



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA

Maria Sala-Cirtog

Aimée Chiș

Liviu Tămaș

Mirabela Romanescu

Silvia Stoia

Anda Alexa
Andrei Anghel
Alexandra Bendelic
Diana Bonțe
Georgeta Bujor
Ramona Buzatu

Alina Georgescu
Daniela Grecu
Camelia Gurban
Anca Marcu
Cătălin Marian
Diana Nitușcă

Flavia Petrașcu
Corina Samoilă
Felicia Sfrijan
Ioan Ovidiu Sirbu
Edward Șeclăman

Coordonateur: MARILENA DINUȚI

BIOCHIMIE

1^{ère} année, 1^{er} semestre
NOTES DE LABORATOIRE

GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE
DE LABORATOR

Editura „Victor Babeș”
Timișoara, 2026

Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

<https://www.umft.ro/ro/organizare-evb/>

Director: Prof. univ. dr. SORIN URSONIU

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. ADRIAN VLAD

Referent științific: Prof. univ. dr. BOGDAN TIMAR

© 2026 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-625-4

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude au personnel du laboratoire pour son soutien précieux, son dévouement et son professionnalisme dans la préparation des travaux pratiques.

Mirela Antonescu
Paula Ciordas
Cristiane Dragomir
Claudia Koch
Dana Tautzenberger

TABLE DES MATIÈRES

L1. Organisation des laboratoires de chimie et de biochimie. Règles générales de protection. .5	
L2. Unités de mesure. Mesures de masse, de volume et de densité.	11
L3. Solutions. Dilutions. Solutions isotoniques. Solutions pour perfusion.	23
L4. Acides. Bases. Titrage.	35
L5. La notion de pH. Détermination du pH des solutions et des liquides biologiques.	42
L6. Solutions tampons.	53
L7. Préparation des échantillons biologiques pour l'analyse de laboratoire. Centrifugation ..	61
L8. Protéines. Séparation des acides aminés par chromatographie.....	62
L9. Protéines. Dialyse. Électrophorèse.....	84
L10. Méthodes d'analyse optique. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	97
L11. Cofacteurs enzymatiques. La méthode du test optique	108
L12. Cinétique enzymatique. Détermination de K_m et V_{max}	116
L13. Dosage des vitamines.....	128
Références	135

L1. ORGANISATION DES LABORATOIRES DE CHIMIE ET DE BIOCHIMIE. RÈGLES GÉNÉRALES DE PROTECTION.

Le laboratoire de biochimie est organisé selon les mêmes principes que les laboratoires de chimie, mais avec des particularités supplémentaires dues à l'utilisation de matériels biologiques et de dispositifs spécifiques, nécessaires à l'étude et à la démonstration des processus métaboliques.

Différentes opérations qui s'exécutent dans la pratique de laboratoire de biochimie et chimie peuvent devenir dangereuses dans les mains de ceux qui ne connaissent pas la nature des matériaux qu'ils utilisent et ne sont pas manipulés avec soin. La meilleure précaution que vous pouvez prendre pour éviter les accidents est de préparer en détail toutes les expériences de laboratoire et de garder une table soignée, propre et bien organisé.

Règles générales de protection dans le laboratoire de chimie et de biochimie

1. Tout accident, quelle que soit son importance apparente, doit être immédiatement signalé à l'assistant de laboratoire.
2. L'accès au laboratoire n'est autorisé qu'aux étudiants portant une blouse de laboratoire propre. Des gants et des lunettes de protection doivent être utilisés pour certaines opérations. Le poste de travail doit être maintenu parfaitement propre pendant toute la durée du travail. Tout liquide ou substance solide accidentellement renversé sur les paillasse, les balances, le spectrophotomètre ou tout autre appareil doit être immédiatement nettoyé. Pour cette raison, les étudiants doivent toujours avoir un chiffon à portée de main.
3. Tous les appareils et outils à utiliser doivent être vérifiés avant de commencer le travail; toute anomalie doit être immédiatement signalée à l'assistant de laboratoire.
4. Les appareils électriques ne doivent être branchés qu'avec les mains sèches. Après utilisation, les appareils électriques doivent être débranchés de l'alimentation électrique.
5. Tous les flacons contenant des produits chimiques doivent être correctement étiquetés et munis de bouchons appropriés. N'utilisez aucun produit chimique si le flacon n'est pas étiqueté. Ne pas échanger les bouchons entre eux.
6. Les acides, les hydroxydes, les agents oxydants, les papiers et le verre brisé ne doivent jamais être jetés dans les éviers.
7. Les aliments et les boissons sont strictement interdits dans la zone du laboratoire.

Substances inflammables

La plupart des incendies de laboratoire sont causés par des liquides inflammables (alcool, éther, acétone, hydrocarbures, etc.). Ne travaillez pas avec de tels liquides près d'une flamme nue. Les incendies provoqués par les solvants doivent être éteints immédiatement en étouffant les flammes avec des chiffons, du sable ou un extincteur. Ne jetez pas les liquides inflammables dans les égouts. Une fois l'incendie déclaré, n'essayez jamais de l'éteindre avec de l'eau. Les agents oxydants (acide chromique, chlorates, bromures, nitrates, nitrites, etc.) peuvent facilement s'enflammer au contact de substances organiques.

- Les brûlures du premier degré doivent être rincées sous l'eau froide courante.
- Les brûlures du deuxième degré doivent être rincées sous l'eau froide, puis traitées avec des poudres (ou pommades) spéciales et recouvertes sans serrer d'un pansement stérile non adhésif. Une consultation médicale ultérieure est obligatoire.

Substances toxiques et vénééuses

De nombreuses substances utilisées dans le laboratoire de biochimie sont hautement toxiques, même en petites quantités. Il est strictement interdit de manger dans le laboratoire, d'utiliser la verrerie de laboratoire pour boire de l'eau, ou de goûter les produits chimiques.

Les réactifs toxiques doivent être mesurés à l'aide de pipettes utilisant une tétine, une poire à pipeter ou un long tube en caoutchouc. Les pipettes en verre utilisées pour les liquides biologiques (sang, sérum, plasma, urine) doivent être munies d'ouate, ou bien des pipettes automatiques doivent être utilisées.

Il est strictement interdit de sentir des substances toxiques (chloroforme, éther, benzène, aniline, méthanol, monoxyde de carbone, chlore, oxyde d'éthylène, etc.).

Réactifs corrosifs

Parmi les agents corrosifs figurent les acides concentrés (HCl, H₂SO₄, HNO₃, HF, CH₃COOH), les bases alcalines (NaOH, KOH, etc.), le nitrate d'argent, le peroxyde d'hydrogène, le brome, les phénols, etc.

Les acides et les bases forts sont non seulement toxiques mais corrodent également les vêtements et la peau. Ne pipetez pas ces substances à la bouche; utilisez plutôt une tétine, une poire à pipeter ou une aspiration sous vide.

Les acides concentrés renversés sur la paillasse doivent d'abord être absorbés avec un chiffon, puis la surface doit être lavée abondamment avec de l'eau ou une solution de bicarbonate de sodium.

Évitez tout contact cutané avec les produits chimiques. Rincez immédiatement toute projection.

- Les brûlures causées par les acides doivent être rincées abondamment à l'eau, puis avec une solution de bicarbonate de sodium.
- Les brûlures causées par les bases doivent être rincées abondamment à l'eau, puis avec une solution d'acide borique à 2 % ou d'acide acétique à 2 %.
- Les brûlures dues à l'acide bromhydrique ou au brome doivent être rincées avec une solution de thiosulfate de sodium à 2 %.

Verrerie et appareils du laboratoire de chimie et de biochimie

La plomberie, le système d'éclairage, l'évacuation des eaux usées et l'installation de gaz doivent fonctionner dans des conditions optimales et desservir tous les postes de travail.

Les réactifs de laboratoire doivent être conservés dans des flacons étanches et étiquetés, rangés dans des armoires appropriées. Les réactifs étiquetés pour être conservés à +4°C ou -20°C doivent être conservés dans des réfrigérateurs ou congélateurs adaptés. Pour la plupart des travaux de laboratoire, les solutions nécessaires sont déjà préparées et placées sur les paillasses avec la verrerie et les instruments requis.

Les paillasses de laboratoire doivent être maintenues parfaitement propres pour éviter tout contact de la peau et des vêtements avec des substances chimiques.

Équipements courants de laboratoire

- | | |
|--|-------------------------------------|
| • réfrigérateur | • étuve de séchage |
| • bain chauffant | • plaque chauffante |
| • pompe péristaltique | • centrifugeuse de table (clinique) |
| • système de titrage automatique | • spectrophotomètre |
| • balance pharmaceutique | • balance analytique |
| • distillateur d'eau | • homogénéisateur |
| • agitateur magnétique chauffant (avec barreau magnétique) | |
| • thermostat à eau avec thermomètre à contact (bain à température contrôlée), etc. | |

Instruments

- plaque de base
- support de statif
- tige de statif
- noix de fixation universelle
- double noix de fixation
- tamis
- pince universelle, pince à tuyau
- anneau de statif (avec tige)
- trépied
- toile métallique
- triangle métallique
- bec Bunsen (brûleur à gaz)
- thermomètre
- chronomètre
- trompe à eau
- cage de protection
- dispositif d'aide au pipetage
- étiquettes
- marqueur indélébile
- pipette automatique avec embouts
- support à pipettes
- insert pour bain chauffant
- portoir à tubes à essai
- spatule à double extrémité
- spatule en plastique
- ciseaux
- couteau
- pincette
- goupillon
- bouchons (en caoutchouc ou en plastique)
- tétine de compte-gouttes
- tuyau en caoutchouc
- soufflet en caoutchouc
- lunettes de sécurité
- gants de protection
- poire à pipeter
- aiguille
- seringue

Instruments et récipients en verre

- bécher
- erlenmeyer (fiolle conique)
- tube à essai (et tube à essai à tubulure latérale)
- tube à centrifuger
- verre de montre
- boîte de Pétri
- ballon à fond rond
- ballon à fond plat
- capsule d'évaporation
- tube en verre
- baguette de verre (agitateur)
- entonnoir
- entonnoir de Büchner
- ampoule à décanter (entonnoir séparateur)
- creuset filtrant en verre
- cristalliseur
- plaque de dépôt
- éprouvette graduée
- pipette graduée
- pipette à bulbe
- burette
- pipette à piston
- fiole jaugée
- pipette Pasteur
- pissette
- flacon compte-gouttes
- fiole à vide (fiolle de Kitasato)
- bouteille de gaz comprimé
- mortier et pilon
- lame de microscope
- dessiccateur à vide
- flacon à col étroit (ou large)
- cuve à chromatographie
- réservoir d'eau distillée

La verrerie de laboratoire est constituée d'objets en verre nécessaires pour travailler avec des liquides, permettant la manipulation, le mélange et la mesure des solutions. Les plus utilisés sont:

- Tubes en verre ou en plastique de différentes dimensions. Les réactifs y sont introduits, mélangés, puis soumis à des dispositifs tels que thermostats, centrifugeuses ou spectrophotomètres.
- Verrerie de mesure de volume: éprouvettes graduées, fioles jaugées, pipettes et burettes.

Les éprouvettes graduées sont fabriquées en verre ou en plastique et marquées de graduations de volume (cm^3). La capacité totale est indiquée en haut, ainsi que la température de travail. Les mesures sont simples mais moins précises, c'est pourquoi elles sont principalement utilisées pour préparer des solutions de concentration approximative.

Les fioles jaugées sont sphériques ou en forme de poire, à fond plat et long col. Un trait de jauge circulaire sur le col indique le volume précis (5-2000 ml). Elles sont calibrées à 20 °C et utilisées pour préparer des solutions de concentrations très exactes. Les substances sont pesées sur une balance analytique, transférées dans la fiole à l'aide d'un entonnoir, puis rincées avec le solvant. Après dissolution complète, la fiole est amenée à température ambiante, puis remplie jusqu'au trait avec le solvant.

Les pipettes sont utilisées pour la mesure rapide et précise des liquides. Elles peuvent être manuelles ou automatiques. Selon leur calibration, elles peuvent avoir un volume fixe ou variable. Les pipettes à volume fixe ne mesurent que leur volume calibré (0,10-100 ml). Les pipettes à volume variable disposent de graduations intermédiaires (0,01-25 ml). Tailles courantes: 0,10, 1,0, 2,0, 5, 10 et 25 ml.

Les micropipettes sont calibrées en microlitres (μl) et ont des capacités comprises entre 0,01 et 0,02 millilitre (10-20 μl).

Les burettes sont des tubes gradués permettant un écoulement contrôlé du liquide. Pour cela, elles possèdent à leur extrémité inférieure un dispositif d'arrêt du liquide, tel qu'un robinet (robinet d'arrêt) ou un tuyau en caoutchouc muni d'une pince de Mohr. Les burettes sont calibrées pour des volumes de 1, 2, 10, 25, 50, 100 millilitres.

Questions

1. Énumérez trois règles générales de protection qui doivent toujours être respectées dans un laboratoire de chimie ou de biochimie.
2. Expliquez la principale différence de précision et d'usage entre une éprouvette graduée et une fiole jaugée.
3. Donnez deux exemples d'acides corrosifs et deux exemples de bases corrosives.
4. Que devez-vous faire en cas de projection d'une solution d'acide fort sur la main ? Et pour une base forte ?
5. Quelle est la méthode correcte pour éteindre un feu causé par un solvant ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L2. UNITÉS DE MESURE. MESURES DE MASSE, DE VOLUME ET DE DENSITÉ.

Unités de mesure

Le terme **grandeur physique (magnitude, quantité)** désigne tout ce qui peut varier en taille, en augmentant ou en diminuant. Toute mesure doit être exprimée par un nombre et une unité. L'unité identifie le type de propriété mesurée (masse, volume, concentration, etc.) et le nombre indique combien d'unités de cette propriété sont présentes.

Le Système international d'unités (**SI**, Système international d'unités) est dérivé du système métrique. Il comprend sept grandeurs fondamentales, dix-huit grandeurs dérivées et des unités supplémentaires, couvrant la plupart des besoins scientifiques (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1. Unités de base du SI

Grandeur physique (dimension)	Unité de mesure	Symbole
Longueur	mètre	m
Masse	kilogramme	kg
Temps	seconde	s
Intensité du courant électrique	ampère	A
Température thermodynamique	kelvin	K
Quantité de matière	mole	mole
Intensité lumineuse	candela	cd

Tableau 2. Unités dérivées du SI (exemples couramment utilisés en laboratoire)

Grandeur physique (dimension)	Unité de mesure	Symbole	Expression en d'autres unités SI	Expression en unités SI de base
Volume	mètre cube	m ³	-	m ³
Masse volumique	kilogramme par mètre cube	kg/m ³	-	kg/m ³
Concentration*	mole par mètre cube	mol/m ³	-	mol/m ³
Fréquence	hertz	Hz	-	s ⁻¹
Force	newton	N	-	m·kg·s ⁻²
Pression	pascal	Pa	N/m ²	m ⁻¹ ·kg·s ⁻²
Énergie, quantité de chaleur	joule	J	N·m	m ² ·kg·s ⁻²
Puissance	watt	W	J/s	m ² ·kg·s ⁻³
Potentiel électrique, différence de potentiel, force électromotrice	volt	V	W·A ⁻¹	m ² ·kg·s ⁻³ ·A ⁻¹
Activité catalytique	katal	cat	-	mol·s ⁻¹

* Le symbole % ne doit pas être utilisé pour exprimer la concentration des solutions, mais uniquement l'expression correcte dans l'unité respective (mg/100mL, g/L, etc.).

Les unités hors SI (additionnelles, supplémentaires) constituent une petite catégorie d'unités qui restent cohérentes avec le SI mais qui ne s'inscrivent pas exactement dans les deux premiers groupes. Elles sont principalement utilisées pour les angles (radian pour l'angle plan, stéradian pour l'angle solide) et les grandeurs sans dimension (%). D'autres unités (litre pour le volume, tonne pour la masse) continuent d'être utilisées pour des raisons pratiques (Tableau 3).

Tableau 3. Unités de mesure hors SI (exemples couramment utilisés en laboratoire)

Grandeur physique (dimension)	Unité de mesure	Symbole	Valeur en unités SI
Temps	minute	min	1 min = 60 s
	heure	h	1 h = 3600 s
	jour	d	1 d = 86400 s
Angle plan	degré	°	1° = $\pi / 180$ rad
	minute	'	1' = $\pi / 10800$ rad
	seconde	"	1" = $\pi / 648000$ rad
Volume	litre	L	1L = 1dm ³ ou 10 ⁻³ m ³
Masse	tonne	t	1t = 1000 kg

En pratique, de nombreuses grandeurs mesurées sont soit trop petites, soit trop grandes pour être exprimées de manière pratique en unités SI de base ou dérivées. Pour simplifier leur expression et éviter des nombres très grands ou très petits, le système SI utilise des préfixes standard représentant des puissances de dix (Tableau 4).

Tableau 4. Multiples et sous-multiples des unités

Préfixe	Symbole	Facteur de multiplication	Valeur numérique des unités
exa	E	10 ¹⁸	1 000 000 000 000 000 000
péta	P	10 ¹⁵	1 000 000 000 000 000
téra	T	10 ¹²	1 000 000 000 000
giga	G	10 ⁹	1 000 000 000
méga	M	10 ⁶	1 000 000
kilo	k	10 ³	1 000
hecto*	h	10 ²	100
déca*	da	10 ¹	10
déci*	d	10 ⁻¹	0,1
centi*	c	10 ⁻²	0,01
milli	m	10 ⁻³	0,001
micro	μ	10 ⁻⁶	0,000 001
nano	n	10 ⁻⁹	0,000 000 001
pico	p	10 ⁻¹²	0,000 000 000 001
femto	f	10 ⁻¹⁵	0,000 000 000 000 001
atto	a	10 ⁻¹⁸	0,000 000 000 000 000 001

Unités couramment utilisées en laboratoire

1. Masse. Unité de base SI = kilogramme (kg), unité de base CGS = gramme (g).

En chimie et en biochimie, le gramme (g) et ses sous-multiples (mg, μg) sont bien plus pratiques. Des unités encore plus petites, telles que le nanogramme (ng, 10^{-9} g) ou le picogramme (pg, 10^{-12} g), sont importantes en biologie moléculaire (quantification de l'ADN/ARN). Une distinction doit être faite entre la masse (propriété intrinsèque de la matière) et le poids (propriété dépendant de la gravité, $W = m \cdot g$).

Tableau 5. Multiples et sous-multiples des unités de masse en SI

Dénomination	Symbole	Valeur en unité de base
Kilogramme	kg	10^3 g
Gramme	g	1 g
Décigramme	dg	10^{-1} g
Centigramme	cg	10^{-2} g
Milligramme	mg	10^{-3} g
Microgramme	μg	10^{-6} g = 10^{-3} mg
Nanogramme	ng	10^{-9} g = 10^{-6} mg
Picogramme	pg	10^{-12} g = 10^{-9} mg
Femtogramme	fg	10^{-15} g = 10^{-12} mg
Attogramme	ag	10^{-18} g = 10^{-15} mg

2. Longueur. Unité de base SI = mètre (m), unité de base CGS = centimètre (cm).

La pratique de laboratoire s'appuie sur les sous-multiples (cm, mm, μm). L'ångström ($\text{\AA} = 10^{-10}$ m, 10^{-8} cm = 10^{-7} mm = 10 m μ), bien qu'il ne fasse pas partie du SI, reste largement utilisé en cristallographie et en physique atomique et moléculaire pour exprimer la longueur d'onde. En microscopie et en nanosciences, le nm et le μm sont les échelles les plus courantes.

