



## TP – Etudes des acides aminés, peptides et protéines

### 1. Réactions colorées des protéines et des acides aminés

Ces réactions seront faites sur le blanc d'œuf :

- 1- Pour pipeter facilement du blanc d'œuf, il faut d'abord le battre avec un petit agitateur pour séparer les chalazes.
- 2- Pour avoir une solution de blanc d'œuf dilué convenablement, prendre 5 ml de blanc d'œuf battu et les diluer à 100 ml avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 1%.

#### 1.1- Réaction xanthoprotéique

- Dans un tube à essai, mettre 3 ml de blanc d'œuf dilué. Ajouter 1 ml d'acide nitrique concentré. Il apparaît un précipité blanc, c'est un précipité de protéines (action des acides forts) ;
- Faire bouillir pendant une minute. Le précipité devient jaune et se dissout partiellement en donnant une solution jaune.

#### Résultat

- Refroidir sous l'eau du robinet puis ajouter goutte à goutte de l'ammoniaque ou de la soude concentrée. La couleur devient orangée. (La réaction dépend de la présence d'acides aminés benzéniques, comme la tyrosine, le tryptophane, la phénylalanine. La coloration est due à la formation d'un dérivé benzénique nitré).

#### 1.2 - Réaction du biuret

- Dans un tube à essai, ajouter 3 ml de blanc d'œuf dilué, 1 ml de soude à 40%. Mélanger puis ajouter goutte à goutte une solution de sulfate cuivrique à 1%.

#### Résultat

- Il apparaît une coloration variant du rouge au violet plus au moins foncé. La couleur rouge est due à la présence de liaisons peptidiques (au moins deux, portées par 2 C différents).
- Cette couleur rouge est modifiée plus au moins selon les conditions, par une coloration bleue due à la formation au niveau des groupes aminés libres, d'amino-complexes cuivriques bleus.
- Lorsque les deux espèces de composés cuivriques sont réalisées, la coloration est violette. Il est important de ne pas ajouter trop de sulfate cuivrique. La couleur bleue ainsi produite empêcherait d'apprécier la coloration violette.

#### 1.3 - Réaction du soufre

- Mettre dans un tube à essai un peu de blanc d'œuf non dilué.
- Ajouter un peu de solution de soude à 40%.
- Faire bouillir pendant 2 minutes, puis ajouter 6 à 8 gouttes de  $H_2SO_4$  1/4.
- Faire bouillir à nouveau en présentant en haut du tube un papier imbibé d'une solution d'acétate de Pb.

#### Résultat

Lors de l'ébullition en présence de soude, du soufre est libéré (provenant en grande partie de la cystine et de la cystéine) sous forme de sulfure de sodium  $Na_2S$  qui est libéré à chaud par  $H_2SO_4$  1/4 sous forme de  $SH_2$  (sentir le haut du tube) qui donne avec l'acétate de Pb du sulfure de Pb noir.

#### 1.4 - Réaction de Molisch

- Dans un tube à essai, ajouter à 5 ml de blanc d'œuf dilué, 10 à 15 gouttes d'une solution d' $\alpha$ -naphtol à 1% dans l'alcool (réactif de Molisch).
- Mélanger. Laisser couler avec précaution le long de la paroi du tube maintenu incliné, 5 ml environ d'acide sulfurique concentré.

#### Résultat :

- L'acide va au fond du tube et il apparaît un anneau violet à sa surface (dû à la présence de glucosamine).
- L'action de l'acide sulfurique sur la glucosamine donne lieu à la formation de furfural. Le furfural en présence d'acides forts, se condense avec l' $\alpha$ -naphtol pour donner un composé coloré).

#### 1.5 - Réaction d'adamkiewicz

- Mettre dans un tube à essai, 2 ml de blanc d'œuf dilué, ajouter 4 ml d'acide acétique concentré et mélanger.
- Verser avec précaution, le long de la paroi du tube maintenu incliné, 2 ml d'acide sulfurique concentré.

