

BROCHURE DE TRAVAUX PRATIQUES

TECHNIQUES D'ANALYSES BIOLOGIQUES

**CCM- Chromatographie sur colonne-
HPLC- SAM-Centrifugation-Electrophorèse**

Dr. Widad KEBSA

**Destinés aux étudiants en :
Pharmacologie Expérimentale- Biochimie -
Biologie Moléculaire**

Année universitaire : 2024-2025

TP N° 1: SEPARATION ET IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.

1. But : Le but de ce TP est d'apprendre à réaliser une chromatographie sur couche mince, de séparer et d'identifier les acides aminés d'un échantillon inconnu.

2. Principe : La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Elle dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Cette vitesse peut s'exprimer par le calcul du rapport frontal (R_f): $R_f = d/D$ avec
d : distance parcourue par le composé **D** : distance parcourue par le front du solvant

3. Matériel et méthodes

Réactifs utilisés:

- **Phase mobile:** butanol, acide acétique, eau (4/1/5, V/V/V)
- **Révélateur :** ninhydrine à 1% dans l'acétone dans un pulvérisateur.
- **Echantillon à analyser :** jus d'orange ou mélange d'acides aminés,
- solution à 2g/l des acides aminés : tyr, lys, ala, glycine, proline, comme acides aminés de référence (étalon).

Matériel : plaque CCM, cuve à chromatographie, hotte, four à 80° pour la révélation, micropipettes ou capillaires et sèche-cheveux.

Mode opératoire

1. Placer la phase mobile dans la cuve sur une hauteur de 1 cm, fermer hermétiquement et laisser saturer pendant 15mn.
2. Tirer un trait de crayon sur la cellulose de la plaque à 2 cm du bord et parallèlement à lui sans arracher le matériau et sans le toucher avec les doigts.
3. Déposer une microgoutte de chaque échantillon sur le trait à 1 cm du bord de la plaque en laissant 1cm entre les dépôts. Faire le dépôt rapidement et sans appuyer de façon à ce que la tache formée n'excède pas 2 mm de diamètre. Prendre soin de ne pas arracher la cellulose avec le capillaire. sécher les taches à l'aide d'un sèche-cheveux.

4. Placer la plaque dans la cuve à chromatographie contenant la phase mobile. Le solvant ne doit pas atteindre la ligne de dépôt.
5. Laisser le développement se poursuivre jusqu'au trait tracé en haut de la plaque.
6. Sortir la plaque avec des pinces et la sécher avec un sèche-cheveux (air froid).
7. Révélation.

Mettre des gants et un masque pour la révélation et manipuler les plaques à la pince. Pas de flamme (acétone). La ninhydrine est cancérogène : prendre les précautions d'usage.

Sous hotte, pulvériser le révélateur (la ninhydrine) rapidement, sur toute la surface de la plaque puis laisser évaporer l'essentiel du solvant sous la hotte. Finir au sèche-cheveux chauffant (ou placer à l'étuve à 80°C et surveiller pour ne pas "cuire" les plaques) jusqu'à apparition des tâches.

4. Résultats et interprétations

- Observer, cercler les taches (les spots de couleur violette) et pointer leur centre.
- Calculer les R_f des échantillons déposés.
- Identifier les acides aminés du mélange.

TP N° 2 : Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe par Chromatographie sur colonne

La technique de **chromatographie sur colonne** repose sur le même principe que la chromatographie sur couche mince : les espèces chimiques à séparer sont plus ou moins entraînées par un éluant sur une phase fixe :

- La phase fixe est un solide, le plus souvent de la silice ou de l'alumine remplissant une colonne ;
- L'échantillon est déposé en haut de la colonne. La séparation des espèces chimiques est obtenue par l'écoulement continu d'une phase mobile (l'éluant) à travers la colonne;

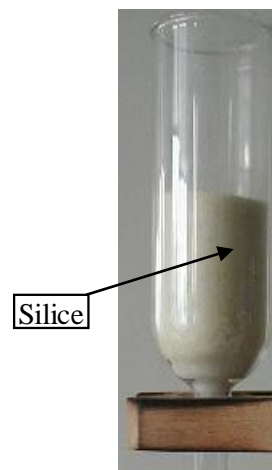
La séparation est basée sur une différence de vitesses d'entraînement des espèces chimiques vers le bas de la colonne. L'objectif de ce TP est donc de séparer les constituants colorés d'un sirop de menthe (colorants alimentaires : le E102 jaune et le E131 bleu) puis de montrer l'intérêt de la chromatographie sur colonne *vis à vis* de la chromatographie sur couche mince.

I. Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe

☞ Préparation de la colonne (phase fixe) (remplissage par voie sèche)

L'opération de remplissage de la colonne conditionne l'efficacité de la séparation. Il ne faut pas qu'il y ait de bulles ou de zone sans phase stationnaire car on aurait alors des chemins préférentiels nuisant à une bonne séparation des composés. Pendant la phase d'élution avec le solvant on veillera également à ne pas assécher la partie supérieure de la phase fixe.

- Fixer verticalement la colonne à l'aide d'une pince ;
- Déposer un petit morceau de coton dans le bas de la colonne ;
- Peser environ 5 g de silice ;
- Introduire la silice dans la colonne ;
- Tapoter la colonne afin d'obtenir une surface plane de silice ;
- Placer un bécher sous la colonne ;
- Introduire doucement de l'eau distillée (à l'aide d'une pipette par écoulement de long de la paroi de la colonne). Ajouter une quantité d'eau suffisante pour être environ à 2 cm au-dessus de la surface plane de la silice.



☞ Dépôt de l'échantillon à séparer

- Déposer très doucement à l'aide d'une pipette, sans toucher les parois de la colonne, l'échantillon de sirop de menthe : attention à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire pendant cette opération ;
- Lorsque le sirop de menthe a pénétré à la surface de la phase stationnaire, éluer avec l'eau en remplissant la colonne ;
- Lorsque le premier colorant arrive en bas de la colonne le récupérer dans une première cuve ;

Eluer ensuite avec un autre éluant : un mélange d'éthanol + eau salée (70/30).

- Lorsque le second colorant parvient en bas de la colonne, le récupérer dans une seconde cuve.
Quel est l'intérêt de ce type de chromatographie par rapport à celle sur couche mince ?

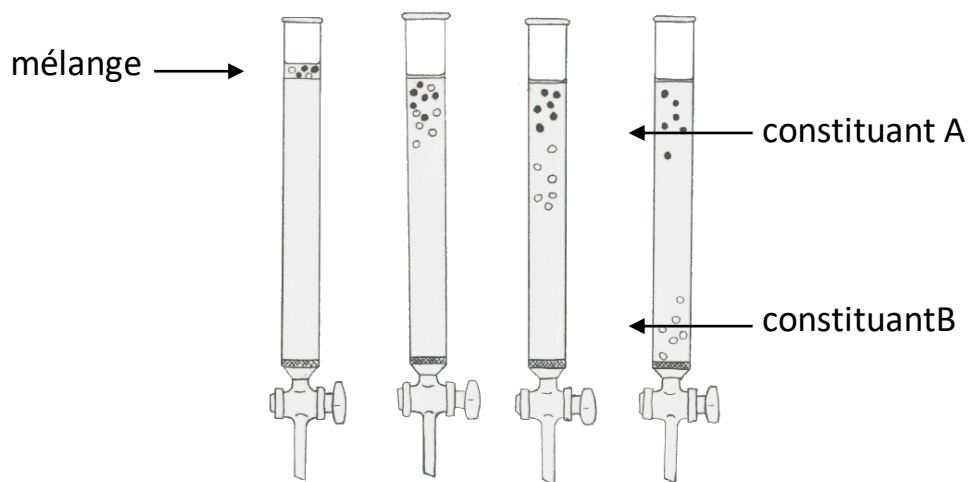
II. Analyse spectrophotométrique des colorants

A l'aide d'un spectrophotomètre, on souhaite tracer les spectres d'absorption $A=f(\lambda)$ du sirop de menthe et des 2 colorants issus de la séparation précédente.

Réaliser ce spectre en tenant comptes des remarques suivantes :

- Faire varier la longueur d'onde entre 400 et 720 nm
- Une dilution des solutions sera éventuellement nécessaire si la valeur maximale mesurable par le spectrophotomètre est atteinte (balayer rapidement la gamme de longueur d'onde puis observer la valeur maximale de l'absorbance)
- Le réglage du zéro se fera sur de l'eau distillée. Il est indispensable de le faire pour toutes les longueurs d'ondes.
- Tracer à l'aide les 3 courbes sur une même fenêtre (fenêtre 1). (le sirop de menthe, E102 et le E131).
- Interpréter les courbes obtenues. Sont-elles conformes à ce que l'on pouvait prévoir ? Interpréter chacune d'elle.

Dans une chromatographie sur colonne on peut recueillir les constituants séparément en bas de la colonne :



Dans le sirop de menthe, le colorant jaune E102 est recueilli en premier : il est plus entraîné par l'eau et moins adsorbé par le gel de silice que le colorant cyan E131.

