

Université Echahid Hamma Lakhdar d'El Oued
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

TRAVAUX PRATIQUES

DE BIOCHIMIE STRUCTURALE ET D'ENZYMOLOGIE **DEUXIÈME ANNÉE BIOLOGIE**

Préparée par :

Dr. MAHBOUB Nasma



Année universitaire : 2021/ 2022

SOMMAIRE

GENERALITES	<u>1</u>
I.RAPPEL DE QUELQUES DEFINITIONS EN CHIMIE ET BIOCHIMIE	<u>1</u>
II.VERRERIE UTILISEE AUX TRAVAUX PRATIQUE DE BIOCHIMIE	<u>6</u>
III.VOLUMETRIE	<u>6</u>
CONSEILS AUX ETUDIANTS	<u>8</u>
COMPTE RENDU	<u>10</u>
I. Les glucides	
TP N°1 : Les glucides	<u>11</u>
I-Dosage des sucres totaux	<u>11</u>
II- Dosages des sucres réducteurs	<u>13</u>
TP N °2 : Polarimètre de Laurent	<u>15</u>
II. Les lipides	
TP N°3 : Les lipides	<u>19</u>
I-Caractérisation des doubles liaisons dans l'huile d'olive	<u>20</u>
II-Détermination de l'indice d'acidité	<u>21</u>
TP N°4 : Indice de saponification d'un corps gras	<u>24</u>
III. Les protéines	
TP N°5 : Les protéines	<u>26</u>
Détermination du pHi de la glycine	
TP N°6 : Dosage des protéines par la méthode du Biuret	<u>29</u>
VI. Enzymologie	
TP N°7: Extraction et mise en évidence de l'activité de la β -fructofuranosidase (invertase) de la levure vis-à-vis la concentration du substrat	<u>31</u>
TP N°8: Extraction et mise en évidence de l'activité de la β -fructofuranosidase (invertase) de la levure vis-à-vis la concentration d'enzyme	<u>34</u>
Références bibliographiques	<u>37</u>

GENERALITES

I. RAPPEL DE QUELQUES DEFINITIONS EN CHIMIE ET BIOCHIMIE

La plupart de des définitions ont été données au cours de l'enseignement de CHIMIE.

1 mole = N entités élémentaires identiques

N = 6,02.10²³ nombre d'AVOGADRO

Exemple d'entités : atomes, molécules, ions, électrons, ...

Poids moléculaire du glucose = 180,156 signifie : 1 mole de glucose pèse 180,156 g.

Poids moléculaire de l'albumine = 68 000 signifie : 1 mole d'albumine pèse 68 000 g ou 68 Kg.

A. MOLE D'EQUIVALENT (ou équivalent)

Une mole d'équivalent est la quantité d'acide pouvant libérer une mole d'ion H₃O⁺ au cours d'une réaction de neutralisation.

Exemple 1 : 1 mole d'acide chlorhydrique (HCl) libère 1 équivalent.

1 mole d'acide sulfurique (H₂SO₄) libère 2 équivalents.

C'est la quantité de base susceptible de neutraliser une mole d'équivalent acide.

Exemple 2 : 1 mole de soude (NaOH) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1 mole de NaOH correspond à un équivalent.

Exemple 3 : 1/2 mole de chaux (Ca(OH)₂) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1/2 mole de Ca(OH)₂ correspond à un équivalent.

C'est la quantité d'agent oxydant (ou réducteur) capable de capter (ou de céder) une mole d'électrons.

Exemple 4 : soit une mole d'ions d'agent oxydant Fe³⁺ pouvant capter une mole d'électrons suivant la réaction :



Une mole d'ions Fe³⁺ correspond à une mole d'équivalent.

Exemple 5 : soit une mole d'ions MnO_4^- pouvant capter 5 moles d'électrons suivant la réaction :



D'où 1/5 de mole d'ions MnO_4^- correspondant à 1 mole d'équivalent.

B. NORMALITE

La normalité d'une solution acide (symbole : N) indique la quantité de moles d'ions H^+ ou H_3O^+ , libérables au cours d'une réaction de neutralisation, que cette solution contient dans un litre, donc le nombre d'équivalents.

Exemple 6 : une solution 2N de HCl contient 2 équivalents par litre, ou 2 moles de HCl par litre.

Exemple 7 : une solution 0,1N de H_2SO_4 contient 0,1 équivalent par litre, ou 0,05 mole par litre de H_2SO_4 .

La normalité d'une solution de BASE indique le nombre d'équivalent d'acide qu'un litre de cette solution peut neutraliser.

Exemple 8 : 1 litre d'une solution de soude 0,5N neutralise 0,5 équivalent d'acide.

La normalité d'une solution d'un agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'équivalents de cet agent que contient un litre de solution.

On dit qu'une solution est NORMALE quand elle contient une mole d'équivalent d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur) par litre.

On peut déduire des définitions précédentes que :

- Deux solutions de même normalité réagissent volume à volume.
- Pour qu'une réaction soit quantitative, il faut mettre en présence autant d'équivalents d'un réactif que de l'autre.

C. MOLARITE

La molarité d'une solution d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) qu'elle contient par litre.

Souvent dans les réactions biochimiques, il est nécessaire de connaître le nombre de mole d'une substance dans la solution, et celle-ci peut être facilement déduite à partir de la molarité de la solution et le volume présent.

-Une solution molaire (M) = 1 mol/l = 1 mmol/ml = 1 μ mol/ μ l

-Une solution millimolaire (mM) = 1 mmol/l = 1 μ mol/ml

Vérifier si vous avez compris cette idée en essayant de résoudre le calcul suivant :

1. Combien de grammes de glucose sont nécessaires pour préparer 100 ml d'une solution molaire ? (PM du Glucose = 180,156). Réponse : 18,0156 g/100 ml.

2. Combien de millimoles ou micromoles par millilitre existent dans les solutions suivantes : (a) urée 6 mol/l ; (b) NaCl 0,15 mol/l ; (c) fructose 12 mmol/l ; (d) ATP 0,2 mmol/l. Réponse : urée : 6 mmol/ml ; NaCl : 150 mmol/ml ; fructose : 12 μ mol/ml ; ATP : 0,2 μ mol/ml.

3. Combien de grammes de glycine sont présents dans 10 ml de solution 20 mmol/l ? (PM Glycine = 75). Réponse : 15 mg.

D. RAPPORT ENTRE NORMALITE ET MOLARITE

Si n est le nombre de moles équivalent contenu dans une mole d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur), on a la relation :

$$\text{NORMALITE} = \text{MOLARITE} \times n$$

Exemple 9 : 1 mole de H₂SO₄ contient 2 moles d'ions H⁺ donc 2 moles d'équivalent ; donc n = 2 ; une solution molaire de H₂SO₄ sera donc 2N.

E. CONCENTRATION MASSIQUE

C'est la MASSE en grammes de soluté par litre de solution.

Exemple 10 : NaCl à 10 g/litre.

F. CONCENTRATION EN POURCENTAGE

C'est la masse en grammes de soluté pour 100 g de solution.

Exemple 11 : Sulfate d'ammonium à 33% quand c'est % (P/P), si non le plus utilisé est le % (P/V). Mais il faut éviter d'utiliser le terme %, à moins qu'il soit clairement défini, car il peut conduire à des confusions.

Exemple 12 : une solution d'acide acétique à 2 % peut signifier :

2 g d'acide acétique par 100 g d'eau (p/p),

2 g d'acide acétique par 100 ml d'eau (p/v),

2 ml d'acide acétique par 100 ml d'eau (v/v).

REMARQUE : Lors de la préparation d'une solution à x %, on tient compte de la densité du solvant, lorsque le soluté est liquide.

Exemple 13 : solution commercial d'acide sulfurique concentré. Une telle solution contient 95 % d'acide sulfurique, autrement dit 95 g d'acide pour 100 g de solution. La densité de la solution est de 1,84 (1 ml pèse 1,84 g), ce qui veut dire que pour avoir 100 g de solution (ou 95 g d'acide) on prélèvera $100 \text{ ml} / 1,84$, soit 54,3 ml de solution commerciale.

