

كلية الطب والصيدلة - أكادير
ⵜⴰⵎⵉⵔⴰ ⵜⴰⵎⵉⵔⴰ ⵏ ⵜⴰⵎⵉⵔⴰ - ⵙⴰⵊⴰⵔ.
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'AGADIR



Travaux Pratiques de Biochimie Structurale

(Version 01)

**1^{ère} Année de Médecine
2023-2024**

Pr M. CHACHI

I- Règles générales à respecter

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 fermer l'orifice de la pipette avec le pouce mais avec l'index.
5. Réserver, à la fin de la séance, 10 minutes pour le rangement et le nettoyage de la paillasse.
6. Rincer les pipettes à l'eau distillée et les poser inclinées sur le bord du plateau.
7. Essuyer la paillasse avec une éponge propre.
8. Ne pas jeter de papiers ni de réactifs dans les éviers.

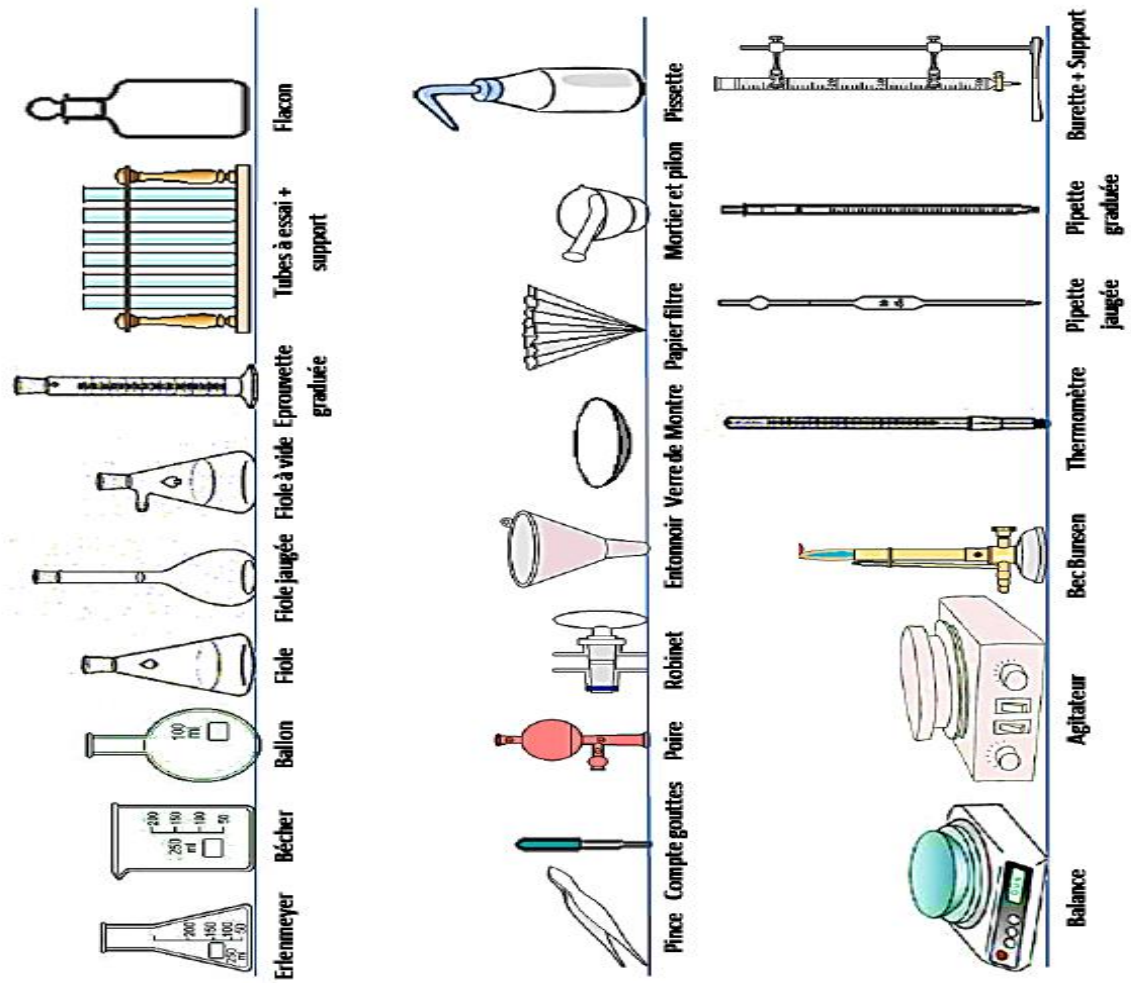
III- Recommandation pour la rédaction de compte rendu

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.

