

UNIVERSITE CADI AYYAD
Faculté des Sciences Semlalia
Département de Biologie



Filière Sciences de la vie

Semestre 3 - Année universitaire 2015-2016

MODULE : TECHNIQUES D'ANALYSES CHIMIQUES POUR LA BIOLOGIE

**Spectrophotométrie :
cas dosage des protéines sériques**



SERVICE DE BIOCHIMIE

RÈGLES GÉNÉRALES A RESPECTER DURANT LES SÉANCES DES TP

- **Il est formellement interdit de changer de groupe de TP (en cas de maladie, présenter un justificatif)**
- Bien connaître la dénomination de la verrerie (schémas ci-joints)
- Il est obligatoire de porter une blouse en coton **avec les boutons fermés.**
- Il est formellement interdit de manger ou de boire dans la salle de T.P. Les déchets solides ne doivent être jetés dans les éviers.
- Ne pas manipuler les liquides inflammables (alcool, chloroforme, éther..) à proximité d'une flamme.
- Utiliser des propipettes pour pipeter les bases et les acides forts.
- En cas d'ingestion de liquide dangereux ou de brûlures extérieures, suite à une projection d'acide ou de bases, laver abondamment à l'eau la partie atteinte et prévenir immédiatement l'enseignant
- Ne jamais verser de l'eau dans les acides concentrés.
- Ne jamais chauffer le fond d'un tube à essai, mais les parois latérales pour éviter de casser la verrerie.
- Les produits toxiques doivent être manipulés sous hotte.

AVANT LA SÉANCE DE TP

- Consulter l'affichage des séances.
- **Avant chaque séance, il est fortement conseillé de préparer la séance : principe, mode opératoire, résultats.** Un contrôle des connaissances en rapport avec la manipulation et sous forme d'interrogation écrite est à prévoir au début de chaque séance.
- Apporter le matériel nécessaire à la rédaction du compte rendu (papiers millimétrés. Papiers ministres, calculatrice, un marqueur indélébile à l'eau, ...).

PENDANT LA SÉANCE DE TP

- Les séances des T.P durent 3 ou 4 heures.
- Les étudiants s'associent par binômes pour toute la durée des T.P.(sauf nouvelles instructions)
- Travailler toujours avec du matériel propre, lavé à l'eau du robinet puis à l'eau distillée.
- Ne pas prélever un réactif avec une pipette contaminée par un autre réactif.
- Pour réutiliser une pipette, la laver à l'eau courante puis la rincer à l'eau distillée de l'intérieur et de l'extérieur.
- Éviter de répandre de l'eau ou des réactifs sur les paillasse ou sur les appareils.
- Attention à la casse : pour cela, évité de mettre la verrerie aux bordures des paillasse, les tubes en verre doivent être bien placés sur le portoir.
- Maintenir la paillasse en parfait état de propreté.

À LA FIN DE LA SÉANCE

1- Présentation du compte rendu. Il doit comporter:

- l'intitulé de la séance
- Le But de la manipulation : Indiquer clairement ce que l'on cherche à déterminer en une ou 2 phrases au maximum.
- Le principe de la manipulation
- Les Résultats : doivent être présentés sous forme de tableau éventuellement assortis de graphes (Pour le tracé : n'oubliez pas le titre, l'échelle, les unités et de bien visualiser vos points expérimentaux).
- Commentaires-conclusion

2- nettoyage de la paille : Vider la verrerie utilisée (pipettes, tubes, cuves de spectrophotomètre, etc... sauf les flacons fournis contenant des réactifs ou solutions), la laver à l'eau du robinet puis à l'eau distillée.

MATÉRIEL UTILISÉ EN TP

1 - Verrerie ordinaire : sert à contenir des solutions. Les graduations indiquées sont très approximatives ex : erlenmeyer, bêcher, ballon, cristalliseur, etc....