G. DILUTIONS

Diluer une solution consiste à diminuer sa concentration. Lorsqu'on veut passer, par exemple, d'une solution de NaCl à 10 g/l à une solution de NaCl à 1 g/l, on effectue une dilution ; dans ce cas, on dilue 10 fois avec un solvant la solution de départ. 10 est la valeur du facteur de dilution. On dit aussi qu'on a effectué une dilution au $1/10^{\text{ème}}$. $1/10^{\text{ème}}$ est la valeur du taux de dilution.

Exemple, si on veut préparer seulement 2 ml de la solution de 1 g/l à partir de la solution initiale de 10 g/l. On utilise la relation : $C_i V_i = C_f V_f$

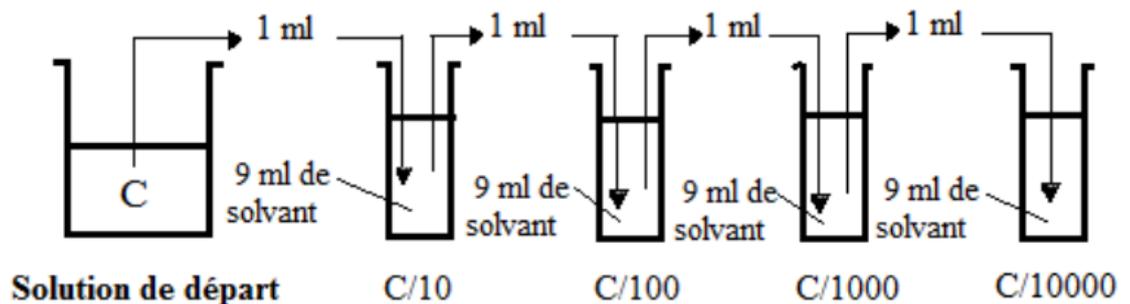
avec $v_i = C_f V_f / C_i$ d'où $v_i = 2 \text{ ml} / 10$ et $V_i = 0,2 \text{ ml}$

Donc on prend 0,2 ml de la solution concentrée initiale et on lui ajoute 1,8 ml d'eau

H. DILUTIONS SUCCESSIVES

Cette méthode de dilutions successives est employée lorsqu'on veut diluer fortement une solution de façon précise et économique.

Exemple 14 : dilution au $1/10\ 000^{\text{ème}}$ (facteur de dilution 10 000). Exemple quand on veut passer des concentrations de l'ordre de moles/litre à picomoles/litre. (1 picomole = 10^{-12} mole).

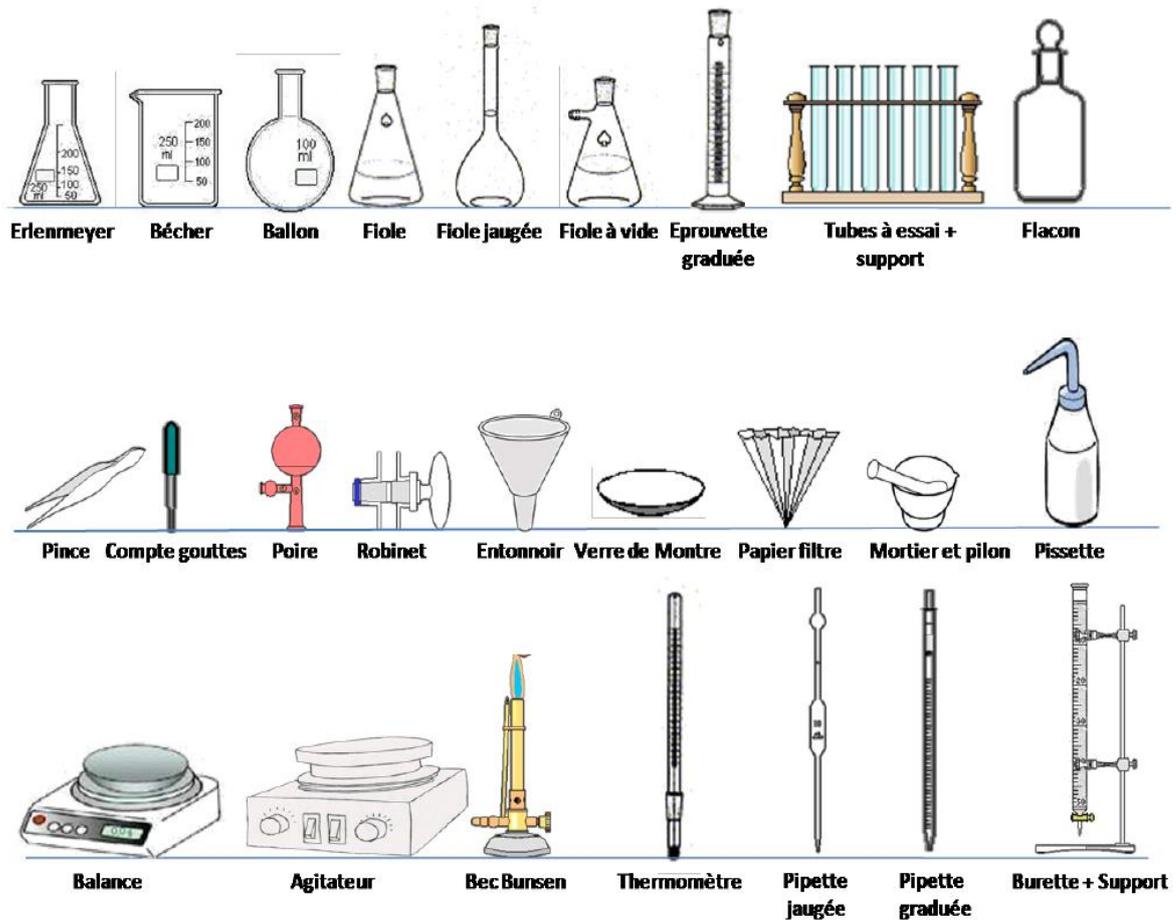


I. OSMOLARITE

L'osmolarité est égale à la molarité des particules dans une solution. Une solution d'1 mol/l formé de solutés non dissociables est 1 Osmolar (la solution contient 6,023 10²³ particules/litre). Une solution de 1 mol/l de NaCl (soluté dissociable) est de 2 Osmolar (2 est le nombre d'ions produit par molécule). Une solution de KCl 0,03 mol/l est 0,06 Osmolar.

L'osmolarité est souvent utilisée en physiologie pour préparer les milieux physiologiques d'incubations des tissus et cellules.

II. VERRERIE UTILISEE AUX TRAVAUX PRATIQUE DE BIOCHIMIE



III.VOLUMETRIE

Pour mesurer des volumes de liquides titrés, on utilise des récipients jaugés ou gradués. Les récipients jaugés sont les fioles et les pipettes ; les récipients gradués sont les burettes et les éprouvettes. Dans le cas des burettes comme dans celui des pipettes, la surface libre du liquide forme un ménisque. C'est la partie inférieure du ménisque qui doit être utilisée pour repérer le niveau du liquide : la figure A montre que le ménisque doit être tangent au trait de jauge. Cependant, avec les solutions d'iode ou de permanganate qui sont fortement colorées, on ne peut pas distinguer le ménisque ; la surface libre de liquide semble horizontale, et c'est elle que l'on amène en coïncidence avec le trait de jauge (figure B).

