

## TD 1 TAB- L3 Biochimie et Pharmaco-Toxicologie

### Exercice 1:

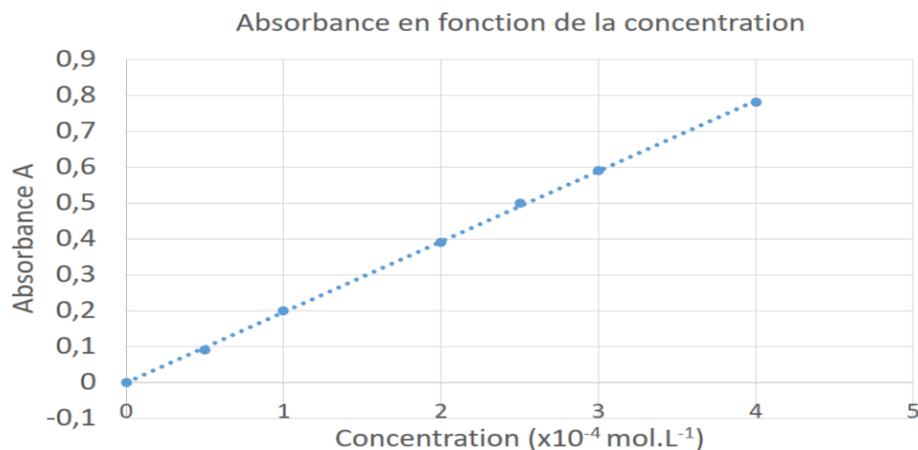
On prépare plusieurs solutions diluées d'une solution commerciale de dichromate de potassium. Le tableau suivant donne les concentrations et l'absorbance correspondante pour chacune de ces solutions.

<b>Concentration (mol.L<sup>-1</sup>) (x 10<sup>-4</sup>)</b>	0	0,5	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0
<b>Absorbance A</b>	0	0,090	0,20	0,39	0,50	0,59	0,78

a- Tracer sur un graphe la courbe d'étalonnage représentant l'absorbance en fonction de la concentration.

b- La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ?

c- On mesure l'absorbance de la solution S :  $A = 0,67$ . Déterminer graphiquement la concentration  $C_S$  de la solution S en dichromate de potassium.



(b) La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ? **La courbe obtenue est une droite passant par l'origine, cela signifie que l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante. La loi de Beer-Lambert est donc bien vérifiée.**

(c) On mesure l'absorbance de la solution S :  $A = 0,67$ . Déterminer graphiquement la concentration  $C_S$  de la solution S en dichromate de potassium. Par lecture graphique, pour  $A = 0,67$ , on trouve une concentration de  **$C_S = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$** .

### Exercice 2:

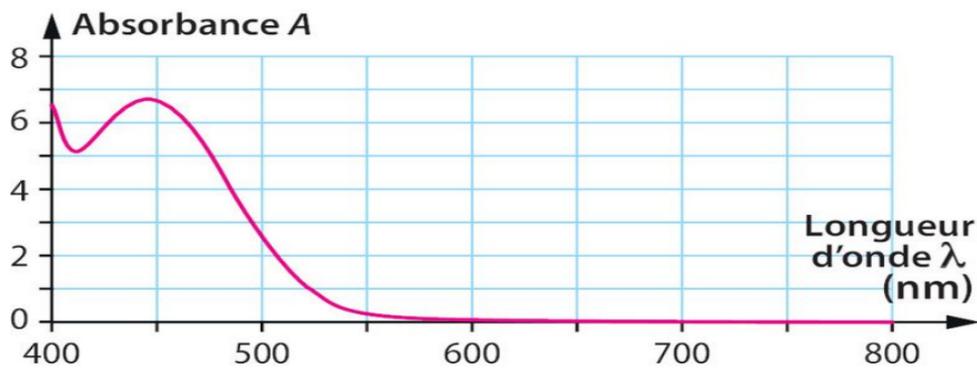


FIGURE 1 – Spectre d'absorption d'une solution de dichromate de potassium

1-Quelle longueur d'onde faut-il régler le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance d'une solution de dichromate de potassium ? Justifier.