EN CAS D'ACCIDENT

- En cas de brûlures extérieures, suite à une projection d'acide ou de base, laver abondamment à l'eau la partie atteinte, et prévenir de suite l'enseignant.
- En cas de brûlures ou de blessures dues au contact du verre, ou en cas d'ingestion de liquide, prévenir immédiatement l'enseignant.
- Pour éviter les accidents, il faut travailler avec :
 - Beaucoup de soin.
 - Beaucoup de propreté.
 - Calme et prudence.
 - A la fin du TP, laver soigneusement vos mains avant de quitter la salle.

Verreries, matériel et accessoires de laboratoire de biochimie



IV-TP1 : Caractérisation des glucides

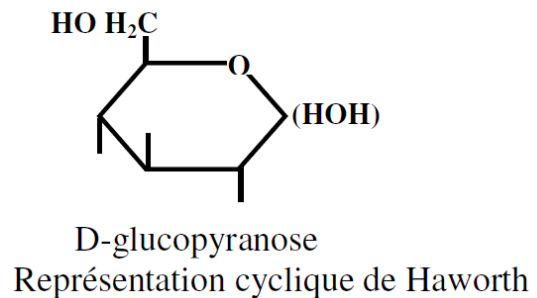
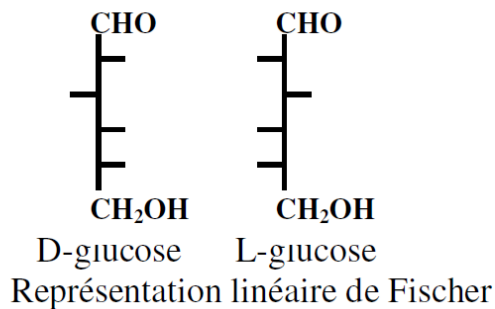
1. Introduction.....	5
2. Caractérisation des glucides.....	6
a. Réaction de Molish.....	6
b. Réaction de Seliwanoff.....	7
c. Réaction de Bial.....	7
d. Réaction à l'iode.....	7
e. Pouvoir réducteur des oses (Réduction de la liqueur de Fehling).....	8
3. Dosage du glucose par spectrophotométrie.....	9

1. 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 :

1.1. 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

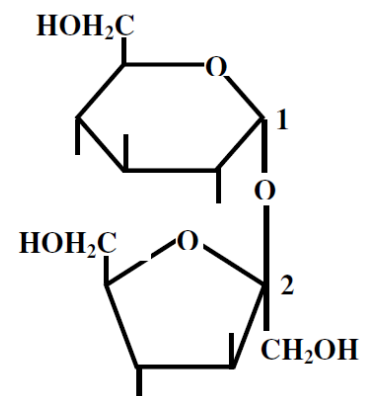


1.2. Osides ou polysaccharides :

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.

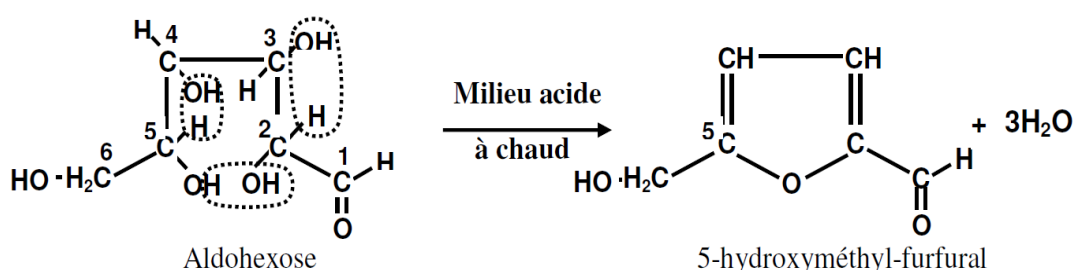
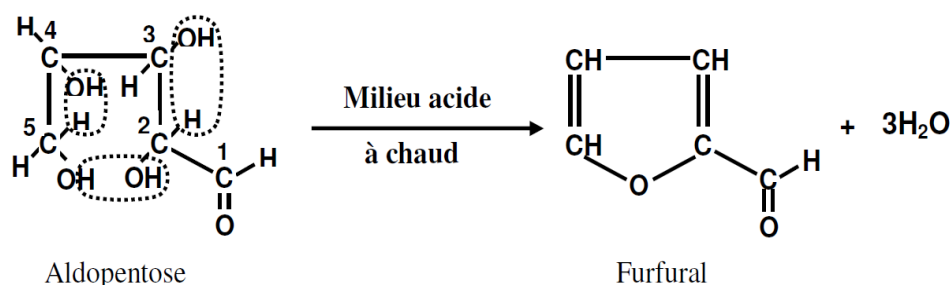
Le saccharose ou
 α -D-glucopyranosyl 1 \rightarrow 2 β -D-fructofuranoside