#### Résultat :

- Il se forme un anneau violacé au niveau de la surface de séparation des deux liquides.
- Si on agite, la coloration violette diffuse dans toute la masse. Cette réaction est due à la présence du tryptophane. L'acide acétique n'intervient pas dans la réaction. C'est l'acide glyoxylique que contient l'acide acétique (impureté) qui intervient. Il réagit avec le tryptophane pour donner des produits colorés.

## 2. Caractérisation des acides aminés

- Les acides aminés présents dans les êtres vivants sous forme libre ou combinés en protéines et peptides peuvent être détectés par voie chimique.
- A titre d'exemples, voici quelques réactions caractéristiques de l'ensemble de ces corps, d'un groupe ayant une même propriété ou d'un seul acide aminé.

### 2.1- Test de la ninhydrine

Commun à tous, il donne une coloration nuancée selon les acides aminés. D'autres corps à fonction  $-NH_2$  réagissent ou ne réagissent pas (sels d'ammonium, amines, urée).

- Dans un tube à essai, mélanger : 5 ml d'acide aminé  
3 ml d'eau  
1 ml de ninhydrine 0,1% (alcool)
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 3 mn,
- Noter la coloration,

Essai à faire sur la glycine, la proline et l'urée.

### 2.2- Test xanthoprotéique

- Il indique la présence d'acide aminé aromatique. Essai à faire sur la glycine, la tyrosine ou le tryptophane ou la phénylalanine.
- Noter les différences observées avec la réaction faite sur une protéine.

### 2.3- Test de l'isatine

Il caractérise la proline.

- Mélanger dans un tube à essai : 20 mg de proline, 5 ml de  $CH_3COOH$  et 1 mg d'isatine,
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5 mn
- Noter la coloration obtenue. Faire un essai comparatif avec la glycine.

### 2.4- Test du nitrite mercurique

Caractérise la tyrosine.

- Mélanger dans un tube à essai : 1 mg de tyrosine, 1 ml d'eau et 2 gouttes de réactif de Millon,
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 1 mn
- Noter la coloration obtenue Faire un essai comparatif avec la glycine.

### 2.5- Test de l'acide glyoxylique

Caractéristique du tryptophane, c'est la réaction d'Adamkiewicz :

- Mélanger dans un tube à essai : 5 mg de tryptophane, 2 ml d'eau et 2 à 5 gouttes de réactifs d'Hopkins-Cole-Benedict (Glyoxylate de Mg)
- Incliner le tube et verser 2 ml de  $SO_4H_2$  en évitant le mélange avec la solution,
- Chauffer 2 mn au bain-marie bouillant,
- Noter la coloration obtenue Faire un essai comparatif avec la glycine.

## 2.6- Test de l'ophtalaldéhyde

Caractérise la glycine.

- Mélanger dans un tube à essai : 5 mg de glycine, 2 ml du tampon phosphate pH = 8 et 5 ml de réactif,
- Laisser 2 mn au repos
- Ajouter 5 ml d'une préparation fraîche de 5 ml d'éthanol + 1 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , agiter fortement pendant 30 secondes,
- Ajouter 15 ml de chloroforme,
- Noter la coloration obtenue.

## 3 - Dosage colorimétrique de l'alanine

### Principe

La réaction à la ninhydrine est une réaction colorée permettant l'identification et le dosage des acides aminés. Grâce à son pouvoir oxydant, la ninhydrine peut désaminer et décarboxyler l'acide aminé. Le composé formé présente une coloration violette dont le spectre d'absorption possède un maximum à 570 nm. La coloration est proportionnelle à la quantité d'acide aminé. On établit à partir d'une gamme étalon une courbe qui permet de traduire la relation entre la D.O et la concentration.

### Préparation de la gamme d'étalonnage (voir tableau)

Dans 5 tubes propres et secs, placer :

- 0 à 1 ml de solution standard d'alanine (20  $\mu\text{g}$  / ml), compléter à 1 ml avec de l'eau distillée.
- 1 ml de réactif à la ninhydrine
- Le blanc (tube 0) sera réalisé en remplaçant la solution standard d'alanine par de l'eau distillée.
- Mélanger soigneusement puis placer les tubes bouchés 15 min au bain-marie bouillant.
- Refroidir sous un courant d'eau froide puis ajouter dans chaque tube 5 ml d'eau distillée, agiter au vortex et lire la D.O. à 570 nm.