**Il faut régler le spectrophotomètre au maximum d'absorbance donc à  $\lambda = 450$  nm.**

### Exercice 3 :

1) Calculez le  $\epsilon_{\max}$  d'un composé dont l'absorption maximale (A) est de 1,2. La longueur de la cellule l est 1 cm, la concentration est 1,9 mg par 25 ml de solution et la masse moléculaire du composé est de 100 g/mol.

2) Calculer le coefficient d'absorption molaire d'une solution de concentration  $10^{-4}$  M, placée dans une cuve de 2 cm, avec  $I_0 = 85,4$  et  $I = 20,3$ .

1) On applique la loi de Beer Lambert,  $\epsilon = 1578,94 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

2)  $\epsilon = 3119,8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### Exercice 4 :

Il est possible de doser simultanément par spectroscopie UV-Visible le cobalt et le nickel dans une solution aqueuse en se basant sur l'absorption des complexes de ces métaux avec le quinolinol-8. Les coefficients d'absorption molaire (en  $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) sont  $\epsilon_{\text{Co}} = 3529$  et  $\epsilon_{\text{Ni}} = 3228$  à 365 nm, et  $\epsilon_{\text{Co}} = 428,9$  et  $\epsilon_{\text{Ni}} = 0$  à 700 nm .

Questions : Calculer la concentration en nickel et en cobalt dans une solution indiquant une absorbance de 0,814 à 365 nm et 0,056 à 700 nm (cellules de 1 cm).

D'après la loi de Beer Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$$

Où E est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), l est l'épaisseur de la cuve (cm) et C la concentration de la solution (mol/L).

A chaque niveau d'absorbance : (échantillon) =  $E \cdot l \cdot C$  du Co +  $E \cdot l \cdot C$  du Ni

Donc en appliquant, nous avons :

$$\text{à } 365 \text{ nm} : 0,814 = 3529 \cdot C_{\text{Co}} + 3228 \cdot C_{\text{Ni}}$$

$$\text{à } 700 \text{ nm} : 0,056 = 428,9 \cdot C_{\text{Co}} + 0 \cdot C_{\text{Ni}}$$

$$C_{\text{Co}} = 0,056 / 428,9 = \mathbf{0,13 \cdot 10^3 \text{ mol/L}}$$

$$0,814 = (3529 \cdot 0,13 \cdot 10^3) + (3228 \cdot C_{\text{Ni}})$$

$$0,354 = 3228 \cdot C_{\text{Ni}}$$

$$C_{\text{Ni}} = 0,354 / 3228$$

$$\mathbf{C_{Ni} = 0,109 \cdot 10^3 \text{ mol/L}}$$

**Exercice 5 :** En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléique pure à 260 nm, on obtient sa concentration à l'aide de l'équation de la loi Beer-Lambert. Le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm. Ces coefficients d'extinction sont listés ci-dessous : ADN simple brin =  $\sim 33 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$ , ADN simple brin:  $0,027 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Oligo sequence	Oligo-specific conversion factor ( $\mu\text{g}/A_{260}$ )	$A_{260}$
AAA AAA AAA AAA AAA AAA	25.41	20.75
/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT TTT CCC	38.18	36.96
CTC AAT TGT AGG TAC TAC TTC	32.19	19.97

### Questions 1 :

A- Quelle relation existe-t-il entre I et  $I_0$  et A ? Rappeler la loi de Beer-Lambert.

B- Calculer les concentrations des oligonucléotides.

### Question 2:

Le Kit QIAamp est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice pour l'isolation et purification de l'ADN génomique. La méthode Trizol utilise un produit chimique qui contient de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol.

A- Quelle est la longueur d'onde optimale ( $\lambda_{\text{max}}$ ) pour une analyse quantitative ?

B- Calculer les concentrations des oligonucléotides.

