hydrolyse du saccharose.

TP N°3. POUVOIR ROTATOIRE DES SUCRES : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE OPTIQUE D'UNE MOLECULE CHIRALE

1. Introduction :

Toute molécule qui possède un carbone asymétrique (carbone lié à quatre substituant différents) est dite **chirale**. Elle existe alors sous deux configurations symétriques (par rapport à un miroir) non superposables dites énantiomères qui représentent deux structures isomères réelles dans la nature. Toute molécule chirale est optiquement active. On dit encore qu'elle possède un **pouvoir rotatoire** : traversé par un faisceau de lumière polarisée plane, cette molécule provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière d'un angle α donné. Le pouvoir rotatoire qui est une valeur spécifique est calculé comme suit :

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{C \times l}$$

$[\alpha]$ = pouvoir rotatoire spécifique en degrés

α = angle de rotation de la lumière polarisée en degrés

l = longueur du trajet optique (dm)

C = concentration de la solution chorale (g/ml)

La mesure de l'angle de rotation se fait à 20°C en utilisant la raie de Na comme source lumineuse.

L'appareil utilisé pour mesurer le pouvoir rotatoire est appelé **polarimètre**. Il peut être manuel ou digital mais le principe est le même :

* Une source de lumière qui est ici une lampe de sodium (lumière monochromatique de longueur d'onde = 589.5 nm : raie D)

* Un prisme polariseur

* Un tube polarimétrique qui contient la substance à analyser

* Un second prisme analyseur que l'on tourne en tournant un cercle gradué en degré

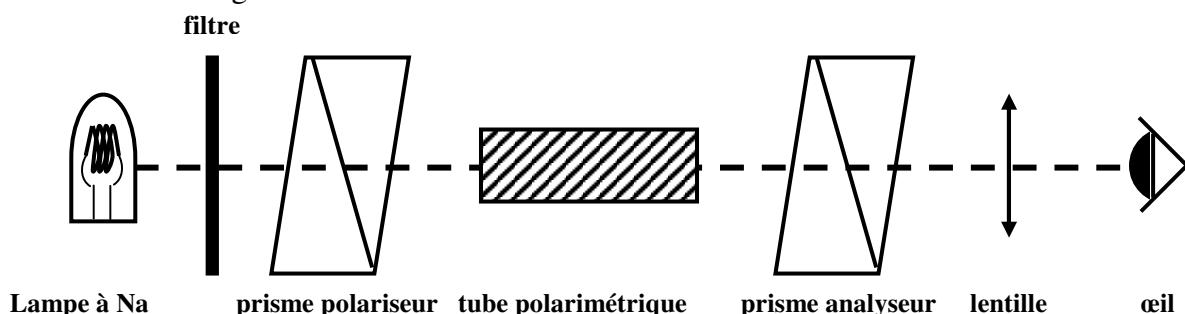


Schéma d'un polarimètre

2. Matériel et réactifs

- Polarimètre
- Tube de polarimètre
- Solution de glucose à 10%

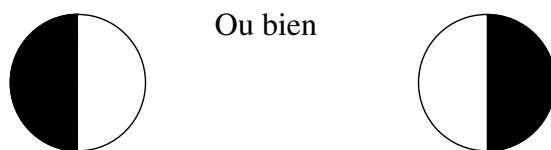
3. Mode opératoire :

Réglage du zéro

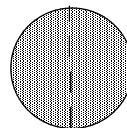
Allumer la lampe de Na 10 min environ avant utilisation

Remplir le tube polarimétrie avec l'eau distille (solvant à utiliser) et s'assurer de l'absence de bulles d air.

Régler le zéro du polarimètre : Regardant dans l'objectif; on observe un cercle avec deux zones de différente intensité lumineuse : une zone claire et une zone sombre.



Le réglage se fait en tournant le cercle gradué, tout en observant le cercle lumineux, jusqu'à ce que les deux zones soient de même intensité : zone de pénombre égale.



Noter l'angle sur le cercle gradué.

Vider alors le tube polarimétrique et préparer **rapidement** une solution de α -D-glucose a 10%.

Remplir le tube polarimétrique avec cette solution.

L'introduction de la solution optiquement active va perturber l'uniformité de la zone de pénombre : tourner alors le cercle gradué jusqu'à rétablissement de l'uniformité des zones.

Lire l'angle sur le cercle gradué. Il correspond à l'angle de déviation de la lumière polarisée par la solution de glucose.

Attendre 10 min et mesurer encore l'angle de déviation comme décrit ci-dessus. (Après rétablissement de l'uniformité des zones).

Continuer à lire et noter (dans le tableau) la valeur de l'angle de déviation de la lumière polarisée jusqu'à stabilisation de cette valeur : **équilibre**.

En déduire le pouvoir rotatoire à l'équilibre de la solution de glucose.

