TP Biochimie BAB2 Q1

06/11/2020

## **Atelier 4:** Les Lipides

### Introduction

#### Qu’est-ce qu’un lipide?

Les lipides sont des molécules amphiphiles à caractère hydrophobe prononcé. A température ambiante, les lipides peuvent être à l’état solide(cires) ou liquide (huiles). Ceux-ci contituent la matière grasses des êtres vivants et ils sont l’un des constituants majeurs des membranes organiques. On peut les classer en trois groupes : \* Les Phospholipides : sont des lipides de structure et il y en existe 2 groupes: les glycérophospholipides et les sphingolopides. \* Les Glycolipides: leur rôle est de stabiliser la membrane cellulaire et il y en existe 2 groupe: les sphigolipides et les glactolipides. \* Les Stéroïdes: n’ont rien avoir avec la struture des acides gras comme les deux autres. Leur molécule est constitué de cycle et jouent un rôle d’hormones. C’est pourquoi, ils n’interviennent pas au niveau de la structure des mebranes. Les stéroïdes et le phosphatidylinositol (glycérophospholipides) sont les seuls lipides à porter un rôle informationnel.

### But

Préparer des solutions qui nous permettront de séparer les trois principales classes de lipides : les triacylglycérols, les phospholipides et le cholestérol, à partir de cervelle et de lard (mammifères) sur base de leur affinité en fonctions des solvants utilisés.

### Matériel

#### Préparation des solutions

* [1] 500 mL de solvant chloroforme (166,67 mL) et méthanol (333,333 mL).
  + 15 g de lard + 40 mL de solvant chloroforme-méthanol.
  + 15 g de cervelle + 40 mL de solvant chloroforme-méthanol.
* [2] Solution KOH saturée
  + 10g de KOH
  + 9mL de H20d
* [3] Solution KOH dans l’alcool
  + 1,2 mL solution [2] KOH saturée
  + 10,8 mL alcool dénaturé (éthanol 100%)
* [4] 10mL Chlorure de cadmium (solution saturée dans l’alcool éthylique)
* [5] Chlorure de calcium 2M
  + 10g CaCl2
  + 33 mL
* [6] 66 mL Ether diéthylique
* [7] 100 mL Acétone



Figure 1: de gauche à droite: solution solvant chloroforme/méthanol, solution de KOH saturée, solution de KOH dans l’alcool, solution de chlorure de cadmium et solution de chlorure de calcium 2M

### Méthodes

#### Séparation des lipides

Cela s’est déroulé en deux étapes. Tout d’abord, il a fallu extraire le lard et la cervelle : 15g de chaque tissus pour 40 ml de solvant. Chaque extrait a été broyé mécaniquement avec un mélange de méthanol/chloroforme (1 pour 2). Les résidus restants ont été éliminés par filtration à travers étamine pour qu’il n’y ait plus résidus insolubes. Une fois la première étape terminée, on a mis sous hotte,les deux extraits. Le solvant fut éliminé par évaporation sur une plaque électrique.



Figure 2: Elimination du solvant sur plaque éléctrique

##### Précipitation de phospholipides

Après refroidissement, les résidus de l’évaporation furent dissous dans 2 mL d’éther [6]. Pour la cervelle cependant, nous avons dû OCTUPLER les quantités de solvant (16 mL d’éther, 40 gouttes de CdCl2 et 48 mL d’acétone) car apparemment, l’échantillon était saturé en graisses. Les produits de dissolution du lard furent ensuite versés dans un tube à centrifuger avec 5 gouttes de CdCl2 [4] et 6 mL d’acétone [7](cervelle%20avec%20quantités%20octuplées), puis les deux tubes sont passés à la centrifugeuse.