TP N° 3 : DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTEINES SERIQUES (MTHODES DE BRADFORD ET DE BIURET)

- 1. But :** Le but de ce TP est d'apprendre à réaliser une courbe d'étalonnage, de réaliser un dosage colorimétrique des protéines sériques en adoptant 2 méthodes différentes ; la méthode de Bradford et celle de Biuret et de comparer la sensibilité des 2 méthodes.
- 2. Principe :** Les méthodes colorimétriques les plus courantes pour le dosage des protéines sont: Bradford, Biuret et Lowry. Le tableau ci-dessous résume le principe, la sensibilité, les variations et les interférences de ces 3 méthodes.

Méthode	Bradford	Biuret	Lowry
Référence	Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248 - 256	Gornall et al. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751	Lowry et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 251
Réactif	Le bleu de Coomassie (s'adsorbe sur le verre des cuves qu'il faut nettoyer fréquemment)	Le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$)	Le biuret et le réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate - 1927)
Groupe réactifs	Réaction avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques	Formation d'un complexe pourpre avec la liaison peptidique en présence de cuivre à pH basique	Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la Tyr et le Trp et, dans une moindre mesure, avec la Cys, l'His et la liaison peptidique
λ mesure	595 nm (bleu de Coomassie seul : 465 nm)	545 nm (ou 300 nm)	745 nm
Sensibilité	Elevée (seuil = 1 μg)	Faible (seuil = 100 μg)	Elevée (seuil = 1 μg)
Rapidité et complexité	Méthode simple et très rapide	Méthode simple et moyennement rapide	Méthode moyennement simple et moyennement rapide
Interférence	Dosage peu influencé par la présence d'autres molécules sauf les détergents et les bases fortes	Dosage influencé par les autres solutés	Dosage fortement influencé par les autres solutés.
Variation d'une protéine à une autre	Forte : la protéine de référence (l'albumine de sérum bovin ou BSA, "Bovine SerumAlbumin") est une protéine globulaire peu représentative de l'ensemble des protéines.	Faible : la formation du complexe est à peu près équivalente pour toutes les protéines puisque le biuret réagit avec la liaison peptidique	Forte

- 3. Mode opératoire :** Ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéine standard; la BSA (Albumine de Sérum Bovin); On utilise le Bleu brillant de coomassie (BBC) comme réactif pour la méthode de Bradford et le réactif de Gornall pour la méthode de Biuret.

3.1. BRADFORD

	Courbe d'étalonnage : BSA						Echantillons : Sérum			
Tubes	1	2	3	5	6	7	Tubes	S1	S2	S3
BSA (μl)	0	25	50	100	150	200	Sérum (μl)	200	200	200
Eau physiologique (μl)	200	175	150	100	50	0	Eau physiologique (μl)	0	0	0
Réactif de BBC (ml)	2	2	2	2	2	2	Réactif de BBC (ml)	2	2	2

Après agitation. Attendre 5 min. Lire les absorbances à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. E1, E2, E3: échantillon de sérums utilisés.

3.2. BIURET

	Courbe d'étalonnage : BSA						Echantillons : Sérum			
Tubes	1	2	3	5	6	7	Tubes	S1	S2	S3
BSA (μl)	0	25	50	100	150	200	Sérum (μl)	200	200	200
Eau physiologique (μl)	200	175	150	100	50	0	Eau physiologique (μl)	0	0	0
Réactif de Gornall (ml)	2	2	2	2	2	2	Réactif de Gornal (ml)	2	2	2

Après agitation ; Attendre 20 à 30min à l'obscurité, à température ambiante. Mesurer l'absorbance à 540 nm contre un blanc réactif. E1, E2, E3: échantillon de sérums utilisés.

4. Calcul

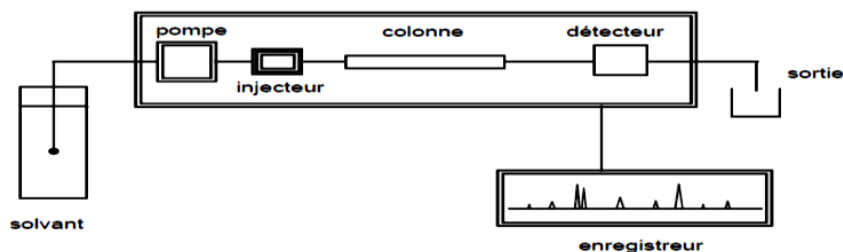
4.1. Caractéristiques de la méthode: pour les 2méthodes Bradford et Biuret.

