

# Travaux pratiques en Biochimie végétale



# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Objectifs</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Introduction</b>   | <b>4</b>  |
| <b>I - Extraction et dosage de protéines dans les céréales par la méthode LOWRY</b> | <b>6</b>  |
| 1. Objectif .....   | 6         |
| 2. Principe .....   | 6         |
| 3. Mode opératoire .....  | 8         |
| 3.1. <i>Extraction des protéines</i> .....  | 8         |
| 3.2. <i>Dosage de protéines</i> .....   | 8         |
| 4. Expression des résultats .....   | 9         |
| 5. Exercice .....   | 9         |
| 6. Exercice .....   | 9         |
| 7. Exercice .....   | 9         |
| <b>Bibliographie</b>  | <b>10</b> |
| <b>Webographie</b>  | <b>11</b> |

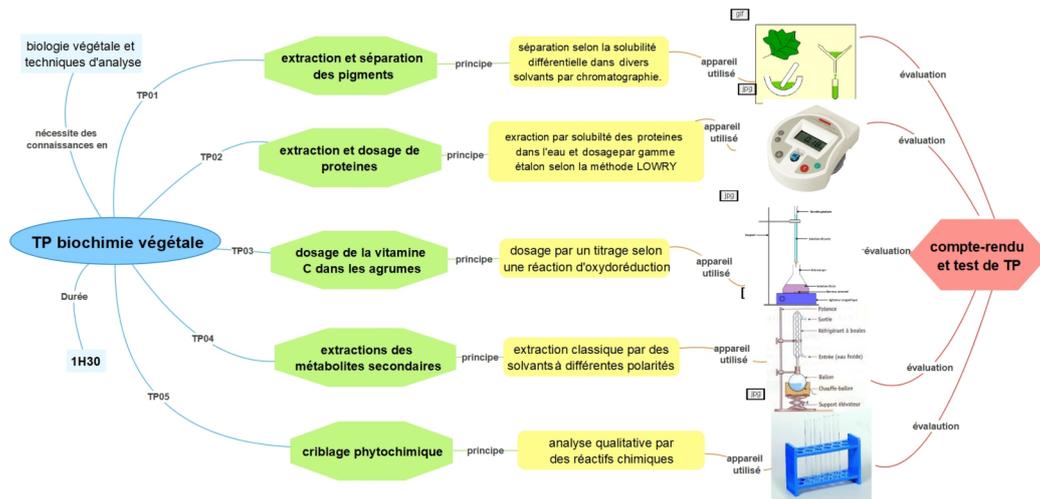
# Objectifs

- Extraire les métabolites primaire et secondaire de plantes.
- Analyse qualitative et quantitative des métabolites par différentes techniques.
- Se préparer à la recherche.

# Introduction

Les plantes sont caractérisés par leur originalité de synthèse de différentes substances classifiées en métabolites primaires (protéines, lipides, glucides) et secondaires qui appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes,...) présentant une source de molécules importante pour l'homme. De ce fait, pour exploiter cette source, ça nécessite une étude pratique qui consiste à réaliser des extractions, identifications et quantifications des différents constituants de plantes.





Carte conceptuelle des travaux pratiques en Biochimie végétale.

# I Extraction et dosage de protéines dans les céréales par la méthode LOWRY

## 1. Objectif

\*Extraire les protéines.

\*Appliquer le dosage par méthode LOWRY.

## 2. Principe

Les graines de céréales sont caractérisées par leur richesse en protéines comme l'albumine, globuline, prolamines, glutéline,... avec des teneurs variables selon les variétés. Le dosage des protéines par la méthode LOWRY est un dosage colorimétrique complémentaire à celle de Biuret. En effet, les protéines extraites à partir des céréales réagissent avec le premier réactif cuivrique alcalin (solution R) à travers leurs liaisons peptidiques, la deuxième réaction est la réduction du réactif du Folin-Ciocalteu principalement par le complexe de liaison cuivre-amide ainsi que par les résidus tyrosine et tryptophane formant ainsi un complexe de couleur bleu foncé qui absorbe à 750 nm<sup>[7\*\*]</sup>

En parallèle, une gamme étalon à différentes concentrations de BSA (Bovin Serum Albumin) est réalisée pour déterminer la concentration de protéines.

### Fondamental

Le dosage consiste à la détermination d'une concentration inconnue, en spectrophotométrie d'absorption deux méthodes de dosage sont appliquées :

- Directe: consiste à connaître le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  de la substance à doser pour calculer sa concentration par loi de Beer-Lambert  $A = \epsilon \cdot C \cdot L$
- Indirecte : la concentration est déterminée par un étalon ou bien par une gamme d'étalonnage.

### Remarque

---

une gamme d'étalonnage est une série de solutions à différentes concentrations, préparés à partir d'une solution mère d'une substance de même nature que la molécule à doser.

### 3. Mode opératoire

#### 3.1. Extraction des protéines

- Préparer trois tubes à essai avec 0,5g de farine de blé (F), de semoule de blé(S) ou du flocon d'avoine (A).
- Ajouter 5mL eau distillée et agiter vigoureusement pendant 10 secondes.
- Laisser décanter 5min et récupérer le surnageant à l'aide d'une micropipette.

