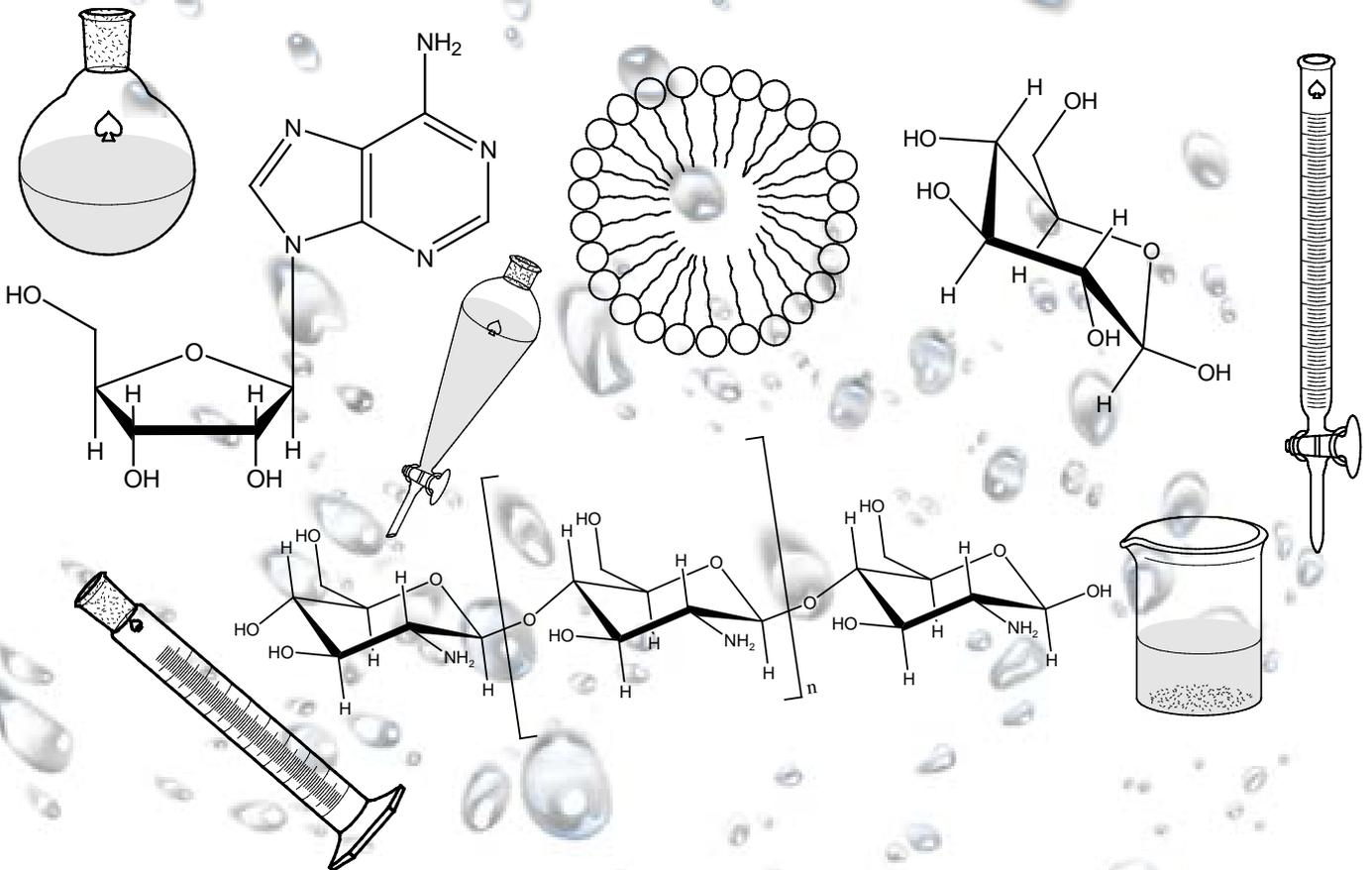


Travaux pratiques

Techniques chimiques

pour la biologie



Recommandations générales pour les séances de travaux pratiques

Travailler dans un laboratoire de biochimie expose à des risques dus aussi bien aux produits chimiques potentiellement toxiques qu'au matériel spécifique qu'un expérimentateur doit connaître pour les utiliser sans danger. Il faut ainsi avoir conscience des risques encourus et tout faire pour protéger les autres et soi-même, tout en gardant en tête que le danger peut venir d'autrui.