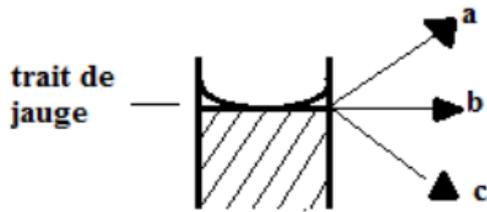


Figure A

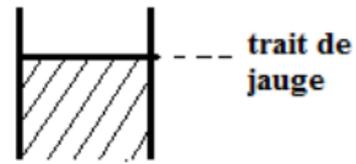


Figure B

Pour régler l'écoulement d'une pipette, on bouche l'orifice supérieur avec l'index : c'est le seul doigt qui permet un réglage précis. D'autre part, il doit rester sec ; le doigt mouillé fait ventouse, et il est alors impossible de régler l'entrée d'air (figure C). L'écoulement d'une pipette se fait à l'air libre ; il ne faut jamais souffler dedans. Quand on vérifie l'affleurement du ménisque, ou bien quand on vidange la pipette, on doit toujours appuyer la pointe de la pipette sur la paroi du récipient (figure D). Il ne doit pas se former de bulle d'air sur les parois du récipient, ce qui entraînerait une source importante d'erreur.

La mesure précise d'un volume se fait entre deux graduations. Eviter les mesures faites entre une graduation et le bout de la pipette.

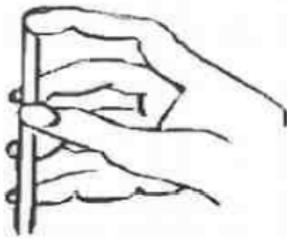


Figure C



Figure D

Lecture de la burette et de la pipette : attention aux erreurs de parallaxe ; sur la figure A, « a » et « b » les lectures sont fausses, « c » est correcte.

CONSEILS AUX ETUDIANTS

RECOMMANDATIONS GENERALES

- Le port de blouse est obligatoire pendant la séance de TP.
- Lire attentivement le texte avant d'entreprendre une expérience, et se conformer strictement aux indications données.
- Maintenir la paille en parfait état de propreté.
- N'utiliser que la verrerie propre. Les tubes propres sont toujours disposés dans les portoirs avec l'ouverture vers le bas.
- Ne pas déboucher plus d'un flacon à la fois ; le reboucher dès qu'on ne s'en sert plus ; les réactions obtenues seront ainsi plus fiables.
- Ne pas intervertir les pipettes ; en cas de doute, les rincer soigneusement à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée.
- Avant de verser son contenu, tenir toujours le flacon de telle sorte que l'étiquette ou l'inscription soit dans la paume de la main.
- Lors du chauffage d'un tube à essai à la flamme :
 - * Ne le remplir qu'au 1/3 environ.
 - * Le saisir à l'aide d'une pince en bois.
 - * Le chauffer en l'agitant doucement, pour éviter les projections.
 - * Le tenir incliné vers le mur ou une cloison de verre, ou encore du côté où il n'y a personne.
- Pour mélanger correctement plusieurs solutés dans un tube à essai, l'agiter en tapotant sa partie inférieure contre la paume de la main ; pour des volumes supérieurs à 5 ml, employer une baguette de verre ou un VORTEX.
- Toujours verser l'ACIDE dans l'eau, et non le contraire, surtout dans le cas de l'acide sulfurique.
- Lorsque la manipulation est terminée, laver et rincer la verrerie sale, nettoyer la paille.

EN CAS D'ACCIDENT

- En cas de brûlures extérieures, suite à une projection d'acide ou de base, laver abondamment à l'eau la partie atteinte, et prévenir de suite l'enseignant.

- En cas de brûlures ou de blessures dues au contact du verre, ou en cas d'ingestion de liquide, prévenir immédiatement l'enseignant.

En résumé, pour éviter les accidents, il faut travailler avec :

- * Beaucoup de soin.

- * Beaucoup de propreté.

- * Calme et prudence.

- * A la fin du TP, laver soigneusement vos mains avant de quitter la salle.

COMPTE-RENDU

Le compte rendu devra être remis à la fin de la séance de Travaux Pratiques. Il comprendra les paragraphes suivants :

BUT : Indiquer clairement ce que l'on cherche à déterminer en 1 ou 2 phrases au maximum.

PRINCIPE : Exposer brièvement dans cette partie la théorie, ou la méthode, sur laquelle est basée la manipulation.

COURBES ET GRAPHERS : Ecrire le titre en haut au milieu de votre papier millimétré. Ecrire l'échelle choisie en haut et à droite de votre papier millimétré. Il est important de choisir une échelle simple qui est un multiple de 1, de 2 ou de 10 (ne jamais choisir une échelle nécessitant une calculatrice). Ecrire clairement les indications de vos axes: Abscisses et Ordonnées. Les projections des points inconnus doivent figurer clairement sur vos courbes. Tracer vos courbes ou graphes en essayant de les faire passer à proximité d'un maximum de points expérimentaux obtenus. Ces points doivent être présents clairement par une croix.

RESULTATS : Indiquer dans ce paragraphe les valeurs expérimentales obtenues. Exposer clairement les calculs, en prenant un exemple. Mettre en évidence le résultat final.

CONCLUSIONS et/ou COMMENTAIRES : Faire les observations, les remarques et les critiques que vous jugerez utiles, s'il y a lieu.

Paragraphe à revoir :

-La présence pendant les séances de TP est obligatoire.

-Le respect des groupes est impératif.

-La préparation des TP avant les séances pratiques est obligatoire. D'autant plus qu'un examen pratique et individuel sera organisé à la fin de l'année.

TP N°1 : Les glucides

RAPPELS

Généralités

Les glucides, encore appelés glucides ou hydrates de carbone $C_n(H_2O)_n$, sont des composés comportant de nombreux groupements hydroxyles (-OH) responsables de leur caractère très hydrophile. Ce sont des polyols. La présence de groupement carbonyle (-C=O), aldéhyde ou cétonique leur confère un caractère réducteur. Ils comprennent 2 grands groupes de substances :

Les oses : ce sont des polyalcools. Ils ont en outre soit une fonction aldéhydrique, soit une fonction cétonique. Ils ne sont pas hydrolysables en milieu faiblement acide. Suivant le nombre de leurs atomes de carbone on trouve : trioses, tétroses, pentoses, hexoses.

Les osides : ce sont des glucides qui libèrent par hydrolyse en milieu faiblement acide un nombre variables de molécules d'oses.

I-Dosage des sucres totaux

Sécurité

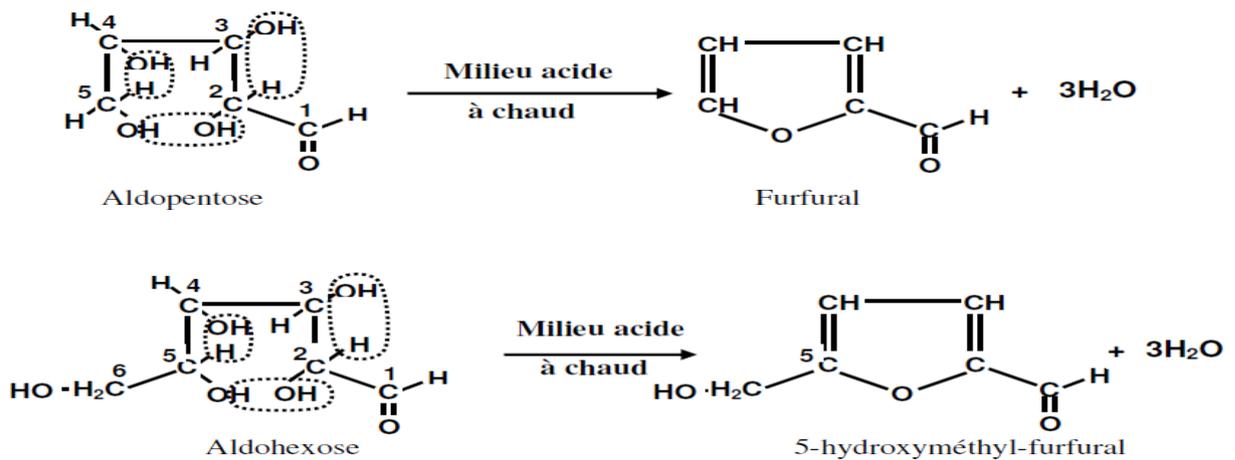
Cette manipulation comporte différentes opérations de chauffage. Il est indispensable d'éviter les phénomènes de surchauffe qui risquent de provoquer les projections brûlantes. Les solutions cuivriques sont placées dans la classe 3 de la classification toxicologique helvétique (poison puissant). L'acide sulfurique y est placé dans la classe 1 (poison très puissant). L'hydroxyle de sodium dans la classe 2 (poison très puissant).