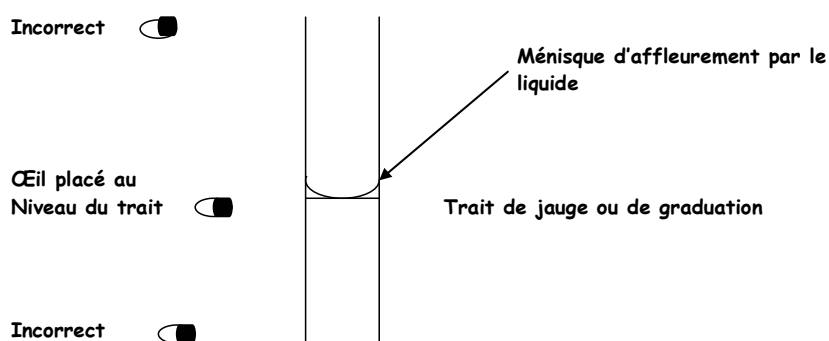
2 - Verrerie pour volumétrie : sert à prélever ou mesurer des volumes précis

a) **Pipettes** : jaugées à 2 traits (volume contenu entre les 2 traits) ou à 1 trait, graduées avec le zéro en haut.

Utilisation de la pipette : pour prélever un volume de 1 mL, il faut utiliser une pipette de 1 mL ou 2 mL et non pas une pipette de 5 ou 10 mL :

- Plonger la pointe de la pipette dans la solution à prélever, aspirer le liquide jusqu'à ce qu'il dépasse la graduation supérieure. Obturer avec l'index.
- Tenir verticalement la pipette entre le pouce et le majeur, ajuster le volume de manière à ce que le ménisque soit tangent au niveau du repère de la graduation.
- Écouler progressivement la solution, en tenant la pointe de la pipette appliquée contre la paroi du récipient.

Cas des produits toxiques : on utilise une propipette adaptable à la pipette, une éprouvette graduée, un distributeur de volume automatique ou une burette.



Pipette maintenue verticalement

- b) **Éprouvette graduée** : permet de prélever divers volumes, mais avec une précision moindre.
- c) **Fiole jaugée** : permet de mesurer avec une bonne précision un volume indiqué par le trait de jauge.
- d) **Burette** : permet de délivrer divers volumes constants lors d'une titration (acide-base ou redox). Pour la lecture des volumes, le ménisque doit être tangent.
- e) **Pipettes automatiques ou micropipettes** : servent à prélever avec une bonne précision des volumes très faibles et possèdent un cône interchangeable.

Verrerie de laboratoire



Becher

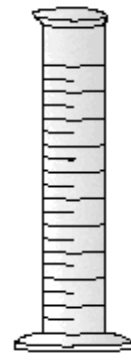


Erlenmeyer Flask

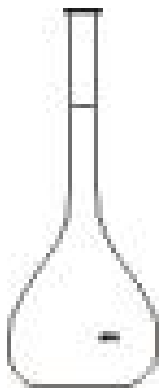
Erlenmeyer



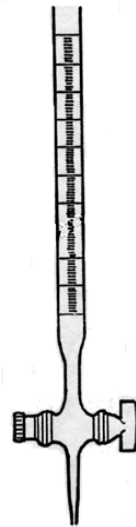
Tube à essai



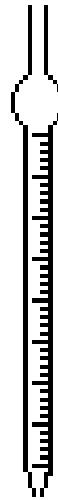
Eprouvette graduée



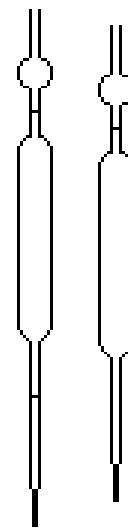
Fiole jaugée



Burette graduée



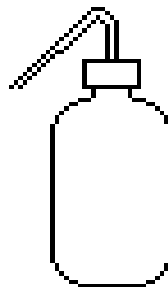
Pipette graduée



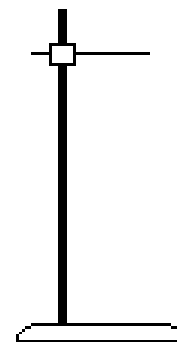
Pipettes jaugées



Entonnoir



Pissette d'eau



Statif

EXPRESSIONS DES CONCENTRATIONS

Une solution est composée d'un soluté et d'un solvant. Une concentration C d'une solution exprime sa quantité q de soluté par unité de volume V de solution $C = q / V$. Cette quantité q peut s'exprimer en :