Une question de bon sens

Le simple fait d'entrer dans un laboratoire de biochimie impose le respect strict de certaines règles :

- Ne pas fumer.
- Ne pas manger ou boire. Ne pas mâcher de chewing-gum.
- Ne pas encombrer le sol avec divers sacs, cartables, etc. En particulier, laisser dégagés les allées et les chemins d'accès vers les sorties de secours.
- Ne pas encombrer la paillasse avec classeurs, trousse, etc.
- Ne pas courir.
- Ne pas porter à la bouche ou au visage ses mains, son stylo, etc.
- Ne pas manipuler seul.
- Ne pas faire des essais de manipulation sans avertir l'enseignant.
- Ne pas goûter ou sentir les produits chimiques.
- Ne pas jouer avec le matériel.
- **Manipuler debout.**



Interdiction de fumer



Interdiction de manger ou boire

Il faut de plus se laver les mains régulièrement pendant un T.P. et systématiquement avant de sortir, temporairement ou définitivement, du laboratoire.

La tenue

L'entrée dans un laboratoire de biochimie nécessite une tenue adaptée :

- Une **blouse** en coton qui doit être **boutonnée** et avoir des **manches longues**.
- Un pantalon couvrant les jambes et des chaussures plates fermées pour minimiser les zones de peau exposées en cas de projections.
- Les cheveux longs attachés.
- **Pas de lentilles** de contact qui peuvent être **attaquées par les solvants volatils**.

Connaissance des produits utilisés.

Il existe trois grandes catégories de dangers intrinsèques aux substances chimiques :

- les dangers physiques (risque d'explosion, d'inflammation, etc.)
- les dangers pour la santé (toxicité aiguë, lésion oculaire, toxicité pour la reproduction, etc.)
- les dangers pour l'environnement (danger pour les milieux aquatiques).

Pictogramme	Classe de dangers associés
 SGH01	Substance ou mélange susceptible d'exploser.
 SGH02	Substance ou mélange susceptible de s'enflammer.
 SGH03	Substance ou mélange sous forme de gaz, liquide ou solide capable de provoquer ou favoriser un incendie.
 SGH04	Gaz sous pression.
 SGH05	Substance ou mélange corrosif susceptible d'attaquer ou de détruire les tissus ou organes vivants tels que la peau ou les yeux, et les métaux lors d'un contact.
 SGH06	Substance ou mélange responsable d'effets de toxicité aiguë après administration par voie orale, cutanée ou par inhalation.
 SGH07	Substance ou mélange qui par voie orale, cutanée ou par inhalation peut provoquer des effets nocifs, une irritation pour la peau, les yeux ou les voies respiratoires, une sensibilisation cutanée. Substance ou mélange qui après une exposition unique peut entraîner des effets altérant le fonctionnement de certains organes cibles. Substance ou mélange pouvant présenter des effets narcotiques.
 SGH08	Substance qui entraîne une hypersensibilité respiratoire par inhalation. Substance capable d'induire dans les cellules germinales chez l'homme des mutations (mutagène). Substance ou mélange qui induit des cancers (cancérogène). Substance ou mélange susceptible de présenter des effets néfastes pour la reproduction chez l'homme (toxique pour la reproduction). Substance ou mélange qui après une exposition unique ou répétée peut entraîner des effets altérant le fonctionnement de certains organes cibles, ces effets étant réversibles ou non, immédiats ou retardés. Substance ou mélange pouvant entraîner des graves effets aigus suite à l'entrée dans la trachée ou les voies respiratoires inférieures.
 SGH09	Substance ou mélange présentant une toxicité aiguë ou chronique pour les organismes aquatiques.