Le naphthol est placé dans la classe 2.

En conclusion, il faut éviter toute projection et tout contact entre les réactifs et la peau, les muqueuses et les yeux.

Principe :

En milieu fortement acide et à chaud, les oses ayant au moins 5 atomes de carbones subissent une déshydratation et se transforment en furfural (si l'ose est un pentose) ou en un dérivé du furfural (si l'ose est un hexose).



Le furfural et ses dérivés peuvent se condenser avec des substances telles que les phénols, les amines aromatiques pour former des produits colorés caractéristiques.

▪ Réaction de Molisch

Cette réaction permet de caractériser la présence de n'importe quel glucide, ose ou oside. En présence d'acide sulfurique, les sucres forment un dérivé furfural qui se condense avec l'alpha -naphtol pour donner un produit coloré en violet.

Matériel

- Portoir ;
- Tubes à essais ;
- Eprouvette graduée ;
- Pipette ;
- Poire d'aspiration.

Réactifs

- solutions de glucose, fructose, saccharose à 1% dans l'eau distillée ;
- Réactif de Molisch (2 g α -naphtol + 100 ml Ethanol) ;
- acide sulfurique (H₂SO₄) concentré.

Mode opératoire

1. Préparer 4 tubes à essai : mettez dans le premier tube 1 ml d'une solution de glucose, dans le deuxième tube 1 ml de solution de fructose, dans le troisième tube 1 ml de solution de saccharose et dans le quatrième tube 1 ml d'eau distillée ;
2. ajouter à chaque tube 2 à 3 gouttes de réactif de Molisch ;
3. Agiter les tubes pour mélanger le contenu ;
4. Couler doucement le long de la paroi de chaque tube 1 ml de H₂SO₄ concentré (sans agiter) ;
5. Observer et noter la coloration obtenue.

II- Dosages des sucres réducteurs**Principe :**

En milieu alcalin et à chaud, les oses et dans certaines conditions les polyholosides peuvent s'oxyder et en même temps réduire des substances telles que les sels métalliques. On parle alors de pouvoir réducteur des sucres. Cette propriété, qui est due à la présence de fonction hémi-acétalique libre, peut être mise en évidence par exemple grâce au réactif de Fehling qui est une solution alcaline d'ions cuivreux de coloration bleue (les ions Cu⁺² sont maintenus en solutions grâce au double tartrate de Na⁺ et K⁺).



Si la réaction est positive, on obtient un précipité rouge brique dont la quantité est proportionnelle à celle du sucre réducteur présent. Si le sucre n'est pas réducteur, la coloration reste bleue.

Matériel :

- Tubes à essai ;
- Pipettes ;
- Propipette (pompe à crémaillère) ;
- Bain marie bouillant.

Réactifs :

- Liqueur de Fehling : La liqueur de Fehling est obtenue en mélangeant V:V deux solutions A et B dont la composition est la suivante :

Solution A : 35 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 5 ml H_2SO_4 concentré + H_2O compléter à 1L.

Solution B : 150 g tartrate de K et Na + 300 ml NaOH pure + H_2O compléter à 1L.

- Solutions de Glucose, fructose, saccharose à 1%.

Mode opératoire :

1. Préparer 4 tubes à essai : mettez dans chaque tube 0,5 ml de la solution A puis 0,5 ml de la solution B. Sachant que le mélange A+B forme la liqueur de Fehling ;
2. Ajoutez au premier tube 1 ml d'une solution de glucose, au deuxième 1 ml de solution de fructose, au troisième 1 ml de solution de saccharose, au quatrième 1 ml d'eau distillée ;
3. Agiter pour bien mélanger le contenu des tubes ;
4. Porter les tubes à ébullition pendant 3 min ;
5. Observer et noter le résultat obtenu.

TP °2 : Polarimètre de Laurent

1. La loi de Biot

Lorsqu'une solution contenant une molécule présentant une asymétrie est traversée par un faisceau de lumière polarisée, le plan de polarisation de la lumière est dévié, vers la gauche [molécule lévogyre (-)] ou vers la droite [molécule dextrogyre (+)].

La dissymétrie de la molécule est due habituellement à la présence d'un (ou plusieurs) carbones substitués asymétriquement, les deux isomères (inverses optiques ou énantiomères) ont les mêmes propriétés physiques (densités, indice de réfraction, température de fusion, ...) et ne diffèrent que par leurs pouvoirs rotatoires qui sont opposés.

Dans le cas d'une substance optiquement active en solution dans un solvant inactif, la rotation produite est exprimée par la loi de Biot :

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{L \cdot C}$$

$[\alpha]$ = pouvoir rotatoire spécifique du composé

α = angle de rotation observé au polarimètre

L = longueur du tube de polarimètre (dm)

C = concentration du composé en g/ml

2. Réactifs et matériels

- Solutions de glucose à des concentrations variables (10,30 et 50%).
- Tube de polarimètre
- Le polarimètre utilisé dans ce TP est de type : Laurent (Figure 1)

3. But du TP

C'est le calcul du pouvoir rotatoire spécifique des glucides après la détermination leurs angles de rotation en utilisant le polarimètre et appliquer la loi de Biot.

4. Présentation de l'appareil

La source lumineuse S est une lampe à vapeur de sodium. Une lentille forme l'image de cette source sur un diaphragme précédé d'un filtre jaune. Ensuite se trouvent un objectif collimateur, puis un polariseur et la lame demi onde. Cette lame, en quartz, n'intercepte que la moitié du faisceau lumineux. Au delà du tube polarimétrique est disposé l'analyseur dont la rotation peut être mesurée sur un cercle gradué muni d'un vernier.

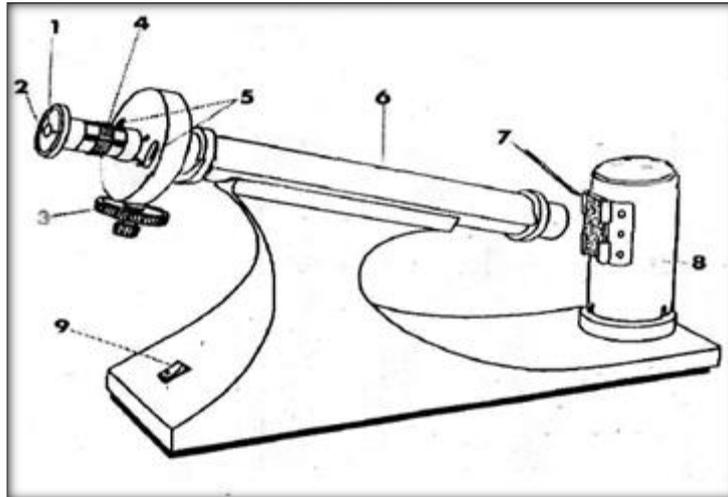


Figure 1 : Description du polarimètre

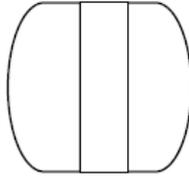
Le polarimètre de Laurent est constitué de :

1. Oculaire ;
2. Bouton de magnification ;
3. Analyseur ou bouton de contrôle et de focalisation ;
4. Bouton de focalisation de l'oculaire ;
5. Fenêtre de lecture des valeurs des angles ;
6. Compartiment contenant le tube du polarimètre de longueur variable ;
7. Filtre de verre ;
8. Lampe de sodium ($\lambda=589$ nm) ;
9. Bouton de mise en marche.

5. Utilisation du polarimètre de Laurent

En principe, il suffit de placer le tube polarimétrique contenant la substance active entre un polariseur et un analyseur croisés et de mesurer l'angle dont il faut faire tourner l'analyseur pour rétablir l'extinction; cette méthode simple ne donne pas des résultats très précis car elle fait appel à la mémoire visuelle. Il est plus commode pour l'observateur de comparer les éclaircissements de deux plages juxtaposées; c'est ce qui est réalisé dans le **polarimètre de Laurent**.