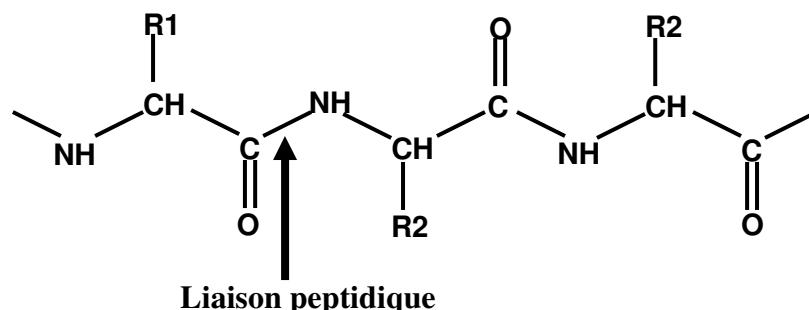
Expliquer le changement de l'angle de déviation au cours du temps puis la stabilisation de cette valeur. Comment appelle-t-on ce phénomène ? Présenter selon Haworth les structures anomériques du Glucose présentes à l'équilibre.

Temps (min)	10	20	30	40
<u>Angle de déviation ($^{\circ}$)</u>				

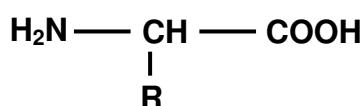
II. Acides aminés & Protéines

Rappel théorique :

Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés liés les uns aux autres par des liaisons amides substituées appelées liaisons peptidiques.



Les acides aminés constitutifs (20 a.a fréquemment rencontrés) de formule générale



Possèdent tous (à l'exception de la proline) au moins deux fonctions caractéristiques : carboxylique α -COOH et aminée α -NH₂.

Certains acides aminés possèdent en plus dans le radical R d'autres groupements ionisables (Asp, Arg, Glu, Lys, Tyr ...).

Généralement une séquence peptidique possède deux extrémités libres α -NH₂ et α -COOH. Par convention, cette séquence s'écrit en plaçant à gauche l'extrémité α -NH₂ et à droite l'extrémité terminale α -COOH.

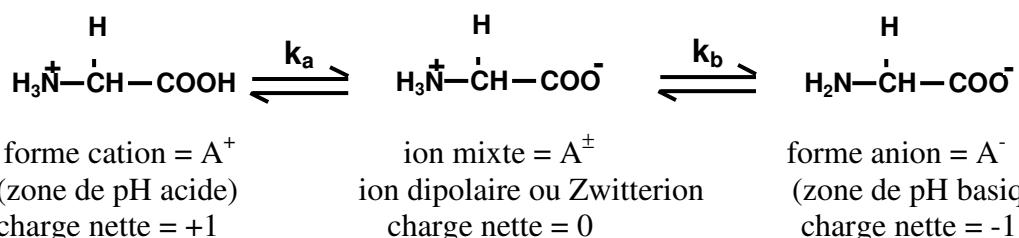
TP N°4 : DETERMINATION DU pH_i DE LA GLYCINE

Les acides aminés en solution sont toujours sous formes chargées. Cette charge dépend du pH, de la force ionique et des constantes de dissociation de leurs fonctions.

En milieu acide ces composés amphotères gagnent des protons. La fonction α -CCOH qui a la constante de dissociation la plus forte donc le pK le plus bas, va s'ioniser la première. L'AA portera à la fois la charge positive et négative. Au moment où les charges + et - s'équilibrivent, le pH du milieu correspond au point isoélectrique (pHi).

En milieu basique, l'AA perd un proton et sera chargé négativement.

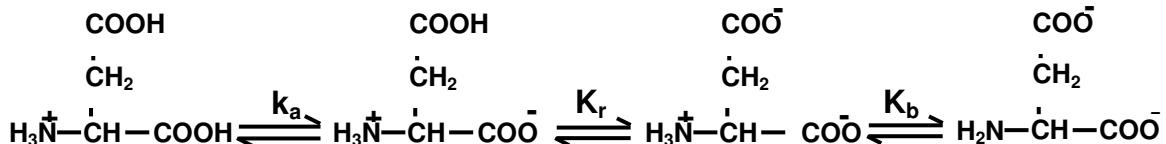
1- Cas d'un acide aminé neutre : ex. la glycine (Gly)



On définit par pH isoélectrique, pHi, le pH pour lequel la charge nette de la molécule est nulle c'est-à-dire le pH auquel va prévaloir la forme ion dipolaire ou zwitterion A \pm . On calcule ce pH à partir des constantes de dissociation k_a et k_b des fonctions ionisables. D'où :

$$pHi = \frac{pK_a + pK_b}{2}$$

2. Cas d'un acide aminé acide : ex. l'acide aspartique (Asp)



Forme cation = A⁺

Charge nette= +1

ion mixte = A[±]

charge nette= 0

forme anion 1= A⁻

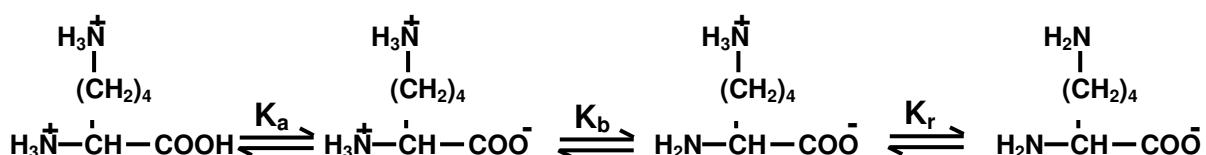
charge nette= -1

forme anion 2= A⁻⁻

charge nette= -2

$$pHi = \frac{pK_a + pK_r}{2}$$

3. Cas d'un acide aminé basique : ex. la lysine



Forme cation 1 = A⁺⁺

Charge nette= +2

forme cation 2= A⁺

charge nette= +1

ion mixte= A[±]

charge nette= 0

forme anion = A⁻

charge nette= -1

$$pHi = \frac{pK_b + pK_r}{2}$$

1. But:

Détermination des pk et du pHi de l'acide aminé, glycine ou glycocolle (Gly)

2. Principe :

Il s'agit de suivre l'évolution du pH sur un volume déterminé d'une solution d'AA de pH égale à 2, en fonction de la quantité de NaOH ajoutée.

3. Matériel et réactif :

- pH mètre
- Agitateur, barreau aimanté
- Burette
- Bechers
- Solution NaOH 0,2N
- Solution de glycine 20mM (0,02M)
- Solution d'HCL 2N

4. Mode opératoire :

- Pour la mise en route demandé au technicien

*** Attention :**

Les électrodes sont très fragiles et coûteuses

- Prière : - de ne pas laisser le barreau aimanté les heurter pendant l'agitation

- de ne pas les laisser à sec
- de bien les rincer avant et après la titration avec de l'eau distillée

- Mesurer 50 ml de la solution d'AA à l'aide d'une éprouvette
- Verser la solution d'AA dans un bêcher de 100 ml
- Après étalonnage du pH mètre, rincer l'électrode du pH mètre à l'eau distillée, et la placer dans le bêcher contenant la solution d'AA
- Mesurer le pH de départ de la solution et le ramener à pH 2 avec quelques gouttes d'HCl 2N
- Mettre dans la burette la solution de NaOH 0,2N
- Titrer la solution d'acide aminé en ajoutant la solution de soude par additions successives de 0,5 ml tout en agitant.
- Pour chaque volume de soude ajouté, noter ce volume et noter la valeur du pH correspondante et ce jusqu'à pH 10,5.

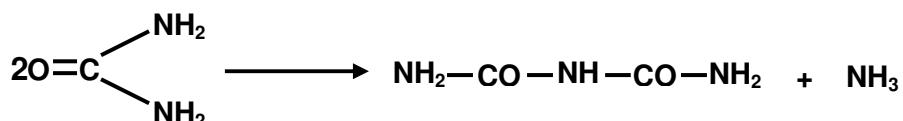
5. Exploitation des résultats

- qu'appelle-t-on le pH isoélectrique de l'acide aminé en solution ?
- tracer la courbe de titration $pH = f(V_{NaOH})$
- déterminer à partir de cette courbe les différentes valeurs de pK et le pHi de cet acide aminé.

TP N° 5. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DU BIURET

1. Principe :

La Biuret résulte de la condensation de 2 molécules d'urée avec départ d'ammoniac.



La Biuret réagit en milieu alcalin avec le CuSO_4 en donnant une coloration violette dont le maximum d'absorption est à 540 nm.

Par suite de leur analogie de structure avec la Biuret, Les peptides et les protéines donnent la même réaction. La zone d'utilisation est de 1 à 20 mg/mL

2. Matériel et réactifs :

- Spectrophotomètre à 540 nm
- Eau physiologique : solution contenant 9g de NaCl dans 1L d'eau distillée
- Solution standard d'ovalbumine à 10 mg/mL dans de l'eau physiologique
- Solution inconnue d'ovalbumine (nous utiliserons un blanc d'œuf)
- Réactif de biuret : - CuSO₄. 5H₂O : 1,5g
 - NaOH : 300 mL à 10%
 - KI : 1g
 - Tartrate double de Na et K : 6g
 - H₂O Q.s.p 1L (Q.s.p = Quantité suffisante pour)
- tubes à essai de 15 ml
- Pipettes (1ml, 2ml, 5ml)
- Portoirs pour 10 tubes à essai

3. Mode opératoire

3.1. Préparation de la solution inconnue d'ovalbumine

- Peser un blanc d'œuf. Noter sa masse
- Mettre le blanc d'œuf en solution dans 1L d'eau physiologique

3.2. Préparation d'une gamme étalon d'ovalbumine

- A partir de la solution étalon d'ovalbumine à 10 mg/mL, réaliser une gamme de 6 tubes (tubes 1-6) contenant de 2 à 10 mg d'ovalbumine par tube.
- Préparer en même temps les tubes expérimentaux qui contiendront une prise d'essai de solution inconnue d'ovalbumine (tubes 7-8).

tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution standard d'ovalbumine à 10mg/mL (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1		
Solution inconnue d'ovalbumine (ml)							0,4	0,8
Eau physiologique (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,6	0,2
Réactif du Biuret (ml)	4 ml dans chaque tube à essai							
Attendre 10 min à l'obscurité à température ambiante								
Lire les D.O à 540nm								

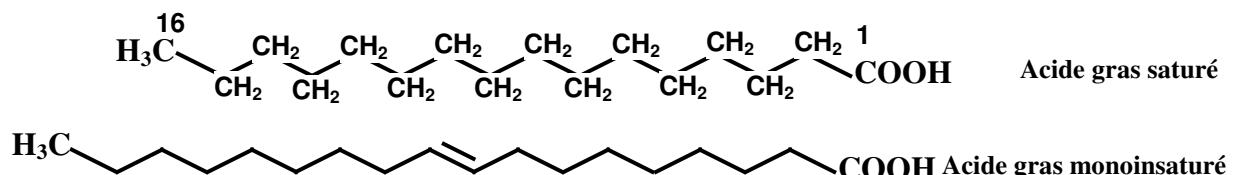
4. Résultats expérimentaux:

- 4.1. Etablir un tableau complet de colorimétrie: N° de tube, composition des tubes, Absorbance, quantités et concentration en ovalbumine par tube.
- 4.2. Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage : A = f(quantité de protéines/tube)
- 4.3. En déduire la concentration en protéines (en g/L) dans la solution de blanc d'œuf puis en déduire la teneur en protéines pour 100 g de blanc d'œuf.

III. Lipides

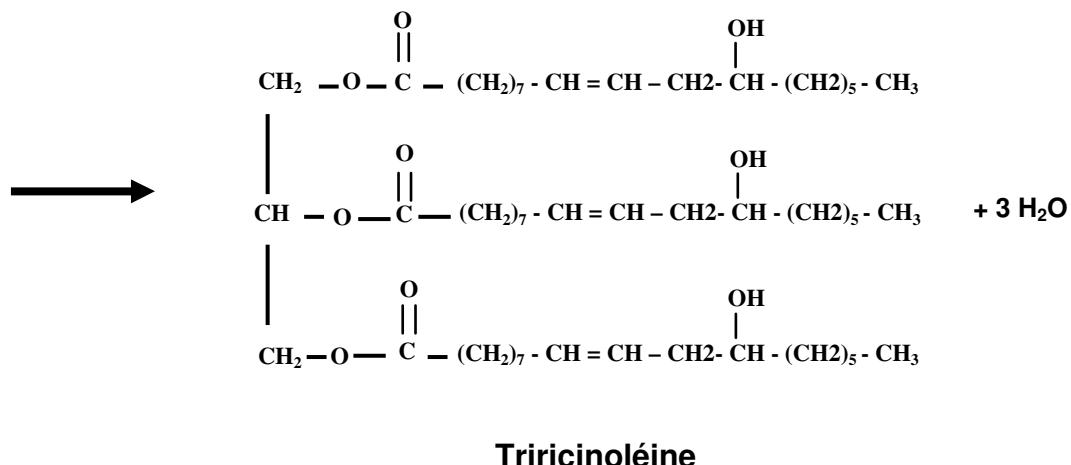
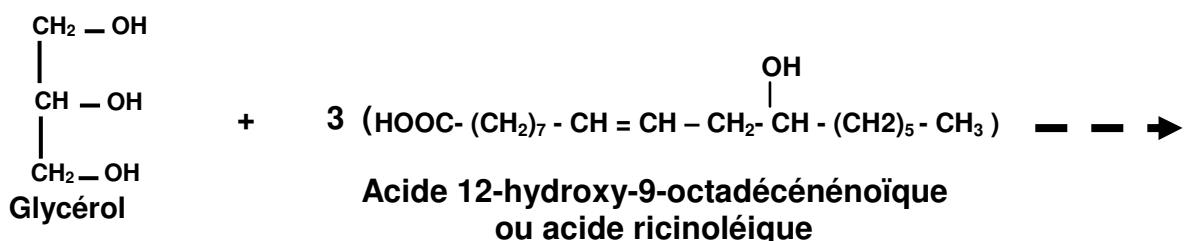
Introduction

Les lipides sont en général des esters d'alcool et d'acides gras. La nature de l'alcool est variable et les acides gras sont saturés ou insaturés, parfois substitués par de l'acide phosphorique et une base azotée (phospholipides). Les graisses sont généralement riches en acides gras saturés et les huiles en acides gras insaturés. Ce sont les longues chaînes paraffiniques des acides gras qui confèrent aux lipides leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.



Les lipides neutres les plus abondants sont les acylglycérols (anciennement appelés glycérides), ce sont des substances de réserve essentiellement constituées de triacylglycérols. Les triacylglycérols résultent de l'estérification d'un triolalcool, le glycérol, par 3 acides gras qui sont différents dans la plupart des cas (triacylglycérols hétérogènes).

Il y a des exceptions de triacylglycérols homogènes tel que la triricinoléine (**esters de glycérol et d'acide ricinoléique**) composant l'huile de ricin.