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

Réactions furfuraliques

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. Caractérisation des glucides

a. Réaction de Molish

C'est une réaction **générale a 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 d'acide sulfurique concentré
5. Observer et noter la coloration obtenue

b. Réaction de Seliwanoff

Cette réaction est **caractéristique des cétones** qui, en présence d'acide chlorhydrique concentré et à chaud, se condensent avec le résorcinol pour former un **composé rouge**. Le saccharose libérant graduellement son fructose en milieu acide, réagira aussi positivement.

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 Seliwanoff
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.

c. 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. (Manipuler sous la hotte).

1. Préparer 3 tubes à essai : mettez dans chaque tube 1 ml de réactif de Bial.
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 (bain marie)
4. Observer et noter les colorations obtenues

d. 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 bleu-noir avec l'amidon.

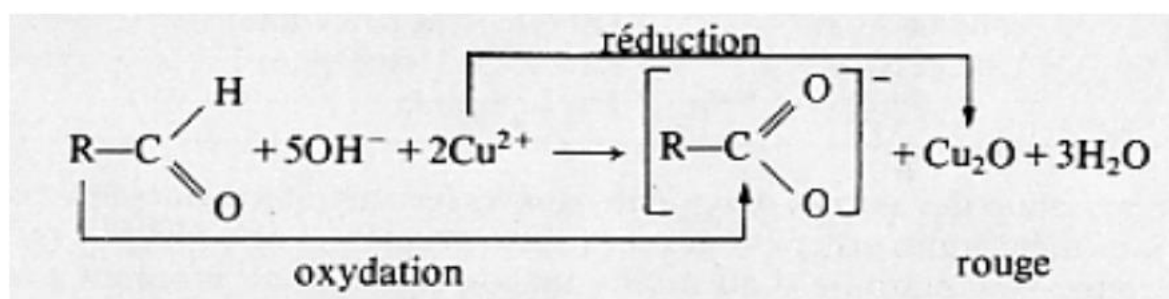
Mode opératoire.

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

e. Pouvoir réducteur des oses (liqueur de Fehling)

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.

Mode opératoire

1. Préparer 5 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 fructose 2 ml, au troisième 2 ml de solution de saccharose, au quatrième 2 ml de solution de maltose et au cinquième 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 :

1. Mettre 5 ml de saccharose dans un tube à essai.
2. Ajouter 3 gouttes de H_2SO_4 concentré (sous la hotte). Agiter et porter à ébullition pendant 2 min. Le saccharose est ainsi hydrolysé.

3. Ajouter 5 gouttes d'une solution de soude à 10% jusqu'à réaction nettement alcaline (utiliser papier indicateur de pH).
4. 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
5. Agiter et porter les deux tubes au bain marie bouillant pendant 3 min.
6. Observer la coloration obtenue dans chaque tube.

3. Dosage du glucose par spectrophotométrie

3.1. Principe de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique qualitative et quantitative, rapide et non dénaturante, qui permet de mesurer l'absorbance d'une substance chimique en solution. L'absorbance d'une solution est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde de l'espèce étudiée. La spectrophotométrie consiste à mesurer la lumière traversant un milieu contenant un ou plusieurs substances absorbantes (chromophores). Lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution contenant une substance dissoute, il est partiellement absorbé et le faisceau émergent possède une intensité inférieure I . plus la substance absorbante est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer Lambert.