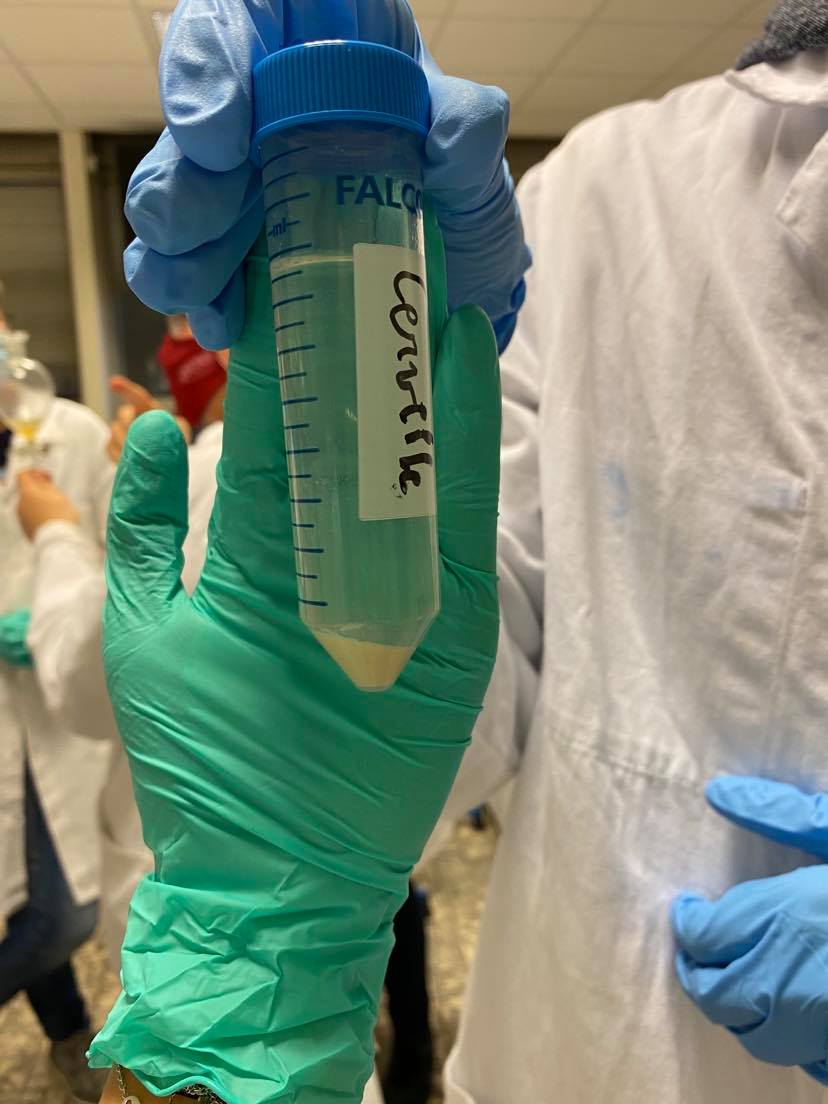


Figure 3: Tube à centrifuge de cervelle

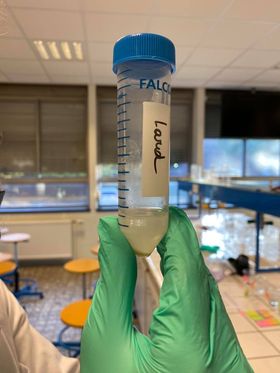


Figure 4: Tube à centrifuge de lard

Nous pouvont voir qu’il y a une différence de volume entre la cervelle et le lard. N’oublions pas que nous avons dû octupler les doses de solvants. Etant donné que les sels de cadmium phospholipides sont insolubles dans une solution d’acétone et d’éther, nous devrions pouvoir apercevoir un précipité dans le fond du tube.

##### Saponification des graisses neutres

Dans le surnageant, il ne reste que les graisses neutres et le cholestérol. Il a fallu décanter ce surnageant dans un bécher attitré au lard ou à la cervelle. Une solution de KOH alcool fut ajoutée et le tout fut mélangé. Le surnageant de cerveau faisait 38 mL, et le culot occupait jusqu’à 2 ml dans le flacon. Nous avons donc décider de quadrupler la quantité de KOH Alcool (24 mL)[3], même si en ratio ça aurait dû être 4,75 fois plus.

Ensuite,ce mélange fut placé sous hotte, chauffé et évaporé. Cette étape provoqua la saponification des graisses neutres. Suite à cette étape, il ne subsistait que le savon, masse informe au fond du bécher (sels de potassium). Le potassium va réagir avec le carboxyle, et le groupement hydroxyle va former le glycérol. Les acides gras ainsi libérés ont été présents sous forme de savons (sels de potassium).

##### Séparation des savons et du cholestérol

Une fois le bécher,contenant la cervelle, refroidit. Nous avons dissout le savon(cervelle) à l’aide de 7ml d’alcool à 50%. Ensuite, nous avons transvasé le tout dans une ampoule à décanter avec ajout de 10ml d’éther de pétrole.

Dans cette ampoule(figure 5) nous avons pu observer deux phases, une phase organique avec le cholestérol et une phase aqueuse avec les savons. Finalement, nous avons laissé s’écouler la phase aqueuse et l’éther de pétrole est recueilli dans un bêcher sec, jusqu’à son évaporation sous la hotte. Pour ce qui en est du cholestérol, il s’est cristallisé en aiguille.



Figure 5: Ampouler à décanter avec les deux phases observées

##### Précipitation des savons calciques

Une fois le bécher, contenant le lard, refroidit. Nous avons repris le résidu du bécher à l’aide de 20ml d’eau et l’avons mélangé. Au plus ces résidus sont abondants, au plus la solution doit être visqueuse, dans notre cas nous n’avons pas eu énormément.

Ensuite, avec les 20ml, nous les avons mis dans deux tubes, de 10ml chacun. Dans l’un, nous avons ajouté petit à petit 10 gouttes de CaCl2 2M [5] , et 10 gouttes d’acide acétique dans l’autre. Les acides gras se sont précipités. Théoriquement, dans le CaCl2 (Ca++, 2 Cl- ), le calcium, de valence 2, va pouvoir accepter 2 têtes hydrophiles des triglycérides, tandis que l’acide acétique (CH3COO- , H+ ) ne va pouvoir se lier qu’à une tête hydrophile. Du coup, nous devrions observer, en quantités égales, deux fois plus de précipités dans la solution de chlorure de calcium.