Triricinoléine

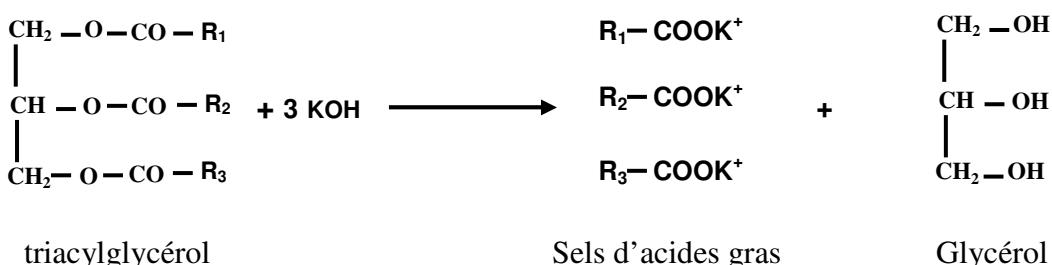
TP N°6. IDICE DE SAPONIFICATION D'UN CORPS GRAS

1. But

A partir de l'indice de saponification, on détermine le poids moléculaire de la triricinoléine, triacylglycérol majeur de l'huile de ricin.

2. Principe de la réaction de saponification

En milieu chaud et fortement basique les triacylglycérols libèrent le glycérol et les sels alcalins d'acides gras (acides stéarique, oléique, palmitique) appelés **savons**.



La réaction de saponification se déroule en présence d'un excès de KOH, non entrée en réaction et dosé par une solution acide (**dosage en retour**).

La potasse consommée par l'huile est calculée par référence à un témoin et permet de déterminer le poids moléculaire du triacylglycérol.

3. Matériel et réactifs

- 2 ballons à saponification de 250 ml
 - Réfrigérant ascendant
 - Huile de ricin
 - Potasse alcoolique 0,2M dans l'éthanol
 - Acide sulfurique 0,25N, phénol phtaléine

4. Mode opératoire

- Choisir 2 ballons à saponification, qui s'adaptent au bouchon du réfrigérant.

Ballon à saponification 1

- Peser le ballon à saponification
 - Introduire à l'aide de la pipette de 1 ml, 0,5 ml d'huile de ricin et repeser, déterminer m : la masse d'huile.
 - Ajouter 10 ml de KOH alcoolique à la pipette, agiter
 - Brancher le ballon à saponification au réfrigérant (celui-ci permet de condenser les vapeurs émises lors du chauffage de la solution).
 - Brancher la circulation d'eau froide
 - Chauffer modérément pour amener la solution alcoolique à ébullition douce, poursuivre la saponification 30 minutes. Agiter fréquemment.
 - Retirer le ballon et le refroidir sous un courant d'eau de robinet
 - Ajouter 5 gouttes de phénol phtaléine et doser la potasse en excès par H_2SO_4

$0,25N = V_1$

Ballon à saponification 2 (témoin)

- Verser la même quantité de KOH alcoolique
- Chauffer une demi heure sous réfrigérant
- Ajouter 5 gouttes de phénol phtaléine
- Doser la potasse par l' H_2SO_4 0,25N = V_2

4. Résultats

- Déterminer le PM de la triricinoléine.

IV. Acides nucléiques

Introduction :

Les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides. Ils jouent un rôle important dans le support et le transfert de l'information génétique. Ce sont des macromolécules pouvant atteindre une taille très élevée ex : l'ADN de la bactérie *Escherichia coli* à un PM = 2×10^9 Daltons et dépasse le millimètre pour une cellule qui n'a que 1 à 2 μ de diamètre.

Composition chimique des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont constitués de D-pentose, de bases et de phosphore.

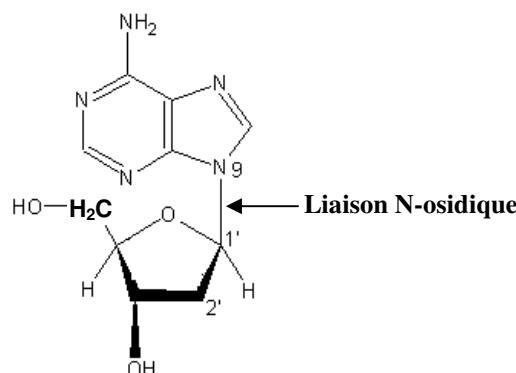
- **Le D-pentose** peut être le D-ribose ou le D-désoxyribose. Ce qui a permis de distinguer deux grandes classes d'acides nucléiques :

1. Les acides ribonucléiques (ARN)
2. Les acides désoxyribonucléiques (ADN)

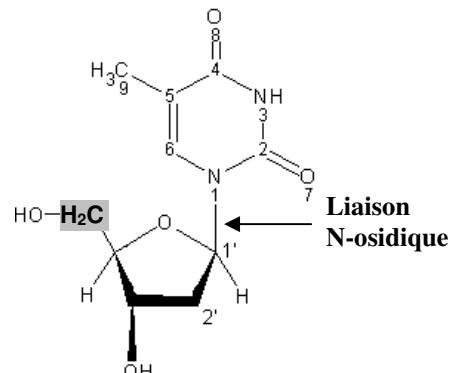
- **Les bases** : sont au nombre de quatre pour chaque classe d'acide nucléique.