Après avoir allumé la lampe de sodium, attendre 10 min de chauffage. Introduire le tube contenant l'eau distillée et lire le blanc. Ajuster le bouton de focalisation d'observation pour obtenir une image claire.



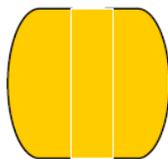
Mettre dans le tube du polarimètre une substance optiquement active (par exemple une solution de sucre). Noter la longueur du tube.

Tourner le bouton de contrôle jusqu'à ce que la plaque indique presque zéro de tous les deux côtés (gauche et droite). On observe un cercle jaune/orange divisé par une bande noire comme suit :



Valeur de mesure $< \alpha$

Tourner l'analyseur à la main jusqu'à ce que les trois parties du cercle aient la même couleur jaunâtre :



Valeur de mesure $= \alpha$

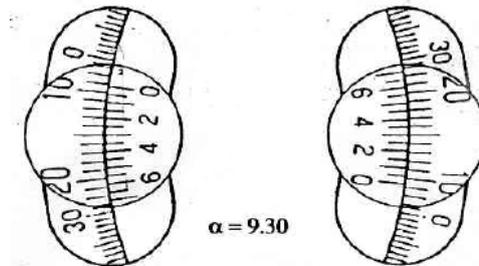
Lorsqu'on dépasse la valeur exacte de l'angle α , on observe l'image ci-dessous :



Valeur de mesure $> \alpha$

La valeur positive de l'angle α est lue à droite et la valeur négative à gauche. La valeur de l'angle de rotation est lue comme suit :

- Lire la valeur obtenue à partir des grandes graduations ;
- Pour obtenir une meilleure précision on divise un degré de rotation part 20 parties (petites graduations). Maintenant on lit la valeur décimale au point où le trait intérieur coïncide avec un trait du cercle extérieur comme indiqué dans l'image ci-dessous :



L'angle de rotation est $9,30^\circ$

1-Remplissez le tableau suivant après avoir déterminé l'angle de rotation des solutions de glucose à différentes concentrations

Angles de rotation ($^\circ$)			
Concentration	$C_1= 10\%$	$C_2= 30\%$	$C_3= 50\%$

2- Calculez leurs pouvoirs rotatoires spécifiques.

3- Tracez la courbe $\alpha = f(C)$ (la courbe est une ligne droite qui passe par l'origine).

4- Déterminez à partir de cette courbe les concentrations de solutions suivantes après avoir détecté au polarimètre leurs angles de rotation, de telle façon que les solutions sont des mélanges (C_1+C_2) (C_2+C_3) (C_1+C_3) .

TP N°3 : Les lipides

RAPPELS

Les lipides sont des biomolécules organiques insolubles dans l'eau et extractibles des cellules et des tissus par des solvants tels que le chloroforme, l'éther ou le benzène. Les lipides peuvent être classés en :

-Lipides saponifiables contenant des acides gras tels que les acylglycérols, les phosphoglycérides et les cires. Ils sont dits saponifiables puisqu'ils fournissent des savons après hydrolyse alcaline.

-Lipides insaponifiables ne contenant pas d'acides gras. On en distingue deux grands types : les stérols et les terpènes.

Une huile alimentaire de bonne qualité est constituée de plus de 98% de triglycérides. Ceux sont des tri-esters de glycérol et d'acides gras. On distingue les triglycérides homogènes et les triglycérides hétérogènes.

Définition de ***l'indice d'acidité*** : c'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g de corps gras. Il permet de déterminer le degré d'altération des huiles alimentaires.

Définition de ***l'indice de saponification*** : c'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras provenant de l'hydrolyse de 1 g de corps gras. Il permet de classer les huiles en fonction de la longueur des chaînes d'acides gras qui les composent.

I- Caractérisation des doubles liaisons dans l'huile d'olive

Principe

Les acides gras insaturés sont des acides éthyléniques possèdent une ou plusieurs doubles liaisons. L'acide oléique est un acide gras insaturé, a une double liaison cis en C₉-C₁₀. Il est très répandu dans les huiles végétales et les lipides animaux. Une molécule d'iode s'additionne à la double liaison de la molécule d'acide oléique ce qui permet sa caractérisation.

Matériel

- Tubes à essai ;
- bain marie bouillant.

Réactifs

- Huile d'olive ;
- Lugol ;
- Empois d'amidon.

Mode opératoire

- 1- Dans un tube à essai mettre 1ml d'huile d'olive, ajouter 5 gouttes de lugol ;
- 2- Agiter et noter la teinte du mélange (brun rougeâtre) ;
- 3- Chauffer au bain- marie bouillant ou dans la flamme du bec Bunsen : la coloration vire au jaune ;
- 4- Lorsque le virage est terminé, laisser refroidir et ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon et noter la teinte du mélange (Il ne se produit pas de coloration bleue) ;
- 5- Ajouter un excès d'eau iodée, et noter la coloration obtenue (la coloration bleue apparaît).

Expliquer :

- Le changement de la couleur lors de la réaction entre l'huile d'olive et le lugol.
- L'effet de la chaleur dans les réactions précédentes.
- L'apparition de la couleur bleue lors de l'ajout d'un excès du lugol.

II- Détermination de l'indice d'acidité

Principe

Les huiles sont des esters du glycérol, désignés sous le nom de triglycérides ou corps gras. Au cours du temps, les triglycérides s'altèrent en s'hydrolysant lentement en acides gras correspondants et en glycérol. L'indice d'acide indique la quantité d'acides gras libres dans une huile. Il est défini comme la masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en mg, nécessaire au titrage de tous les acides libres contenus dans 1,0 g de cette huile.

L'huile dégradée contient de plus en plus d'acides libres ce qui fait croître son indice d'acide. La mesure de cette acidité libre est un moyen pour déterminer son altération.

But :

Déterminer l'indice d'acide d'une l'huile par titrage acido-basique d'une quantité connue de cette huile dissoute dans un solvant, en présence de phénolphtaléine.

Matériel

- Une burette de 25ml ;
- Un erlenmeyer de 100ml ;
- Un éprouvette graduée de 25 ml ;
- Un balance ;
- Un agitateur magnétique et barreau.

Réactifs

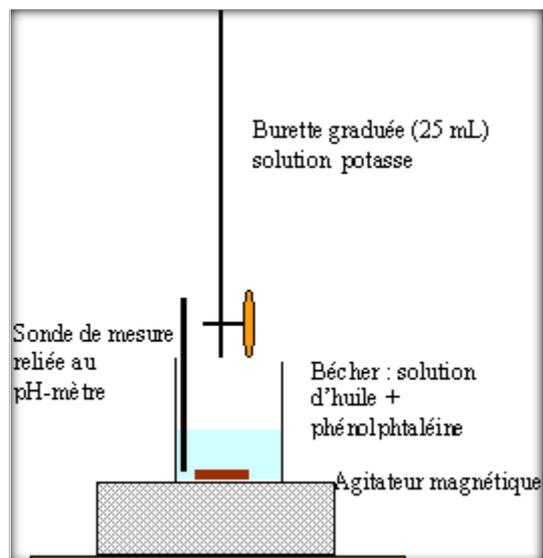
- Potasse alcoolique (KOH) de concentration molaire $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l ;
- Phénolphtaléine (joue le rôle d'indicateur coloré) ;
- Mélange alcool-chloroforme ou alcool éther (1 V d'éthanol + 1V d'éther, mélange déjà préparé) ;
- Huile d'olive.

Mode opératoire

1. Peser exactement 2,5g d'huile dans un erlenmeyer de 100ml. Noter cette valeur.
2. Introduire dans l'erlenmeyer et dans l'ordre :

- 2,5g d'huile ;
- 25ml du solvant (alcool éther) mesurés à l'éprouvette graduée ;
- Quelques gouttes de phénolphtaléine.