Description de la verrerie

1- Verrerie de stockage

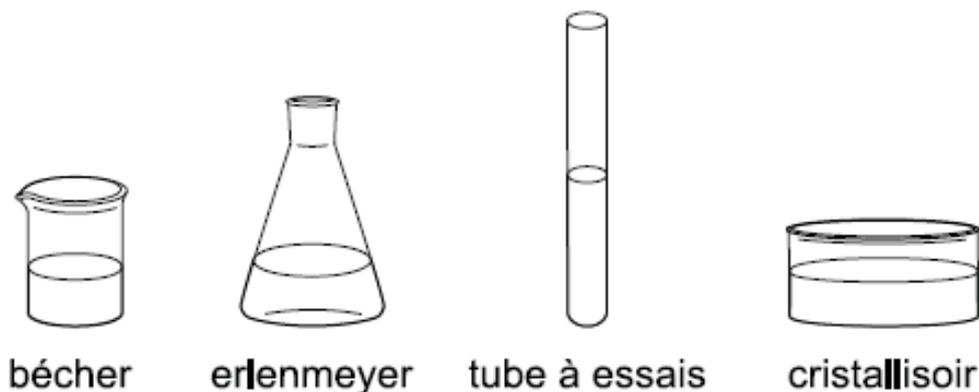
La verrerie de stockage sert à conserver un liquide pendant la durée d'une manipulation. En fonction de la nature et de la quantité de liquide à stocker, plusieurs ustensiles sont disponibles :

-Le bécher : il est généralement utilisé pour stocker momentanément des solutions, en particulier les solutions aqueuses. Lors d'un pipetage, il contient le liquide à prélever. Lors d'un titrage, on peut y placer la solution à titrer.

-L'erenmeyer : il a approximativement le même rôle que le bécher mais son col étroit empêche les projections de liquide, ce qui est intéressant lors d'agitations vigoureuses, de gouttes à gouttes ou de mélanges fortement exothermiques. Sa forme conique est plus adaptée au stockage des liquides organiques volatils. Cependant, il est difficile de lui adjoindre des électrodes ou un thermomètre.

-Le cristallisoir : il peut contenir une grande quantité de liquide comme un mélange réfrigérant, un bain d'eau ou d'huile de silicone pour un chauffage...

-Le tube à essais : il est utilisé pour réaliser des tests caractéristiques (parfois en le chauffant à la flamme) ou pour servir de tube témoin.



-Le ballon : il possède entre 1 et 3 cols, parfois rodés, et est majoritairement utilisé comme réacteur en chimie organique. Il doit être posé sur un valet ou maintenu au niveau d'un des cols par une pince 2 doigts (pince plate).



2- Verrerie de prélèvement et de mesure

Elle est utilisée pour mesurer un volume de liquide grossièrement ou précisément en fonction de l'usage que l'on souhaite faire de ce liquide.

2-1- Mesure grossière :

Parfois, il n'est pas nécessaire d'avoir une grande précision sur un volume de liquide comme dans le cas :

- d'un solvant en chimie organique
- d'eau à ajouter lors d'un titrage
- d'un réactif en excès...

La mesure grossière d'un volume est réalisée grâce à une **éprouvette graduée**.

L'incertitude sur le volume est de l'ordre d'une demi-graduation, c'est-à-dire entre 0,1 et 1 mL (selon le volume total de l'éprouvette).

Cependant, il ne faut pas utiliser les graduations extrêmement peu précises d'un bécher ou d'un erlenmeyer pour mesurer un volume, même grossièrement.

2-2- Mesure précise :

Un volume de liquide doit être mesuré avec précision dans les cas suivants :

- volume d'un réactif limitant en chimie organique
- volume d'une solution à titrer ou d'un réactif titrant
- préparation d'une solution de concentration précise...

Deux types de verrerie de précision sont à distinguer :

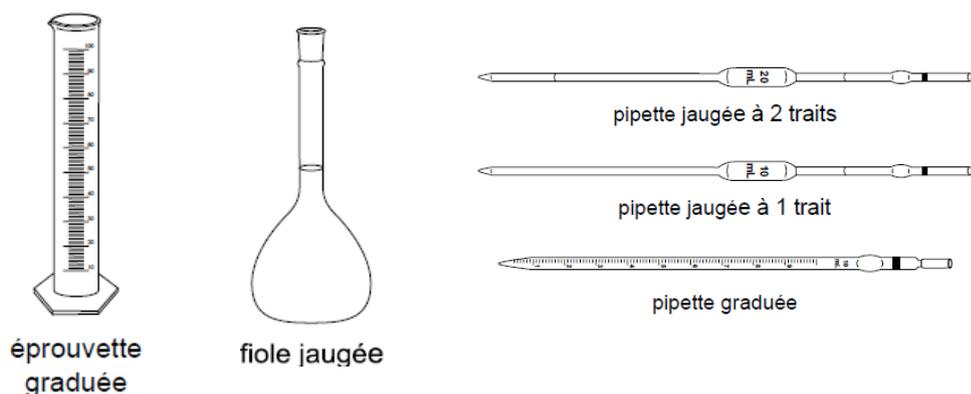
• **La verrerie qui contient un volume précis** : elle porte la mention In pour « Intérieur ». En laboratoire de T.P. seule la fiole jaugée appartient à cette catégorie.