#### 🗨 Conseil

A ne pas bouger les tubes pour éviter le trouble

#### 3.2. Dosage de protéines

- Prélever 0,2 mL du surnageant et compléter à 1 mL par eau distillée.
- Préparer en parallèle une gamme étalon à différentes concentrations de BSA ( 0-1 mg/mL).
- Le dosage est effectué selon le tableau suivant :

| Gamme étalon                   |   |     |     |     |     |     |   | Farine | Semoule | Avoine |
|--------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|--------|---------|--------|
| BSA (mL)                       | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |        |         |        |
| Echantillon(mL)                |   |     |     |     |     |     |   | 1      | 1       | 1      |
| Eau distillée (mL)             | 1 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 |        |         |        |
| Solution R (mL)                | 5 | 5   | 5   | 5   | 5   | 5   | 5 | 5      | 5       | 5      |
| incubation 10min               |   |     |     |     |     |     |   |        |         |        |
| folin dilué (1/3) (mL)         | 1 | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1 | 1      | 1       | 1      |
| incubation 30min à l'obscurité |   |     |     |     |     |     |   |        |         |        |
| Lecture absorbance à 750nm     |   |     |     |     |     |     |   |        |         |        |

Tableau 01: Mode opératoire du dosage.

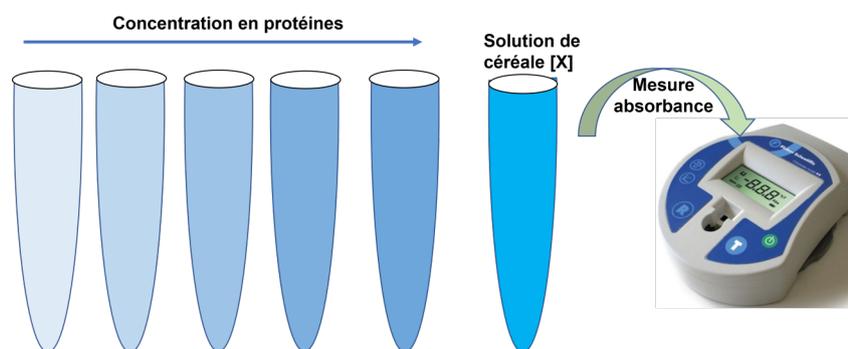


Figure 01: Dosage de protéines dans les céréales.

#### ⊕ Complément : Préparation de la solution R :

**Réactif A** : Solubiliser 20g de carbonate de sodium dans 1000mL NaOH 0,1N (3,999g NaOH dans 1000mL eau distillée).

**Réactif B** : Solubiliser 2g tartrate double Na et K dans 100mL eau distillée

**Réactif C** : Solubiliser 1g de sulfate de cuivre dans 100mL eau distillée.

**Solution R** : mélanger 960mL du réactif A, 20mL du réactif B et 20mL du réactif C.

Cf. "Dosage de protéines"

## 4. Expression des résultats

Réaliser le compte rendu de ce TP incluant:

- introduction
- But et principe du TP
- Matériel et méthodes
- Résultats et interprétations

Tracer la courbe d'étalonnage  $DO=f([proteines])$ .

Déduire la concentration des protéines dans les échantillons.

Quel est la source la plus riche en protéines ?

- Conclusion

## 5. Exercice

Le dosage des protéines par la méthode LOWRY est un dosage colorimétrique [ ] à celle de Biuret. En effet, les protéines réagissent avec le premier réactif [ ] (solution R) à travers leurs liaisons [ ], la deuxième réaction est la [ ] du réactif du Folin-Ciocalteu principalement par le complexe de liaison cuivre-amide ainsi que par les résidus tyrosine et tryptophane formant ainsi un complexe de couleur [ ] qui absorbe à 750 nm.

## 6. Exercice

Quel est l'intérêt de la gamme étalon ?

## 7. Exercice

Quelle est la méthode du dosage appliquée dans ce TP ?

# Bibliographie

Duval, D., Lafont, O. (2001). *Le Préparateur En Pharmacie. Dossier 1, Chimie, Biochimie*. France: Tec & Doc Lavoisier.

Schoefs, B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 217–226. doi:10.1016/j.chroma.2004.05.105.

Gross, J. (2012). *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Royaume-Uni: Springer US.

Davies K., *Plant Pigments and Their Manipulation*. (2009). *Annual Plant Reviews*, Allemagne: Wiley.

Olson, B. J. S. C., & Markwell, J. (2007). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 3.4.1–3.4.29. doi:10.1002/0471140864.ps0304s48

Mendham, J., Toullec, J. (2005). *Analyse chimique quantitative de Vogel*. Belgique: De Boeck Supérieur.

Le Grand Oral du Bac en sciences: Pistes de réflexion en Mathématiques - NSI - Physique-chimie - SVT. (2023). (n.p.): ELLIPSES.

# Webographie

<https://www.alloschool.com/element/132257>

<https://fsm.rnu.tn/useruploads/cours/ulpcsm/biologie/module1/simuler/chapitre2/photosynt/2extract-det.htm>