3. Préparer la burette : la remplir avec la potasse alcoolique, ajuster le zéro.
4. Titrer le contenu de l'erlenmeyer en ajoutant progressivement la potasse alcoolique jusqu'à virage de l'indicateur coloré.
5. Arrêter dès que l'indicateur coloré a atteint sa zone de virage.
6. Noter le volume de KOH, V.



Résultats

- Comparer les résultats obtenus avec les normes en vigueur

1- PRINCIPE :

- 1-1- Ecrire l'équation d'hydrolyse d'un triglycérol (triglycéride) homogène.
- 1-2- Ecrire l'équation de la réaction entre un acide gras R-COOH et l'hydroxyde de potassium ou potasse alcoolique.
- 1-3- Dédire le rôle du mélange éthanol-éthère lors de la réaction entre l'huile et la potasse.

2- MODE OPERATOIRE :

- Réaliser le schéma clairement légendé du montage réaliser.

Compléter :

Masse d'huile (en g): $m = \dots\dots\dots$

Volume de potasse ajouté (en ml) : $V = \dots\dots\dots$

3- CALCULS ET RESULTATS :

a. Masse molaire (M) de KOH (en g/mol)

On sait que :

$K = 39 \text{ g/mol}$; $O = 16 \text{ g/mol}$; $H = 1 \text{ g/mol}$.

Donc :

$M_{\text{KOH}} = \dots\dots\dots$

b. Nombre de moles (n) de KOH (en mol)

On sait que :

$C_{\text{KOH}} = \dots\dots\dots$;

$V = \dots\dots\dots$

Sachant que : $C_{\text{KOH}} = n / V$

(C : concentration molaire)

On détermine : $n = \dots\dots\dots$

c. Masse (m) de KOH (en g)

En sachant que $n_{\text{KOH}} = m_{\text{KOH}} / M_{\text{KOH}}$

$m_{\text{KOH}} = \dots\dots\dots$

d. Détermination de l'indice d'acide

$I_a = \dots\dots\dots$

3. Normes

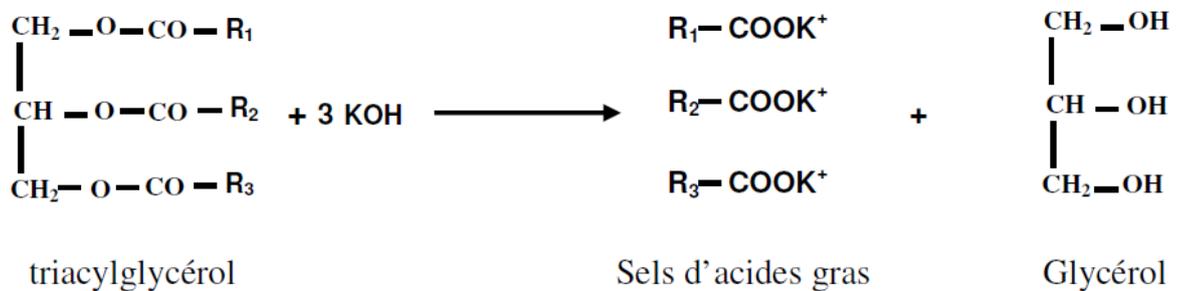
Huile d'olive $I_a = 0,3 - 1$

TP N°4 : Indice de saponification d'un corps gras**-But**

A partir de l'indice de saponification, on détermine le poids moléculaire de la triricinoléine, triacylglycérol majeur de l'huile de ricin.

-Principe de la réaction de saponification

En milieu chaud et fortement basique les triacylglycérols libèrent le glycérol et les sels alcalins d'acides gras (acides stéarique, oléique, palmitique) appelés **savons**.



La réaction de saponification se déroule en présence d'un excès de KOH, non entrée en réaction et dosé par une solution acide.

La potasse consommée par l'huile est calculée par référence à un témoin et permet de déterminer le poids moléculaire du triacylglycérol.

-Matériel et réactifs

- 2 ballons à saponification de 250 ml ;
- Réfrigérant ascendant ;
- Huile de ricin ;
- Potasse alcoolique 0,2M dans l'éthanol ;
- Acide sulfurique 0,25N, phénol phtaléine.

- Mode opératoire

- Choisir 2 ballons à saponification, qui s'adaptent au bouchon du réfrigérant.

Ballon à saponification 1

- Peser le ballon à saponification ;
- Introduire à l'aide de la pipette de 1 ml, 0,5 ml d'huile de ricin et repeser, déterminer m : la masse d'huile ;
- Ajouter 10 ml de KOH alcoolique à la pipette, agiter ;
- Brancher le ballon à saponification au réfrigérant (celui-ci permet de condenser les vapeurs émises lors du chauffage de la solution) ;
- Brancher la circulation d'eau froide ;
- Chauffer modérément pour amener la solution alcoolique à ébullition douce, poursuivre la saponification 30 minutes. Agiter fréquemment ;
- Retirer le ballon et le refroidir sous un courant d'eau de robinet ;
- Ajouter 5 gouttes de phénol phtaléine et doser la potasse en excès par H_2SO_4 0,25N = **V1**

Ballon à saponification 2 (témoin)

- Verser la même quantité de KOH alcoolique ;
- Chauffer une demi heure sous réfrigérant ;
- Ajouter 5 gouttes de phénol phtaléine ;
- Doser la potasse par l' H_2SO_4 0,25N = **V2**.

Résultats

- Déterminer le poids moléculaire de la triricinoléine.

TP N°5 : Les protéines**Détermination du pHi de la glycine**

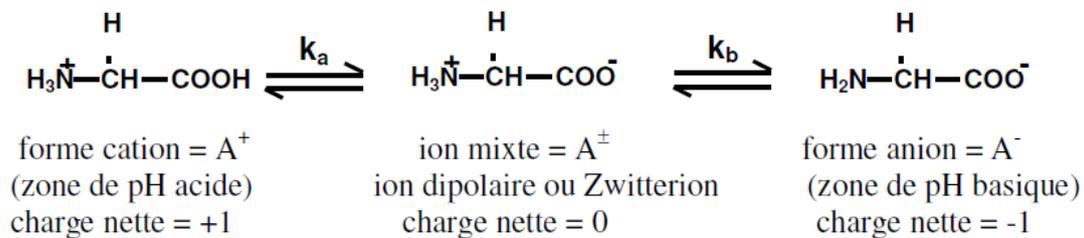
Les acides aminés en solution sont toujours sous formes chargés. Cette charge dépend du pH, de la force ionique et des constantes de dissociation de leurs fonctions.

En milieu acide ces composés amphotères gagnent des protons. La fonction α -CCOH qui a la constante de dissociation la plus forte donc le pK le plus bas, va s'ioniser la première.

L'AA portera à la fois la charge positive et négative. Au moment où les charges (+) et (-) s'équilibrent, le pH du milieu correspond au point isoélectrique (pHi).

En milieu basique, l'AA perd un proton et sera chargé négativement.