Il n'est pas correct d'utiliser une fiole jaugée pour délivrer précisément un volume. En effet, si on transvase son contenu dans un bécher : tout le liquide ne tombe pas dedans.

• **La verrerie qui délivre un volume précis** : elle porte la mention Ex pour « Expurger ». En laboratoire de T.P., appartiennent à cette catégorie :

- **les pipettes jaugées** : ce sont les pipettes jaugées (avec un trait ou deux traits de jauge) : ce sont les instruments les plus précis.

- **les pipettes graduées** : elles sont moins précises que les pipettes jaugées. Elles peuvent être utilisées lorsque la précision du volume prélevé est moins critique, mais également si aucune pipette jaugée n'est adaptée pour prélever le volume requis (par exemple, il n'existe pas de pipette jaugée permettant de prélever 2,3 mL ou 7 mL).



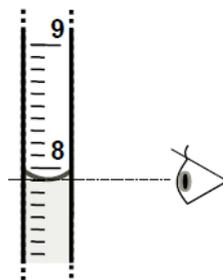
– les **burettes graduées** : elles sont utilisées pour délivrer précisément des volumes variables en particulier lors de titrages volumétriques.



2-3- Lecture et ajustement d'un volume

Le bas du ménisque (dû au mouillage du liquide sur le verre) sert de référence visuelle. Cette référence doit être utilisée pour ajuster le volume d'une fiole jaugée ou d'une pipette jaugée et pour lire le volume d'une pipette graduée ou d'une burette. Les consignes suivantes doivent être suivies précisément :

- l'élément de verrerie doit être rigoureusement vertical ;
- l'observation du ménisque doit se faire dans un plan horizontal afin d'éviter les erreurs de parallaxe.



Ajustement d'un ménisque sur une burette ou une pipette graduée. Dans cette illustration, l'expérimentateur relève un volume de 7,9 mL en utilisant le bas du ménisque comme référence visuelle.

Dans le cas des **burettes graduées**, la lecture du volume peut se faire plus précisément à l'aide d'une bande verticale généralement bleue sur fond blanc incrustée dans la burette. Un rétrécissement de la bande bleue est observé au niveau du ménisque et permet de lire le volume.

Séparation des acides aminés d'un mélange par chromatographie d'adsorption et révélation des empreintes digitales.

Les acides aminés :

Formule générale d'un acide aminé :

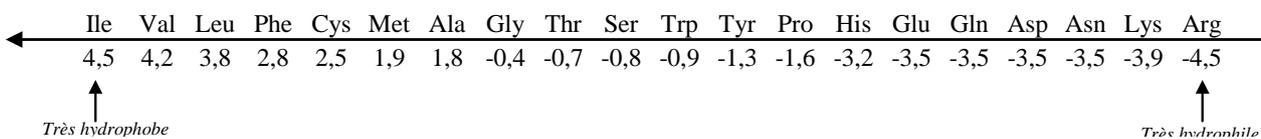


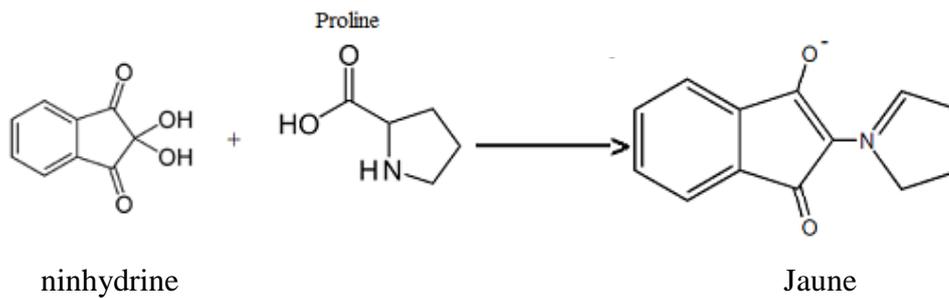
Le radical R dépend de l'acide aminé et peut comporter ou non des fonctions ionisables (COOH, NH₂, SH...etc).

Les acides aminés sont des substances **amphotères**.

Les acides aminés diffèrent par leurs polarités.

Echelle d'hydrophobicité des acides aminés (kyte et Doolittle, 1982).