1 – Masse :

- La concentration massique peut s'exprimer en : g/L, mg/L ou mg/mL.
- Elle peut parfois s'exprimer en pourcentage c.à.d en g/100 mL. Exemple : solution de glucose à 20 % : 20 g pour 100 g de solution aqueuse, mais comme le solvant est l'eau distillée ($d = 1$), ceci équivaut à 20 g/100 mL de solution.
- Il est toujours préférable d'exprimer les concentrations par litre, pour respecter la nomenclature internationale et qui de plus permet facilement de les transformer en l'expression en Moles/L.

Exemple : Solution de NaCl à 9 ‰ (9 pour mille) : 9 g de NaCl / 1000 mL ou mieux NaCl 9 g/L. En effet en écrivant g% ou g/1000 on peut ajouter ou oublier un zéro et transformer involontairement g % en g/1000 ou g/1000 en g %.

2 –Moles :

- La concentration molaire ou molarité : elle s'exprime en moles par litre.
- La concentration massique d'une solution est liée à sa molarité par :

$$\text{Concentration massique (g/L)} = \text{PM} \times \text{Concentration molaire (mole/L)}.$$

PM = poids moléculaire sans unité ou masse molaire en gramme/mole.

D'où

$$C \text{ mole/L} = \frac{C \text{ g/L}}{\text{PM}}$$

Exemple : soit une solution de NaCl à 9g/L, sa concentration molaire sera $C_{\text{mole/L}}$ ou $M = 9/58,44 = 0,155M$ ou 155mM, milliMolaire

Liens utiles:

- Conversion de g/L en mmol/L de la concentration du glucose dans le sang (version Fr) : <https://youtu.be/PYKygy8Adi4>
- Conversion de g/L en mmol/L de la concentration du glucose dans le sang (version Ar) : <https://youtu.be/LSU3gFGIFsl>

TP TECHNIQUES D'ANALYSE

SPECTROPHOTOMETRIE : CAS DE DOSAGE DES PROTEINES SERIQUÉ

RAPPEL THEORIQUE SPECTROPHOTOMETRIE

– Généralités

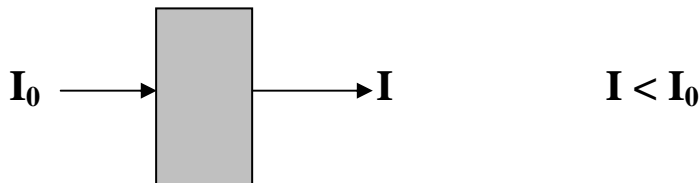
Les substances mises en solutions, confèrent à ces solutions des propriétés optiques particulières qui permettent de mesurer la nature et la quantité du corps dissous. Ainsi pour chaque corps considéré, il y a une corrélation entre corps et spectre photométrique d'absorption spécifique.

2 détections possibles :

- détection directe en UV, lumière visible. Elle permet de récupérer l'échantillon après analyse. Sensibilité de détection faible.
- Détection après une réaction colorimétrique : la coloration est caractéristique de la molécule étudiée mais l'échantillon ne peut être récupéré après l'analyse. Cette technique est beaucoup plus sensible (x1000).

– Loi de BEER-LAMBERT :

Loi fondamentale de l'absorption : lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique (c'est-à-dire de longueur d'onde fixe et définie λ) d'intensité I_0 traverse une solution homogène et d'épaisseur l , on constate que l'intensité I de la lumière transmise est inférieure à celle de la lumière incidente I_0 . On dit qu'il y a absorption.



L'absorption due au soluté dépend du nombre de molécules rencontrées par le flux lumineux, donc de la concentration C du soluté dans la solution et de l'épaisseur l de la solution traversée (trajet optique).