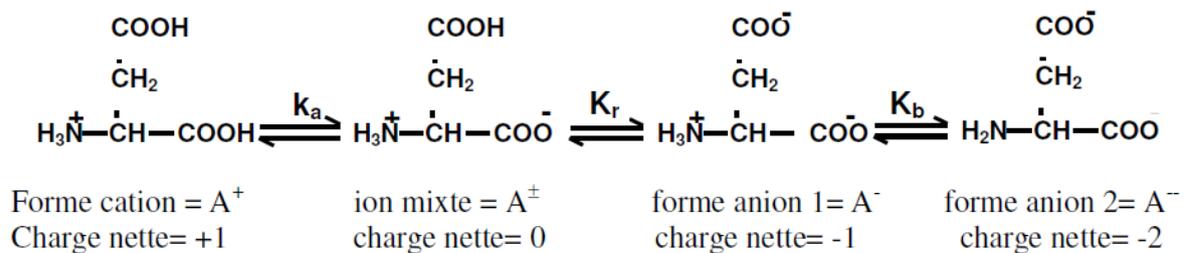
1-Cas d'un acide aminé neutre : ex. **la glycine (Gly)**



On définit par pH isoélectrique, pHi, le pH pour lequel la charge nette de la molécule est nulle c'est-à-dire le pH auquel va prévaloir la forme ion dipolaire ou zwitterion A^\pm . On calcule ce pH à partir des constantes de dissociation k_a et k_b des fonctions ionisables. D'où :

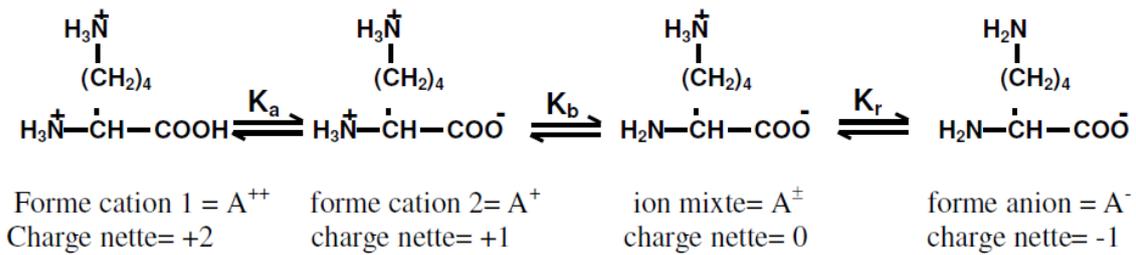
$$\text{pHi} = \frac{\text{pk}_a + \text{pk}_b}{2}$$

3- Cas d'un acide aminé acide : ex. **l'acide aspartique (Asp)**



$$\text{pHi} = \frac{\text{pk}_a + \text{pk}_r}{2}$$

3-Cas d'un acide aminé basique : ex. **la lysine**



$$\text{pHi} = \frac{\text{pk}_b + \text{pk}_r}{2}$$

1. But

Détermination du pk et du pHi de l'acide aminé, glycine ou glycolle (Gly)

2. Principe

Il s'agit de suivre l'évolution du pH sur un volume déterminé d'une solution d'AA de pH égale à 2, en fonction de la quantité de NaOH ajoutée.

3. Matériel et réactifs utilisés

- pH mètre ;
- Agitateur, barreau aimanté ;
- Burette ;
- Bechers ;
- Solution NaOH 0,2N ;
- Solution de glycine 20mM (0,02M) ;
- Solution d'HCL 2N.

4. Mode opératoire

- Mesurer 50 ml de la solution d'AA à l'aide d'une éprouvette ;
- Verser la solution d'AA dans un bûcher de 100 ml ;
- Après étalonnage du pH mètre, rincer l'électrode du pH mètre à l'eau distillée, et la placer dans le bûcher contenant la solution d'AA ;
- Mesurer le pH de départ de la solution et le ramener à pH 2 avec quelques gouttes d'HCL 2N ;

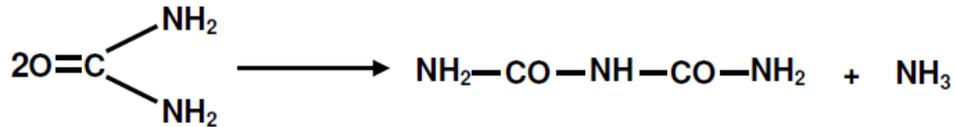
- Mettre dans la burette la solution de NaOH 0,2N ;
- Titrer la solution d'acide aminé en ajoutant la solution de soude par additions successives de 0,5 ml tout en agitant ;
- Pour chaque volume de soude ajouté, noter ce volume et noter la valeur du pH correspondante et ce jusqu'à pH 10,5.

5. Exploitation des résultats

- Qu'appelle-t-on le pH isoélectrique de l'acide aminé en solution ?
- Tracer la courbe de titration $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$.
- Déterminer à partir de cette courbe les différentes valeurs de pK et le pHi de cet acide aminé.

TP N°6 : Dosage des protéines par la méthode du Biuret**1. Principe**

La Biuret résulte de la condensation de 2 molécules d'urée avec départ d'ammoniac.



La Biuret réagit en milieu alcalin avec le CuSO_4 en donnant une coloration violette dont le maximum d'absorption est à 540 nm.

Par suite de leur analogie de structure avec la Biuret, Les peptides et les protéines donnent la même réaction. La zone d'utilisation est de 1 à 20 mg/ml.

2. Matériel et réactifs

- Spectrophotomètre à 540 nm ;
- Eau physiologique : solution contenant 9g de NaCl dans 1L d'eau distillée ;
- Solution standard d'ovalbumine à 10 mg/ml dans de l'eau physiologique ;
- Solution inconnue d'ovalbumine (nous utiliserons un blanc d'œuf) ;
- Réactif de biuret : - $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 1,5g ;
- NaOH : 300 ml à 10% ;
- KI : 1g ;
- Tartrate double de Na et K : 6g ;
- H_2O Q.s.p 1L (Q.s.p = Quantité suffisante pour) ;
- tubes à essai de 15 ml ;
- Pipettes (1ml, 2ml et 5ml) ;
- Portoirs pour 10 tubes à essai.

3. Mode opératoire**3.1. Préparation de la solution inconnue d'ovalbumine**

- Peser un blanc d'œuf. Noter sa masse ;
- Mettre le blanc d'œuf en solution dans 1L d'eau physiologique.

3.2. Préparation d'une gamme étalon d'ovalbumine

- A partir de la solution étalon d'ovalbumine à 10 mg/ml, réaliser une gamme de 6 tubes (tubes 1-6) contenant de 2 à 10 mg d'ovalbumine par tube.
- Préparer en même temps les tubes expérimentaux qui contiendront une prise d'essai de solution inconnue d'ovalbumine (tubes 7-8).

tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution standard d'ovalbumine à 10mg/mL (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1		
Solution inconnue d'ovalbumine (ml)							0,4	0,8
Eau physiologique (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,6	0,2
Réactif du Biuret (ml)	4 ml dans chaque tube à essai							
Attendre 10 min à l'obscurité à température ambiante								
Lire les D.O à 540nm								

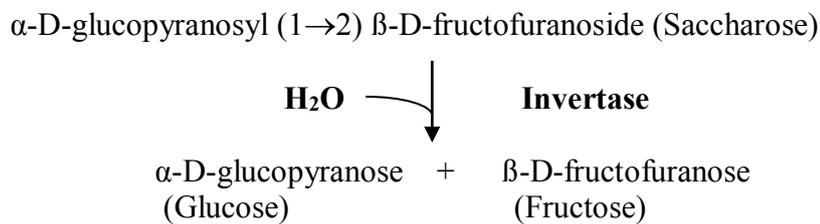
4. Résultats expérimentaux

- 4.1. Etablir un tableau complet de colorimétrie: N° de tube, composition des tubes, Absorbance, quantités et concentration en ovalbumine par tube.
- 4.2. Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage : $A = f(\text{quantité de protéines/tube})$
- 4.3. En déduire la concentration en protéines (en g/l) dans la solution de blanc d'œuf puis en déduire la teneur en protéines pour 100 g de blanc d'œuf.

TP N°7: Extraction et mise en évidence de l'activité de la β -fructofuranosidase (invertase) de la levure vis-à-vis la concentration du substrat

Généralités

Le saccharose est le plus répandu des diholosides, Il est extrait de la betterave et de la canne à sucre. C'est un sucre non réducteur dextrogyre qui par hydrolyse chimique ou enzymatique, libère un mélange équimolaire de glucose et de fructose, tous deux réducteurs. L'invertase ou β -fructofuranosidase est une hydrolase capable de scinder le saccharose en glucose et fructose par rupture des liaisons β -fructofuranosiques.



But

Il s'agit d'extraire la fraction soluble de la levure de boulangerie, de mettre en évidence l'activité invertase dans l'extrait cellulaire et de déterminer les conditions optimales de cette activité enzymatique. Ces expériences illustrent le mode d'action des enzymes en général.

L'invertase est une enzyme intracellulaire, son extraction nécessite obligatoirement la rupture de la membrane cellulaire.