Loi de Beer Lambert

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 et de longueur d'onde λ donnée passe à travers une solution. La quantité de lumière absorbée est proportionnelle à la concentration c de l'espèce en solution et à la longueur du trajet optique l :

$$A = \text{Log } I_0/I = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A : absorbance ou densité optique

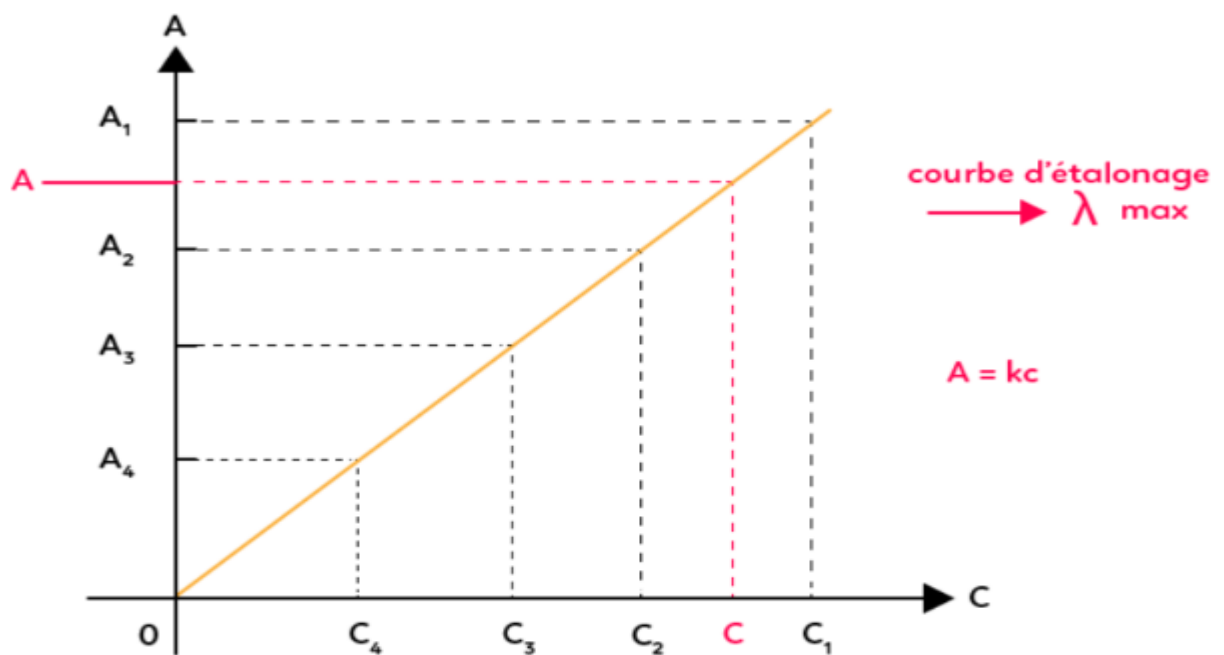
l : est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) en cm

ϵ : coefficient d'absorption ou coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance

3.2. Mise en œuvre

Méthode avec gamme d'étalonnage :

- Consiste à préparer une **gamme de dilutions** d'une solution étalon "mère", à mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons "filles", puis à tracer la **courbe d'étalonnage** $A = f(c)$.
- L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage ; on fait ainsi une **détermination graphique** de la concentration de la solution à doser
- Elle permet de **vérifier la linéarité**, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation.



Courbe d'étalonnage

3.3. Dosage du glucose par la méthode à l'ortho-toluidine

La détermination du taux de glucose dans un échantillon par la **méthode à l'ortho-toluidine** repose sur le fait que cette substance, en milieu acide et en présence de thiourée, génère une coloration verte avec les aldohexoses.

Mode opératoire :

On mesure la glycémie d'un sujet à jeun par la méthode colorimétrique à l'ortho-toluidine. A partir d'une solution mère de 2 g/l de glucose, on prépare la gamme étalon. Les valeurs expérimentales sont résumées dans le tableau suivant :

	N° tube					
	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (ml)	2	1.5	1	0.5	0	0
Solution mère de glucose (ml)	0	0.5	1	1.5	2	0
Sérum à doser (ml)	0	0	0	0	0	2
Concentration (g/l)						
Ortho-toluidine (ml)	5	5	5	5	5	5
Densité optique (DO)						

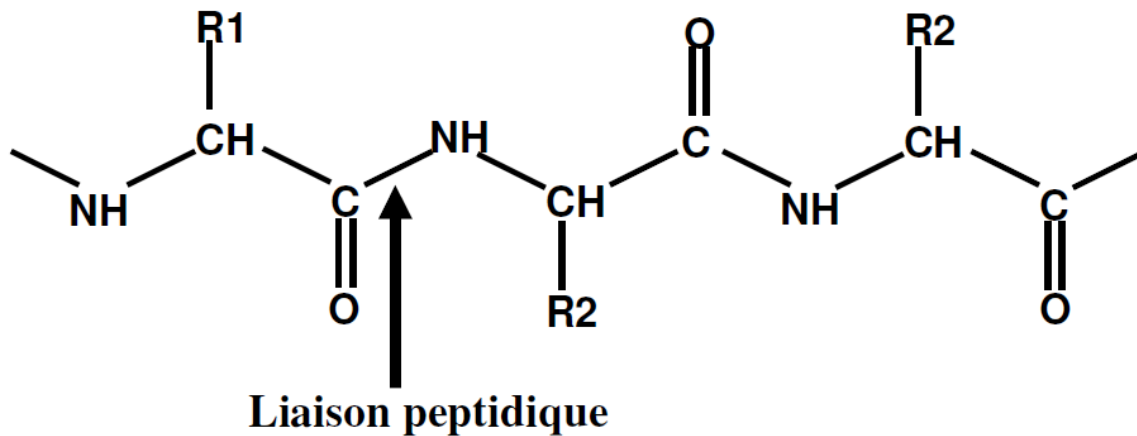
- Compléter le tableau en calculant la concentration de chaque tube
- Tracer la courbe $DO=F(C)$
- Déterminer la concentration du sérum à doser.

(papier millimétré, crayon ou porte-mine, double décimètre)

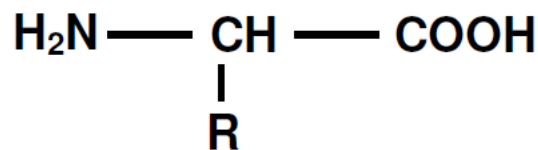
V-TP2 : Caractérisation et dosage des acides aminés et des protéines

1. Caractérisation des acides aminés.....	13
1.1. La réaction à la ninhydrine.....	13
1.2. La réaction xanthoprotéique.....	14
1.3. La réaction à l'acétate de plomb.....	15
2. Caractérisation des protéines.....	15
3. Dosage des protéines par la réaction de Biuret.....	16

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 AA 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.

1. Caractérisation des acides aminés

1.1. La réaction à la ninhydrine

La ninhydrine caractérise la fonction alpha amino-acide.

Principe :

Cette réaction comporte plusieurs étapes, dans un premier temps on observe la formation de la ninhydrine réduite, alors que l'acide aminé est transformé en iminoacide celui-ci s'hydrolyse en cétoacide qui est décarboxylé en un aldéhyde ayant un atome de moins que l'acide aminé de départ. Puis la molécule d'ammoniac (NH₃) engendrée dans la première partie de la réaction

provoque la condensation de deux molécules de ninhydrine (réduite également formée pendant la première étape et une molécule de ninhydrine oxydée) pour former un complexe de couleur bleu violette : le bleu de RUHEMAN.

Réactifs

- Une solution de ninhydrine à 1%
- Glycine à 1%
- Proline à 1%

Mode opératoire

Dans trois tubes à essai :

T1 : verser 2 ml de l'eau distillée

T2 : verser 2 ml de la solution de glycine

T3 : verser 2 ml de la solution de proline

Dans chaque tube ajouter 3 gouttes de ninhydrine 1%, mélanger et porter au bain marie bouillant pendant 2 minutes. On observe une coloration pourpre

1.2. La réaction xanthoprotéique

Principe :

Cette réaction caractérise certains acides aminés aromatiques : tyrosine, tryptophane, phénylalanine, par une coloration jaune orangé due à la formation de dérivés benzéniques nitrés en milieu alcalin.

Mode opératoire :

Dans trois tubes à essai :

T1 : verser 2 ml d'eau distillée

T2 : verser 2 ml de la solution de tyrosine à 5%

T3 : verser 2 ml de la solution inconnue X

- Dans chaque tube ajouter 1 ml d'acide nitrique concentré
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5 minutes la solution prend une coloration jaune (en se dissociant partiellement, il communique une teinte jaune au surnageant).
- Refroidir les trois tubes de l'eau glacée, puis ajouter goutte à goutte de l'ammoniaque : la coloration jaune passe au jaune orangé.
- Interpréter les résultats

1.3. La réaction à l'acétate de plomb

Principe :

Cette réaction décèle la présence du soufre dans la cystéine et dans la méthionine par formation d'un précipité de sulfure de plomb noir en milieu alcalin à chaud.