Comme les **sécrétions cutanées contiennent des acides aminés**, les services de **polices** et de médecine légale utilisent la réaction à la **ninhydrine** pour révéler des **empreintes digitales**, il est possible de détecter des empreintes datant d'une quinzaine d'années.

Chromatographie :

La chromatographie a pour but de séparer et de caractériser les molécules d'un mélange qui diffèrent par :

- la solubilité
- la taille
- la forme
- la masse
- la charge
- les propriétés d'adsorption

Il existe plusieurs types de chromatographie dont le principe est fondé sur les interactions entre 3 composants :

- le mélange à séparer (solutés)
- phase stationnaire (**qui ne bouge pas**)
- phase mobile (éluant)

L'importance de ces interactions est en fonction de la méthode utilisée :

- les interactions **soluté-phase stationnaire** dominent en chromatographie d'échange d'ions.
- les interactions **soluté-phase mobile** sont plus importantes en chromatographie de partage.

Durant cette séance de travaux pratiques, nous étudierons la séparation des acides aminés d'un mélange par chromatographie d'adsorption.

Séparation des acides aminés d'un mélange par chromatographie d'adsorption :

1. Principe :

La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des solutés entre la phase stationnaire (adsorbant solide fixe) et la phase mobile (solvant = éluant). Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par **adsorption** et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation. Les séparations sont basées sur le principe de **polarité**, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

- la phase stationnaire c'est une phase solide constituée par de la silice.
- La phase mobile est constituée par un solvant organique qui va migrer par capillarité

Plus un composé possède des groupements polaires, plus il est hydrophile, donc plus retenue par la phase stationnaire (la silice).

Dans ce T.P nous utiliserons comme support, une plaque de couche mince de la silice. Cette plaque va être traversée par un solvant organique (phase mobile). Ainsi, un soluté très polaire migrera lentement, la force d'adsorption de la phase stationnaire prédominant sur la force d'entraînement par le solvant. A l'inverse, un soluté plus soluble dans la phase mobile migrera rapidement. On en déduit :

- le coefficient R_f qu'on appelle rapport frontal

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par un soluté}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

2. Manipulation.

2.1. But.

Le but de cette manipulation est de déterminer les acides aminés constituant un mélange, en comparant leur position sur le chromatogramme à celle d'acides aminés témoins.

2.2. Préparation du solvant.

Préparer le mélange suivant.

- 70% (v/v) n-butanol
- 18% (v/v) d'acide acétique
- 12 % (v/v) d'eau distillée.

2.3. Préparation du chromatogramme.

- Travailler sur une paille propre.
- Prendre une plaque CCM et tracer au crayon graphite dans le sens de la largeur une droite à 1 cm du bord inférieur. **Ne pas toucher la silice de la plaque avec vos doigts.**
- sur cette droite marquer 5 points distants entre eux de 0,5 cm. Le premier et le dernier étant situé de 0,5 cm des bords.

Noter sur votre cahier de manipulation à quoi correspondent les points.

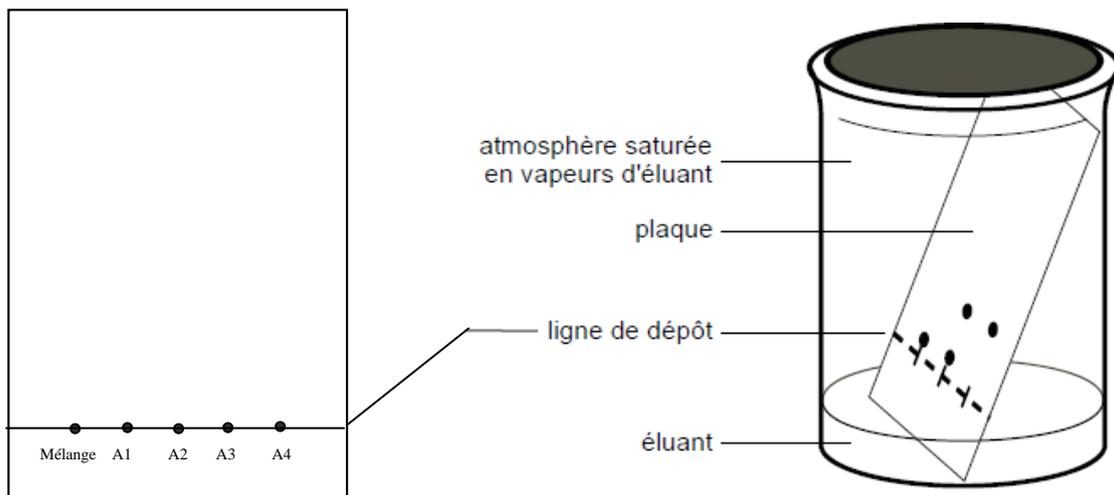
Les acides aminés témoins sont donnés en solution éthanol.