Figure 6: Tube avec 10 gouttes de CaCl2 à gauchet et Tube avec 10 gouttes d’acide acétique

### Résultats

#### Précipitation des phospholipides

Tout d’abord, le tube à centrifugation, contenant la cervelle, avait un culot plus important que celui du lard. Cela signifie que la cervelle contient plus de phospholipides que le lard. Ensuite nous avions remaqué que le surnageant avait une couleur jaunâtre dans les deux cas.

#### Saponification des graisses neutres

Nous avions pu observer une fine couche de couleur brun/jaune, dans le fond des béchers, qui forme les savons. Dans notre cas nous avions peu savon lard par rapport aux autres groupes.

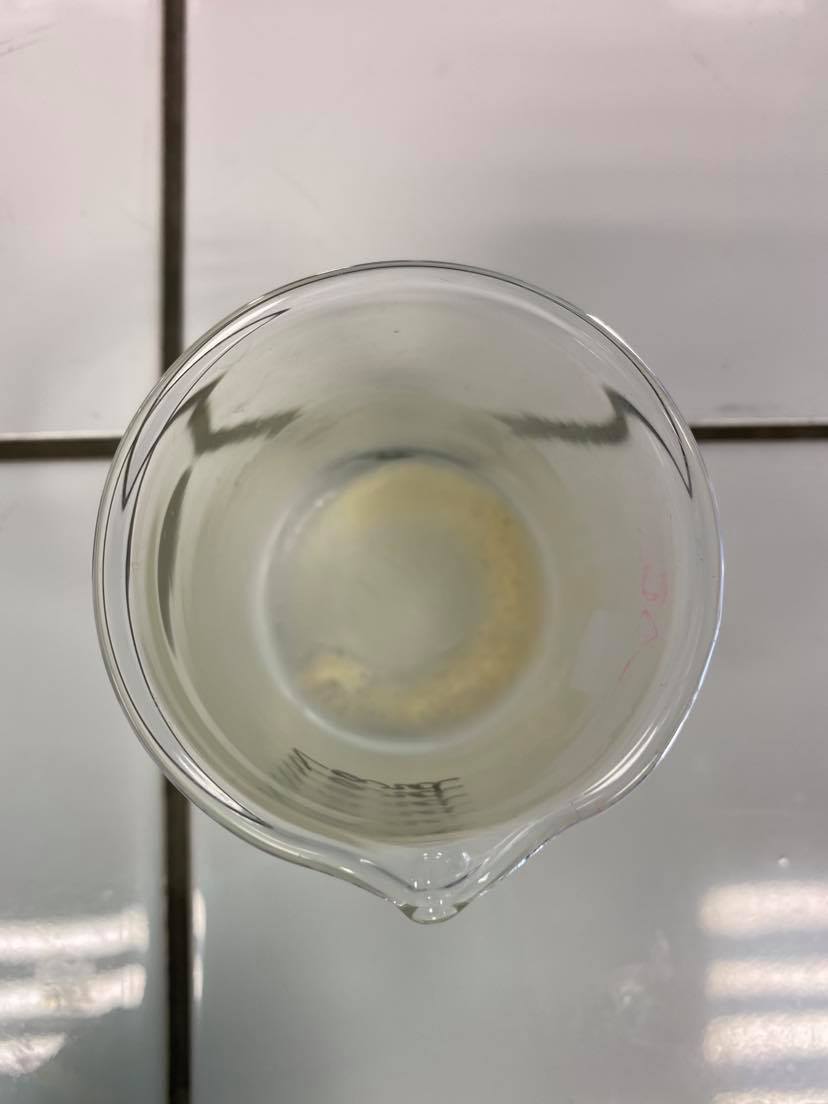


Figure 7: Savon lard

####Séparation des savons et du choléstérol Les résultats nous viennent du groupe 1 car nous n’avons pas eu le temps de la recommencer. Dans l’ampoule à décanter, nous avions pu voir deux phases clairement distinguables (figure 6). La phase organique contenait le cholésstérol et la phase aqueuse contenait les savons. Seulement 1 à 2 g de choléstérol ont été cristalisé.

### Discussion

#### Précipitation des phospholipides

Les phospholipides ont précipité grâce au sel de cadmium ce qui a formé par la suite le culot. Il est important de noter que les phospholipides forment une grande partie de la membrane cellulaire. Ce qui nous permet d’expliquer le fait qu’il y ait plus de phospholipides dans la cervelle que dans le lard par le fait que la cervelle est composée de plus de cellules que le lard. Comme le lard est constitué de moins de cellule ça veut dire que les cellules sont relativement grosses et c’est pour cela qu’il y’en a moins.

#### Saponification des graisses neutres

Les graisses sont saponifiées par le KOH-alcool.De plus, il y’a précipiation des acides gras sont formes de sels de potassium que l’on appelle savon.

####Séparation des savons et du cholestérol La cristalisation est obtenue par l’évaporation de la phase organique grâce à la plaque chauffante. ### Conclusion

### Bibliographie