- Etablir un tableau complet de colorimétrie pour les 2méthodes.
- Tracer la courbe d'étalonnage : $DO = f(c(SAB))$
- Analyser l'allure de la courbe.
- Déterminer la sensibilité de la méthode (préciser les unités)
- Déterminer le seuil de détection et le seuil de quantification de la méthode.
- Faites une comparaison entre les 2méthodes.

4.2. Dosage des protéines: Déterminer la concentration des protéines dans les sérums utilisés par les 2méthodes. Analyser, commenter et comparer les résultats des 2 méthodes.

TP N° 4 : Quantification des sucres dans de miel et le jus d'orange par HPLC.

1. Appareillage:



2. Conditions opératoires :

- Phase mobile : Acétonitrile / Eau dégazée : CH_3CN (85V)/ H_2O (15V)
- Débit : 2 ml/min
- Température de la colonne : ambiante.
- Détecteur : UV-VS 190nm.
- Volume injecté : 20 μl .
- Temps écoulé : 20 min.

2. Solutions Standards:

- Glucose 7.5 mg/ml, 15mg/ml et 30mg/ml dans l'eau bi-distillée.
- Fructose 7.5 mg/ml dans l'eau bi-distillée
- Saccharose 7.5 mg/ml l'eau bi-distillée
- Maltose 7.5 mg/ml l'eau bi-distillée

3. Echantillons:

- 1 g du miel dans 50 ml d' l'eau bi-distillée.
- 2 ml de jus d'orange dilué jusqu'à 50 ml de l'eau bi-distillée.

4. Injection des standards et des échantillons :

- Après préparation des échantillons et des étalons, on procède à la filtration des solutions en utilisant un filtre de 0.2 μm (Système de filtration sous vide).
- pour l'injection, les échantillons sont introduits avec une micro-seringue à la pression atmosphérique, dans un injecteur à boucle d'échantionnage de 20 μl .

5. Résultats :

Après injection des étalons et des échantillons différents chromatogrammes (pics) seront obtenus :

- Identifier les différents sucres dans les 2 échantillons miel et jus d'orange.
- Etablir une courbe d'étalonnage pour le glucose (variation : log (air de pic) en fonction de la concentration).
- Déterminer la concentration du glucose dans le miel et le jus d'orange.

TP N° 5: Fractionnement des composants cellulaires par centrifugation


But du TP


On se propose dans le cadre de ce TP d'appliquer une technique de laboratoire simple qu'est la centrifugation pour faire le fractionnement des composants cellulaires sur la base d'un gradient de concentration de saccharose. Pour ce faire nous utiliseront comme matériel biologique un tissu végétal (laitue, épinard, menthe, tomate, carotte)/et ou un tissu hépatique (foie de bœuf) pour isoler essentiellement les noyaux et les chloroplastes des autres organites cellulaires. La vitesse de sédimentation d'une particule sera fonction de la différence entre sa densité et celle du milieu ambiant du gradient de densité.

Matériel et produits chimiques

Centrifugeuse, godets, mortiers et verrerie courante, solution de saccharose à 3%, 5%, 30%, et 70%, eau distillée, échantillons: laitue, menthe, épinard, tomate, carotte.

Manipulations et aspect pratique

 **Préparation des échantillons :** On procède au broyage des échantillons dans un mortier à l'aide de la solution de saccharose à 3% puis on procède à une filtration sur un morceau de gaze. Les filtrats des tissus sont ensuite recueillis dans des tubes à centrifuger.

 **Equilibrage des tubes :** Les poids des tubes qui sont face à face dans le rotor doivent être identiques. On parle alors d'équilibrer les tubes à centrifuger. Si on emploie une ultracentrifugeuse, la précision de la pesée est encore plus critique (utilisation d'une balance analytique).

Centrifugation

1. On centrifuge 2000 tr/mn durant 10mn.
2. Rejeter le surnageant et ajouter 2ml de saccharose à 3% au culot et agiter
3. Prélever 0.5ml de ce mélange et l'introduire dans un autre tube contenant un gradient de concentration : 1.5 ml de saccharose à 5%, 1.5ml saccharose à 30% et 1.5 ml saccharose à 70%.
4. Après centrifugation à 6000tr/mn pendant 10 mn, les organites subcellulaires atteignent leurs positions d'équilibre.

Résultats

1. Prélever à chaque fois une fraction du culot et du surnageant pour observation microscopique (fixation par la chaleur, coloration dans une goutte de vert de méthyle-pyronine).
2. Observez la position des différentes fractions ou bandes obtenues après centrifugation ainsi que leur couleur.
3. Discuter vos résultats.