- 2 bases puriques (adénine et guanine) communes à l'ADN et à l'ARN
- 2 bases pyrimidiques (cytosine, thymine pour l'ADN ; cytosine et uracile pour les ARN)

L'association d'un pentose avec une base constitue un **nucléoside**. La liaison covalente qui s'établit entre le **C_{1'}** du pentose et l'azote **N₁** des pyrimidines ou **N₉** des purines est de type **N-osidique**



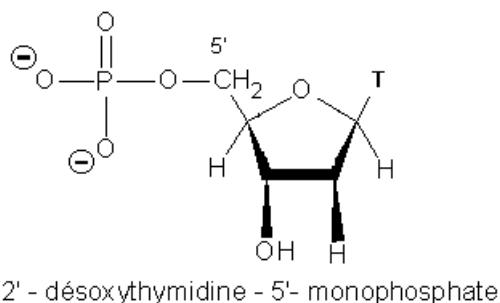
Un nucléoside : 2'- désoxyadénosine



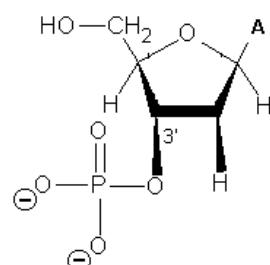
Un nucléoside : 2'- désoxythymidine

L'estérification d'un nucléoside par l'acide phosphorique conduit à un **nucléotide**.

La première molécule d'acide phosphorique estérifie le nucléoside essentiellement sur le **C_{3'}** ou le **C_{5'}**. On parle alors de nucléoside 3' ou 5' monophosphate. Exemple :

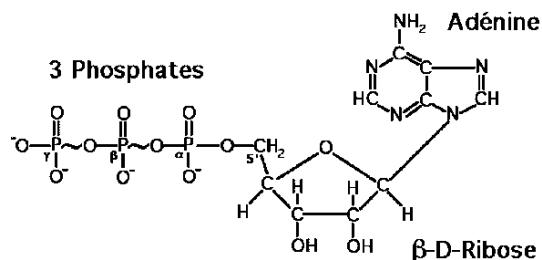


2' - désoxythymidine - 5' - monophosphate

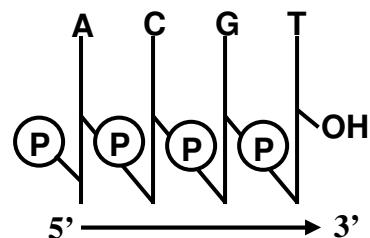
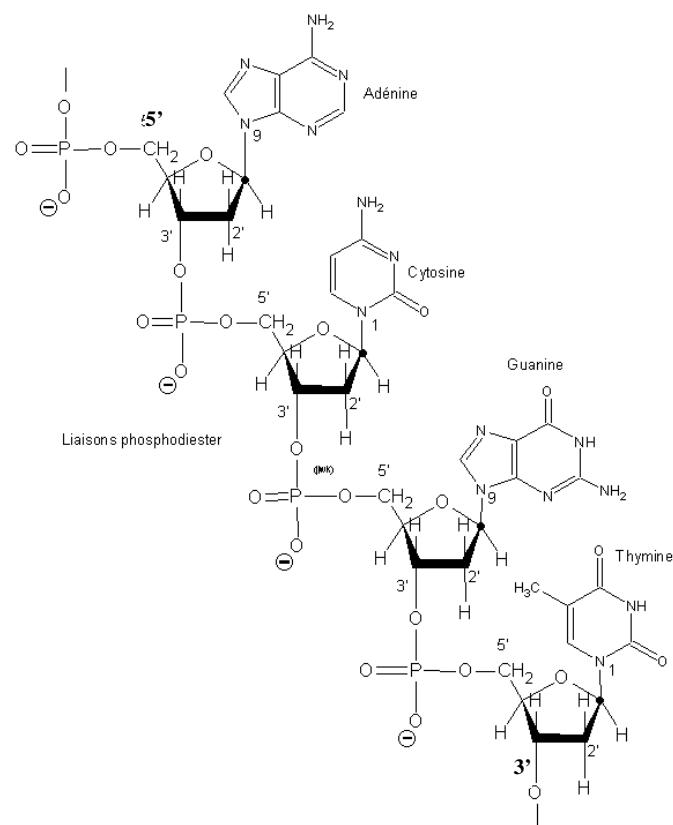


2' - désoxyadénosine - 3' - monophosphate

La fixation d'une deuxième puis d'une troisième molécule d'acide phosphorique se fait par une liaison pyrophosphate riche en énergie. Ce qui aboutit à des nucléosides di et tri phosphates. Exemple l'adénosine-5'-triphosphate.



Dans les cellules, les acides nucléiques résultant de l'association covalente de nucléosides-5'-monophosphate : un pont phosphodiester s'établit entre le **OH** libre en position **C_{3'}**, du 1^{er} nucléotide et l'acide phosphorique fixé en **C_{5'}**, du second nucléotide. Cette opération se répétant successivement aboutit à la formation d'une longue chaîne nucléotidique ayant une extrémité 5-phosphorylée ou libre et une extrémité 3'-OH libre.