Principe

L'activité enzymatique de l'invertase peut être étudiée en dosant les sucres réducteurs libérés après hydrolyse par une des méthodes suivantes :

- La méthode à la glucose-oxydase ;
- Par réduction à la liqueur de Fehling.

Matériel et réactifs

- levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- bicarbonate de sodium à 0,1M (préparation : 8,4 g dans 1L eau distillée) ;
- solutions sucrées (glucose, fructose) ;

- centrifugeuse ;
- tubes à centrifuger ;
- étuve ;
- spectrophotomètre UV-visible ;
- micropipettes ;
- éprouvettes ;
- flacons pour la congélation.

Mode opératoire

- Suspender 10g de levure de boulangerie dans 40 ml de bicarbonate de sodium à 0,1M ;
- Incuber à 35-40°C pendant 24H ;
- Centrifuger à 5000 tr/min pendant 5 min ;
- Après centrifugation, récupérer le surnageant contenant les molécules solubles entre autres l'invertase ;
- Jeter le culot formé de débris cellulaire ;
- Noter le volume total de surnageant (éprouvette) ;
- Conserver le surnageant au froid pour les manipulations ultérieures.

Mise en évidence de l'activité enzymatique

Introduire dans des tubes différents les solutions suivantes :

	1	2	3	4	5	6	7
Solution	Eau distillée	Solution glucose	Solution saccharose				
Volume (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Concentration (g/l)	/	1	20	20	25	30	35
Invertase	1 ml	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Eau distillée	-	-	1 ml	-	-	-	-

Pour la méthode de Liqueur de Fehling

- On prépare autres 7 tubes à essais ;
- Ajouter 1ml de liqueur de Fehling dans chaque tube de 1 à 7 ;
- Ajouter 1ml de l'échantillon déjà préparé (tableau) dans chaque tube.
- Agiter le mélange manuellement ;
- Mettez le mélange au bain marie ;
- Expliquer les résultats.

Il faut ici que vous basez vos remarques sur les points suivants :

- La vitesse de l'apparition de précipité rouge brique ;
- La quantité de précipité rouge brique ;
- L'intensité de couleur apparu.

Pour la méthode spectrophotométrique

- On prépare autres 7 tubes à essais ;
- Ajouter 1ml de réactif de glucose oxydase dans chaque tube de 1 à 7 ;
- Ajouter 10 μ l de l'échantillon déjà préparé (tableau) dans chaque tube ;
- Agiter le mélange manuellement ;
- Laisser le mélange quelques minutes à la température ambiante ;
- lire la densité optique (D.O.) de tubes à une longueur d'onde ($\lambda=500\text{nm}$) ;
- Mesurer la concentration de glucose dans la solution des tubes 3, 4, 5,6 et 7 en utilisant la solution de tube n° 2 comme étalon ;
- Expliquer les résultats.

TP N°8: Extraction et mise en évidence de l'activité de la β -fructofuranosidase (invertase) de la levure vis-à-vis la concentration d'enzyme

But

Il s'agit d'extraire la fraction soluble de la levure de boulangerie, de mettre en évidence l'activité invertase dans l'extrait cellulaire et de déterminer les conditions optimales de cette activité enzymatique. Ces expériences illustrent le mode d'action des enzymes en général.

L'invertase est une enzyme intracellulaire, son extraction nécessite obligatoirement la rupture de la membrane cellulaire.

Principe

L'activité enzymatique de l'invertase peut être étudiée en dosant les sucres réducteurs libérés après hydrolyse par une des méthodes suivantes :

- La méthode à la glucose-oxydase ;
- Par réduction à la liqueur de Fehling.

Matériel et réactifs

- levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- bicarbonate de sodium à 0,1M (préparation : 8,4 g dans 1L eau distillée) ;
- solutions sucrées (glucose, fructose) ;
- centrifugeuse ;
- tubes à centrifuger ;
- étuve ;
- spectrophotomètre UV-visible ;
- micropipettes ;
- éprouvettes ;
- flacons pour la congélation.

Mode opératoire

- Suspender 10g de levure de boulangerie dans 40 ml de bicarbonate de sodium à 0,1M ;
- Incuber à 35-40°C pendant 24H ;
- Centrifuger à 5000 tr/min pendant 5 min ;

- Après centrifugation, récupérer le surnageant contenant les molécules solubles entre autres l'invertase ;
- Jeter le culot formé de débris cellulaire ;
- Noter le volume total de surnageant (éprouvette) ;
- Conserver le surnageant au froid pour les manipulations ultérieures.

Mise en évidence de l'activité enzymatique

Introduire dans des tubes différents les solutions suivantes :

	1	2	3	4	5	6	7
Solution	Eau distillée	Solution glucose	Solution saccharose	Solution saccharose	Solution saccharose	Solution saccharose	Solution saccharose
Volume (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Concentration (g/l)	/	1	35	35	35	35	35
Invertase	1 ml	1 ml	-	1 ml	750 µl invertase 250 µl eau	500 µl invertase 500 µl eau	250 µl invertase 750 µl eau
Eau distillée	-	-	1 ml	-	-	-	-

Pour la méthode de Liqueur de Fehling

- On prépare autres 7 tubes à essais ;
- Ajouter 1ml de liqueur de Fehling dans chaque tube de 1 à 7 ;
- Ajouter 1ml de l'échantillon déjà préparé (tableau) dans chaque tube.
- Agiter le mélange manuellement ;
- Mettez le mélange au bain marie ;
- Expliquer les résultats.

Il faut ici que vous basez vos remarques sur les points suivants :

- La vitesse de l'apparition de précipité rouge brique ;

- La quantité de précipité rouge brique ;
- L'intensité de couleur apparue.

Pour la méthode spectrophotométrique

- On prépare autres 7 tubes à essais ;
- Ajouter 1ml de réactif de glucose oxydase dans chaque tube de 1 à 7 ;
- Ajouter 10 μ l de l'échantillon déjà préparé (tableau) dans chaque tube ;
- Agiter le mélange manuellement ;
- Laisser le mélange quelques minutes à la température ambiante ;
- lire la densité optique (D.O.) de tubes à une longueur d'onde ($\lambda=500\text{nm}$) ;
- Mesurer la concentration de glucose dans la solution des tubes 3, 4, 5,6 et 7 en utilisant la solution de tube n° 2 comme étalon ;
- Expliquer les résultats.

Références bibliographiques

-ALI O. MED SALEM O. BOUKHARY ET AHMEDOU OULD HOUMEIDA, 2008. Travaux pratiques de biochimie structurale deuxième année biologie-géologie département de biologie faculté des sciences et techniques. Université de Nouakchott.

-CATHERINE BARATTI-ELBAZ ET PIERRE LE MARECHAL, 2015- Biochimie. Ed. Dunod, Paris, 160 p.

- CUVELIER C., CABARAUX J.-F., DUFRASNE I., HORNICK J.-L., ISTASSE L. 2004. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. Manuscrit déposé le 26/09/2004 *Ann. Méd. Vét.*, 2004, **148**, 133-140, formation continue – article de synthèse.

-FAUREH Patrice : Structure des glucides, *Biochimie métabolique* Année universitaire 2011/2012. Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés. Etudes de santé 1^{ère} année commune.

-MAMOUDOU H. DICKO, 2006. Travaux Pratiques de Biochimie Structurale et d'Enzymologie From the SelectedWorks. Available at: <http://works.bepress.com/dicko/17>.

- SERGE WEINMAN ET PIERRE MEHUL, Toute la biochimie. Ed. Dunod, Paris, 464p.

-SERVICE DE BIOCHIMIE, FACULTE DES SCIENCES SEMLALIA, 2021-2022. Travaux pratique module biochimie structurale déroulement et organisation des tp de biochimie sv-s3 : 2021 / 2022service de biochimie, faculté des sciences semlalia, marrakech 2021-2022 université cad i ayyad faculté des sciences semlalia département de biologie b.p : 2390, 40000, marrakech, (maroc).