On définit d'après Beer-Lambert ces lois :

Transmission : exprimée en % et fonction exponentielle de la concentration C .

$$T = I/I_0 = 10^{-\epsilon IC}$$

Densité optique ou absorbance (DO) ou Absorbance :

$$DO = \log_{10} I_0/I = \epsilon IC$$

ϵ , coefficient d'extinction molaire de la substance pour une longueur d'onde λ donnée. C'est l'absorbance de la solution lorsque $l = 1$ cm et $C = 1$ mol/l et s'exprime en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Il dépend de la nature de la substance en solution et de la longueur d'onde λ du faisceau lumineux.

Ainsi la densité optique est directement proportionnelle à la concentration. La représentation graphique de la DO en fonction de la concentration est une droite passant par l'origine et dont la pente exprime le coefficient d'extinction molaire ϵ .

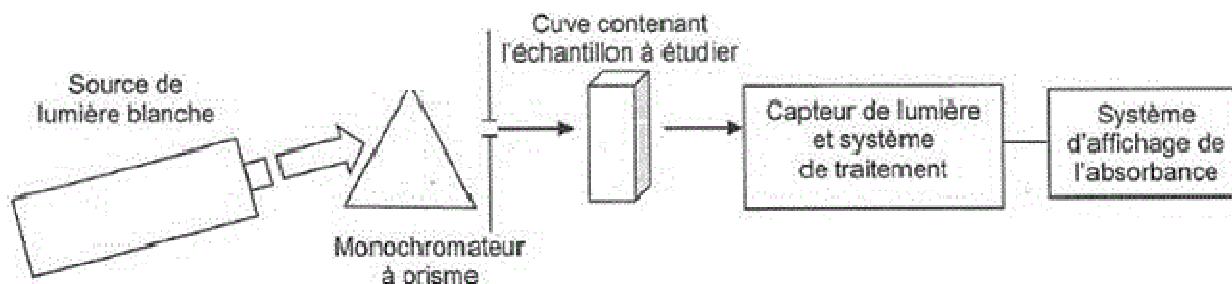


Schéma de principe d'un spectrophotomètre à prisme

Liens utiles:

- Vidéo sur la loi de Beer-Lambert (Fr): <https://youtu.be/xwSKw5er66A>
- Exercices sur la spectrophotométrie + corrigé: <http://www.takween.com/techniques/spectrophotometrie-exercices.html>

DOSAGE DES PROTEINES SERIQUES PAR LA METHODE DE LOWRY

CENERALITES

Chez l'individu, Le taux des protéines sériques étant constant dans le sang, sa variation peut traduire une défaillance fonctionnelle de l'organisme. En effet une augmentation ou diminution des protéines sériques (Albumines , Globulines), est la conséquence d'une anomalie pathologique aigue ou chronique.

Les valeurs normales en protéines totales humaines sont de 64-80g/l, les fractions protéiniques estimées par électrophorèse sur acétate de cellulose présentent Les taux suivants :

- **Albumines** : 60% (52%-67%)
- **Globulines** : 40%. ($\alpha 1$ globulines : 2,4-4,6% ; $\alpha 2$ globulines : 6,6-14,0% ; β globulines : 9,0-15,0% ; γ globulines : 9,0-21,0%)

Exemples de variations pathologiques : (Je dois faire des recherches sur internet pour approfondir mes connaissances, en utilisant les mots clés ci-dessous)

A- Hypoprotidémies dues principalement à la sérum-albumine

- Carence d'apport alimentaire : malnutrition, régime hypoprotidique
- Insuffisance d'absorption intestinale : maladie cœliaque
- Insuffisance de synthèse : insuffisance hépatique, prématurité
- Déperdition anormale
 - o par voie rénale : néphrose lipoïdique de l'enfant, syndrome néphrotique
 - o par voie digestive : mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas, entéropathies exsudatives (syndrome de Crohn).
 - o par voie cutanée : brûlures étendues

B- Hyperprotidémies portant principalement sur les immunoglobulines

- Excès de synthèse d'immunoglobulines : gammopathies poly- et mono-clonales (myélome).