Dans les manipulations qui suivent nous nous proposons

1/ d'extraire l'ADN à partir d'un tissu biologique. Voici, à titre indicatif, un tableau donnant les teneurs de quelques organes et microorganismes en acides nucléiques (en g pour 100 g de matière sèche)

	ADN	ARN
Pancréas	1,9	8
Thymus	12,3	2,2
Foie	1,3	2,7
Reins	2	2
Rate	7	2,6
Cerveau	0,8	0,8
Muscle	0,3	0,2
E. coli	4,2	9,7
Staphylococcus	2,8	8,8
Levure (boulangerie)	0,3	4

2/ d'étudier une des propriétés physicochimiques : l'absorption dans l'ultra-violet.

TP N°7. EXTRACTION DE L'ADN

1. But

Extraire l'ADN à partir de tissus animaux ou végétaux (testicules d'agneau, thymus de veau, oignon), pour en étudier les constituants.

2. Matériel et réactifs

2.1. Matériel

- testicule d'agneau ou oignon - couteau - mixer « Waring blender » - glace pilée
- grand entonnoir - gaze à pansement - éprouvettes de 250 et 100 ml
- un erlen de 100 ml + bouchon - centrifugeuse + tubes à centrifuger - une pipette pasteur stérile

2.2. Réactifs :

- **Tampon d'extraction pH 7,5** : Tris-HCl 0,02M ; NaCl 1% ; Citrate de Na 0,02M ; EDTA dissodique 2mM.
- SDS (Sodium dodécyl sulfate) à 10%
- NaCl 6M
- Ethanol absolu (95°) placé au congélateur
- Solution de rinçage : Ethanol à 70%
- Tampon SSCx1 : tampon sodium citrate salin : 150mM NaCl et 15mM citrate de sodium : dissoudre 8,75 g de NaCl et 4,4 g de citrate de sodium dans 900 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7 avec du HCl 1M et compléter à 1 litre.

3. Mode opératoire

a) Homogénéisation

- Pour 4 binômes, peser (10 g de testicules de veau ou 1 oignon) et 40 g de glace pilée, mettre le tout dans le mixer en y ajoutant 65 ml de tampon d'extraction. Broyer pendant 1 à 2 min à vitesse réduite.
- Filtrer la suspension au travers d'une double couche de gaze à l'aide de l'éprouvette de 250 ml et du grand entonnoir.
- Partager le filtrat en quatre volumes égaux dans 4 éprouvettes de 100 ml (1 par binôme).

- Noter le volume du filtrat obtenu par binôme = V_1 . Transvaser le contenu dans un erlen de 100 ml

b) déprotéinisation

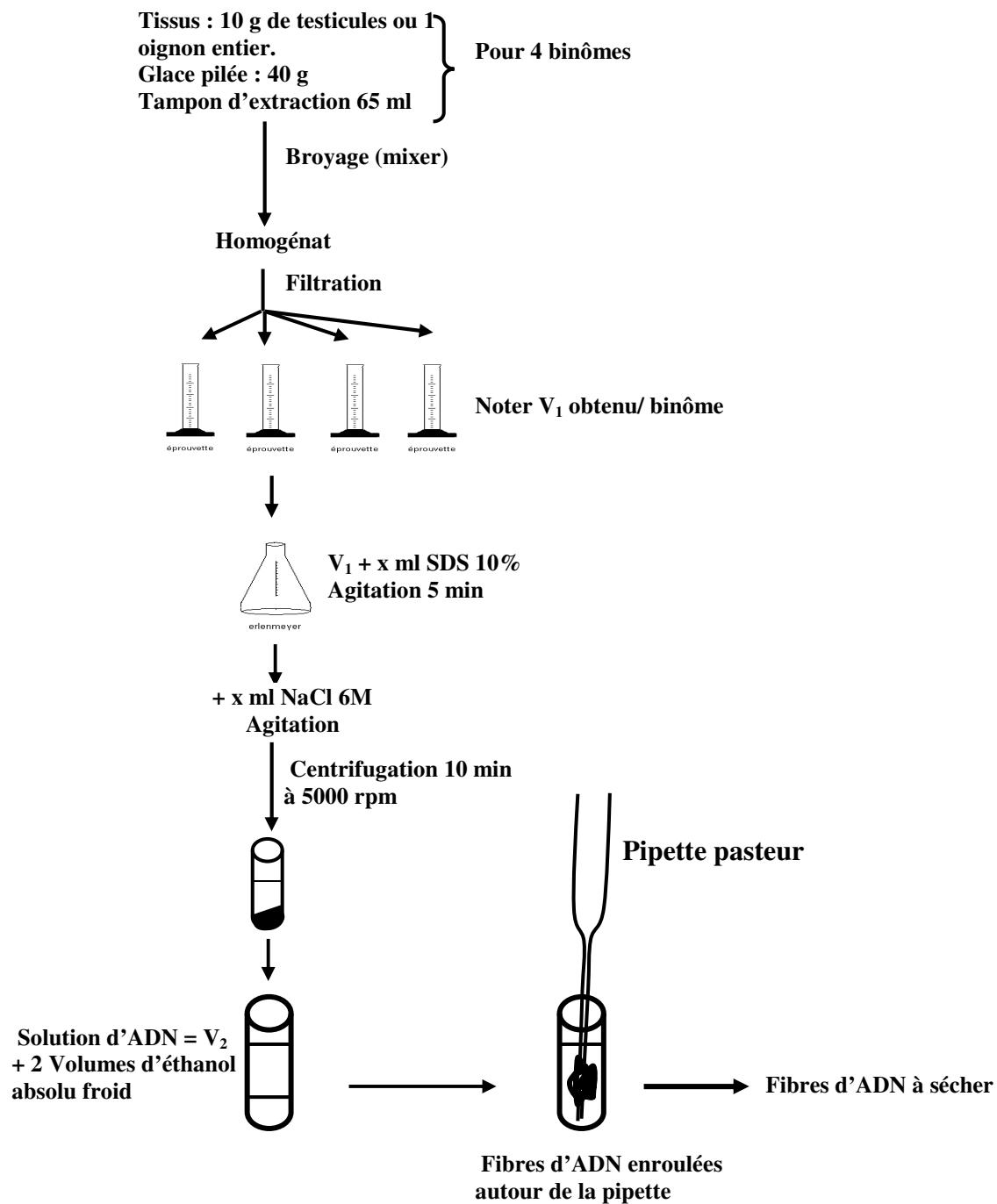
- Au volume V_1 ajouter un volume de SDS à 10% de manière à obtenir une concentration finale en SDS égale à 1% (faire le calcul au préalable).
- Boucher l'rlen, agiter vigoureusement pendant 5 min.
- Ajouter dans l'rlen un volume de NaCl à 5M de manière à obtenir une concentration finale en NaCl égale à 1,3M. Agiter fortement (Vortex).
- Centrifuger le contenu de l'rlen pendant 10 min à 3000 rotation par minute (rpm)
- Récupérer le surnageant contenant l'ADN et noter son volume V_2 . Jeter le culot.