- Déposer à l'aide du **tube capillaire** le mélange des acides aminés et chacun des acides aminés témoins.

Remarque :

Lorsqu'on doit déposer une goutte sur un même point, il faut attendre que la 1^{ère} ait séché pour pouvoir déposer la 2^{ème} et ainsi de suite.

- Attendre que le solvant ait parcouru la longueur de la plaque.
- Tracer le front du solvant et attendre que le chromatogramme et attendre que le chromatogramme soit bien sec (après mise à l'étuve).



Le réactif le plus couramment utilisé pour caractériser les acides aminés est la **ninhydrine**. Elle donne une coloration **bleue-violette** avec la plus part des acides aminés. Cependant, quelques un d'entre eux se distinguent par une coloration spécifique permettant leur identification. La proline notamment donne une coloration **jaune**.

2.4. Révélation.

Pulvériser le réactif sur le chromatogramme et le mettre dans une étuve à 80°C pendant 5 min.

2.5. Lecteur du chromatogramme.

- Entourer immédiatement les **spots** obtenus par un trait de crayon.
- Comparer les spots obtenus du mélange avec les spots des acides aminés témoins.

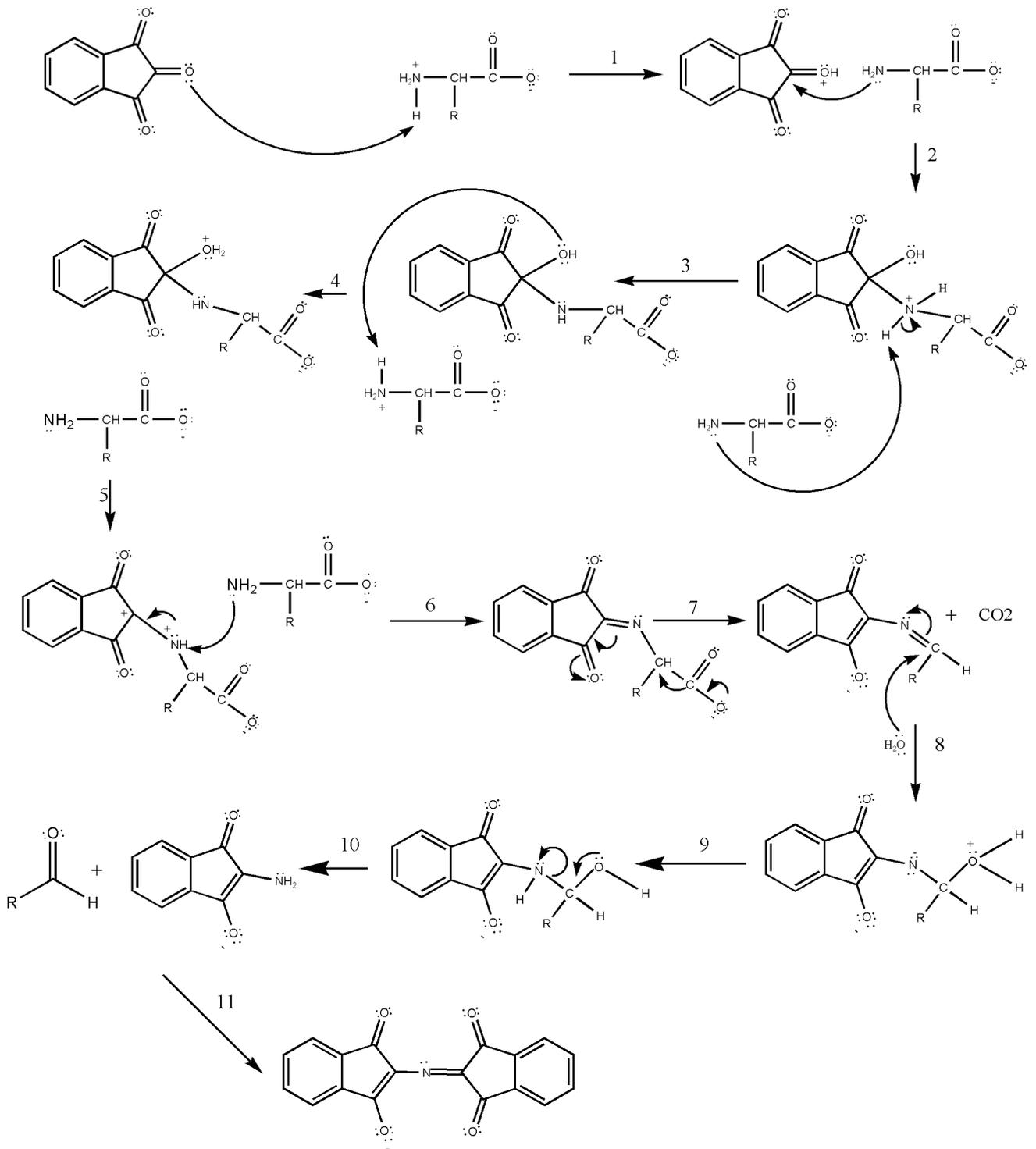
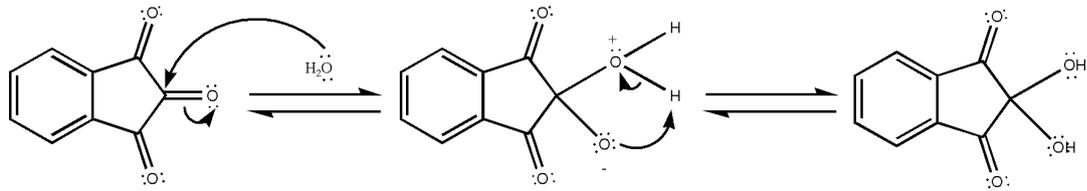
3. Compte -Rendu