Les méthodes colorimétriques les plus utilisées pour doser les protéines sont celles de Biuret, Lowry et Bradford : **Je dois faire des recherches sur le sujet**

Liens utiles:

- *Page web sur le dosage des protéines et précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium (Fr):*
<http://www.takween.com/techniques/proteines-dosage-lowry.html>

Principe

La méthode de Lowry est très sensible, elle permet de déterminer les concentrations en protéines comprises entre 0,05 mg/ml et 0,1 mg/ml. Il s'agit de la combinaison d'un traitement cupro-alcalin et de la réaction de Folin.

Le réactif de Folin (acides phosphotungstique et phosphomolybdique) réagit de façon spécifique avec certain phénol en donnant une coloration bleue spécifique.

Réactifs :

Réactif A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N.

Réactif B : tartrate de Na et K à 2% dans l'eau.

Réactif C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau

Réactif D : mélange constitué de 96 ml de réactif A, 2 ml de réactif B et 2 ml de réactif C (préparé juste avant l'emploi).

Réactif E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3.

Solution saturée de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Solution étalon de l'albumine bovine du sang à 0,2 mg/ml (BSA).

Solution F : sérum de poulet dilué 20 fois (concentration protéique inconnue).

Mode opératoire

1- Précipitation par les sels

Les globulines sériques sont séparées des albumines par précipitation au sulfate d'ammonium (relargage). Elles précipitent à 50% de saturation (***Je fais des recherches précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium***)

- Réaliser le test comme c'est décrit dans le tableau ci-dessous

	Tube 1 (Témoin)	Tube 2 (Essai)
Sérum dilué	0 ml	4 ml
Eau distillée	4 ml	0 ml
Sulfate d'ammonium	4 ml	4 ml

- Ajouter goutte à goutte, 5 ml d'une solution saturée en sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) tout en agitant lentement le tube maintenu dans la glace. Laisser précipiter 20 minutes.
- Centrifuger à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le précipité contient les globulines. Les albumines restent dans le surnageant.
- Eliminer le surnageant et égoutter le tube sur du papier filtre.
- Dissoudre le précipité dans 4ml d'eau distillée en agitant vigoureusement. On utilisera 1ml de cette solution (solution H) pour doser les globulines.

2- Dosage des protéines sériques totales

- Réaliser le test comme c'est décrit dans le tableau ci-dessous

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution de SAB à 200 microgramme/ml (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8				
Sérum dilué (ml)						0,5	0,8		
Solution H (culot) (ml)								0,5	0,8
Eau distillée	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,3	0	0,3	0
Sol. cupro alcaline (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Attendre 10 mn									
Réactif de Folin (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

- Incuber 30 minutes à l'obscurité
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm

Résultats et discussion : Compléter la fiche compte rendu ci-joint

Compte rendu Tp techniques d'analyse Spectrophotométrie : cas du dosage des protéines

Nom	Prénom	Note	Date :	
				Groupe :
				Paillasse :

Réaction de Lowry : calcul des concentrations de protéines dans le sérum de poulet

1. Remplir le tableau suivant en donnant un exemple détaillé de calcul de la qualité de SAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO									
SAB en microgramme									

.....

- Tracer la courbe étalon sur papier millimétré, en déduire les quantités de protéines des tubes 6 à 9
- Donner la concentration en mg/ml des protéines dans les solutions de sérum et de culot utilisées directement dans l'expérimentation
- Déterminer la concentration en mg/ml des globulines dans le sérum de poulet
- Calculer la concentration en mg/ml des albumines dans le même sérum
- Déterminer la concentration en mg/ml des protéines totales
- Quel est l'intérêt du dosage des protéines du sérum pour le diagnostic clinique ?

(Vous pouvez utilisé le verso de la fiche indiquer le numéro des réponses)

.....

Liens utiles:
 Contrôle type TP: <http://www.takween.com/techniques/biochimie-techniques-S3-2015-contrôle.pdf>