Tableau 6. Multiples et sous-multiples des unités de longueur en SI

Dénomination	Symbole	Valeur en unités de base
Kilomètre	Km	10^3 m
Hectomètre	Hm	10^2 m
Décamètre	Dam	10 m
Mètre	M	1
Décimètre	dm	10^{-1} m
Centimètre	cm	10^{-2} m
Millimètre	mm	10^{-3} m
micromètre (micron)	μm (μ)	10^{-6} m = 10^{-3} mm
nanomètre (millimicron)	nm (m μ)	10^{-9} m = 10^{-6} mm
picomètre (micromicron)	pm ($\mu\mu$)	10^{-12} m = 10^{-9} mm

- 3. Surface (aire).** Unité de base SI = mètre carré (m^2), unité de base CGS = centimètre carré (cm^2).
 Le travail de laboratoire utilise généralement des échelles bien plus petites: cm^2 , mm^2 , μm^2 .
 Applications: couverture de surface, surfaces de réaction ou mesures de films minces.

Tableau 7. Multiples et sous-multiples des unités de surface en SI

Dénomination	Symbole	Valeur en unités de base
kilomètre carré	km^2	10^6 m^2
hectomètre carré	hm^2	10^4 m^2
décamètre carré	dam^2	10^2 m^2
mètre carré	m^2	1 m^2
décimètre carré	dm^2	10^{-2} m^2
centimètre carré	cm^2	10^{-4} m^2
millimètre carré	mm^2	10^{-6} m^2
micromètre carré	μm^2	$10^{-12} \text{ m}^2 = 10^{-6} \text{ mm}^2$

- 4. Volume.** Unité de base SI = mètre cube (m^3), unité de base CGS = centimètre cube (cm^3).
 En pratique de laboratoire, le mètre cube est peu pratique; on utilise plutôt le litre (L) et ses sous-multiples. Alors que le mL et le μL dominent dans les dosages biochimiques (réactions enzymatiques, PCR, chromatographie, etc.), le L est couramment utilisé pour les solutions en vrac (de réserve) et les gaz.

Tableau 8. Multiples et sous-multiples des unités de volume en SI

Dénomination	Symbole	Valeur en unités de base
Kilomètre cube	km^3	10^9 m^3
Mètre cube	m^3	1 m^3
Décimètre cube (litre)	$\text{dm}^3 (\text{L})$	10^{-3} m^3
Centimètre cube	cm^3	$10^{-6} \text{ m}^3 = 10^{-3} \text{ dm}^3$
Millimètre cube (millilitre)	$\text{mm}^3 (\text{mL})$	$10^{-9} \text{ m}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$
Micromètre cube	μm^3	$10^{-18} \text{ m}^3 = 10^{-15} \text{ dm}^3$
Nanomètre cube	nm^3	$10^{-27} \text{ m}^3 = 10^{-24} \text{ dm}^3$

Tableau 9. Multiples et sous-multiples du litre

Dénomination	Symbole	Valeur en unités de base
Hectolitre	hL	10^2 L
Litre = 1 dm^3	L	1 L
Décilitre	dL	10^{-1} L
Centilitre	cL	10^{-2} L
Millilitre = 1 cm^3	mL	10^{-3} L
Microlitre	μL	$10^{-6} \text{ L} = 10^{-3} \text{ mL}$

5. Temps. Unité de base SI = seconde (m^3).

Les sous-multiples tels que ms sont utilisés en cinétique et en spectroscopie, tandis que μs et ns sont utilisés pour les durées de vie de fluorescence et les impulsions laser. Les multiples (min, h, d), bien qu'ils ne fassent pas partie du SI, sont acceptés pour être utilisés avec le SI.

Tableau 10. Unités de temps

Dénomination	Symbole	Valeur en unités de base
Heure	h	3600 s = 60 min
Minute	min	60 s
Seconde	s	1 s
Milliseconde	ms	10^{-3} s
Microseconde	μs	10^{-6} s

6. Température. Unité de base SI = degré Kelvin (K).

Le degré Kelvin est l'unité utilisée en thermodynamique. Les températures en Kelvin ne portent pas de signe de degré. Le Celsius ($^{\circ}C$) est l'échelle de laboratoire la plus courante (). Le Fahrenheit ($^{\circ}F$) est rare en science mais courant dans certaines régions. Sur l'échelle Fahrenheit, le point de congélation de l'eau à 1 atm est de 32 et le point d'ébullition de 212 (l'intervalle entre ces deux points étant divisé en 180 degrés).

$$T(K) = T(^{\circ}C) + 273,15;$$

$$T(^{\circ}F) = (9/5) \cdot T(^{\circ}C) + 32$$

Tableau 11. Unités de température

Unité	Symbole	Valeur de température	
		Au zéro absolu	Point de congélation de l'eau
Kelvin	K	0	273,15
Degré Celsius	$^{\circ}C$	-273,15	0
Degré Fahrenheit	$^{\circ}F$	-459,67	32,018

Mesures de masse

La masse est la mesure directe de la quantité de matière d'une substance. La masse d'un échantillon donne une indication directe du nombre d'atomes ou de molécules qu'il contient. Comme les réactions chimiques se produisent en proportion du nombre d'atomes ou de molécules réagissants, il est essentiel que la masse du réactif soit connue avec précision. Le poids, en revanche, est une fonction de la masse représentant la force exercée par la gravité sur une masse donnée. Ainsi, le poids dépend du lieu (par exemple, la Terre par rapport à la Lune), tandis que la masse n'en dépend pas.

$$W = m \cdot g$$

W = le poids

m = la masse

g = l'accélération gravitationnelle locale.

La détermination précise de la masse est l'une des techniques de laboratoire les plus fondamentales. La mesure des substances s'effectue par **pesée**, à l'aide d'appareils appelés **balances**. Une bonne balance doit répondre à trois critères essentiels:

- Sensibilité = la plus petite différence de masse qu'elle peut détecter.
- Précision = la reproductibilité des mesures répétées d'un même objet.
- Exactitude = la proximité entre la valeur mesurée et la valeur vraie.

Selon leur sensibilité, les balances peuvent être classées en:

1. Balances techniques, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-2}$ g
2. Balances pharmaceutiques, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-3}$ g
3. Balances analytiques, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-4}$ g - $5 \cdot 10^{-5}$ g
4. Balances semi-microanalytiques, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-5}$ g
5. Microbalances, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-6}$ g
6. Balances ultramicroanalytiques, avec une sensibilité de $1 \cdot 10^{-7}$ g

Il existe divers types de balances, selon leur construction, leur aspect et leur précision. **Selon la force de contrebalancement**, les balances peuvent être divisées en deux catégories:

- Balances mécaniques: utilisent des poids étalons pour la contrebalance.
- Balances électroniques: utilisent la compensation électromagnétique de force, offrant des lectures rapides et très précises.

Les balances sont généralement installées dans des salles isolées, à l'abri des courants d'air et des vibrations, loin de la lumière directe du soleil et de la poussière. Leurs performances sont vérifiées périodiquement à l'aide de poids étalons certifiés, une faible tolérance d'erreur étant acceptée.

Bonnes pratiques de pesée

Une pesée précise est essentielle pour obtenir des résultats expérimentaux fiables. Pour minimiser les erreurs et protéger les balances sensibles, les pratiques suivantes doivent toujours être respectées:

- Vérifiez toujours que l'affichage indique 0,000 g lorsque le plateau est vide. Utilisez la fonction *tare* ou *zéro* pour remettre l'affichage à zéro avant de placer le récipient de l'échantillon. Si la balance ne peut pas être remise à zéro, signalez le problème, cessez de l'utiliser et demandez l'aide de l'enseignant.
- Toutes les balances, mais surtout les balances électroniques, sont très sensibles à l'humidité et aux dommages chimiques. Ne versez pas de liquides à proximité de la balance. Essayez immédiatement toute projection dans la zone de la balance.
- Aucune substance chimique réactive ne doit jamais être pesée directement sur le plateau de la balance. Idéalement, les réactifs doivent être pesés directement dans le bécher ou la fiole où ils seront utilisés. Des nacelles de pesée en plastique ou des verres de montre peuvent également être utilisés si plusieurs réactifs sont nécessaires pour une expérience. Choisissez une taille de récipient adaptée au plateau de la balance et évitez la verrerie surdimensionnée qui pourrait déstabiliser les lectures.
- Pour des déterminations de masse exactes, l'objet à peser doit être à température ambiante. Si un objet chaud ou tiède est placé sur le plateau de la balance, il réchauffe l'air environnant. L'air chaud monte, et ce mouvement peut être détecté par la balance, faisant baisser la valeur affichée.
- Essayez de trouver un endroit à l'abri des courants d'air pour utiliser la balance. La plupart des balances analytiques sont équipées de pare-brises; gardez-les fermés pendant la pesée. Évitez les vibrations en plaçant les balances sur des tables solides. Ne vous appuyez pas sur la paillasse et ne la heurtez pas pendant la pesée.

- Utilisez une spatule propre et sèche pour transférer les poudres. Évitez de respirer directement au-dessus du plateau; les courants d'air de l'expiration peuvent perturber les mesures. Pour les liquides volatils, utilisez des récipients munis de couvercles afin de réduire l'évaporation pendant la pesée.
- Après utilisation, retirez tous les récipients et essuyez délicatement le plateau avec un tissu doux et sec. N'utilisez jamais de matériaux abrasifs sur le plateau. Gardez la zone environnante dégagée et sans poussière.
- Les masses plus importantes doivent être pesées sur une balance à plateau supérieur, avec un degré de précision approprié. Veillez à noter les limites de la balance; bien que la plupart disposent de dispositifs de protection contre la surcharge, vous risquez d'endommager définitivement le mécanisme de pesée.

Les balances électroniques à affichage numérique sont largement utilisées. Elles sont faciles à lire, rapides, et disposent d'une fonction de tare, qui permet de soustraire automatiquement la masse du récipient. Le type le plus courant offre une précision allant jusqu'à 1 mg pour des plages de 1 mg à 160 g, ce qui convient à la plupart des applications chimiques et biologiques.

Utilisation d'une balance standard à tare automatique

1. Mettez la balance à niveau. Réglez les pieds jusqu'à ce que la bulle du niveau à bulle soit centrée (généralement à l'arrière de l'appareil). Pour un travail précis, assurez-vous qu'un pare-brise est installé sur la balance.
2. Tarez le récipient. Placez un récipient vide sur le plateau de la balance et laissez la lecture se stabiliser. Appuyez sur la tare pour remettre à zéro.
3. Ajoutez l'échantillon. Placez soigneusement le produit chimique ou l'objet dans le récipient (les produits chimiques en poudre doivent être prélevés avec une spatule propre de taille adaptée).
4. Retirez l'excédent avec précaution. Si vous ajoutez un excès de produit chimique, faites très attention en le retirant. Notez la masse. Laissez la lecture se stabiliser et notez la valeur. Ne remettez pas l'excédent dans le récipient d'origine.
5. Notez la masse. Laissez la lecture se stabiliser et notez la valeur.

Mesure du volume

De nombreux types de verrerie de laboratoire sont marqués par le fabricant pour indiquer le volume de liquide qu'ils contiennent lorsqu'ils sont remplis jusqu'à un niveau précis. Cependant, la précision de ces graduations varie considérablement selon le type de verrerie et son usage prévu. Il est important de distinguer les situations où une haute précision est essentielle (par exemple, les titrages, la préparation de solutions étalons) de celles où seuls des volumes approximatifs sont acceptables:

- Les béchers et les fioles d'Erlenmeyer sont marqués avec des volumes très approximatifs, qui ne servent que de repère grossier du volume de liquide contenu.
- Les éprouvettes graduées, les fioles jaugées, les burettes et les pipettes sont marquées de manière beaucoup plus précise et sont utilisées lorsqu'une détermination exacte du volume est requise.

La **température** (généralement 20 °C) utilisée pour l'étalonnage figure sur la plupart de la verrerie volumétrique. Cela importe car le volume d'un liquide varie avec la température, ce qui entraîne une variation de la densité du liquide. Bien qu'une pipette donnée contienne ou délivre le *même volume géométrique* à toute température, la *quantité de substance* présente dans ce volume variera avec la température. Pour un écart de température assez important, le verre peut également se contracter ou se dilater, entraînant des différences de volume.

Parmi les dispositifs de laboratoire utilisés pour mesurer et transférer des volumes de différentes substances figurent les éprouvettes graduées, les burettes, les pipettes, les seringues, les fioles jaugées, etc.

1. Éprouvettes graduées

Bien que les éprouvettes graduées offrent une précision modérée, elles sont moins précises que les pipettes/burettes. Elles sont utilisées pour de nombreuses applications où une précision exacte n'est pas essentielle (mesure de volumes de solvants).

Il est important d'effectuer une lecture correcte lors de la mesure du volume avec des éprouvettes graduées. Lorsqu'une solution est versée dans un récipient en verre étroit (comme une éprouvette graduée), la surface du liquide n'est pas plane mais courbée, généralement vers le bas. Cette surface courbée est appelée ménisque et résulte de l'interaction (adhésion) entre les molécules d'eau et les molécules de la paroi du récipient en verre. Pour une lecture correcte, ajustez le récipient de manière que le niveau du liquide soit à hauteur des yeux, en prenant le point le plus bas du ménisque comme lecture correcte.

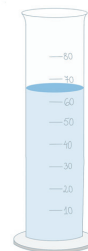


Figure 1. Éprouvette graduée

2. Fioles jaugées

Les fioles jaugées sont des ballons en verre ou en plastique à fond plat, à panse ronde et à long col étroit. Le volume qu'elles fournissent est fixe et indiqué sur la panse. Un unique trait de jauge sur le col indique le niveau correct lorsque le ménisque l'atteint. Les fioles jaugées sont couramment utilisées pour préparer des solutions de différentes concentrations molaires, normales ou en masse/volume. Les fioles doivent être utilisées à la température indiquée. Toute variation peut provoquer une dilatation ou une contraction du verre et introduire des erreurs de volume.

3. Burettes

Une burette est un tube en verre haut, étroit et gradué, muni à sa partie inférieure d'un robinet/valve permettant de contrôler l'écoulement du liquide. Elle est utilisée pour délivrer des volumes variables mais mesurés avec précision, notamment lors des titrages. La précision permise par une burette est de $\pm 0,02$ mL (pour les burettes de 10, 20, 50 et 100 mL) et de $\pm 0,01$ mL pour les microburettes (1-5 mL). Les burettes manuelles sont progressivement remplacées par des burettes automatiques, à affichage numérique des volumes.

Une burette doit être scrupuleusement propre avant utilisation. Avant emploi, la burette doit être rincée avec plusieurs petites portions de la solution à utiliser dans la burette, en éliminant l'écoulement. Après utilisation, la burette doit être rincée à l'eau distillée.

Il n'est pas nécessaire de remplir la burette jusqu'au trait 0,00. La burette doit être remplie jusqu'à un niveau confortable à lire pour l'utilisateur, selon sa hauteur. Le volume du liquide doit être noté au début, puis à la fin de la procédure. Le volume final est déterminé par soustraction.



Figure 2. Burette

4. Pipettes

Lorsqu'une détermination plus précise du volume de liquide est nécessaire (ce qu'une éprouvette graduée ne peut pas offrir), une pipette peut être utilisée. Les pipettes sont particulièrement utiles lorsque plusieurs mesures du même volume sont nécessaires. Plusieurs types de pipettes sont couramment disponibles:

- Pipettes jaugées: ne peuvent délivrer qu'un seul volume fixe (celui de la panse de la pipette).
- Pipettes graduées: peuvent délivrer des volumes variables (jusqu'à la capacité de la pipette). Elles sont calibrées le long de la tige par de multiples graduations. Il en existe 2 types: les pipettes de Mohr (les graduations s'arrêtent avant la pointe; le liquide ne doit être délivré que jusqu'au dernier trait de graduation, pas jusqu'à la pointe) et les pipettes sérologiques (les graduations s'étendent jusqu'à la pointe; conçues pour être vidées complètement en soufflant la dernière goutte).
- Pipettes Pasteur: simples tubes en verre ou en plastique munis d'une poire, utilisés pour le transfert de petits volumes approximatifs (non précis). Elles sont courantes en microbiologie et dans les travaux qualitatifs.

Les pipettes sont remplies à l'aide d'une poire de sécurité en caoutchouc ou d'un dispositif d'aide au pipetage. Il est absolument interdit de pipeter à la bouche dans le laboratoire !

5. Micropipettes automatiques (Autopipettes)

Les micropipettes sont des dispositifs semi-automatiques largement utilisés en chimie moderne, en biochimie et en biologie moléculaire. Une micropipette doit être équipée de l'embout jetable approprié avant chaque utilisation. Pour cela, chaque fabricant produit des embouts différents adaptés à ses propres modèles.

Les principales parties d'une micropipette sont le bouton-poussoir, le bouton d'éjection d'embout, la molette de réglage du volume, l'indicateur numérique de volume, la tige, et le point de fixation de l'embout.

6. **Les seringues** sont utilisées pour des opérations volumétriques de très haute précision sur de très petites pages. Elles sont courantes en chromatographie et en électrophorèse. La capacité des seringues est de 1 à 500 µl, les erreurs allant jusqu'à 1 % dans l'intervalle 5-500 µl et 2 % dans l'intervalle 1-5 µl.

Mesures de densité

La densité (ρ) d'une substance est définie comme le rapport de sa masse à son volume.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

La densité représente donc la masse par unité de volume (également appelée masse spécifique d'une substance). Les unités de mesure de la densité sont g/dm³ (g/L) pour les gaz et g/cm³ (g/mL) pour les liquides et les solides. Les densités des substances varient avec **la température et la pression**. L'influence de la pression sur les liquides et les solides est faible (le coefficient de compressibilité étant faible), c'est pourquoi elle est généralement négligée. La température, en revanche, doit être mentionnée dans tous les cas.

La densité sert à la caractérisation des substances, étant une **constante physique** qui peut être utilisée pour identifier et vérifier la pureté d'une substance. La densité est influencée par la structure moléculaire. Une ramification accrue diminue généralement la densité car elle réduit l'efficacité de l'empilement moléculaire. En revanche, la présence de doubles ou triples liaisons et de structures cycliques augmente souvent la densité en produisant des molécules plus compactes occupant un volume plus faible.

Détermination de la densité des liquides à l'aide d'un densimètre (aréomètre)

Un aréomètre est un instrument utilisé pour déterminer la densité relative (densité par rapport à l'eau) des liquides. Il est généralement en verre et se compose d'une tige cylindrique et d'un flotteur lesté de mercure ou de plomb afin qu'il flotte à la verticale. Le fonctionnement de l'aréomètre repose sur le principe d'Archimède, selon lequel un solide immergé dans un liquide subit une force de poussée égale au poids du liquide déplacé. Ainsi, plus la densité de la substance est faible, plus l'aréomètre s'enfonce.

Le liquide est versé dans un récipient haut, et l'aréomètre est délicatement introduit dans le liquide jusqu'à ce qu'il flotte librement. Le point où la surface du liquide touche la tige de l'aréomètre est noté. Les aréomètres contiennent généralement une échelle en papier à l'intérieur de la tige, permettant de lire directement la densité relative. La densité relative est le rapport entre une densité et celle de l'eau. Par conséquent, la densité relative n'a pas d'unité de mesure (elle est sans dimension). De nombreuses industries disposent de plusieurs jeux d'aréomètres, 1,0-0,95, 0,95-0,9, etc., afin d'obtenir des mesures de densité plus précises.

Densité urinaire (densité relative) et sa signification clinique

La densité urinaire, plus précisément appelée *densité relative* (DR) ou *densité relative*, est une mesure de la concentration de l'urine par rapport à l'eau. Elle reflète la masse des solutés et de l'eau contenus dans l'urine. Sur le plan clinique, la densité urinaire est utilisée comme marqueur indirect de la capacité de concentration rénale et de l'état d'hydratation.

$$\text{densité relative} = \frac{\text{densité de l'urine}}{\text{densité de l'eau}}$$

La densité urinaire normale (*normosthénurie*) est de 1,015 à 1,025. La densité urinaire varie proportionnellement à la masse des substances dissoutes dans l'urine et à l'intensité de la couleur, et inversement proportionnellement à la quantité d'urine émise.

Hyposthénurie (densité < 1,015) peut résulter d'une diminution de l'activité de l'ADH ou d'une incapacité des tubules à réabsorber l'eau. Les causes possibles d'une densité urinaire réduite sont la maladie rénale chronique, la pyélonéphrite, la nécrose tubulaire aiguë, le diabète insipide, l'hyperhydratation. À une densité inférieure à 1,010 g/cm³, les leucocytes et les érythrocytes sont lysés, ce qui peut donner des résultats faussement négatifs lors de l'analyse du sédiment urinaire.

Hypersthénurie (densité > 1,025) peut résulter d'une réabsorption accrue d'eau (souvent via l'hormone antidiurétique) ou de la présence de solutés non physiologiques (par exemple, glucose, protéines) dans l'urine. Les causes possibles d'une densité urinaire élevée sont le syndrome néphrotique, la glomérulonéphrite, la transpiration, la fièvre, l'exercice physique, l'hémorragie, les vomissements, la diarrhée, le diabète sucré non contrôlé, la déshydratation.

Questions

1. Énumérez les sept unités de base du SI et leurs symboles.
2. Définissez la sensibilité, la précision et l'exactitude dans le contexte des balances.
3. Quelles sont les étapes de la pesée d'une substance au laboratoire ?
4. Une solution a une densité de 1,25 g/mL. Quelle est la masse de 2 L de cette solution ?
5. Un aréomètre s'enfonce plus profondément dans le liquide A que dans le liquide B. Quel liquide a la densité la plus élevée ? Expliquez.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L3. SOLUTIONS. DILUTIONS. SOLUTIONS ISOTONIQUES. SOLUTIONS POUR PERFUSION.

Solutions

Une solution est un mélange homogène, monophasique, constitué de deux ou plusieurs substances qui ne réagissent pas chimiquement entre elles. Dans cette unité, nous aborderons les solutions aqueuses qui jouent un rôle très important dans plusieurs réactions chimiques. Voyons les termes utilisés lorsque l'on parle de solutions:

- Le **soluté (dissous)** est la substance présente en plus petite quantité, dispersée au niveau moléculaire ou ionique.
- Le **solvant (dissolvant)** est la substance présente en plus grande quantité, qui détermine l'état physique de la solution.

Selon leur état physique, il existe 3 types de solutions:

- **Gazeuses:** l'air (O_2 , CO_2 , N_2 , Ar).
- **Liquides:** les plus courantes, elles peuvent être *aqueuses* (eau comme solvant, par ex. NaCl dans l'eau), *partiellement aqueuses* (mélange d'eau et d'un autre solvant, par ex. éthanol-eau) et *non aqueuses* (solvant non aqueux, par ex. iode dans l'éthanol, sucre dans le glycérol).
- **Solides:** les alliages (laiton = Cu + Zn).

Le paramètre fondamental qui caractérise une solution est sa **concentration**. La concentration désigne la quantité de soluté dans une solution; elle est généralement exprimée en termes de quantité de soluté par volume de solution, mais dans certains cas d'autres expressions sont utilisées.

En chimie analytique, les solutions de concentration connue sont essentielles pour déterminer la quantité de substances inconnues. En utilisant des solutions de concentration connue, on peut déterminer la quantité d'une substance dans une solution analysée dont la concentration est inconnue. Il existe plusieurs façons d'exprimer la concentration, selon le contexte:

Solution en pourcentage (concentration en pourcentage, %) exprime la quantité de soluté par rapport à la solution totale, en termes de 100 parts. Sauf indication contraire, la concentration en pourcentage se réfère à une solution masse/volume (m/v).

- Une *solution en pourcentage masse/volume (m/v %)* est une solution dans laquelle un nombre déterminé de grammes de soluté est contenu dans 100 ml de solution. À proprement parler, il s'agit d'une solution en pourcentage « hybride », et non « vraie », puisqu'on se réfère à des grammes de soluté dans 100 ml de solution.

$$\%(w/v) = \frac{\text{masse de soluté (g)}}{\text{volume de solution (mL)}} \cdot 100$$

- Une *solution en pourcentage masse/masse (m/m %)* est une « vraie » solution en pourcentage dans laquelle un nombre déterminé de grammes de soluté est contenu dans 100 g de solution.
- Une *solution en pourcentage volume/volume (v/v %)* est également une « vraie » solution en pourcentage dans laquelle un nombre déterminé de ml de liquide est contenu dans 100 ml de solution.
- Une *solution en mg/100 mL (mg%)*, largement utilisée en chimie clinique, est là encore une solution « hybride » et non « vraie ». C'est une solution dans laquelle un nombre déterminé de mg de soluté est contenu dans 100 ml de solution.

La molarité (concentration molaire, M) désigne la concentration d'une solution exprimée en nombre de moles de soluté par litre de solution. Notez que *la mole* (masse moléculaire en grammes; masse moléculaire exprimée en grammes, masse correspondant au nombre d'Avogadro de molécules) désigne la quantité de soluté, tandis que la *molarité* désigne la concentration (quantité de soluté par volume donné de solution).

$$M(\text{moles/L}) = \frac{\text{moles de soluté (mol)}}{\text{volume de solution (L)}}$$

Le symbole M (ou mM, μM , nM) ne doit jamais être utilisé pour représenter des quantités, mais uniquement des concentrations. En biochimie, la molarité est utilisée même pour des substances qui n'existent pas sous forme de véritables molécules (comme NaCl) et pour lesquelles la formalité est utilisée dans certaines branches de la chimie. La masse, la masse moléculaire et le nombre de moles sont liés par la relation suivante:

$$\begin{aligned} \text{moles de soluté}(n) &= \frac{\text{masse de soluté (g)}}{\text{masse moléculaire (g/mol)}} \\ M(\text{moles/L}) &= \frac{\text{mass of solute (g)}}{\text{masse moléculaire (g/mol)} \cdot \text{volume de solution (L)}} \end{aligned}$$

Dilutions

Une dilution est le processus consistant à diminuer la concentration d'un soluté dans une solution en ajoutant davantage de solvant (généralement de l'eau au laboratoire). Diluer une solution signifie y ajouter davantage de solvant. La quantité de soluté ne change pas, seule la concentration diminue car le volume total augmente. Comme la quantité de soluté reste constante avant et après la dilution, le principe de dilution suit l'équation:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

où: c_1 = concentration de la solution initiale (mère, concentrée)

V_1 = volume de la solution initiale

c_2 = concentration de la solution souhaitée (finale, diluée)

V_2 = volume de la solution souhaitée

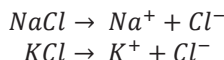
Étapes de la dilution:

- commencez avec une solution concentrée (appelée solution mère).
- déterminez le volume et la concentration finaux souhaités.
- calculez la quantité de solution mère nécessaire à l'aide de la formule.
- ajoutez du solvant (généralement de l'eau) pour atteindre le volume final souhaité.
- mélangez soigneusement pour que la solution soit homogène.

Solutions isotoniques

Il est connu que la pression osmotique est directement proportionnelle au nombre de particules dissoutes dans un volume de cette solution, étant indépendante à la fois de la nature du solvant et du soluté. Les solutions isotoniques (isosmotiques) ont la même concentration effective de particules (pression osmotique) qu'un liquide de référence (par exemple, le plasma sanguin). Selon la loi d'Avogadro, deux volumes égaux de solutions différentes, ayant la même pression osmotique et la même température, contiendront le même nombre de particules, qu'il s'agisse de molécules ou d'ions. Réciproquement, on peut dire que des solutions molaires d'électrolytes et de non-électrolytes, qui contiennent le même nombre de particules (molécules ou ions), ont la même pression osmotique.

Ainsi, une solution de KCl contenant une molécule-gramme de KCl dans 1 litre de solution est isotonique avec une solution de NaCl contenant une molécule-gramme de NaCl dans 1 litre de solution, car elles contiennent le même nombre de particules.



Solutions pour perfusion

Les préparations parentérales sont des préparations pharmaceutiques stériles destinées à être administrées par injection, perfusion ou implantation à travers la peau ou les muqueuses directement dans l'organisme, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Elles doivent être stériles, apyrogènes et, de préférence, présenter une isotonicité, un pH et une stabilité appropriés. Il existe 2 types de préparations parentérales:

- **Les solutions injectables** sont conçues pour l'administration rapide de petits volumes (< 100 mL). Les principales voies d'administration sont intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée.
- **Les solutions pour perfusion** sont conçues pour l'administration lente de grands volumes (> 100 mL). Elles sont toujours administrées par voie intraveineuse. Les trois types de solutions intraveineuses sont isotoniques, hypertoniques et hypotoniques (Tableau 1).

Les solutions isotoniques ont la même osmolarité que le sérum/plasma. Elles augmentent le volume du liquide extracellulaire sans modifier la taille des cellules. Elles sont utilisées pour la réhydratation ou pour compenser les pertes de liquide extracellulaire (par exemple, hémorragie, déshydratation due aux vomissements/diarrhée). Les solutions isotoniques les plus utilisées sont le sérum physiologique (NaCl 0,9 %) et le Ringer lactate (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , lactate).

Les solutions hypotoniques ont une osmolarité inférieure à celle du sérum/plasma. Lorsqu'elles sont administrées, elles font entrer l'eau dans les cellules et dans l'espace interstitiel, où l'osmolarité est plus élevée. Les cellules s'hydratent et le volume de liquide circulant diminue. Les solutions hypotoniques sont utilisées lorsque le patient est déshydraté au niveau intracellulaire, par exemple après un traitement diurétique. Elles ne sont pas indiquées chez les patients présentant un œdème cérébral, une pression intracrânienne élevée, des brûlures ou une hypoprotéïnémie plasmatique (due à la malnutrition ou à des problèmes hépatiques). La solution hypotonique la plus utilisée est le sérum physiologique demi-normal (NaCl 0,45 %).

Les solutions hypertoniques ont une osmolarité supérieure à celle du sérum/plasma. Lorsqu'elles sont administrées, elles provoquent une augmentation de l'osmolarité sérique initiale, ce qui entraîne une perte de liquide depuis l'intérieur des cellules. Ainsi, le volume extracellulaire augmente et le volume des cellules diminue. Elles sont administrées en cas de déshydratation (causée par la diarrhée et les nausées), d'œdèmes et de tension artérielle instable. Les patients recevant des solutions hypertoniques doivent être surveillés afin de prévenir une surcharge circulatoire. Elles ne sont pas indiquées chez les patients présentant une insuffisance cardiaque ou rénale. Les solutions hypertoniques les plus utilisées sont le dextrose (glucose) à 10 % et le sérum salé hypertonique (par exemple, NaCl 3 %, NaCl 5 %, utilisés en cas d'hyponatrémie sévère).



Figure 1. Effet des différents types de solutions pour perfusion sur les érythrocytes

Tableau 1. Solutions pour perfusion couramment utilisées

Solution	Catégorie	Utilisation / avantage	Inconvénient
Solutions de chlorure de sodium			
NaCl 0,225 %	Hypotonique	- Remplacement des pertes de liquide extracellulaire en cas de perte de $\text{Cl}^- \geq \text{Na}^+$ - Traitement de la déplétion en Na^+ - La seule solution pouvant être utilisée avec les préparations sanguines	- Hypermnatrémie possible - Déplétion possible d'autres électrolytes (K^+) - Surcharge circulatoire possible
NaCl 0,45 %	Hypotonique		
NaCl 0,9 %	Isotonique		
NaCl 3 %	Hypertonique		
Solution de dextrose			
Dextrose 5 % dans l'eau (D5W)	Isotonique	- Apport calorique sous forme de glucides - Traitement de l'hypercalcémie et de la déshydratation	- Irritation des vaisseaux sanguins (concentrations élevées) - Déshydratation causée par la perfusion rapide de solutions hypertoniques - Hyperinsulinémie possible - Incompatible avec les préparations sanguines et certains traitements
Dextrose 10 % dans l'eau (D10W)	Hypertonique		
Dextrose 20 % à 70 % dans l'eau	Hypertonique		
Combinaisons de solutions salines physiologiques et de dextrose			
Dextrose 5 % + NaCl 0,225 %	Isotonique	- Traitement temporaire du choc hypovolémique - Remplacement des nutriments et des électrolytes - Traitement de la déshydratation et soutien de la diurèse	- Hyponatrémie, acidose et surcharge circulatoire possibles - Nécessite de la prudence chez les patients atteints de maladies cardiaques, rénales ou hépatiques
Dextrose 5 % + NaCl 0,45 %	Hypertonique		
Dextrose 5 % + NaCl 0,9 %	Hypertonique		
Solutions d'électrolytes			
Solution de Ringer	Isotonique	- Traitement de la déshydratation; rétablissement de l'équilibre des liquides avant et après une intervention chirurgicale - Tolérée par les patients atteints de maladie hépatique - Similitude avec le sérum physiologique	- Apport calorique réduit - Aggravation de la rétention sodée, insuffisance rénale
Solution de Ringer lactate	Isotonique	- Traitement de la déshydratation, des pertes hydriques en cas de brûlures - Composition en électrolytes similaire à celle du milieu extracellulaire - Précurseur de bicarbonate	- Hypermnatrémie possible - Contre-indiquée en cas de maladie hépatique, d'hypovolémie, de choc profond

Chez les nouveau-nés, les besoins en liquides et en électrolytes sont particuliers. À la naissance, il existe un excès d'eau extracellulaire qui sera éliminé dans les premiers jours. Quelques jours après la naissance, les besoins en liquides et en électrolytes augmentent, à mesure que le nouveau-né commence à grandir. Il est donc nécessaire d'assurer une gestion stricte des liquides et des électrolytes chez les nourrissons nés avant terme, en tenant compte du poids de naissance, de l'âge gestationnel et de l'âge après la naissance. Les nourrissons atteints du syndrome de détresse respiratoire ont besoin d'un apport liquidien approprié. Cependant, une administration excessive de liquides peut entraîner une hyponatrémie et une surcharge volémique, aggravant l'état pulmonaire et augmentant le risque de dysplasie bronchopulmonaire. Les solutions pour perfusion généralement administrées chez les nouveau-nés sont: le sérum physiologique, la solution saline normale avec 5 % de glucose et la solution de NaCl à 0,45 % avec 5 % de glucose. Selon leur objectif, les perfusions peuvent être divisées en:

1. Perfusion pour thérapie liquidienne

Ces perfusions sont utilisées pour restaurer et maintenir le volume sanguin (volémie), corriger les déséquilibres électrolytiques et acido-basiques, et assurer une prophylaxie pendant l'anesthésie/la chirurgie. La thérapie liquidienne peut être réalisée par l'administration de solutions colloïdales et cristalloïdes.

- **Les solutions cristalloïdes** contiennent des molécules de faible poids moléculaire capables de traverser les membranes semi-perméables, telles que l'endothélium vasculaire. Elles peuvent être *ioniques* (NaCl) ou *moléculaires* (glucose). Selon leur osmolarité, elles peuvent être isotoniques, hypotoniques ou hypertoniques. De nombreux types de solutions cristalloïdes sont utilisés pour remplacer le liquide extracellulaire (LEC) de l'espace interstitiel et de l'espace intravasculaire, en étant isotoniques avec eux.

L'élément principal qui définit ces solutions est la concentration en Na^+ similaire à celle du Na^+ du LEC, ce qui entraîne leur distribution uniquement au niveau du LEC, proportionnellement au volume de LEC de chaque compartiment (interstitiel et intravasculaire); le volume intracellulaire n'est pas influencé.

Si elles sont utilisées pour compenser une perte sanguine, il est nécessaire d'administrer un volume 3 à 4 fois supérieur au volume perdu, car seulement 1/3 à 1/4 du volume administré reste intravasculaire. Chez un adulte en bonne santé avec des valeurs d'hémoglobine normales, pour une perte sanguine représentant 20 % du volume sanguin total (environ 1000 ml), la thérapie liquidienne peut être administrée avec 3000-4000 ml de solutions cristalloïdes sans effets indésirables. Ce type de solutions est préféré pour solubiliser les médicaments et pour l'administration parentérale de médicaments en perfusion.

La solution de glucose à 5 %, isotonique avec le plasma (252 mosm/l), est indiquée pour le traitement de la déshydratation et de l'hyponatrémie; le glucose est capté par les cellules, ne restant pratiquement dans le compartiment extracellulaire que l'eau, qui réduit la concentration en sodium et augmente le volume d'eau extracellulaire.

Les solutions de glucose plus concentrées, hypertoniques, sont indiquées pour le traitement de l'hypoglycémie, de l'hyperkaliémie et pour l'apport énergétique. Le débit d'administration du glucose (débit de perfusion) ne doit pas dépasser 0,5 g/kg/heure.

- **Les solutions colloïdales** contiennent des molécules de poids moléculaire élevé (protéines, polyglucides) incapables de traverser l'endothélium vasculaire. Administrées par voie intraveineuse, elles restent plus longtemps dans l'espace intravasculaire par rapport aux solutions cristalloïdes et créent un effet volémique plus important; une pression colloïdo-osmotique plus élevée par rapport au plasma explique cet effet. Les solutions colloïdales couramment utilisées sont des dérivés de la gélatine, une protéine produite par hydrolyse partielle et irréversible du collagène (oxypolygélatine), l'hydroxyéthylamidon, et plus rarement les dextrans (Dextran 70, Dextran 40).

2. Le sang et les préparations sanguines

Le sang est le principal transporteur d'oxygène, de nutriments, d'hormones et d'autres substances importantes dans l'organisme. Le corps d'un adulte contient environ 5 litres de sang. Lorsque le patient subit une diminution du volume sanguin circulant, il peut être nécessaire de le remplacer. Toute réduction de ce volume entraîne des déséquilibres électrolytiques et hydriques. L'administration de sang et de préparations sanguines restaure le volume liquidien, améliore la fonction de transport de l'oxygène et remplace les composants sanguins déficients, y compris les facteurs de coagulation. Les préparations sanguines sont utilisées seules ou en association, selon l'état du patient. Le sang et les préparations sanguines ne sont administrés qu'avec une solution saline et non du glucose (qui peut provoquer une hémolyse). Les principaux exemples sont:

- Sang total: restaure le transport de l'oxygène et les facteurs de coagulation.
- Concentré érythrocytaire: pour l'anémie ou la perte de sang, contient moins de plasma.
- Concentré plaquettaire: pour la thrombocytopénie ou les troubles de la coagulation.
- Plasma (plasma frais congelé): déficits en facteurs de coagulation, maladie hépatique.

3. Nutrition parentérale

Il s'agit d'un type de perfusion intraveineuse par laquelle tout ou partie des nutriments sont administrés par voie intraveineuse à des patients ne pouvant pas s'alimenter correctement par voie intestinale. La nutrition parentérale est indiquée en cas de malnutrition, de maladies digestives sévères, d'obstruction, de perforation, etc. Les principaux nutriments intraveineux sont:

- le glucose - la principale source d'énergie en nutrition parentérale.
- les émulsions lipidiques - fournissent de l'énergie et des acides gras essentiels.
- les solutions d'acides aminés à 5,5 %, 8,5 %, 10 %, 15 % et 20 %.

Tableau 2. Composants des solutions de nutrition parentérale

Composant	Objectif
Dextrose ou substituts	Maintenir l'apport calorique
Acides aminés	Maintenir les réserves protéiques et prévenir la perte de protéines musculaires
Électrolytes	Rétablir l'équilibre des électrolytes (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , P et NaCl)
Vitamines	Couvrir les besoins en vitamines hydro- et liposolubles, en biotine et en acide folique
Micronutriments	Couvrir les besoins en zinc, cuivre, chrome, sélénium et manganèse
Eau	La quantité nécessaire est déterminée en fonction des besoins individuels
Insuline	Ajoutée pour prévenir l'hypoglycémie causée par des concentrations élevées de glucose
Lipides	Administrés séparément pour prévenir ou corriger une carence en acides gras

4. Perfusions pour traitement médicamenteux

Divers traitements médicamenteux (antibiotiques, anticoagulants, antidiabétiques, etc.) peuvent être administrés par voie intraveineuse tels quels, en bolus, ou véhiculés par d'autres solutions pour perfusion (glucose à 5 %, solution saline).

Les perfusions intraveineuses impliquent l'utilisation de liquides déjà préparés, ou nécessitant une préparation afin d'obtenir la dose optimale à administrer. La préparation des perfusions intraveineuses repose sur le calcul de la concentration du médicament, généralement exprimée en grammes ou sous-multiples de grammes par millilitre, et du volume total de liquide à administrer. Dans certaines situations, il est même nécessaire de calculer la dose par kilogramme.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Préparation de solutions de différentes concentrations

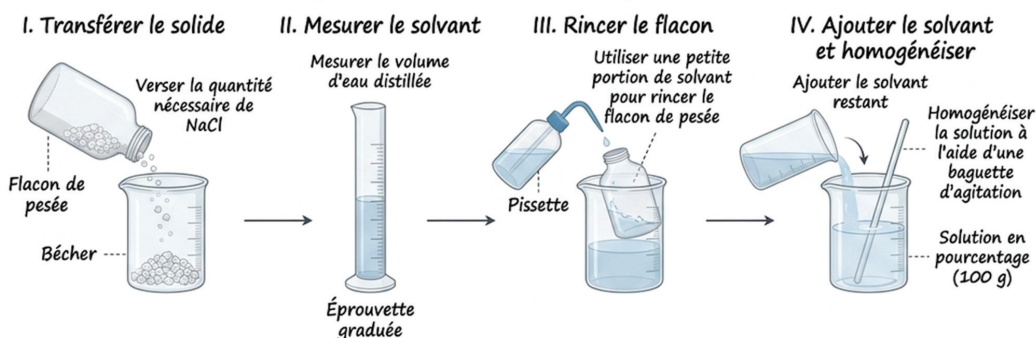
Préparez 100 mL de solution de NaCl aux concentrations suivantes: 2 %, 4 %, 6 %, 0,34 M, 0,7 M, 1 M.

Étapes:

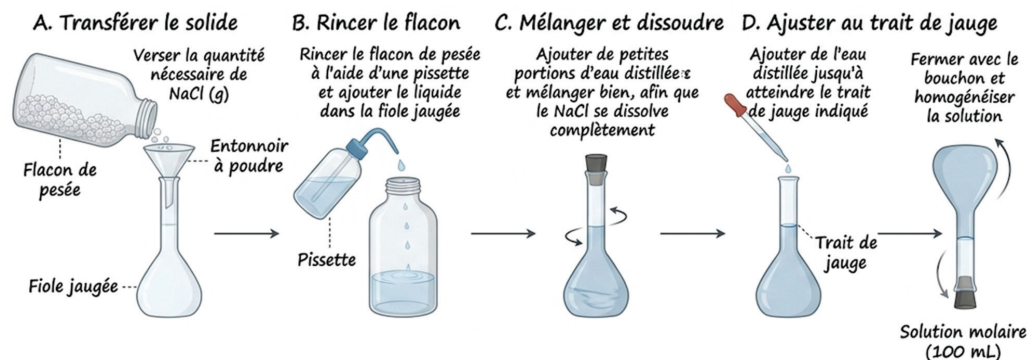
- déterminez la quantité de NaCl, la masse/le volume de solution et le volume d'eau distillée (pour les solutions en pourcentage) nécessaires pour l'expérience.
- pesez la quantité nécessaire de NaCl à l'aide d'une balance électronique.
- ajoutez de l'eau distillée et homogénéisez
- vérifiez la concentration à l'aide d'un densimètre, sachant que la masse molaire du NaCl = 58,44 g/mol à 20 °C.

% (m/m)	M	ρ (g/cm ³)
2	0,3465	1,0125
4	0,7028	1,0268
6	1,0691	1,0413

Les solutions en pourcentage, 100 g – sont préparées dans des béchers:



Les solutions molaires, 100 mL – sont préparées dans une fiole jaugée:



2. Dilution de solutions mères pour obtenir de nouvelles solutions de différentes concentrations

À partir d'une solution mère de NaCl 2 M, préparez 100 mL de solution de NaCl aux concentrations suivantes: 0,34 M, 0,7 M, 1,07 M, 1,44 M et 1,83 M.

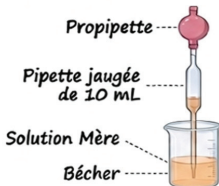
Solution	Concentration (mol/L)	ρ (g/cm ³)
Solution 1	0,34	1,0125
Solution 2	0,70	1,0268
Solution 3	1,07	1,0413
Solution 4	1,44	1,0559
Solution 5	1,83	1,0707

1. Transférer la Solution Mère
On verse suffisamment de solution Mère dans un bécher



On ne pipette jamais directement dans le flacon qui contient la solution Mère.

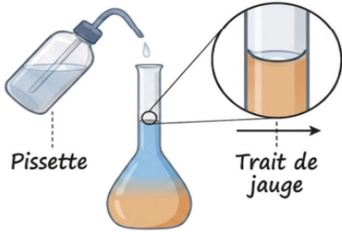
2. Prélever le Volume Nécessaire
On prélève le volume nécessaire de solution Mère à l'aide d'une pipette jaugée munie de sa propipette.



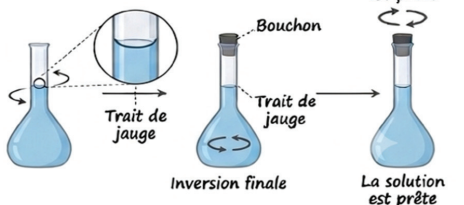
3. Transférer dans la Fiole
On verse le volume nécessaire de solution dans la fiole jaugée de volume approprié.



4. Compléter jusqu'au Trait de Jauge
On ajoute de l'eau distillée avec une pissette jusqu'au trait de jauge.



5. Homogénéiser la Solution
On agite pour homogénéiser. La solution est prête



3. Préparation de solutions isotoniques

A. Préparation de solutions phosphatées, isotoniques avec le plasma sanguin

Une solution isotonique a la même pression osmotique que le plasma sanguin, ce qui signifie qu'elle ne provoque aucun mouvement net d'eau à travers les membranes cellulaires. À titre de référence, une solution isotonique de NaCl contient 8,6 g de NaCl dans 1 litre de solution ($\approx 0,15$ M NaCl, car NaCl se dissocie en 2 particules). Pour préparer d'autres solutions isotoniques, on compare le nombre de particules dissoutes (osmoles) produites par chaque soluté avec celui du NaCl.

A.1. Phosphate monosodique isotonique (NaH₂PO₄): Lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, le NaCl et le NaH₂PO₄ se dissocient tous deux en 2 particules, donc une solution de NaCl 1 M est isotonique avec une solution de NaH₂PO₄ 1 M. La quantité de NaH₂PO₄·H₂O à dissoudre dans 1000 millilitres d'eau distillée dans une fiole jaugée peut être calculée:



$$\begin{array}{rcl}
1 \text{ mol NaCl} & \dots\dots\dots & 1 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \\
58,45 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & 138,01 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \\
8,6 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & x \\
x = \frac{8,6 \cdot 138,01}{58,45} & = & 20,3 \\
& & \text{g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O par L d'eau}
\end{array}$$

A.2. Solution isotonique de phosphate disodique (Na₂HPO₄): Lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, le NaCl se dissocie en 2 particules et le Na₂HPO₄ en 3 particules, donc une solution de NaCl 3 M est isotonique avec une solution de Na₂HPO₄ 2 M. La quantité de Na₂HPO₄ · 12 H₂O à dissoudre dans 1000 millilitres d'eau distillée dans une fiole jaugée peut être calculée:

$$\begin{array}{rcl}
\text{NaCl} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{Cl}^- & & \text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 2\text{Na}^+ + \text{HPO}_4^{2-} \\
3 \text{ mol NaCl} & \dots\dots\dots & 2 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} \\
3 \cdot 58,45 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & 2 \cdot 358,18 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} \\
8,6 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & x \\
x = \frac{8,6 \cdot 2 \cdot 358,18}{3 \cdot 58,45} & = & 35,1 \\
& & \text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O par L d'eau}
\end{array}$$

A3. Solution isotonique de phosphate trisodique (Na₃PO₄): Lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, le NaCl se dissocie en 2 particules et le Na₃PO₄ en 4 particules, donc une solution de NaCl 2 M est isotonique avec une solution de Na₃PO₄ 1 M. La quantité de Na₃PO₄ · 12 H₂O à dissoudre dans 1000 millilitres d'eau distillée dans une fiole jaugée peut être calculée:

$$\begin{array}{rcl}
\text{NaCl} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{Cl}^- & & \text{Na}_3\text{PO}_4 \rightarrow 3\text{Na}^+ + \text{PO}_4^{3-} \\
2 \text{ mol NaCl} & \dots\dots\dots & 1 \text{ mol Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} \\
2 \cdot 58,45 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & 380,17 \text{ g Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O} \\
8,6 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & x \\
x = \frac{8,6 \cdot 380,17}{2 \cdot 58,45} & = & 28,0 \\
& & \text{g Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O par L d'eau}
\end{array}$$

B. Préparation d'une solution de glucose, isotonique avec le plasma sanguin: Lorsqu'il est dissous dans l'eau, le NaCl se dissocie en 2 particules et le glucose ne se dissocie pas, donc une solution de NaCl 1 M est isotonique avec une solution de glucose 2 M. La quantité de glucose à dissoudre dans 1000 millilitres d'eau distillée dans une fiole jaugée peut être calculée:

$$\begin{array}{rcl}
\text{NaCl} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{Cl}^- & & \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 (\text{glucose}) \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 (\text{glucose}) \\
1 \text{ mol NaCl} & \dots\dots\dots & 2 \text{ mol glucose} \\
58,45 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & 2 \cdot 180,16 \text{ g glucose} \\
8,6 \text{ g NaCl} & \dots\dots\dots & x \\
x = \frac{8,6 \cdot 2 \cdot 180,16}{58,45} & = & 53,0 \\
& & \text{g glucose par L d'eau}
\end{array}$$

4. Travailler avec des perfusions pour traitement médicamenteux

Exemple A. Phénobarbital contre les convulsions

Un patient doit recevoir 160 mg de phénobarbital par voie intraveineuse. Le médicament est fourni en ampoules de 1 mL, 40 mg/mL. Combien d'ampoules sont nécessaires ?

40 mg de phénobarbital.....1 mL de solution à 40 mg/mL

160 mg de phénobarbital x

$x = 160/40 = 4$ mL. Comme 1 ampoule contient 1 mL => 4 ampoules sont nécessaires

Exemple B. Débit de perfusion de glucose

Un patient de 70 kg nécessite une perfusion de glucose à 0,18 g/kg/h pendant 2 h. Solution disponible: glucose 5 %, 500 mL par flacon. Combien de flacons sont nécessaires ?

Dose de glucose requise pour 1 heure (0,18 g/kg): $0,18 \text{ (g)} \cdot 70 \text{ (kg)} = 12,6 \text{ g}$

Dose requise de glucose pour 2 heures (0,18 g/kg/h): $\cdot 12,6 = 25,2 \text{ g}$

5 g glucose.....100 mL solution 5 %

25,2 g glucose x

$x = (25,2 \cdot 100)/5 = 504$ mL. Comme 1 flacon contient 500 mL => environ 1 flacon est nécessaire

Exemple C. Perfusion de dopamine

Un patient de 70 kg nécessite de la dopamine à 5 µg/kg/min. Solution disponible: 200 mg de dopamine dans 500 mL de glucose 5 %. Calculez le débit de perfusion en mL/h.

Dose de dopamine requise par minute (µg/kg/min): $5 \text{ (µg)} \cdot 70 \text{ kg} = 350 \text{ µg}$

Dose de dopamine requise par minute: $60 \cdot 350 = 21\,000 \text{ µg} = 21 \text{ mg}$

200 mg dopamine.....500 mL solution glucose 5 %

21 mg dopamine x

$x = (21 \cdot 500)/200 = 52,5$ mL/h

Questions

1. Écrivez la formule de calcul de la concentration
 - a. en % (m/v).
 - b. Concentration molaire (M).
2. Donnez des exemples de solutions hypertoniques. Quand peuvent-elles être utilisées ?
3. Quelle est la différence entre les solutions colloïdales et cristalloïdes ? Donnez des exemples.
4. Une solution mère de glucose a une concentration de 20 % (m/v). Quelle quantité de cette solution est nécessaire pour préparer 100 mL de glucose à 5 % ?
5. Combien de grammes de NaCl sont nécessaires pour préparer 250 mL de solution à 0,9 % (m/v) ?

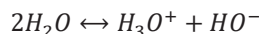
Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L4. ACIDES. BASES. TITRAGE.

Ionisation de l'eau

L'eau est une **molécule amphotère**, fonctionnant à la fois comme donneur de protons (acide) et accepteur de protons (base). Sa dissociation produit des ions hydronium (H_3O^+) et hydroxyle (HO^-):



Par simplicité, l'ion hydronium sera désigné comme ion hydrogène (H^+):



La constante d'équilibre, K_e , de cette réaction est présentée dans l'équation (1), où les termes entre crochets représentent les concentrations molaires:

$$K_e = \frac{[H^+] \cdot [HO^-]}{[H_2O]} \quad (1)$$

Dans l'eau pure, la concentration $[H_2O]$ est pratiquement constante, à ≈ 55 mol/L. En substituant cette valeur dans l'équation (1), on obtient l'équation (2), où **K_w (P_{H_2O}) est le produit ionique de l'eau.**

$$P_{H_2O} = K_{H_2O} = K_w = [H^+] \cdot [HO^-] \quad (2)$$

À 25°C, le produit ionique de l'eau est:

$$K_w = 1 \cdot 10^{-14} \Rightarrow [H^+] \cdot [HO^-] = 1 \cdot 10^{-14} \Rightarrow [H^+] = [HO^-] = 1 \cdot 10^{-7} M$$

Ainsi, dans les solutions, la concentration de H^+ et de HO^- sont réciproquement corrélées. Si $[H^+]$ augmente, alors $[HO^-]$ diminue, et vice-versa.

Acides et bases

Acides. Dans un solvant ionolytique (un solvant qui se dissocie en ions), un acide est toute substance dissoute qui se dissocie en ions, produisant un ion positif identique à celui résultant de la dissociation du solvant. Dans l'eau, toutes les substances qui se dissocient pour donner des ions hydrogène (hydronium) sont des acides. Dans l'ammoniac liquide, où existent les ions NH_4^+ et NH_2^- , tous les sels d'ammonium sont des acides. La réaction d'ionisation de tout acide peut être représentée par:



La constante d'équilibre (K_a , constante d'acidité) de ce système est:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

Selon la constante d'acidité, les acides peuvent être forts ou faibles:

- Les acides forts se dissocient complètement dans l'eau. En solution, presque toutes les molécules d'acide libèrent des protons, ce qui entraîne un K_a très élevé. Exemples: HCl, HBr, HNO₃, HClO₄, H₂SO₄ (première étape d'ionisation).
- Les acides faibles se dissocient partiellement dans l'eau. En solution, seule une fraction des molécules d'acide libère des protons, ce qui entraîne un K_a faible. Exemples: CH₃COOH, H₂CO₃.

Bases. Dans un solvant ionolytique, une base est toute substance dissoute qui se dissocie en ions, produisant un ion négatif identique à celui résultant de la dissociation du solvant. Dans l'eau, toutes les substances qui se dissocient pour donner des ions hydroxyle sont des bases. La réaction d'ionisation de toute base peut être représentée par:



La constante d'équilibre (K_b , constante de basicité) de ce système est:

$$K_b = \frac{[B^+] \cdot [HO^-]}{[BOH]}$$

Selon la constante de basicité, les bases peuvent être fortes ou faibles:

- Les bases fortes se dissocient complètement dans l'eau. En solution, presque toutes les molécules de base libèrent des ions hydroxyle, ce qui entraîne un K_b très élevé. Exemples: les hydroxydes alcalins (NaOH, KOH, LiOH), les hydroxydes alcalino-terreux (Ca(OH)₂, Ba(OH)₂)
- Les bases faibles se dissocient partiellement dans l'eau. En solution, seule une fraction des molécules de base libère des ions hydroxyle, ce qui entraîne un K_b faible. Exemples: NH₃, Al(OH)₃.

Paires conjuguées. L'ion formé lorsqu'un acide cède un proton est sa base conjuguée. L'ion formé lorsqu'une base accepte un proton est son acide conjugué. La force du conjugué est inversement proportionnelle: les acides forts ont des bases conjuguées faibles (par exemple, HCl = acide fort, Cl⁻ = base conjuguée faible), tandis que les acides faibles ont des bases conjuguées fortes (par exemple, CH₃COOH = acide faible, CH₃COO⁻ = base conjuguée forte). Il en va de même pour les bases: les bases fortes ont des acides conjugués faibles et les bases faibles ont des acides conjugués forts.

Introduction au pH

Le pH est une mesure de la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Il est calculé comme le logarithme décimal négatif de la concentration en ions hydrogène.

$$pH = \log \left[\frac{1}{[H^+]} \right] = -\log[H^+]$$

Selon le produit ionique de l'eau, $[H^+] \cdot [HO^-] = 10^{-14}$ M, donc:

- Dans l'eau pure: $[H^+] = [HO^-] \Rightarrow [H^+] = 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH = 7
- Dans les solutions acides: $[H^+] > [HO^-] \Rightarrow [H^+] > 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH < 7
- Dans les solutions basiques: $[H^+] < [HO^-] \Rightarrow [H^+] < 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH > 7
- L'intervalle de pH: $[H^+]_{\min} = 10^0$ et $[H^+]_{\max} = 10^{-14} \Rightarrow$ intervalle de pH = 0-14

Équation de Henderson-Hasselbalch

En partant de l'équilibre de dissociation de l'acide, en prenant les logarithmes, en réarrangeant les termes et en sachant que $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ et $\text{pK}_a = -\log\text{K}_a$, on obtient l'**équation de Henderson-Hasselbalch**, largement utilisée pour calculer le pH des solutions tampons:

$$\begin{aligned}K_a &= \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \\ \log K_a &= \log[\text{H}^+] + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \\ -\log[\text{H}^+] &= -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \\ \text{pH} &= \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\end{aligned}$$

Titrage

L'analyse volumétrique représente un groupe de méthodes analytiques quantitatives utilisées pour déterminer la quantité d'un composant analysé = *analyte* (ion, radical, élément, substance complexe) en mesurant avec précision le volume de solution réactive = *titrant* (solution étalon de concentration connue) nécessaire à la réaction.

Le titrage est une technique dans laquelle une solution réactive (titrant, R_1) est ajoutée progressivement (goutte à goutte) à un volume connu d'une autre solution (analyte, R_2) afin de déterminer sa concentration. Pour cela, une burette est utilisée pour mesurer le volume exact de la solution réactive.

La réaction est complète lorsque tout l'analyte (R_2) a réagi avec le titrant (R_1). **Le point d'équivalence** est l'étape du titrage à laquelle des quantités stœchiométriquement équivalentes de titrant et d'analyte ont réagi (réaction à 100 %). La concentration de l'analyte est déterminée à partir de:

- la concentration connue du titrant,
- le volume mesuré de titrant utilisé,
- l'équation chimique équilibrée.

Conditions requises pour une bonne réaction de titrage:

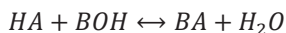
- la réaction doit être complète.
- la réaction doit être rapide et sélective.
- le point d'équivalence doit être clairement détectable.

Pour déterminer le point d'équivalence, des **indicateurs** chimiques sont utilisés comme troisième composant dans le titrage. Les indicateurs ne participent pas à la réaction de titrage elle-même, mais sont ajoutés à la solution d'analyte pour signaler la fin de la réaction. La plupart des indicateurs de titrage sont des substances organiques ou inorganiques ayant la propriété de changer de couleur selon les conditions du milieu. Parmi les indicateurs les plus fréquemment utilisés figurent:

- les indicateurs acide-base (pH): méthylorange, phénolphthaléine
- les indicateurs redox: bleu de méthylène, 2,4-dichlorindophénol
- les indicateurs complexométriques: calcon, murexide
- les indicateurs de précipitation: chromate de potassium, diphenylcarbazone

Titrage acide-base

Le titrage acide-base repose sur la réaction de neutralisation. Une réaction de neutralisation est la réaction chimique entre un acide et une base, aboutissant à la formation d'un sel et d'eau. La réaction générale est:



Les indicateurs acide-base (pH) sont des substances organiques qui changent de couleur selon le pH. Les indicateurs acide-base sont généralement des acides ou des bases faibles, et ils changent de couleur selon leur état de dissociation. Chacun possède un pKa et une plage de transition de pH (environ ± 1 unité autour du pKa). Des exemples d'indicateurs de pH sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Les indicateurs acide-base les plus utilisés et leur plage de pH

Indicateur	pK _a	Plage de pH	Couleur		
			Forme acide	Transition	Forme basique
Bleu de thymol (1 ^{re} transition)	1,7	1,2-2,8	Rouge	Orange	Jaune
Bleu de thymol (2 ^e transition)	8,9	8,0-9,6	Jaune	Vert	Bleu
Méthylorange	3,4	3,1-4,4	Rouge	Orange	Jaune
Bleu de bromophénol	3,9	3,0-4,7	Jaune	Vert	Bleu
Rouge de chlorophénol	6,0	5,2-6,8	Jaune	Orange	Rouge
Bleu de bromothymol	7,1	6,0-7,6	Jaune	Vert	Bleu
Rouge de phénol	7,8	6,6-8,0	Jaune	Orange	Rouge
Phénolphtaléine	9,5	8,3-10,0	Incolore	Rose	Rouge/Fuchsia

La courbe de titrage (pH en fonction du volume de titrant) présente une variation verticale marquée au point d'équivalence (point d'inflexion). L'indicateur doit avoir une plage de transition qui se situe dans cette région verticale:

- Acide fort + base forte aboutit à une équivalence à $\text{pH} \approx 7 \Rightarrow$ phénolphthaléine ou bleu de bromothymol.
- Acide fort + base faible aboutit à une équivalence à $\text{pH} < 7 \Rightarrow$ méthylorange.
- Acide faible + base forte aboutit à une équivalence à $\text{pH} > 7 \Rightarrow$ phénolphthaléine.

Procédure de titrage acide-base:

- Rincez la burette avec la solution titrante, remplissez-la et notez le volume initial.
- Pipetez un volume connu de solution d'analyte dans un erlenmeyer. Ajoutez 2-3 gouttes de l'indicateur approprié.
- Commencez le titrage: ajoutez le titrant lentement, en agitant, jusqu'au changement de couleur de l'indicateur (point final).
- Notez la lecture finale de la burette, représentant le volume de titrant utilisé.
- Calculez la concentration de l'analyte à l'aide de la stœchiométrie:

$$c_{\text{analyte}} = \frac{c_{\text{titrant}} \cdot V_{\text{titrant}}}{V_{\text{analyte}}}$$

PARTIE EXPÉRIMENTALE

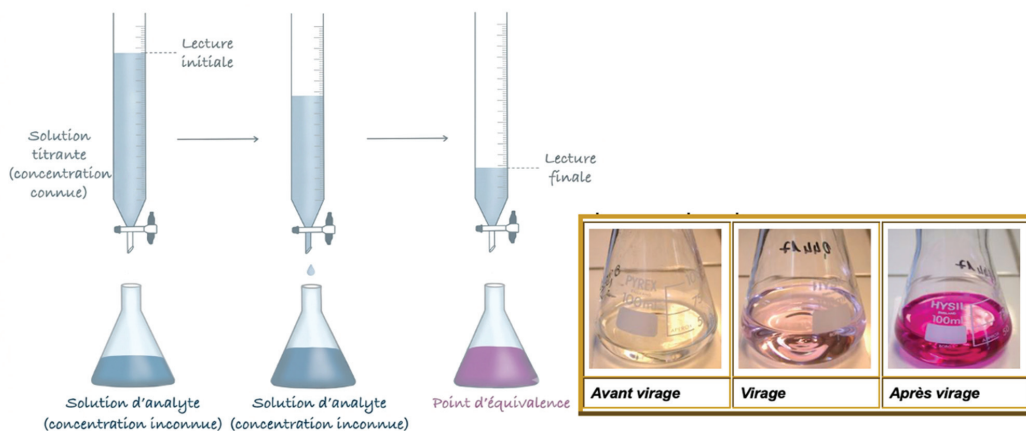
Détermination de la concentration d'une solution inconnue d'acide acétique ou d'acide oxalique par titrage avec une solution étalon d'hydroxyde de sodium.

Matériel:

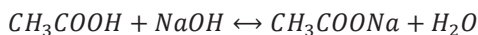
- Fiole d'Erlenmeyer (100 mL)
- Burette (50 mL)
- Pipette (10 mL) avec poire
- Solution de NaOH 0,01 M = titrant étalon
- Solution d'acide inconnue: acide acétique ou acide oxalique (10 mL) = analyte
- Solution de phénolphthaléine = indicateur

Procédure:

- Pipetez 10,00 mL de la solution d'acide inconnue dans une fiole d'Erlenmeyer.
- Ajoutez 3-4 gouttes d'indicateur phénolphthaléine. Agitez pour homogénéiser.
- Rincez et remplissez la burette avec du NaOH 0,01 M. Notez la lecture initiale de la burette.
- Ajoutez progressivement la solution de NaOH à l'acide en agitant.
- À l'approche du point final (changement de couleur visible), ajoutez le NaOH goutte à goutte.
- Le point final est atteint lorsque la solution devient rose pâle et que cette couleur persiste au moins 30 secondes. Notez le volume d'équivalence (V_e).



Calculez la concentration de l'acide



$$n_{\text{CH}_3\text{COOH}} = n_{\text{NaOH}} \Rightarrow c_{\text{CH}_3\text{COOH}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{CH}_3\text{COOH}}} = \frac{0.01\text{M} \cdot V_e}{10\text{mL}}$$



$$2 \cdot n_{\text{HOOC} - \text{COOH}} = n_{\text{NaOH}} \Rightarrow c_{\text{HOOC} - \text{COOH}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2 \cdot V_{\text{HOOC} - \text{COOH}}} = \frac{0.01\text{M} \cdot V_e}{2 \cdot 10\text{mL}}$$

Questions

1. Dans l'eau pure, quelles sont les concentrations des ions hydrogène et hydroxyle ?
2. Donnez deux exemples de bases fortes et deux exemples de bases faibles.
3. Écrivez l'équation générale d'une réaction de neutralisation entre un acide et une base.
4. Pourquoi la plage de transition de pH de l'indicateur doit-elle chevaucher le point d'équivalence ?
5. Lors d'un titrage, 25,0 mL de HCl ont été neutralisés par 20,0 mL de NaOH 0,100 M. Quelle est la concentration du HCl ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L5. LA NOTION DE pH. DÉTERMINATION DU pH DES SOLUTIONS ET DES LIQUIDES BIOLOGIQUES.

Définition du pH

Le pH d'une solution est une mesure de sa concentration en ions hydrogène. Le pH est défini comme le logarithme décimal négatif de la concentration en ions hydrogène:

$$pH = \log \left[\frac{1}{[H^+]} \right] = -\log[H^+]$$

Selon le produit ionique de l'eau, $[H^+] \cdot [HO^-] = 10^{-14}$ M, donc:

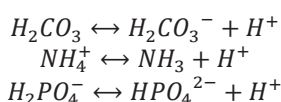
- Dans l'eau pure: $[H^+] = [HO^-] \Rightarrow [H^+] = 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH = 7
- Dans les solutions acides: $[H^+] > [HO^-]$ (excès de protons) $\Rightarrow [H^+] > 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH < 7
- Dans les solutions basiques: $[H^+] < [HO^-]$ (excès d'hydroxyles) $\Rightarrow [H^+] < 10^{-7}$ M $\Rightarrow$ pH > 7

L'intervalle de pH: $[H^+]_{\min} = 10^0 = 1$ et $[H^+]_{\max} = 10^{-14} \Rightarrow$ **échelle de pH = 0-14**. Les relations entre les concentrations en ions hydrogène/hydroxyle et leurs exposants sont résumées dans le Tableau 1:

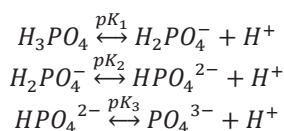
Tableau 1. La relation entre le pH, le pOH et la concentration en protons et en ions hydroxyle

$[H_3O^+]$	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
$[HO^-]$	10^{-14}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pOH	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Solution	← acide neutre alcaline →														

En biochimie, les réactions de dissociation sont toujours écrites dans le sens de la donation de protons:



La constante de dissociation pour les équilibres liés aux protons est toujours la constante d'acidité (K_a), donc $pK = pK_a$. Pour les acides polyprotiques (molécules ayant plus d'un proton dissociable), les valeurs de pK sont numérotées par ordre croissant de pH. Par exemple, pour H_3PO_4 :



À partir de l'équilibre de dissociation et de l'équation de Henderson-Hasselbalch: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$, lorsque $[A^-] = [HA] \Rightarrow pK_a = pH$. Par conséquent, le pK_a est la valeur de pH à laquelle les concentrations des formes dissociée et non dissociée sont égales.

Calcul du pH des solutions

Pour calculer le pH des solutions acides/basiques, les équations des constantes d'acidité/basicité sont nécessaires. Nous notons c la concentration initiale de l'acide/de la base.

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}, K_b = \frac{[B^+] \cdot [HO^-]}{[BOH]}$$

a. Solutions d'acides forts ou de bases fortes. Les acides et bases forts sont complètement dissociés en solution aqueuse. Par conséquent, la concentration en ions hydrogène sera égale à la concentration analytique (c) de l'acide ou de la base. Dans ce cas:

- Pour les acides forts: $[H^+] = [HA]_i = c$
 $pH = -\log[H^+] \Rightarrow pH = -\log[HA]_i \Rightarrow \mathbf{pH = -\log(c)}$
- Pour les bases fortes: $[HO^-] = [BOH]_i = c$
 $pH = 14 - pOH = 14 + \log[BOH]_i \Rightarrow pH = 14 + \log[BOH]_i \Rightarrow \mathbf{pH = 14 + \log(c)}$

b. Solutions d'acides faibles ou de bases faibles. Les acides et bases faibles ne sont que partiellement dissociés. Pour calculer leur pH, les constantes d'acidité/basicité sont nécessaires:

- Pour les acides faibles: $[H^+] = [A^-]$ et $[HA]_{undissociated} = c - [H^+]$. Ainsi, la constante d'acidité devient:

$$K_a = \frac{[H^+]^2}{c - [H^+]} \Rightarrow [H^+]^2 = K_a \cdot (c - [H^+]) \Rightarrow [H^+] = \sqrt{K_a \cdot (c - [H^+])}$$

$$\text{Étant donné que } c - [H^+] \approx c \Rightarrow [H^+] = \sqrt{K_a \cdot c} \Rightarrow \mathbf{pH = -\log(\sqrt{K_a \cdot c})}$$

- Pour les bases faibles, de façon similaire: $\mathbf{pH = 14 + \log(\sqrt{K_b \cdot c})}$

c. Solutions de sel. Réaction d'hydrolyse. Lorsque certains sels se dissolvent dans l'eau, leurs ions peuvent réagir avec les ions H^+ + HO^- issus de la dissociation de l'eau. Cette réaction est appelée hydrolyse. Les ions issus d'acides ou de bases forts sont neutres (pas d'hydrolyse), mais les ions issus d'acides ou de bases faibles s'hydrolysent. L'hydrolyse est une réaction réversible. La position d'équilibre dépend de la force acide ou basique des composés parents, du degré de dissociation, de la solubilité ou de la volatilité des produits d'hydrolyse:

- *Sels neutres (acide fort + base forte):* Le cation et l'anion proviennent tous deux d'un acide et d'une base forts; leurs paires conjuguées sont donc des espèces faibles, incapables de réagir avec l'eau. Les concentrations de protons et d'ions hydroxyle restent inchangées et égales, donc $pH = 7$.
- *Sels basiques (acide faible + base forte):* Le cation provient d'une base forte et représente un acide conjugué faible; il ne réagit donc pas avec l'eau. L'anion provient d'un acide faible et représente une base conjuguée forte; il s'hydrolyse donc, générant des ions hydroxyle et élevant le pH (> 7): $A^- + H_2O \leftrightarrow HA + HO^-$
- *Sels acides (acide fort + base faible):* L'anion provient d'un acide fort et représente une base conjuguée faible; il ne réagit donc pas avec l'eau. Le cation provient d'une base faible et représente un acide conjugué fort; il s'hydrolyse donc, générant des protons et diminuant le pH (< 7): $B^+ + H_2O \leftrightarrow BOH + H^+$
- *Sel basique/acide (acide faible + base faible):* Le cation et l'anion proviennent tous deux d'un acide et d'une base faibles; leurs paires conjuguées sont donc des espèces fortes, capables de s'hydrolyser. Le pH dépend de la force relative de l'acide et de la base parents: $A^- + B^+ + H_2O \leftrightarrow HA + BOH$

Détermination du pH

Le pH d'une solution peut être déterminé à l'aide de deux méthodes principales:

- papier indicateur de pH
- pH-mètre

Le **papier indicateur de pH** est imprégné d'un mélange de colorants sensibles au pH et change de couleur selon l'acidité/alcalinité de la solution. La couleur du papier est comparée à une échelle standard pour estimer le pH. Il présente les avantages d'être simple, peu coûteux et rapide, mais il est limité par le fait qu'il ne fournit que des valeurs approximatives (précision $\sim \pm 0,5$ -1,0 unité).

Le pH-mètre est la méthode privilégiée lorsque des mesures précises sont requises. C'est un potentiomètre qui mesure le potentiel développé entre une électrode de verre et une électrode de référence (calomel: $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}/\text{solution saturée}$), immergées dans la solution de pH inconnu. L'électrode de verre possède une extrémité en verre spécial, très fin, perméable uniquement aux ions hydronium.

Actuellement, la plupart des appareils utilisent l'**électrode combinée** (l'électrode de référence et l'électrode sensible au pH se trouvent dans le même tube de verre). L'utilisation d'une telle électrode est relativement simple. Il existe cependant une série de précautions dont dépend le bon fonctionnement de l'électrode. Ainsi, une vérification périodique du niveau de la solution saturée de KCl dans l'électrode est nécessaire. Après utilisation, l'électrode doit être conservée dans une solution de KCl 3 M. De plus, une manipulation soigneuse est importante car l'extrémité en verre spécial, perméable aux ions hydronium, est très fragile.

Étalonnage du pH-mètre

Avant d'effectuer une mesure, le pH-mètre doit être étalonné avec des solutions tampons (étalons standardisés de pH bien établi). Les solutions tampons les plus courantes ont une valeur de pH de 4, 7 ou 10 et une précision de $\pm 0,02$ unité de pH.

Procédure de travail

1. Retirez l'électrode de la solution de conservation.
2. Rincez à l'eau distillée et séchez délicatement en tamponnant avec du papier filtre (ne pas frotter, afin d'éviter d'endommager la membrane de verre).
3. Immergez la pointe de l'électrode (y compris la jonction céramique) dans la solution à mesurer.
4. Attendez que la lecture se stabilise, puis notez la valeur du pH.
5. Après la mesure, rincez à nouveau l'électrode et replacez-la dans la solution de conservation de KCl 3 M.

pH isoélectrique

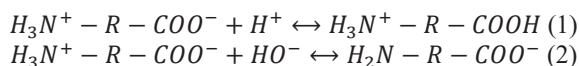
Le pH isoélectrique (pI ou pHi) est le pH auquel une molécule ne porte aucune charge électrique nette. À ce point, le nombre de charges positives = le nombre de charges négatives, la charge globale de la molécule = 0, la solubilité est minimale, et la migration dans un champ électrique ne se produit pas.

Le pH isoélectrique des acides aminés

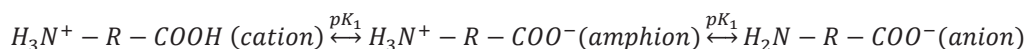
Les acides aminés sont des composés qui possèdent à la fois des fonctions acide et basique dans leur structure. La représentation habituelle (I) contenant un groupement $-NH_2$ et un groupement $-COOH$ ne représente pas correctement leur structure, car ces deux groupements peuvent se neutraliser mutuellement. En solution aqueuse, les acides aminés ont la structure d'amphions ou d'ions dipolaires/zwiterions (II):



En raison de ce double caractère des acides aminés, ils forment des sels à la fois avec des acides et des bases. En milieu acide, les acides aminés se comportent comme des bases, et en milieu basique comme des acides. Si un acide est ajouté à la solution d'un acide aminé, les protons seront neutralisés selon l'équation (1); si une base est ajoutée, les ions hydroxyle seront neutralisés selon la réaction (2). Dans les deux cas, le pH de la solution ne change pas de manière appréciable. L'utilisation des acides aminés dans les solutions tampons repose sur cette propriété.



Par conséquent, en solution acide, les acides aminés sont des cations et migrent vers la cathode (-). En solution basique, les acides aminés sont des anions et migrent vers l'anode (+). Sous forme amphionique, les acides aminés ne contribuent pas au transport du courant dans le champ électrique, étant attirés de façon égale par la cathode et l'anode:



Le pH isoélectrique d'un acide aminé (pI) est défini comme le pH de la solution auquel l'acide aminé est entièrement présent sous forme d'ions dipolaires, de charge globale nulle. Au pH isoélectrique, la solubilité de l'acide aminé est minimale, et il ne migre pas dans un champ électrique. En considérant ses 2 constantes d'acidité:

$$K_{a1} = \frac{[H^+] \cdot [H_3N^+ - R - COO^-]}{[H_3N^+ - R - COOH]}, K_{a2} = \frac{[H^+] \cdot [H_2N - R - COO^-]}{[H_3N^+ - R - COO^-]}$$

Au pH isoélectrique: $[H_3N^+ - R - COOH] = [H_2N - R - COO^-]$, donc:

$$\begin{aligned} \frac{[H^+] \cdot [H_3N^+ - R - COO^-]}{K_{a1}} &= \frac{K_{a2} \cdot [H_2N - R - COO^-]}{[H^+]} \Rightarrow [H^+]^2 = K_{a1} \cdot K_{a2} \\ [H^+] &= \sqrt{K_{a1} \cdot K_{a2}} \Rightarrow pH = -\log \sqrt{K_{a1} \cdot K_{a2}} \Rightarrow pI = \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2}) \end{aligned}$$

Plusieurs acides aminés possèdent plus d'un groupement amino et carboxyle, et ont donc 2 valeurs de pKa. Le point isoélectrique des différents types d'acides aminés est donc:

- Acides aminés neutres (monoaminomonocarboxyliques): $pI \approx 6$
- Acides aminés acides (monoaminodicarboxyliques): $pI < 6$ (plage acide).
- Acides aminés basiques (diaminomonocarboxyliques): $pI > 7$ (plage basique).

Le pH isoélectrique des acides aminés a une pertinence physiologique car les acides aminés font partie des chaînes polypeptidiques des protéines. La charge électrique d'un acide aminé est positive dans les liquides biologiques ayant un pH inférieur au pH isoélectrique, et négative si celui-ci est supérieur. Au pH sanguin physiologique ($\sim 7,4$), les résidus d'aspartate et de glutamate ($-\text{COOH}$) sont chargés négativement ($-$), tandis que les résidus de lysine, d'arginine et d'histidine ($-\text{NH}_2$) sont chargés positivement ($+$). Cette répartition des charges influence le repliement des protéines, l'activité enzymatique, ainsi que les interactions protéine-protéine et protéine-ADN

Par exemple, la glycine (Figure 1) a un $pK_{a1} = 2,34$ et $pK_{a2} = 9,60$, donc $pI = 5,97$. À un pH = 5,97, la charge nette des molécules en solution est nulle.

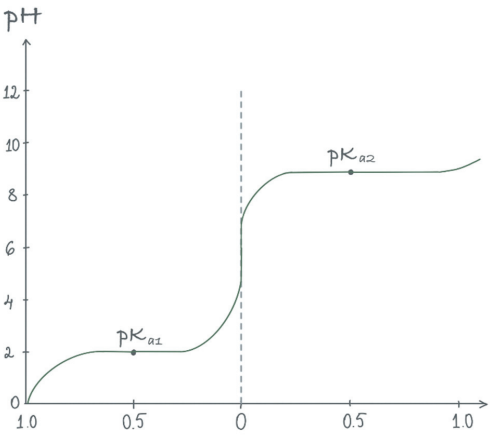


Figure 1. Courbe de titrage de la glycine

Détermination du pH sanguin et urinaire

a. pH sanguin

Les déterminations du pH sanguin sont utiles pour diagnostiquer certaines affections ainsi que pour évaluer le fonctionnement de divers organes. La valeur normale du pH sanguin est de 7,35-7,45.

- La diminution du pH sanguin en dessous de 7,35 est appelée acidose (*diabète décompensé*)
- L'augmentation du pH sanguin au-dessus de 7,45 est appelée alcalose (*hyperventilation pulmonaire, vomissements prolongés*)

Tableau 2. Modifications du pH, de la $p\text{CO}_2$, du HCO_3^- dans l'acidose et l'alcalose

CONDITION	pH	$p\text{CO}_2$	HCO_3^-
ACIDOSE MÉTABOLIQUE	↓	N / ↓ (compensation)	↓
ACIDOSE RESPIRATOIRE	↓	↑	N / ↑ (compensation)
ALCALOSE MÉTABOLIQUE	↑	N / ↑ (compensation)	↑
ALCALOSE RESPIRATOIRE	↑	↓	N / ↓ (compensation)

L'introduction de la **méthode ASTRUP** micro dans l'exploration de l'équilibre acido-basique représente une avancée importante dans ce domaine. Contrairement à la détermination des bicarbonates plasmatiques, la méthode Astrup prend en compte le rôle du tampon constitué par l'hémoglobine et l'intervention de l'anhydrase carbonique érythrocytaire. Cette méthode repose sur la relation de proportionnalité inverse qui existe entre la pression partielle de CO_2 ($p\text{CO}_2$) et les valeurs de pH dans le sang. Pour la micro méthode Astrup, 3 gouttes de sang artériel ou veineux suffisent, à partir desquelles peuvent être déterminés le pH sanguin, la $p\text{O}_2$, la $p\text{CO}_2$, l'excès de base et le bicarbonate actuel.

b. pH urinaire

Le pH urinaire peut être déterminé à l'aide de bandelettes urinaires (également appelées bandelettes réactives). Elles analysent de manière semi-quantitative certains produits présents dans l'urine: urobilinogène, bilirubine, corps cétoniques, acide ascorbique (pour certaines d'entre elles), glucose, protéines, globules rouges, nitrites, leucocytes, ainsi que le pH et la densité urinaires.

Une bandelette est constituée de 4 couches superposées: un film de nylon protecteur, un papier imprégné du réactif correspondant, un papier filtre absorbant et un support en plastique. La bandelette de test contient plusieurs zones distinctes, correspondant chacune à un paramètre à tester. L'insertion de la bandelette dans l'urine produira ou non un changement de couleur dans chaque zone.

La lecture des bandelettes urinaires peut être effectuée:

- manuellement: les changements seront comparés à une échelle standard (Figure 2), fournie avec le test, dans laquelle la corrélation est établie entre la concentration du paramètre analysé et l'intensité de la coloration
- automatiquement: à l'aide de dispositifs appelés lecteurs de bandelettes. Ce sont des photomètres portables capables de lire un nombre variable d'échantillons/heure et pouvant être utilisés dans les laboratoires d'analyses, les hôpitaux, les ambulances et les cabinets individuels des médecins généralistes ou spécialistes.

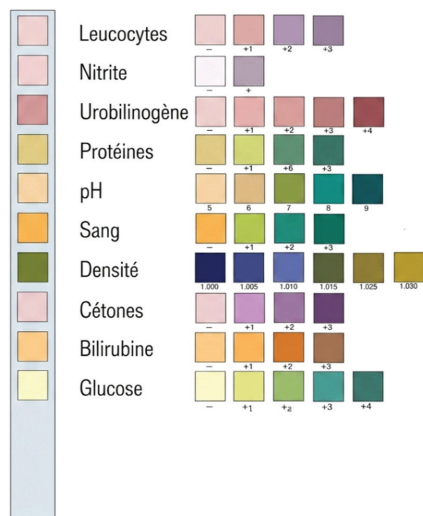


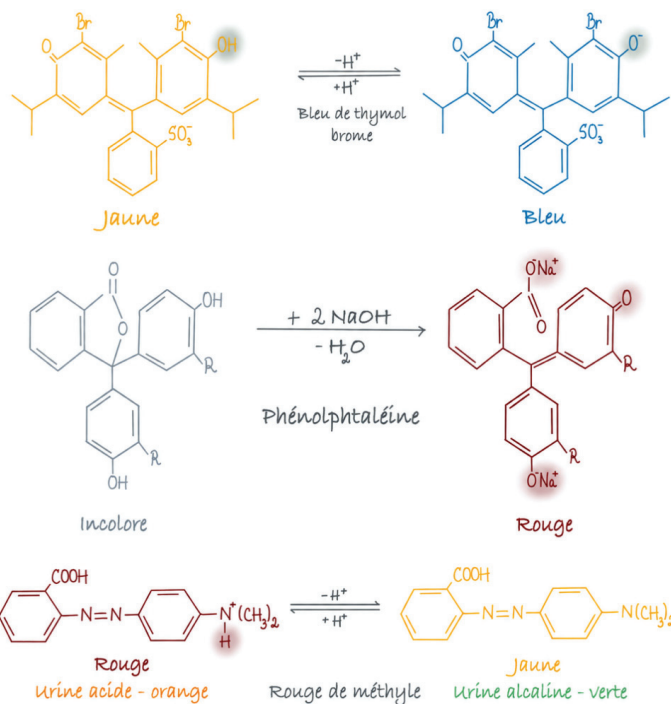
Figure 2. Bandelettes urinaires et échelle

Procédure

- On utilise de l'urine fraîche non centrifugée, généralement la première urine du matin.
- L'urine est recueillie de préférence dans un récipient stérile (si le récipient n'est pas stérile, les nitrites ne sont pas interprétés).
- La bandelette est immergée pendant 2 secondes dans l'urine afin que toute sa surface (chaque zone réactive) soit entièrement recouverte par le liquide.
- Retirez l'excès de liquide en touchant le bord de la bandelette au bord du récipient d'urine, puis placez la bandelette en position horizontale.
- Les zones réactives de la bandelette sont comparées aux zones correspondantes de l'échelle standard dans un intervalle de 60 secondes (pour les leucocytes, l'intervalle est de 60-120 secondes).
- Deux minutes ne doivent pas être dépassées pour la comparaison des résultats.

Principe de détermination du pH urinaire avec des bandelettes urinaires

La zone réactive contient un mélange de trois indicateurs: le rouge de méthyle, le bleu de bromothymol et la phénolphthaléine. Dans la plage de pH de 5-9, une couleur est obtenue variant progressivement de l'orange-jaune-vert au bleu.



Sources d'erreur

Dans le cas d'échantillons d'urine restant longtemps avant d'être analysés, le pH peut évoluer vers l'alcalinité en raison de la croissance bactérienne.

Signification clinique

Normalement, l'urine présente une réaction acide. Le pH de l'urine est déterminé, dans une large mesure, par la proportion de phosphates dibasiques (alcalins) et monobasiques (acides) dans l'urine. Comme on le sait, le rein est irrigué par le sang, qui a un pH d'environ 7,4, et forme une urine de pH acide. Cette variation de pH est obtenue, en partie, par la modification de la proportion entre phosphates acides et alcalins. Grâce à ce mécanisme, un grand nombre de bases fixes de l'organisme sont épargnées, en particulier le Na^+ , mais aussi le K^+ , le Mg^{2+} et le Ca^{2+} .

Le rapport des phosphates alcalins dans le plasma ($\text{pH} = 7,4$) est:

$$\frac{NaH_2PO_4}{Na_2HPO_4} = \frac{1}{5}$$

Le rapport des phosphates alcalins dans l'urine (pH = 4,5-5,5) s'inverse:

$$\frac{NaH_2PO_4}{Na_2HPO_4} = \frac{5}{1}$$

Dans les cas où l'urine atteint une acidité maximale, le rapport est égal à 50:1.

Le pH urinaire varie entre 5,8 et 7,4 au cours de la journée. L'urine du matin a un pH de 5-6. En la conservant plus longtemps, l'urine peut devenir alcaline car, par contamination avec des germes microbiens, l'urée est décomposée (sous l'action de l'uréase) en ammoniac. Les valeurs de pH supérieures à 7 ont une importance analytique car, dans ce cas, les érythrocytes et les leucocytes subissent une lyse rapide, ce qui explique les résultats négatifs obtenus dans le sédiment urinaire en présence de résultats positifs sur la bandelette.

Variations physiologiques du pH urinaire

- selon le régime alimentaire:
 - dans un régime strictement carné, l'urine est acide (pH = 5,2 - 5,3)
 - dans un régime exclusivement végétarien, l'urine est alcaline (pH = 7,0 - 7,5)
 - dans le cas d'un régime mixte, la réaction urinaire est faiblement acide
 - il faut se rappeler que, après administration de bicarbonates ou traitement par des eaux minérales, l'urine présente une réaction alcaline
- selon le rythme nycthéméral:
 - l'urine la plus acide est éliminée vers minuit et la moins acide (parfois alcaline) le matin

Variations pathologiques du pH urinaire

- **Des valeurs basses de pH urinaire (urine acide)** se rencontrent en cas de jeûne, d'intoxications diverses, d'insuffisance rénale, d'acidocétose diabétique.
- **Des valeurs élevées de pH urinaire (urine alcaline)** se rencontrent en cas de vomissements abondants de diverses étiologies, d'infections urinaires (urétrite, cystite, pyélite, pyélonéphrite), d'hypokaliémie sévère, d'intoxications diverses, de fièvre de diverses étiologies.

Tableau 3. Plage de pH de quelques liquides biologiques

Liquide biologique	pH
Sang	7,35-7,45
Larmes	7,20-7,40
Salive	6,40-7,00
Suc gastrique	1,50-3,00
Suc pancréatique	7,50-8,00
Urine	5,00-7,50
Liquide céphalorachidien	7,20-7,40

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Détermination du pH des solutions à l'aide du pH-mètre.

Objectifs:

1. Mesurez le pH de cinq solutions préparées à l'aide d'un pH-mètre.
2. Comparez les valeurs de pH mesurées avec celles des liquides biologiques du corps humain.

SOLUTION 1 – pH ~ 2 (suc gastrique)

SOLUTION 2 – pH ~ 5,5 (urine)

SOLUTION 3 – pH ~ 7,4 (plasma)

SOLUTION 4 – pH ~ 7,8 (urine)

SOLUTION 5 – pH ~ 8,2 (suc pancréatique)

Procédure de travail avec le pH-mètre:

- Allumez le pH-mètre (bouton d'alimentation).
- Préparez l'électrode: Rincez à l'eau distillée. Séchez délicatement en tamponnant avec du papier filtre (ne pas frotter la membrane de verre).
- Mesurez le pH: Insérez la pointe de l'électrode dans la solution. Attendez ~30-40 secondes que la lecture se stabilise. Lisez et notez la valeur du pH affichée.
- Répétez la procédure pour chaque solution, en rinçant et en séchant l'électrode entre les mesures.
- Après toutes les mesures, remettez l'électrode dans la solution de conservation (KCl 3 M).

Questions

1. Quel est le pH de l'eau pure à 25 °C et pourquoi ?
2. L'acide acétique a $K_a = 1,8 \times 10^{-5}$. Calculez le pH d'une solution d'acide acétique 0,1 M.
3. Pourquoi les sels d'acides faibles + bases fortes donnent-ils des solutions basiques ? (Donnez des exemples)
4. Quelle est la signification physiologique du point isoélectrique dans les protéines ?
5. Sachant que l'alanine a $pK_{a1} = 2,34$ et $pK_{a2} = 9,69$, déterminez le pH auquel sa solubilité est minimale.

Notes de laboratoire

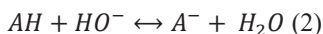
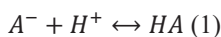
Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L6. SOLUTIONS TAMPONS.

Solutions tampons

Une solution tampon est une solution qui contient un acide faible (HA) et sa base conjuguée (A⁻) (ou une base faible et son acide conjugué). Elle résiste à des changements significatifs de pH lorsque de petites quantités d'acide fort ou de base forte sont ajoutées. Les tampons sont essentiels dans les systèmes chimiques et biologiques pour maintenir un pH stable.

Si un acide (H⁺) est ajouté à une solution tampon, il est consommé par la base conjuguée (A⁻), qui se transforme en son acide correspondant (HA), comme indiqué dans l'équation (1). Si une base (OH⁻) est ajoutée à une solution tampon, elle est consommée par l'acide faible (HA), qui se transforme en sa base correspondante (A⁻), comme dans l'équation (2). Par conséquent, l'ajout d'un acide ou d'une base entraîne une modification du rapport A⁻ / HA.



Équation de Henderson-Hasselbalch. Plage tampon et capacité tampon

En partant de l'équilibre de dissociation de l'acide, en prenant les logarithmes, en réarrangeant les termes et en sachant que $pH = -\log[H^{+}]$ et $pK_a = -\log K_a$, on obtient l'**équation de Henderson-Hasselbalch** (3). Dans l'**équation de Henderson-Hasselbalch**, le rapport $[A^{-}]/[HA]$ est une fonction logarithmique, donc même de grandes variations des concentrations de $[A^{-}]$ et de $[HA]$ produisent de petites variations absolues de pH.

$$K_a = \frac{[H^{+}] \cdot [A^{-}]}{[HA]} \Leftrightarrow \log K_a = \log[H^{+}] + \log \frac{[A^{-}]}{[HA]} - \log[H^{+}] = -\log K_a + \log \frac{[A^{-}]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^{-}]}{[HA]} \quad (3)$$

La **plage tampon** est déterminée par la valeur de pK du système. La plage tampon la plus efficace est $pH = pK_a \pm 1$. En dehors de cette plage, la solution perd sa capacité tampon (excès de forme acide/basique).

La **capacité tampon** (β) = le nombre d'équivalents de H⁺ ou d'OH⁻ (le nombre de moles d'acide ou de base forts) qui doivent être ajoutés à 1 L de tampon pour modifier son pH d'une unité. La capacité tampon augmente avec une concentration totale plus élevée des composants du tampon et un volume de tampon plus grand.

Le choix des tampons biochimiques

Idéalement, toute investigation biochimique doit être réalisée dans des solutions tampons aqueuses. Le milieu naturel des biomolécules et des organites cellulaires est soumis à un contrôle strict du pH ($pH \approx 6-8$). L'extraction des composants biologiques (protéines, acides nucléiques, organites) nécessite un environnement contrôlé pour maintenir la stabilité. De nombreuses réactions enzymatiques consomment ou libèrent des protons (H⁺), ce qui modifierait sinon le pH du milieu; un système tampon est donc essentiel pour maintenir un pH constant. Occasionnellement, des tampons avec d'autres valeurs de pH sont nécessaires (Tableau 1).

Le Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane] est l'un des tampons biochimiques synthétiques les plus utilisés (plus que le tampon phosphate). Il est efficace dans la plage: pH 7,5-9,0. Étant une amine primaire, il interfère minimalement avec les processus biochimiques. De plus, il ne précipite pas les ions Ca^{2+} , il est chimiquement stable et largement disponible. Pour préparer 1 L de tampon Tris 0,1 M: dissoudre 12,11 g de Tris dans 950-975 mL d'eau distillée, ajuster le pH avec du HCl concentré (pour obtenir du Tris-HCl), puis compléter le volume final à 1 L avec de l'eau distillée.