Mode opératoire :

Dans trois tubes à essai

T1 : verser 2 ml d'eau distillée

T2 : verser 2 ml de la solution de cystéine à 1%

T3 : verser 2 ml de la solution inconnue X

- Ajouter dans chaque tube 1 ml de lessive de soude (10N).
- Homogénéiser les trois tubes
- Porter au bain marie bouillant pendant 2 minutes
- Ajouter dans chacun des 3 tubes 8 gouttes de solution d'acétate de plomb (0.2 M) puis chauffer au bain-marie bouillant pendant 2 minutes.
- Observer l'apparition d'un précipité noir de sulfate de plomb
- Interpréter les résultats

2. Caractérisation des protéines

Principe :

Les protéines urinaires peuvent être précipitées par la chaleur. Cette précipitation sera d'autant plus efficace que l'on fait intervenir dans la réaction de Tanret, un anion lourd, le mercuriodure d en présence d'acide acétique.

Mode opératoire :

Dans un tube à essai mettre :

- 5 ml d'urine
- 0.5 ml de réactif de Tanret

Porter à ébullition et examiner sur fond noir en comparant à un témoin (urines sans protéines).

3. Dosage des protéines par la réaction de Biuret

Principe :

L'hydrogène aminé de la liaison peptidique est substituable par un métal (sodium, mercure, cuivre). La substitution la plus utilisée dans un but analytique est celle qui met en jeu le cuivre en milieu alcalin : cette réaction est connue sous le nom de la réaction de Biuret. Elle se manifeste par l'apparition d'une coloration violette. En fait, la réaction de Biuret n'est pas exclusivement spécifique de la liaison peptidique. Selon la règle de Schiff, toutes les substances contenant au moins deux liaisons amides voisines donnent cette réaction. Si elle n'est pas totalement spécifique, la coloration apparue est toutefois qualitative et quantitative :

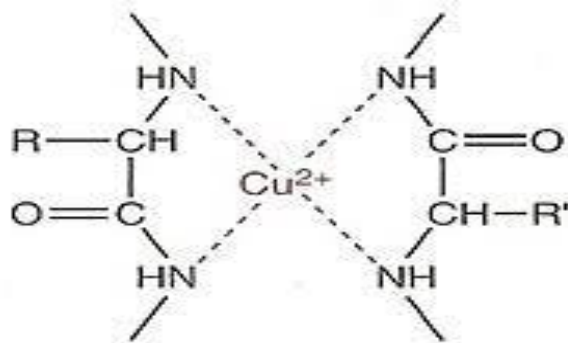
- ❖ **Qualitative**, parce que le maximum d'absorption de la coloration varie avec le nombre de liaisons peptidiques présentes dans la molécule :

Dipeptides : 630-650 nm

Tripeptides : 580 nm

Polypeptides : 530-540 nm

- ❖ **Quantitative**, parce que l'intensité de l'absorption est proportionnelle à la concentration protidique. Elle peut donc permettre le dosage colorimétrique d'une solution protéique à partir d'une courbe de référence.



Mode opératoire :

Tube gamme étalon	1	2	3	4	5	6
Réactif de Gornall en ml	4	4	4	4	4	4
Solution physiolo- gique en ml	1	0.75	0.5	0.25	0	0
Solution de protéines à 5 g/l	0	0.25	0.5	0.75	1	0
Solution à doser (sé- rum dilué au 1/20 ème)	0	0	0	0	0	1
Homogénéiser (vortex) soigneusement						
Laisser incuber 10 minutes à température ambiante						
[Protéines] dans le tube						
Absorbance à 545 nm						

- Calculer les concentrations des tubes
- Tracer la courbe $DO = f(C)$
- Calculer la concentration de la solution à doser
- En tenant compte de la dilution de la solution au 1/20 ème, quelle est la concentration réelle en protéines du sérum ?

Conseils réalisation gamme

- Décaler les tubes dans le portoir après chaque ajout
- Vérifier le niveau équivalent dans les tubes quand on a atteint le volume total.
- A la fin vérifier que la couleur des essais se situe à l'œil dans la gamme.