### Question 3 :

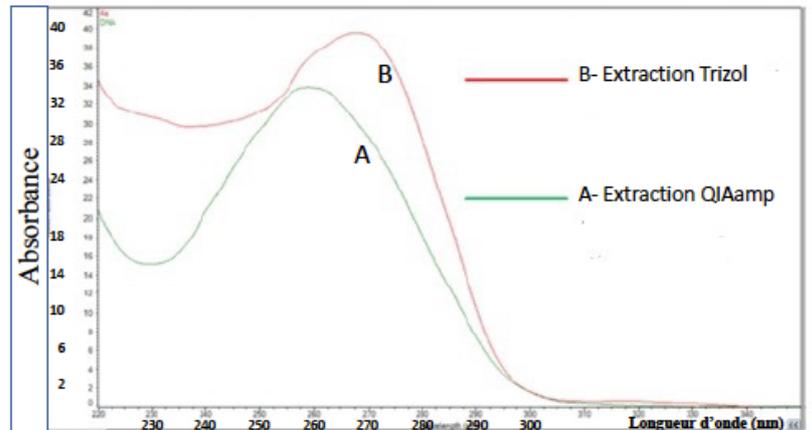
Plusieurs paramètres basés sur les absorptions spectrophotométriques sont utilisés pour analyser la pureté d'une solution d'acides nucléiques.

A- Analyser la pureté des acides nucléiques des deux extractions.

B- Interpréter les résultats.

/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT  
CCC CCT TTT CCC

**Figure:** Spectre typique relatif à un dosage d'acides nucléiques. A- Extraction QIAamp. B- Extraction Trizol.



**1-A)** Quelle relation existe-t-il entre I et I<sub>0</sub> et A ? Rappeler la loi de Beer-Lambert.

Lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectroscope, elle reçoit un rayonnement d'intensité I<sub>0</sub>. Une partie de cette lumière incidente notée I<sub>0</sub> est absorbée par le milieu et le reste, noté I, est transmis. L'intensité du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I<sub>0</sub>).

La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ .

**1-B)** Les concentrations des oligonucléotides.

loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ .

O1- 5' AAA AAA AAA AAA AAA AAA 3'

$C = 20,75 * 33 = 684,75 \text{ ng/}\mu\text{l}$

O2-5' CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCT TTT CCC 3'

$C = 36,96 * 33 = 1219,68 \text{ ng/}\mu\text{l}$

O3 -5' CTC AAT TGT AGG TAG TAG TTC 3'

$C = 19,97 * 33 = 659,01 \text{ ng/}\mu\text{l}$

**Ou bien**

O1- 5' AAA AAA AAA AAA AAA AAA 3'

$C = 20,75 * 25,41 = 527,26 \text{ ng/}\mu\text{l}$

O2-5' CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCT TTT CCC 3'

$C = 36,96 * 38,18 = 1411,13 \text{ ng/}\mu\text{l}$

O3 -5' CTC AAT TGT AGG TAG TAG TTC 3'

$C = 19,97 * 32,19 = 642,83 \text{ ng/}\mu\text{l}$

**2-A)** Les acides nucléiques absorbent dans l'UV à  $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$

**2B)** Les concentrations des oligonucléotides

**Extraction A : QIAamp**

loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ .

$A_{260} = \approx 34$

$C = 34 * 33 = 1122 \text{ ng/}\mu\text{l}$

**Extraction B : Trizol**

$A_{260} = \approx 38$

$$C=38 * 33 = 1254 \text{ ng/ } \mu\text{l}$$

**3-A)** La pureté des acides nucléiques des deux extractions.

**Extraction A : QIAamp**

$$A260 / A230 = 2.3.$$

$$A260/A280 = 1.9$$

**Extraction B : Trizol**

$$A260 / A230 = 1.2$$

$$A260/A280 = 1.3$$

**3-B)** La pureté des acides nucléiques des deux extractions.

Le spectre et les ratios  $A260 / A230$  et  $A260/A280$  des oligonucleotides (extraction Trizol) sont décalés par rapport à l'extraction QIAamp.

Le ratio  $A260 / A230$  est un indicateur de pureté (un ratio  $260 / A230$  compris entre 2 et 2.2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le pheno, Trizol et EDTA.

Le ratio  $A260/A280$  est compris entre 1.8 et 2 pour l'ADN. Ce ratio est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques.