

TP 2 — Organisation d'un laboratoire type de Biochimie et Enzymologie

I. Objectifs pédagogiques

1. Identifier et décrire les équipements spécifiques d'un laboratoire de biochimie ;
2. Comprendre les principes de la centrifugation, de la spectrophotométrie et de l'électrophorèse ;
3. Maîtriser les règles d'utilisation et d'étalonnage du pH-mètre et du spectrophotomètre ;
4. Appliquer la loi de *Beer-Lambert* pour calculer la concentration d'une solution.

II. Introduction

Le laboratoire de biochimie est actif dans les secteurs médical (biochimie clinique) et alimentaire (biochimie alimentaire). Il réalise des dosages quantitatifs de molécules biologiques (protéines, glucides, lipides, enzymes, ions) par des méthodes spectrophotométriques, enzymatiques, chromatographiques et électrophorétiques. Ce TP présente les équipements fondamentaux du laboratoire de biochimie, avec un focus particulier sur le centrifugeur, le pH-mètre, le spectrophotomètre et l'électrophorèse — appareils qui feront l'objet de vos TP de biochimie analytique.

III. Équipements du laboratoire de Biochimie

1. pH-mètre

Rappel théorique

Le $\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$ exprime la concentration en ions hydronium d'une solution sur une échelle de 0 à 14 (échelle de Sørensen, 1909). Une variation d'une unité pH correspond à une variation d'un facteur 10 de la concentration en H_3O^+ .

Composantes du pH-mètre de paillasse

- Électrode combinée : électrode de verre (mesure) + électrode de référence Ag/AgCl (signal stable) ;
- Sonde de température (compensation manuel et/ou automatique des variations de T°) ;
- Bras porte-électrodes, panneau de contrôle, afficheur numérique ;
- Solutions étalons (tampons de calibration : pH 4,01 ; pH 7,00 ; pH 10,01).

Protocole d'étalonnage

1. Rincer l'électrode avec de l'eau distillée, essuyer doucement avec papier doux ;
2. Régler la température de travail sur le potentiomètre ;
3. Immerger l'électrode dans le tampon pH 7,00 → ajuster jusqu'à affichage 7,00 ;
4. Immerger dans le tampon pH 4,01 → ajuster jusqu'à affichage 4,01 ;
5. Optionnel (3ème point) : tampon pH 10,01 ;
6. L'étalonnage doit être refait après tout choc mécanique ou thermique de l'électrode.

2. Centrifugeur

PRINCIPE

Le centrifugeur applique une force centrifuge ($FCR = 1,12 \times r \times n^2/10^6$ en $\times g$, où r = rayon en mm et n = vitesse en rpm) pour séparer des composants de densités différentes : les éléments plus denses sédimentent (culot) et les moins denses restent en suspension (surnageant).

Classes de centrifugeurs

| Classe | Vitesse max (rpm) | FCR max ($\times g$) | Placement |
|-------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| Basse vitesse (+ microcentrifugeur) | 3 000 (14 000) | 3 000 (18 000) | Paillasse |
| Haute vitesse | 30 000 | 100 000 | Sol — réfrigéré |
| Ultra-vitesse | 130 000 | 1 000 000 | Sol — réfrigéré + vide |

Types de rotors

- À angle fixe (fixed angle, 20° – 40°) : sédimentation rapide, culot sur paroi puis fond du tube ;
- À godets mobiles (*swinging bucket*) : sédimentation dans le fond du tube, bandes bien définies, centrifugation isopycnique ;
- Verticaux (tube vertical) : vitesses très élevées, temps de centrifugation court.

Règles de sécurité essentielles

- Équilibrer les charges symétriquement (différence de masse $< 0,1$ g) ;
- Vérifier l'intégrité des rotors avant utilisation (pas de fissures, de corrosion) ;
- *Ne jamais ouvrir le couvercle en cours de fonctionnement ;*
- *Décontaminer le rotor avec désinfectant germicide après chaque usage en microbiologie.*

3. Spectrophotomètre UV-Visible

Loi de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \times C \times L$$

Avec : A = absorbance (sans unité) ; ϵ = coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) ; C = concentration molaire (mol/L) ; L = longueur du trajet optique (cm, = 1 pour cuves standard).

La transmittance $T = I/I_0 \times 100$ (%) et l'absorbance $A = -\log T = \log(I_0/I)$.

Composantes du spectrophotomètre

- Source lumineuse polychromatique : lampe tungstène (visible 380–780 nm) + lampe deutérium (UV 180–380 nm) ;
- Monochromateur (prisme ou réseau de diffraction) : sélection de la longueur d'onde ;
- Fente d'entrée et fente de sortie : définissent la bande passante spectrale ;
- Porte-cuve : reçoit les cuves en verre (visible), plastique (visible) ou quartz (UV + visible) de 1 cm de côté ;
- Photodétecteur (photodiode ou photomultiplicateur) : mesure l'intensité lumineuse transmise ;
- Afficheur numérique : absorbance (A), transmittance ($T\%$), concentration (après étalonnage).

Protocole de mesure

1. Allumer 15 min avant utilisation (stabilisation de la lampe) ;
2. Sélectionner la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) de la molécule étudiée ;
3. Faire la mise à zéro (blanc) avec le solvant seul dans la cuve ;
4. Établir la courbe d'étalonnage (A en fonction de C) à partir de solutions de concentration connue ;
5. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et lire la concentration sur la courbe d'étalonnage.

4. Lyophilisateur

Le lyophilisateur réalise la déshydratation par sublimation (passage direct de l'eau de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par l'état liquide) sous vide poussé. C'est la technique de conservation de référence pour les biomolécules thermosensibles (enzymes, anticorps, acides nucléiques).

Étapes de la lyophilisation

1. Congélation rapide de l'échantillon (-40°C à -80°C) ;
2. Dessiccation primaire (sublimation de la glace libre) sous vide poussé (0,1–0,5 mbar) ;
3. Dessiccation secondaire (désorption de l'eau liée) à température légèrement positive.

5. Électrophorèse

Principe

L'électrophorèse sépare des molécules chargées (acides nucléiques, protéines) sous l'effet d'un champ électrique, en fonction de leur rapport charge/masse (ou uniquement de leur masse en SDS-PAGE). Les molécules migrent vers l'anode (si chargées négativement) ou la cathode (si chargées positivement).

Types d'électrophorèse

- Gel d'agarose (0,5–3 %) : séparation des acides nucléiques (ADN, ARN) selon leur taille ;
- PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) : séparation des protéines selon charge, forme et masse ;
- SDS-PAGE : les protéines sont dénaturées par SDS → séparation uniquement selon la masse moléculaire.

Composantes du système

- Cuve horizontale (agarose) ou verticale (PAGE/SDS-PAGE) avec couvercle de sécurité ;
- Plaque de coulage et peigne (formation des puits pour dépôt des échantillons) ;
- Générateur de courant continu (réglage de la tension en V et de l'intensité en mA) ;
- Système de visualisation : transilluminateur UV (ADN avec bromure d'éthidium) ou colorimétrie (Coomassie bleu pour protéines).

⚠ Le bromure d'éthidium (BET) est un agent intercalant mutagène et potentiellement cancérigène. Porter obligatoirement des gants nitrile lors de son utilisation. Des alternatives moins toxiques existent (GelRed, SYBR Safe).

6. Conductimètre

Le conductimètre mesure la conductivité électrique (κ , en $\mu\text{S}/\text{cm}$ ou mS/cm) d'une solution, qui est proportionnelle à la concentration totale en ions. Applications : contrôle de la pureté de l'eau distillée, dosage des électrolytes.