Tableau 1. Systèmes tampons courants utilisés en biochimie

Composé	Abréviation	MM	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
Acide N-(2-acétamido)-2-aminoéthanesulfonique	ACES	182,2	6,90	-	-	-
Acide N-(2-acétamido)-2-iminodiacétique	ADA	212,2	6,60	-	-	-
Acide acétique		60,1	4,76	-	-	-
Arginine	Arg	174,2	2,17	9,04	12,48	-
Acide barbiturique		128,1	3,79	-	-	-
Acide N,N-bis(2-hydroxyéthyl)-2-aminoéthanesulfonique	BES	213,1	7,15	-	-	-
N,N-bis(2-hydroxyéthyl)glycine	BICINE	163,2	8,35	-	-	-
Acide borique		61,8	9,23	12,74	13,80	-
Acide citrique		210,1	3,10	4,75	6,40	-
Acide éthylènediaminetétraacétique	EDTA	292,3	2,00	2,67	6,24	10,88
Acide formique		46,03	3,75	-	-	-
Acide fumarique		116,1	3,02	4,39	-	-
Glycine	Gly	75,1	2,45	9,60	-	-
Glycylglycine		132,1	3,15	8,13	-	-
Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique	HEPES	238,3	7,15	-	-	-
Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-3-propanesulfonique	HEPPS	252,3	8,00	-	-	-
Histidine	His	209,7	1,82	6,00	9,17	-
Imidazole		68,1	6,95	-	-	-
Acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique	MES	195,0	6,15	-	-	-
Acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique	MOPS	209,3	7,20	-	-	-
Acide phosphorique		98,0	2,12	7,21	12,32	-
Acide succinique		118,1	4,18	5,60	-	-
Acide 3-tris(hydroxyméthyl)aminopropanesulfonique	TAPS	243,2	8,40	-	-	-
Acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthanesulfonique	TES	229,2	7,50	-	-	-
N-Tris(hydroxyméthyl)méthylglycine	Tricine	179,0	8,15	-	-	-
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane	Tris	121,1	8,30	-	-	-

Propriétés idéales des tampons biochimiques

1. Avoir un pKa compris entre 6 et 8 (proche du pH physiologique).
2. Être très soluble dans l'eau, mais peu soluble dans les solvants organiques.
3. Contribuer le moins possible à la force ionique du milieu.
4. Ne pas traverser les membranes biologiques (ou avoir des effets négligeables si c'est le cas).

5. Avoir un effet de sel minimal.
6. Ne pas interagir avec les ions métalliques d'importance biologique (ou ne former que des complexes stables et bien définis).
7. Avoir une absorbance minimale dans le domaine visible et UV (afin de ne pas interférer avec les dosages spectroscopiques).
8. Être chimiquement stable dans le temps et résistant à la dégradation.
9. Être facilement disponible sous forme pure à un coût raisonnable.

Systèmes tampons biologiques

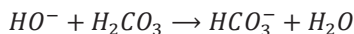
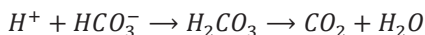
La concentration en H^+ dans le sang et l'espace extracellulaire est d'environ 40 nM. Cela correspond à un **pH de 7,40**. L'organisme s'efforce de maintenir cette valeur constante, car des variations importantes de pH sont incompatibles avec la vie. La valeur du pH est maintenue constante par des systèmes tampons qui amortissent les perturbations mineures de l'équilibre acido-basique. À plus long terme, l'aspect déterminant est le maintien d'un équilibre entre la production et la captation de H^+ et la libération de H^+ . Si la capacité tampon du sang est insuffisante, ou si l'équilibre acido-basique n'est pas maintenu - par exemple, en cas de maladie rénale ou lors d'une hypoventilation ou d'une hyperventilation - des variations de la valeur du pH plasmatique peuvent survenir. Une diminution de plus de 0,03 unité est appelée **acidose**, et une augmentation est appelée **alcalose**.

Les systèmes tampons les plus importants, qui fonctionnent en permanence dans l'organisme, sont le bicarbonate/acide carbonique, les phosphates inorganiques ($HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$), les protéines et les systèmes hémoglobine (non protonée/protonée).

1. Bicarbonate/acide carbonique

C'est le tampon extracellulaire le plus important et le principal régulateur du pH sanguin. Il est constitué d'eau, de dioxyde de carbone (CO_2 , l'anhydride de l'acide carbonique H_2CO_3), et de bicarbonate (hydrogénocarbonate) (HCO_3^-). Il constitue un système ouvert: le CO_2 peut être exhalé par les poumons et les reins peuvent excréter le H^+ et régénérer le HCO_3^- , permettant une régulation dynamique.

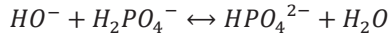
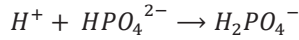
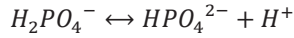
L'ajustement de l'équilibre entre le CO_2 et le HCO_3^- est accéléré par l'anhydrase carbonique, une enzyme contenant du zinc, qui catalyse l'hydratation du CO_2 , avec formation rapide de H_2CO_3 . Le H_2CO_3 agit comme un acide faible, neutralisant l'excès de base, et le HCO_3^- agit comme une base faible, neutralisant l'excès d'acide.



À la valeur de pH du plasma et avec un pK_a de 6,1, le HCO_3^- et le CO_2 sont présents dans un rapport d'environ 20:1 (24 mEq de bicarbonate et 1,2 mEq d'acide carbonique). Au lieu d'utiliser le rapport $[HCO_3^-]/[H_2CO_3]$, il est plus pratique d'utiliser le rapport $[HCO_3^-]/pCO_2$, où pCO_2 représente la pression partielle de dioxyde de carbone dans le sang.

2. Phosphates inorganiques

Le $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ est important principalement dans le liquide intracellulaire et les tubules rénaux. Le $pK_a \approx 6,8$, ce qui lui permet de tamponner efficacement autour du pH physiologique. Le $H_2PO_4^-$ agit comme un acide faible (neutralise l'excès de base) et le HPO_4^{2-} comme une base faible (neutralise l'excès d'acide).



Le rapport dihydrogénophosphate:monohydrogénophosphate est de 1:5 dans le sang et de 5:1 dans l'urine. Dans le plasma, le tampon phosphate ne contribue qu'à une faible fraction de la capacité tampon du sang (bien moins que le bicarbonate et l'hémoglobine), car la concentration plasmatique en phosphate est relativement faible. Dans l'urine, le tampon phosphate aide à excréter le H^+ et à maintenir l'équilibre acido-basique systémique. Dans le liquide intracellulaire (LIC), le phosphate est bien plus concentré que dans le plasma, et il joue un rôle majeur dans le tamponnement des acides métaboliques à l'intérieur des cellules.

3. Protéines

Les protéines sont des molécules amphotères; elles contiennent à la fois des groupements acides ($-COOH$) et basiques ($-NH_2$), ainsi que des chaînes latérales ionisables sur certains acides aminés. Cela leur permet d'accepter ou de céder des protons (H^+) selon le pH. À pH bas, les protéines agissent comme des bases (acceptent H^+), et à pH élevé, comme des acides (cèdent H^+). L'histidine (groupement imidazole, $pK_a \approx 6,8$) est l'acide aminé le plus important pour le tamponnement au pH physiologique.



Étant la protéine plasmatique la plus abondante (~60 % des protéines totales) et portant de nombreux groupements ionisables, l'albumine contribue de façon significative à la capacité tampon du plasma. Chaque molécule d'albumine possède de multiples résidus d'histidine, ce qui en fait un tampon efficace autour du pH physiologique.

4. Hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est une protéine tétramérique présente dans les globules rouges, chaque sous-unité contenant un groupement hème (qui lie l' O_2) et une chaîne de globine riche en résidus d'histidine. Ces groupements imidazole de l'histidine constituent les principaux sites de liaison des protons.



De plus, l'hémoglobine possède une capacité tampon importante grâce à l'effet Bohr et à sa capacité à lier les H^+ générés durant le métabolisme. Dans les tissus (faible O_2 , CO_2 élevé, pH acide), le CO_2 pénètre dans les globules rouges, produisant du H^+ . Le H^+ se lie à l'Hb, stabilisant la désoxyhémoglobine (HHb). Cela diminue l'affinité de l'Hb pour l' O_2 , favorisant la libération d' O_2 . Dans les poumons (O_2 élevé, CO_2 faible, pH plus alcalin): l' O_2 se lie à l'Hb, déplaçant le H^+ . Le H^+ se combine avec le HCO_3^- pour former du CO_2 , qui est exhalé. Ceci représente l'effet Bohr. L'hémoglobine fonctionne en synergie avec le tampon bicarbonate; les érythrocytes constituent donc le point de rencontre de ces deux systèmes.

Troubles acido-basiques

Les valeurs normales de pH sanguin sont **7,35-7,45**. Le pH sanguin est principalement déterminé par le rapport HCO_3^- et H_2CO_3 ou pCO_2 (normalement 20:1). Des valeurs de pH <6,9 ou >7,9 représentent les limites de survie.

- Une diminution du rapport $\text{HCO}_3^-/\text{pCO}_2$ produit une **acidose** (pH<7,35).
- Une augmentation du rapport $\text{HCO}_3^-/\text{pCO}_2$ produit une **alcalose** (pH>7,45).
- Lorsque les modifications de l'équilibre acido-basique sont causées par une modification initiale des bicarbonates, on parle d'acidose ou d'alcalose **métabolique**.
- Lorsque les modifications de l'équilibre acido-basique sont causées par une modification initiale du dioxyde de carbone, on parle d'acidose ou d'alcalose **respiratoire**.

L'acidose métabolique représente la diminution du pH sanguin due à une diminution primaire du bicarbonate (HCO_3^-). Elle peut être causée par l'acidocétose diabétique (excès de corps cétoniques), l'acidose lactique (choc, hypoxie), la diarrhée (perte de HCO_3^-), la maladie rénale chronique (excrétion altérée de H^+ , perte de HCO_3^-).

L'alcalose métabolique représente une augmentation du pH sanguin due à une augmentation primaire du bicarbonate (HCO_3^-). Elle peut être causée par des vomissements prolongés (perte de HCl gastrique), une prise excessive d'antiacides (ingestion d'alcalins), un traitement diurétique (perte de Cl^- , K^+ entraînant un déplacement de H^+).

L'acidose respiratoire représente une diminution du pH sanguin due à une augmentation primaire de l'acide carbonique ($\uparrow\text{pCO}_2$) due à une hypoventilation. Elle peut être causée par la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), une dépression respiratoire (médicaments, anesthésie, traumatisme crânien) et une obstruction des voies respiratoires.

L'alcalose respiratoire représente une augmentation du pH sanguin due à une diminution primaire de l'acide carbonique ($\downarrow\text{pCO}_2$) due à une hyperventilation. Elle peut être causée par l'anxiété, les crises de panique (respiration rapide), la haute altitude (faible $\text{O}_2 \rightarrow$ hyperventilation), les stades précoces de pneumonie, l'embolie pulmonaire, la fièvre, le sepsis.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation de solutions tampons

Obtenez 200 mL de tampon acide acétique/acétate de sodium, pH=4,8, en utilisant des solutions d'acide acétique et d'acétate de sodium de concentration 0,01 M, sachant que $pK_a=4,76$.

1. Préparez 200 mL de solution d'acétate de sodium 0,1 M, en utilisant de l'acétate de sodium solide pur:

- Calculez la quantité nécessaire d'acétate de sodium
- Pesez la quantité nécessaire d'acétate de sodium à l'aide d'un flacon de pesée
- Transférez la substance dans une fiole jaugée de 200 mL à l'aide d'un entonnoir et ajoutez de l'eau distillée
- Homogénéisez la solution jusqu'à dissolution complète du solide
- Ajoutez de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge de la fiole

2. Préparez 200 mL de solution d'acide acétique 0,1 M en diluant une solution d'acide acétique 1 M:

- Calculez le volume nécessaire de solution concentrée d'acide acétique (1 M)
- Mesurez le volume nécessaire à l'aide d'une éprouvette graduée
- Transférez le volume de solution concentrée d'acide acétique dans une fiole jaugée de 200 mL, puis ajoutez de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge
- Homogénéisez la solution

3. Préparez 100 mL de solution tampon $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ de pH=4,8, en utilisant les solutions préparées aux points 1 et 2.

- Mesurez à l'aide d'éprouvettes graduées les volumes nécessaires de solutions d'acide acétique et d'acétate de sodium et ajoutez-les dans la même fiole jaugée de 100 mL
- Homogénéisez le mélange
- Mesurez le pH de la solution tampon à l'aide d'un pH-mètre

Capacité tampon:

Réactif	Solution tampon		Eau distillée	
	1a	1b	2a	2b
Solution tampon (pH=4,8)	30 mL	30 mL	-	-
Eau distillée	-	-	30 mL	30 mL
pH				
HCl 0,01 M	0,5 mL	-	0,5 mL	-
NaOH 0,01 M	-	0,5 mL	-	0,5 mL
pH				

Questions

1. Définissez la capacité tampon. Énumérez deux facteurs qui l'augmentent.
2. Écrivez les deux réactions qui expliquent comment un tampon répond à l'ajout de H^+ et à l'ajout de OH^- .
3. Tampon acétate, $pK_a = 4,76$. Quel est le pH lorsque le rapport acétate de sodium/acide acétique est 1 ? Et lorsqu'il est 2 ? Et lorsqu'il est 0,5 ?
4. Nommez les quatre principaux systèmes tampons sanguins et indiquez lequel est quantitativement le plus important dans le plasma.
5. Expliquez comment le tamponnement par l'hémoglobine est lié à l'effet Bohr.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L7. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES POUR L'ANALYSE DE LABORATOIRE. CENTRIFUGATION

Le sang - est un liquide spécialisé, composé d'un fluide jaune pâle, le plasma, et des éléments cellulaires: les érythrocytes (globules rouges), les leucocytes (globules blancs) et les thrombocytes (plaquettes).

Son rôle principal est le transport: le sang achemine l'oxygène et les nutriments vers les tissus et élimine le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques. Dans la circulation systémique, le sang artériel est rouge vif en raison de sa teneur élevée en oxygène, tandis que le sang veineux est rouge foncé après que l'oxygène a été délivré aux tissus.

Techniques de prélèvement

Prélèvement de sang veineux (ponction veineuse):

- Généralement réalisé à partir d'une veine du bras.
- La veine est rendue plus visible en appliquant un **garrot** et en demandant au patient de serrer et desserrer le poing.
- Le site de ponction est désinfecté à l'alcool et laissé sécher.
- Une aiguille stérile est insérée dans la veine, le biseau orienté vers le haut. La veine est stabilisée avec le pouce pour éviter qu'elle ne roule.
- Une fois que le sang commence à s'écouler, le garrot est relâché. Une fois le volume requis prélevé, l'aiguille est retirée et le site de ponction est recouvert de coton ou de compresse stérile.

Prélèvement de sang capillaire (micro-prélèvement):

- Utilisé lorsque seules de petites quantités sont nécessaires ou lorsque l'accès veineux est difficile.
- Obtenu en ponctionnant le doigt (généralement l'annulaire), le pouce (face latérale), le lobe de l'oreille, ou le talon chez les nourrissons de moins d'1 an.
- Les indications comprennent:
 - Veines très petites ou fragiles (enfants, patients âgés).
 - Tissu cicatriciel dû à des ponctions veineuses multiples.
 - Obésité sévère.
 - Tests au chevet du patient nécessitant un minimum de sang.

Considérations préanalytiques: Le sang est prélevé après une période de jeûne de 8 à 12 heures (sauf en cas d'urgence). La concentration de nombreux métabolites est influencée par la prise de nourriture ou de boisson.

Le sang coagule normalement en 20-30 minutes à température ambiante. Au cours de ce processus, la fibrine, une protéine insoluble, forme un réseau qui piège les érythrocytes et d'autres cellules, produisant un caillot.

- Pour la préparation du sérum, le tube de prélèvement est maintenu droit ou incliné à 30-45° jusqu'à ce que la coagulation soit complète et que le sérum se soit séparé.
- Si la séparation est incomplète, l'échantillon peut être centrifugé à environ $1500 \times g$, ce qui fait sédimenter le caillot et les érythrocytes, laissant un sérum clair.

Plasma et sérum

Le plasma: le composant liquide du sang non coagulé, obtenu en mélangeant du sang total avec un anticoagulant (par exemple, EDTA, héparine, citrate) avant centrifugation. À noter: pour séparer le plasma des cellules sanguines, une centrifugation est réalisée (généralement 10 minutes à 1000-1200 × g)

Le sérum: le composant liquide du sang coagulé, c'est-à-dire le plasma dépourvu de fibrinogène et des facteurs de coagulation consommés durant la coagulation.

Ainsi:

- Sang = Plasma + Cellules sanguines
- Sérum = Plasma – Fibrinogène

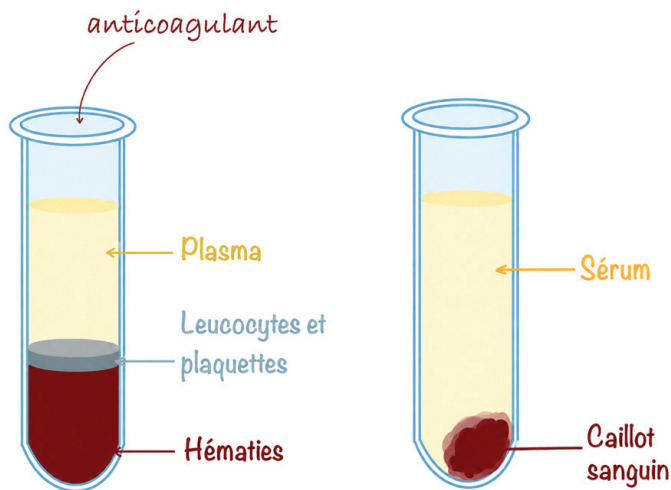


Figure 1. Sérum sanguin (droite) versus plasma sanguin (gauche)

Anticoagulants

Dans la pratique clinique et le diagnostic de laboratoire, les anticoagulants sont utilisés pour empêcher la coagulation du sang lorsque du sang total ou du plasma est nécessaire pour l'analyse. Le choix de l'anticoagulant dépend du test, car certains interfèrent avec les réactions biochimiques ou peuvent altérer la morphologie des cellules sanguines. Les anticoagulants suivants sont couramment utilisés pour les dosages de laboratoire.

Le Na_2EDTA - (éthylènediaminetétraacétate) empêche la coagulation du sang en liant les ions calcium (essentiels à la coagulation sanguine) et en formant un chélate stable. Anticoagulant préféré en hématologie (numération formule sanguine, formule leucocytaire) car il préserve le mieux la morphologie cellulaire sans produire d'artefacts.

À noter: non adapté aux études de coagulation, car il chélate le calcium de manière irréversible.

Le citrate de sodium lie le calcium de manière réversible. C'est l'anticoagulant de choix pour les études de coagulation (par exemple, temps de prothrombine, temps de céphaline activée). Le sang doit être mélangé au citrate dans un rapport 9:1 (sang:anticoagulant) pour garantir des résultats précis.

L'héparine de lithium ou de sodium empêche la coagulation du sang en renforçant l'activité de l'antithrombine III, qui inhibe la thrombine et d'autres facteurs de coagulation. Meilleur anticoagulant pour les études cytogénétiques et certains tests hématologiques spéciaux (par exemple, fragilité osmotique, hémoglobine plasmatique); également utilisé en analyse des gaz du sang.

À noter: l'héparine est un anticoagulant naturel; chimiquement, c'est un glycosaminoglycane sulfaté (polysaccharide).