c) précipitation de l'ADN

- Au même volume V_2 du surnageant ajouter doucement le long de la paroi du tube, 2 volumes d'éthanol absolu très froid (conservé au congélateur).
- Observer les fibres d'ADN qui forment un précipité dans l'alcool (méduse d'ADN).

d) récupération des fibres d'ADN

- Introduire dans le tube une pipette Pasteur et la faire tourner entre les doigts, les fibres d'ADN s'enroulent sur cette pipette. Continuer cette opération jusqu'à ce que la solution devienne limpide.
- Tremper ensuite la pipette pasteur avec les fibres encore enroulées pendant 5 min dans la solution de rinçage (alcool à 70%).
- Sortir doucement les fibres de la pipette et les plonger dans un tube plastique Falcon à bouchon vissant de 50 ml contenant 8 ml de solution SSCx1. Attendre quelques minutes la réhydratation de l'ADN puis dérouler en agitant modérément jusqu'à dissolution complète.
- remettre les tubes à l'assistant



Résumé des différentes étapes d'extraction de l'ADN

TP N°8. Propriétés physicochimiques des acides nucléiques

Spectre d'Absorption dans l'UV et estimation de la pureté de l'extrait d'ADN

Les acides nucléiques (ADN et ARN) possèdent la capacité d'absorber à une longueur d'onde (λ) de 260 nm, c'est à dire dans l'U.V. Cette propriété peut être utilisée pour doser la quantité d'acides nucléiques en solution et pour en estimer la pureté (contamination avec des protéines). La loi de Beer-Lambert donne une relation linéaire entre l'absorbance (A) d'une substance en solution et sa concentration dans la solution. Cependant, les spectrophotomètres que nous utilisons ont des "limites de fabrication" : ils ne peuvent suivre cette loi que pour des A comprises entre 0 et 1. Au-delà de cette valeur, la droite n'est plus linéaire et les valeurs d'A obtenues sont sous-estimées. Il est donc indispensable de diluer les échantillons pour être toujours dans la bonne zone de lecture.

1. Matériel et réactifs

Spectrophotomètre UV + cuve en quartz de 1 cm

Extrait d'ADN en solution

Tubes à essai

Tampon SSCx1

2. Mode opératoire

- **Spectre d'absorption**

Pour l'ADN obtenu en fin de préparation (TP 8), prélever 0,5 ml faire une dilution au 1/10 et tracer le spectre d'absorption $DO = f(\lambda)$ entre 220 et 320 nm.

λ	220	230	240	245	250	255	260	265	270	280	290	300	320
DO													

En déduire λ_{max} .

- **Estimation de la pureté de l'extrait d'ADN**

Utiliser les valeurs des DO pour les longueurs d'ondes 260 et 280. Calculer le rapport DO_{260}/DO_{280} .

En général pour des solutions d'ADN pure, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

Si ce rapport est inférieur à 1,8, l'extrait d'ADN est contaminé avec des protéines.

Si en revanche le rapport est supérieur à 2, l'extrait d'ADN est contaminé avec de l'ARN.

Donnez vos conclusions sur le degré de pureté de votre extrait d'ADN