### Tableau du dosage

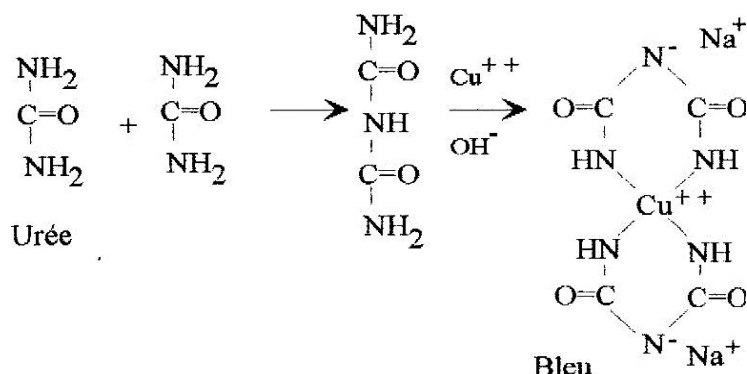
Tube	0	1	2	3	4	Solution à doser X1 , X2
Solution D'Ala (ml)	0 (ml)	0,25 (ml)	0,5 (ml)	0,75 (ml)	1 (ml)	0,5 (ml)
	0 ( $\mu\text{g}$ )	5 ( $\mu\text{g}$ )	10 ( $\mu\text{g}$ )	15 ( $\mu\text{g}$ )	20 ( $\mu\text{g}$ )	? ( $\mu\text{g}$ )
H <sub>2</sub> O distillée (ml)	1	0,75	0,5	0,25	0	0,5
Ninhydrine (ml)	1	1	1	1	1	1
H <sub>2</sub> O distillée (ml)	5	5	5	5	5	5

### Mesure de l'absorbance

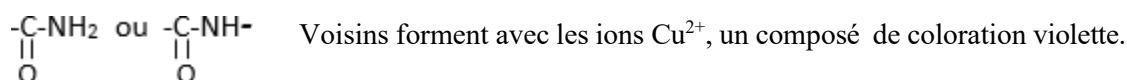
L'absorbance des tubes est mesurée contre le blanc de la gamme à 570 nm, la coloration est stable environ 30 mn.

### Dosage des protéines par la méthode du Biuret (sensibilité 1 – 10 mg protéines/ml)

Le Biuret résulte de la condensation (à haute température) de deux molécules d'urée, et qui, en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  en milieu alcalin, donne un composé bleu :



En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements :



Cette réaction est qualitative et quantitative :

- Qualitative : puisque le maximum d'absorption de la coloration varie avec le nombre de liaisons peptidiques présentes dans la molécule.
  - Dipeptide                      630-650 nm
  - Tripeptide                     580 nm
  - Polypeptide                  530-540 nm
- Quantitative : parce que l'intensité de l'absorption est proportionnelle à la concentration protéique

#### ➤ Réactifs

- Protéine étalon (E) de titre connu.
- Protéine de concentration inconnue
- Réactif de Biuret :
  - Dissoudre 3 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) et 9 g de tartrate double de sodium et de potassium dans 500 ml d'eau distillée.
  - Ajouter en agitant 300 ml d'une solution de soude (NaOH) à 2,7%.
  - Ajouter 5 g d'iodure de potassium (KI) et compléter à 1 litre par de l'eau distillée. Le réactif obtenu est stable ; toutefois s'il apparaît un précipité, il doit être rejeté.
- Eau physiologique (solution de NaCl à 9 g/l)

#### ➤ Préparation de la gamme étalon et dosage des protéines

On dispose d'un sérum E à 6 mg/ml de protéines. Dans 16 tubes à essais, préparer les solutions suivantes :

- 6 tubes serviront pour la gamme étalon (E)

- 2 tubes pour l'échantillon X

	Blanc	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	Echantillon X1 et X2
Solution protéique	0	0,5	1	1,5	2	3	3
NaCl 9‰	3	2,5	2	1,5	1	-	-
Volume total en ml	3	3	3	3	3	3	3