- 1- Noter le n° de la solution à identifier.
- 2- Joindre la plaque CCM à votre compte-rendu
- 3- Schématiser le chromatogramme expérimental.
- 4- Calculer les R_f et faire une comparaison.

Rapport frontal : $R_f = \frac{\text{distance parcourue par un soluté}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$

- 5- Interpréter les résultats et donner la composition du mélange inconnu.

	Ala Glu Leu Ser	Arg Gln Lys Thr	Asn Gly Met Trp	Asp His Phe Tyr	Cys Ile Pro Val
Ala Arg Asn Asp Cys	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,69 \quad 2,34 \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine PHi= 6,02</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,04 \quad 2,17 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \\ 12,48 \end{array}$ <p>Arginine PHi= 11,15</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 8,8 \quad 2,02 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagine PHi= 5,41</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,82 \quad 2,09 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \\ 3,86 \end{array}$ <p>acide aspartique PHi= 2,77</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 10,78 \quad 1,71 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \\ 8,33 \end{array}$ <p>Cystéine PHi= 5,03</p>
Glu Gln Gly His Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,67 \quad 2,16 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \\ 4,25 \end{array}$ <p>Acide glutamique PHi= 3,22</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,13 \quad 2,17 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamine PHi= 5,65</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,60 \quad 2,34 \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine PHi= 5,97</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,17 \quad 1,82 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N} \\ 6 \end{array}$ <p>Histidine PHi= 7,47</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,68 \quad 2,36 \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine PHi= 5,94</p>
Leu Lys Met Phe Pro	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,60 \quad 2,36 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine PHi= 9,98</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 8,95 \quad 2,18 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \\ 10,53 \end{array}$ <p>Lysine PHi= 9,59</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,21 \quad 2,28 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Méthionine PHi= 5,74</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,13 \quad 1,83 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phénylalanine PHi= 5,48</p>	$\begin{array}{c} \text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ 1,99 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7\text{N} \\ 10,60\text{HN} \end{array}$ <p>Proline PHi= 6,30</p>
Ser Thr Trp Tyr Val	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,15 \quad 2,21 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Sérine PHi= 5,68</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 10,43 \quad 2,63 \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Thréonine PHi= 5,64</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,39 \quad 2,38 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ <p>Tryptophane PHi= 5,89</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 9,11 \quad 2,20 \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \\ 10,07 \end{array}$ <p>Tyrosine PHi= 5,66</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \quad \\ 2,62 \quad 2,32 \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine PHi= 5,96</p>



Séquences réactionnelles de la réaction d'un acide aminé avec la ninhydrine (sauf proline).