- Ajouter 3 ml de réactif de Biuret dans chaque tube. Mélanger, laisser la coloration se développer pendant 10 mn.
- Lire la D.O. au spectrophotomètre à 540 nm après avoir réglé le "0" de l'appareil avec le blanc.
- Tracer la courbe : DO en fonction de la concentration protéique (mg/ml)
- Déterminer la concentration protéique de l'échantillon X en mg/ml

## TP – Chromatographie

### 1. Introduction

La chromatographie a pour but de séparer et de caractériser les divers constituants d'un mélange. Elle repose sur le principe suivant : soit une solution d'une molécule M dans un solvant S. Supposons que cette solution s'écoule à travers un espace vide : les molécules M et S se déplacent à la même vitesse et aucune séparation n'a lieu.

Supposons maintenant que l'espace soit rempli d'une phase quelconque, non miscible avec le solvant S et pour laquelle les molécules M ont une affinité plus grande que celle des molécules S. Les interactions entre les molécules M et la phase vont retarder ces molécules par rapport à celles du solvant, les molécules M vont donc prendre une vitesse propre qui sera caractéristique. Si la solution contient plusieurs types moléculaires M1, M2, M3, ces trois types vont migrer à des vitesses différentes. Chaque type pourra être caractérisé par sa vitesse de migration. En outre chaque type pourra être recueilli séparément et un fractionnement en résultera.

Selon le procédé physique de séparation utilisé, on distingue :

- La chromatographie de partage
- La chromatographie d'absorption
- La chromatographie par échange d'ions
- La chromatographie d'affinité
- La chromatographie d'exclusion

Nous verrons dans cette manipulation un exemple de chromatographie de partage en faisant une chromatographie sur papier d'acides aminés (un mélange d'acides aminés à analyser et des acides aminés témoins)

### 2- La chromatographie de partage

Il y a dans ce cas, partage des molécules d'un mélange entre deux phases liquides non miscibles, dont l'une est immobile et l'autre mobile.

- La phase stationnaire liquide (en général l'eau) est retenue sur un support inerte.
- La phase mobile peut être liquide (cas de la chromatographie sur papier) ou gazeuse (cas de la chromatographie en phase gazeuse).

Les constituants du mélange se répartissent selon leur coefficient de partage q :

$$q = \frac{\text{Concentration d'une substance dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration de cette substance dans la phase mobile}}$$

Cette substance se déplacera d'autant plus vite qu'elle est soluble dans la phase mobile, d'autant moins vite qu'elle est plus soluble dans la phase stationnaire. On la caractérise pour des conditions expérimentales précises (support et couple phase stationnaire-phase mobile déterminées) par son  $R_f$  :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

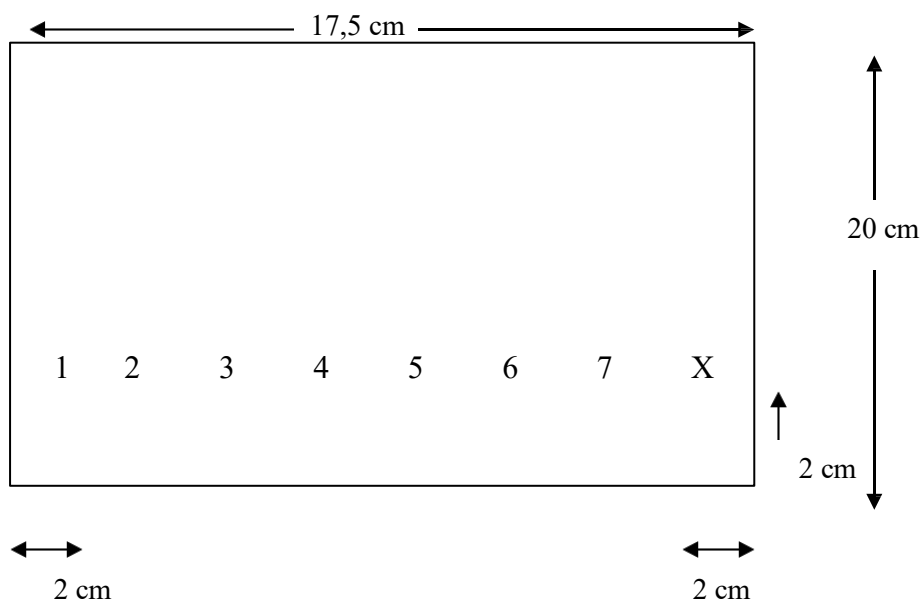
L'identification des constituants d'un mélange pourra se faire par comparaison avec le  $R_f$  des substances connues. En réalité il n'est pas facile d'obtenir des  $R_f$  tout à fait reproductibles. Il existe une relation simple entre le  $R_f$  et le coefficient de partage.

### 3- Partie pratique : Chromatographie ascendante d'acides aminés sur papier

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

#### 3.1- Préparation du chromatogramme

- Prendre une bande de papier Whatmann N°1 de 20 x 17,5 cm comme suit :



- A l'aide d'une pipette à chromatographie, faire un dépôt de 5  $\mu$ l à partir de chaque solution.
- Placer le chromatogramme dans la cuve de migration durant environ 3 heures (15 cm environ de déplacement du solvant)

Les solution témoins sont à la concentration 0,025M de : Pro (Met), Ala, Glu, Arg, Val, Leu, Gly

#### 3.2- Préparation du solvant

Préparer le mélange suivant :

- |                  |       |
|------------------|-------|
| - Chloroforme    | 40 ml |
| - Méthanol       | 40 ml |
| - Ammoniaque 1/2 | 20 ml |

### 3.3- Révélation

- Après une migration d'environ 3 heures, sécher le chromatogramme dans un courant d'air Frais ou sous la hotte puis à 100-105°C dans une étuve.
  - Révéler ensuite les acides aminés avec une solution de ninhydrine à 0,2% dans l'alcool éthylique 95°.
  - Sécher de nouveau le chromatogramme à l'étuve 100-105°C
  - Entourer immédiatement les spots obtenus par un trait de crayon.
  - Calculer les  $R_f$  des différents spots et en déduire les constituants du mélange X
- Commenter et discuter les résultats obtenus

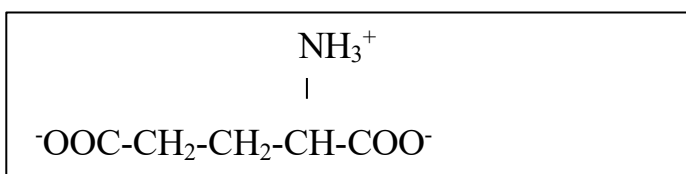
## TP – ELECTROPHORESE

### Introduction

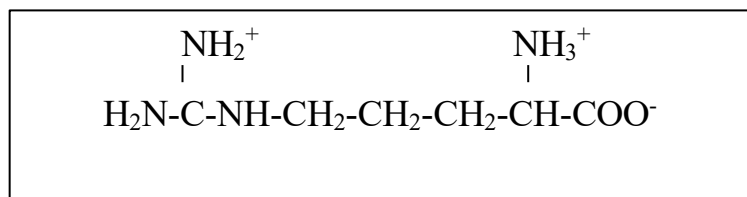
Dans un champ électrique continu, les molécules ionisées sur un support ; comme une feuille de papier imprégnée d'une solution tampon de pH donné, migrent vers la cathode ou l'anode suivant leur charge à ce pH.

**Par exemple, dans un tampon pH5,9 :**

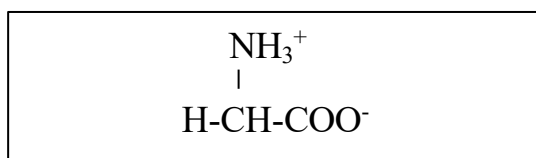
\* L'acide glutamique est sous forme anionique : il migre vers l'anode.



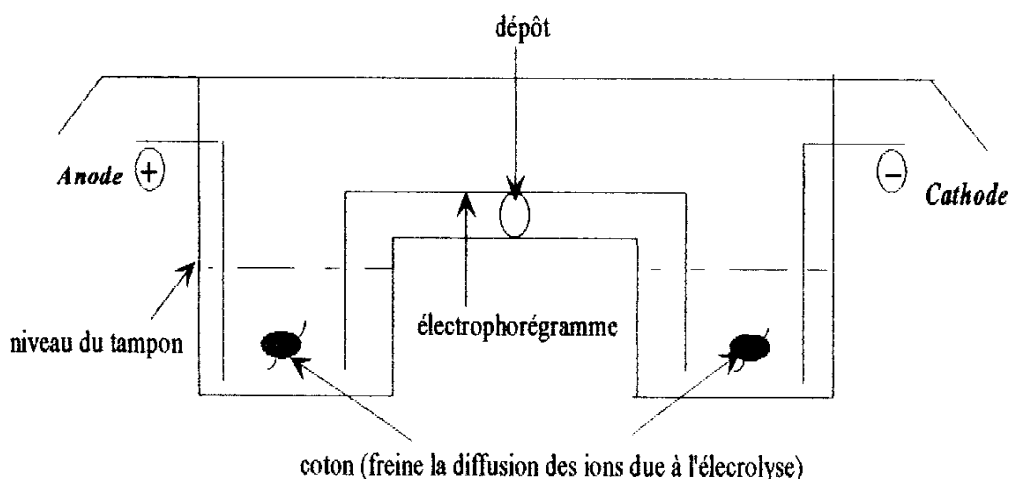
\* L'arginine est sous forme cationique : elle migre vers la cathode.



\* La glycine, par contre, elle a un  $\text{pH}_i = 5,9$  ; elle est sous forme zwitterion : elle ne migre pas.



En fait, les molécules électriquement neutres peuvent être déplacées légèrement vers la cathode sous l'effet de phénomènes secondaires.



### Montage :

## 1. Facteurs influençant les migrations

Nous avons vu l'importance du pH mais il nous faut envisager d'autres facteurs.

### 1.1- Influence des ions

La concentration et la nature des ions de la solution tampon sont caractérisées par sa force ionique ( $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ ;  $c_i$  = concentration ionique,  $z_i$  = valence des ions). La mobilité des ions, c'est à dire, la vitesse de déplacement des ions, décroît quand la force ionique croît.

### 1.2- Influence de la température

Le papier imbibé de tampon soumis à une d.d.p., est le siège d'un effet joule qui élève la température et provoque une certaine évaporation. Celle-ci est la plus importante au centre de la feuille de papier. Cette évaporation est compensée par une migration de tampon des bacs à tampon vers le centre de la feuille. Ce phénomène est appelé rhéophorèse.

### 1.3- Influence du papier

Dans le champ électrique, le papier filtre se trouve chargé négativement par filtration d'ions négatifs du tampon. L'excès de charges positives ainsi créé va provoquer une migration globale de tampon de l'anode vers la cathode, et ceci quelque soit le tampon utilisé ; c'est l'électroendosmose.

## 2. Technique d'électrophorèse sur papier

Au milieu d'une feuille de papier filtre spécialement traité, nous déposons les acides aminés sous forme de taches allongées. L'électrophorogramme ainsi constitué, est placé sur la cuve d'électrophorèse comme il est schématisé ci-dessus. Les bacs à tampon sont séparés des bacs à électrodes par des tampons de coton de manière à éviter les phénomènes d'électrolyse. On établit une d.d.p. entre les deux électrodes et on laisse la migration s'effectuer pendant un temps déterminé.

Supposons que l'électrophorèse a lieu dans une solution tampon de pH déterminé pour un aminoacide donné dont le point isoélectrique est  $pH_i$ . Si  $pH - pH_i = 0$  : aucune migration

Si  $pH - pHi < 0$  : migration vers la cathode Si  $pH - pHi > 0$  : migration vers l'anode

Ces deux dernières seront d'autant plus importantes que l'écart  $pH - pHi$  sera plus grand.

La porosité du papier intervient dans le chemin parcouru par les substances déposées sur

L'électrophorégramme. Le chemin réel parcouru est plus grand que la distance que l'on peut mesurer.

Tous ces facteurs font qu'une molécule subit un déplacement dû aux courants de rhéophorèse et d'électroendosmose et du déplacement dû à la force électrostatique agissant sur la molécule. On peut connaître facilement le déplacement dû aux courants de rhéophorèse et d'électroendosmose en faisant une substance électriquement neutre (glucose).

## II-Partie pratique

### ➤ Réactifs

- ✓ Tampon acétate pH 5,9  $\mu = 0,05$
- ✓ Acide glutamique à 1 mg/ml dans le tampon acétate
- ✓ Arginine à 1 mg/ml dans le tampon acétate
- ✓ Glycine à 1 mg/ml dans le tampon acétate
- ✓ X inconnu dans le tampon acétate
- ✓ Ninhydrine 0,2 g/100 ml d'éthanol 95°

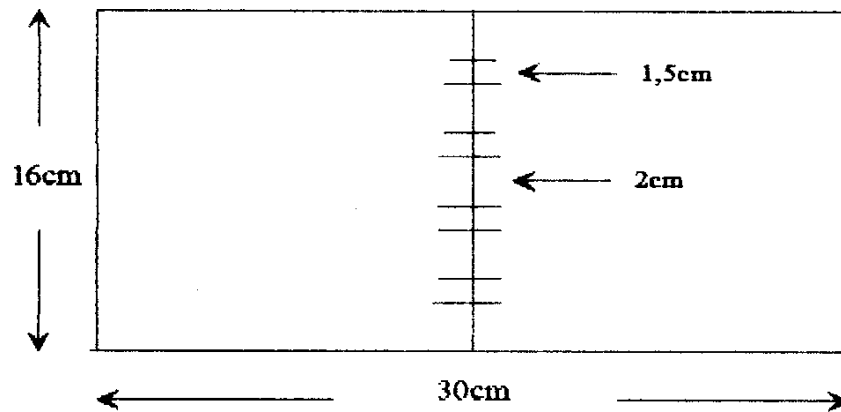
### ➤ Technique

#### 1- Préparation de la cuve

Placer des tampons de coton lâches entre les bacs à tampon et à électrodes. Remplir les bacs avec la solution tampon acétate pH =5,9  $\mu = 0,05$

#### 2- Préparation de l'électrophorégramme

- Préparer l'électrophorégramme de la manière suivante : découper un rectangle de papier Whatmann de dimensions 30 x 16cm.
- Tracer au crayon de papier la droite qui joint les milieux des longueurs. Sur cette droite, tracer 4 segments de 1,5cm de longueur séparée de 2cm.



- Effectuer les dépôts suivants sous forme de taches allongées, les plus régulières possibles, sur les pistes de 1,5cm de longueur :
  - 6 $\mu$ l d'une solution à 1mg/ml d'acide glutamique pHi = 3,2
  - 6 $\mu$ l d'une solution à 1mg/ml de glycine pHi = 5,9
  - 6 $\mu$ l d'une solution à 1mg/ml d'arginine pHi = 10,6
  - 6 $\mu$ l de la solution X
- L'électrophorégramme ainsi préparé est imbibé par la solution tampon. Pour cela, on trompe le papier placé dans une augette. En partant d'une extrémité et en se rapprochant de la ligne des dépôts. S'arrêter à 1cm des dépôts. Refaire la même chose en partant de l'autre extrémité. Le mouillage complet de la feuille se terminera par capillarité
- Cette opération s'effectuera en utilisant des gants de caoutchouc pour éviter le dépôt d'acides aminés de la peau sur le papier. Placer l'électrophorégramme sur la cuve à électrophorèse

### Révélation

- Après une migration de 1H30 à 300volts, l'électrophorégramme est mis à sécher à l'étuve (porte ouverte).
- L'électrophorégramme contenant les acides aminés est révélé à la ninhydrine en pulvérisant le réactif suivant : 0,2g de ninhydrine sont dissous dans 100ml d'éthanol 96°
- On place l'électrophorégramme humide à l'étuve à 105°C. On le retire de l'étuve dès que les taches apparaissent.

 Commenter les résultats obtenus.