Les oxalates - généralement l'oxalate de potassium ou l'oxalate de sodium, se lient au calcium, le précipitant sous forme d'oxalate de calcium insoluble, inhibant ainsi la coagulation. Autrefois utilisés dans certaines analyses chimiques et études de coagulation, mais aujourd'hui largement remplacés par le citrate ou l'EDTA, car les oxalates peuvent altérer la morphologie des cellules sanguines. Aujourd'hui, ils sont surtout utilisés avec le fluorure de sodium.

Le fluorure de sodium-oxalate de potassium est un mélange anticoagulant couramment utilisé pour la détermination de la glycémie. Le fluorure de sodium inhibe l'enzyme glycolytique émolase, empêchant ainsi les globules rouges et autres cellules sanguines de consommer le glucose après le prélèvement. L'oxalate de potassium agit comme anticoagulant en liant le calcium. Cette combinaison empêche à la fois la coagulation et la perte de glucose après le prélèvement.

À noter: en présence de fluorure de sodium, la concentration en glucose de l'échantillon reste stable jusqu'à 24 heures à température ambiante ($\approx 25^\circ\text{C}$) et jusqu'à 48 heures au réfrigérateur ($\approx 4^\circ\text{C}$).

La solution ACD - contient 4,7 g d'acide citrique, 16,0 g de $\text{Na}_3\text{citrate}$, et 25,0 g de dextrose (glucose) dans 1000 ml d'eau distillée. Le citrate lie les ions calcium de manière réversible dans le sang, ce qui signifie que la coagulation peut reprendre si du calcium est réintroduit. Le dextrose (glucose) sert de nutriment aux globules rouges, maintenant leur activité métabolique (principalement la glycolyse). Cela préserve la viabilité des globules rouges pendant le stockage. L'acide citrique aide à maintenir un environnement légèrement acide, réduisant l'activité métabolique et ralentissant la dégradation cellulaire.

Elle est utilisée pour le prélèvement de sang destiné aux tests d'histocompatibilité pour la transfusion et la transplantation (par exemple, tests de banque de sang et typage des antigènes leucocytaires humains (HLA)), ainsi que pour les tests d'ADN et de paternité.

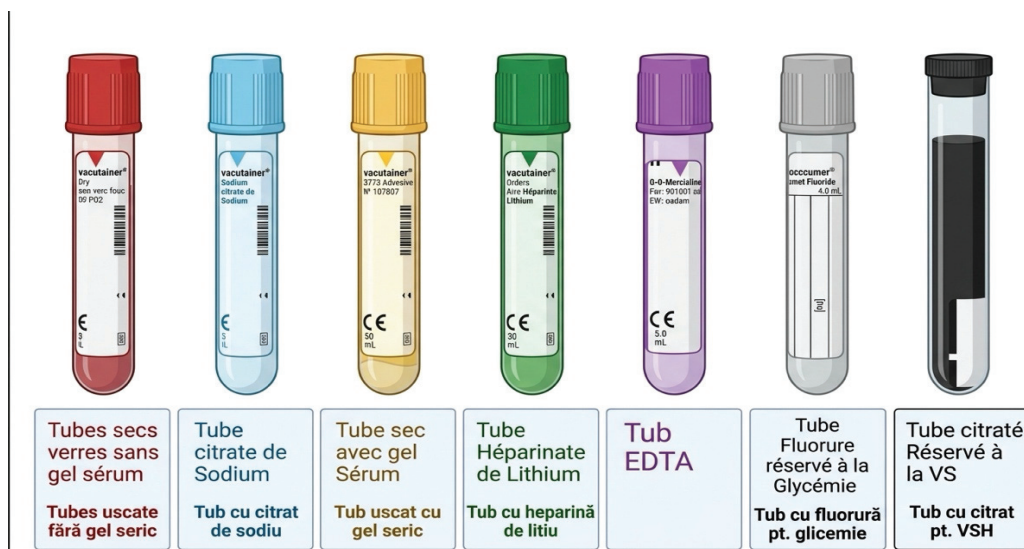


Figure 2. Tubes Vacutainer utilisés pour le prélèvement sanguin

Tableau 1. Ordre de prélèvement - tubes de prélèvement sanguin

Ordre de prélèvement	Couleur du bouchon du tube	Anticoagulant / Additif	Usages principaux
1	Flacons d'hémoculture (SPS jaune ou flacons)	SPS (Polyanétholesulfonate de sodium)	Microbiologie: hémocultures
2	Bleu clair	Citrate de sodium (lie le Ca^{2+} , réversible)	Études de coagulation: TP, TCA, dosages des facteurs de coagulation
3	Rouge (simple) ou Or/« Tiger Top » (SST)	Sans anticoagulant / Activateur de coagulation ± Gel séparateur	Sérum pour biochimie, immunologie, sérologie
4	Vert	Héparine de lithium ou de sodium (inhibe la thrombine)	Biochimie clinique, dosages plasmatiques, cytogénétique
5	Lavande/Violet	K_2/Na_2 EDTA (chélate le Ca^{2+})	Hématologie: NFS, frottis sanguins, HbA1c
6	Gris	Oxalate de potassium + fluorure de sodium (le fluorure inhibe la glycolyse, l'oxalate empêche la coagulation)	Dosage du glucose
Spécial	Jaune (solution ACD)	Acide-Citrate-Dextrose	Banque du sang (conservation du sang du donneur), typage HLA, études d'ADN
Spécial	Bleu foncé (bleu royal)	Additifs spéciaux (EDTA, héparine, ou aucun)	Oligoéléments, toxicologie, métaux lourds

TP = temps de prothrombine; TCA = temps de céphaline activée; NFS = numération formule sanguine; HbA1c = hémoglobine glyquée

Déprotéinisation du sang, du plasma ou du sérum

Dans certains dosages biochimiques, les protéines doivent être éliminées de l'échantillon car elles peuvent interférer avec les réactifs et fausser les résultats. La déprotéinisation est réalisée en précipitant les protéines sous forme de sels insolubles, suivie d'une filtration pour obtenir un filtrat exempt de protéines.

Types de filtrats exempts de protéines:

- Le filtrat neutre exempt de protéines, selon Folin-Wu: les protéines sont précipitées avec du tungstate de sodium et de l'acide sulfurique. Les filtrats neutres sont utilisés dans l'analyse de l'urée, de l'acide urique, de la créatinine, du glucose, des acides aminés, du chlorure.
- Le filtrat acide exempt de protéines est obtenu par précipitation des protéines avec l'acide trichloroacétique (TCA). Il est utilisé pour les dosages du phosphore, de l'insuline, du Na^+ .
- Le filtrat alcalin exempt de protéines est obtenu par précipitation des protéines avec du sulfate de zinc (ZnSO_4) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH).

Urine

À l'exception de l'urine obtenue par cathétérisme ou par aspiration sus-pubienne, la plupart des échantillons sont recueillis directement par le patient lors d'une miction normale. Une instruction correcte du patient est essentielle pour garantir un échantillon fiable. Les patients doivent être informés des techniques de prélèvement propres, de l'hygiène des mains et de la propreté générale afin d'éviter toute contamination.

Tous les échantillons d'urine doivent être correctement étiquetés avec l'identification du patient, ainsi que la date et l'heure du prélèvement, afin d'assurer une interprétation exacte des résultats.

Types d'échantillons d'urine

1. **Échantillon aléatoire** – Recueilli à tout moment du jour ou de la nuit; couramment utilisé pour l'analyse d'urine de routine.
2. **Échantillon du premier matin** – Recueilli immédiatement après le réveil; préféré pour de nombreux tests car il est plus concentré.
3. **Échantillon chronométré** – Recueilli sur une période définie (par exemple, 24 heures) ou à un moment précis après un événement (par exemple, 2 heures après le repas pour un test de glycémie postprandiale).
4. **Échantillon de mi-jet propre** – Nécessite une préparation minutieuse du patient afin de minimiser la contamination par la flore urétrale; souvent utilisé pour la culture microbiologique.

Récipients de prélèvement

- L'urine doit être recueillie dans des récipients chimiquement propres.
- Pour les cultures d'urine, le récipient doit être stérile.
- Si l'urine doit être testée pour des substances qui se dégradent à l'exposition à la lumière (par exemple, bilirubine, porphyrines), elle doit être recueillie dans un récipient foncé (ambré) ou un récipient enveloppé de papier aluminium.
- Si un conservateur est utilisé, l'étiquette du récipient doit clairement l'indiquer, ainsi qu'un avertissement « Attention » si le conservateur est dangereux (par exemple, acide chlorhydrique, formol).

Conservateurs

Idéalement, les échantillons d'urine doivent être examinés immédiatement après le prélèvement. Cependant, comme cela n'est pas toujours possible, des méthodes de conservation appropriées sont nécessaires pour éviter les modifications chimiques et la croissance bactérienne.

Pour les recueils d'urine de 24 heures, des conservateurs tels que le thymol (1-2 g), le toluène, le xylène ou le chloroforme (5-10 mL) peuvent être ajoutés. Le chloroforme ne doit pas être utilisé si l'urine doit être analysée pour le glucose ou les corps cétoniques, car il interfère avec ces tests.

Si l'urine doit être conservée plus d'une heure, elle doit être réfrigérée afin de ralentir l'activité bactérienne et la dégradation chimique. Avant l'analyse, l'échantillon doit être ramené à température ambiante et mélangé soigneusement pour assurer son homogénéité.

Méthode	Usage	Inconvénient
Réfrigération	Conservation de toutes les urines pendant 24 heures	Insatisfaisante pour des périodes plus longues
Congélation	Pour un stockage prolongé	Détruit les cellules
Formol	Bon pour préserver les cellules et les cylindres	Interfère avec l'urobilinogène et l'estérase leucocytaire sur les bandelettes réactives et la culture bactérienne
Chlorhexidine	Conservateur pour le glucose	Interfère avec le test des protéines sur bandelette réactive
Comprimés conservateurs	Analyse d'urine de routine et cellules	Interfère avec la densité, le sodium, le potassium et les études hormonales

Liquide céphalorachidien (LCR)

Le LCR est un produit de sécrétion des plexus choroïdes au niveau des ventricules cérébraux. L'exploration du LCR représente une aide réelle pour les cliniciens dans le diagnostic et le pronostic des maladies du système nerveux central (SNC).

Le prélèvement du LCR est réalisé par ponction lombaire, sous-occipitale ou ventriculaire, dans des récipients stériles et avec une aiguille de ponction spéciale.

Composition du LCR: protéines, glucides, urée, acide urique, acides organiques, bilirubine, phosphate, carbonate, sulfate, calcium, magnésium, sodium, potassium, chlorure.

L'examen du LCR comprend l'examen physique (couleur, transparence, densité), l'examen chimique (dosage des protéines, du glucose, du sodium, etc.), les examens cytologique, virologique, sérologique, etc.

Centrifugation

La centrifugation est une technique de laboratoire dans laquelle une suspension est soumise à une **force centrifuge** afin d'en séparer les composants. Cette méthode est couramment utilisée pour récupérer des précipités, séparer différentes phases (par exemple, le plasma des cellules sanguines) ou sédimerter des macromolécules. La séparation repose sur les différences de **taille, de forme et de densité** des particules.

Une centrifugeuse fonctionne en faisant tourner des tubes maintenus dans un rotor (tête) autour d'un axe fixe. Lorsque le rotor tourne, une force centrifuge est générée, dirigée vers l'extérieur à partir de l'axe de rotation. L'intensité de cette force augmente à la fois avec la vitesse de rotation et la distance de la particule par rapport au centre.

Les particules en suspension dans un liquide subissent cette force centrifuge, qui les pousse vers l'extérieur, provoquant leur sédimentation. Cependant, leur mouvement est contré par une force de frottement (traînée), qui dépend de la taille et de la forme de la particule ainsi que de la viscosité du milieu. À mesure que la particule sédimentant accélère, la force de frottement augmente jusqu'à ce qu'elle finisse par équilibrer la force centrifuge.

À ce stade, la particule atteint une vitesse de sédimentation constante. C'est cette vitesse de déplacement constante qui permet de séparer efficacement différentes particules au cours de la centrifugation.

Classification des centrifugeuses

Les centrifugeuses peuvent être classées selon leur vitesse de fonctionnement ou le type d'application pour lequel elles sont conçues.

Selon la vitesse:

- **Les centrifugeuses de table (cliniques)** sont des centrifugeuses à basse vitesse, offrant généralement des vitesses allant jusqu'à environ 3000 tours par minute (tr/min). Elles sont couramment utilisées dans les laboratoires cliniques pour des procédures de routine telles que la séparation du sérum ou du plasma à partir du sang total.
- **Les centrifugeuses à haute vitesse** offrent des vitesses allant jusqu'à environ 20 000 tr/min. Elles sont utiles pour séparer des particules plus petites telles que des organites ou de grandes macromolécules.
- **Les ultracentrifugeuses** offrent des vitesses allant jusqu'à environ 60 000 tr/min.

Les centrifugeuses à haute vitesse et les ultracentrifugeuses sont généralement réfrigérées afin de permettre la centrifugation d'échantillons biologiques sensibles à la température. De plus, les ultracentrifugeuses fonctionnent sous vide afin d'éliminer la chaleur qui serait sinon générée par le frottement entre le rotor tournant rapidement et l'air dans la chambre de la centrifugeuse.

Les centrifugeuses sont également classées selon le type d'application, en analytiques ou préparatives:

- **Une centrifugeuse analytique** est équipée de divers systèmes optiques permettant de prendre des photographies et d'effectuer des mesures réelles pendant la sédimentation.
- **Une centrifugeuse préparative** est utilisée principalement pour la purification et le fractionnement des macromolécules.

Types de rotors

Les centrifugeuses sont équipées de différents types de rotors, choisis selon leur usage prévu.

Les rotors basculants - les tubes d'échantillon sont maintenus dans des godets qui basculent en position horizontale pendant la centrifugation. **Avantages:** Les particules parcourent une distance plus longue avant de sédimenter, ce qui permet une meilleure séparation des composants, en particulier lors de la centrifugation en gradient de densité. L'orientation horizontale des tubes facilite le retrait du surnageant sans perturber le culot.

Dans les **rotors verticaux**, les tubes d'échantillon sont positionnés parallèlement à l'axe de rotation. Ils sont principalement utilisés dans les centrifugeuses à haute vitesse ou les ultracentrifugeuses et sont souvent équipés de systèmes optiques permettant un suivi en temps réel de la sédimentation.

Le rotor à angle fixe est le type le plus largement utilisé, en particulier en centrifugation préparative. Dans cette conception, les tubes sont maintenus à un angle constant (généralement entre 25-45°) par rapport à l'axe de rotation. **Avantages:** Les particules ne parcourent qu'une courte distance avant d'atteindre la paroi du tube, ce qui accélère la sédimentation. Cela se traduit par une durée de fonctionnement plus courte et une meilleure efficacité par rapport aux autres types de rotors.

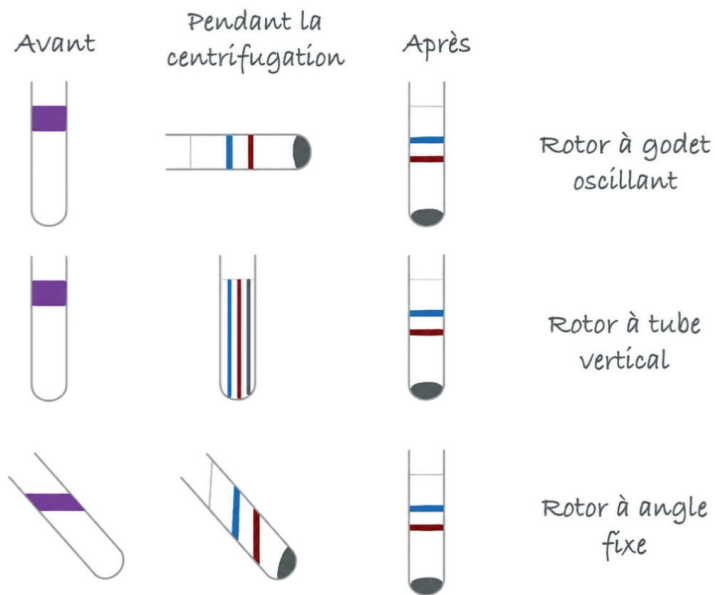


Figure 3. Types de rotors

Effet du rayon du rotor sur la force centrifuge

La force centrifuge dépend non seulement de la vitesse de rotation (tr/min) mais aussi de la distance par rapport à l'axe de rotation (rayon). Ainsi, deux rotors de diamètres différents, fonctionnant à la même vitesse (tr/min), généreront des forces centrifuges différentes.

Pour cette raison, les conditions de centrifugation ne sont pas exprimées en tr/min mais plutôt en *force centrifuge relative (RCF)*, exprimée en multiples de la gravité (g). L'utilisation de la RCF garantit une reproductibilité entre différents rotors et centrifugeuses.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Centrifugation du sang total pour séparer le plasma

Procédure: le sang prélevé dans un tube vacutainer contenant un anticoagulant sera centrifugé pendant 10 min à 2000 tr/min.

Le surnageant sera un liquide jaune transparent, appelé *plasma*.

Questions

1. Expliquez les différences entre le sérum et le plasma.
2. Indiquez l'ordre de prélèvement dans les différents tubes de collecte.
3. Nommez trois anticoagulants; indiquez la couleur du bouchon du tube dans lequel ils se trouvent.
4. Présentez les types d'échantillons d'urine.
5. Présentez les principaux types de rotors de centrifugeuse.
6. Quelle est la différence entre tr/min et RCF ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L8. PROTÉINES. SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE

La **chromatographie** est une technique de laboratoire permettant de séparer des mélanges complexes en leurs composants individuels en exploitant les différences d'affinité pour une phase stationnaire et une phase mobile.

En chromatographie, la *phase mobile* (un liquide ou un gaz) déplace le mélange à travers le système, tandis que la *phase stationnaire* (un solide ou un liquide) interagit avec les composants à des degrés variables. En raison de ces différences d'interaction, les composants se déplacent à des vitesses différentes et se séparent.

Le terme chromatographie vient des mots grecs chrôma (« couleur ») et gráphein (« écrire »). Le nom reflète l'utilisation originale de la technique, développée pour séparer des mélanges de pigments biologiques.

Composants essentiels d'un système de chromatographie

- **Phase stationnaire** – un solide (tel qu'un gel) ou un liquide immobilisé lié à une matrice de support.
- **Lit chromatographique** – le support qui contient la phase stationnaire; il peut être compacté dans une colonne en verre ou en métal, étalé en une fine couche sur une plaque (verre ou plastique), ou adsorbé sur du papier ou des fibres de cellulose.
- **Phase mobile** – un liquide ou un gaz qui agit comme solvant, transportant l'échantillon à travers la phase stationnaire et finissant par éluer du lit chromatographique.
- **Système d'alimentation** – assure un écoulement continu de la phase mobile à travers le lit chromatographique.
- **Système de détection** – utilisé pour surveiller et identifier les substances séparées.

Pendant la chromatographie, chaque substance du mélange interagit à des degrés divers avec la phase stationnaire. Les molécules qui interagissent fortement avec la phase stationnaire se déplacent plus lentement, tandis que celles ayant des interactions plus faibles se déplacent plus rapidement avec la phase mobile. Ces différences de temps de migration ou d'élution permettent une séparation efficace des composants du mélange.

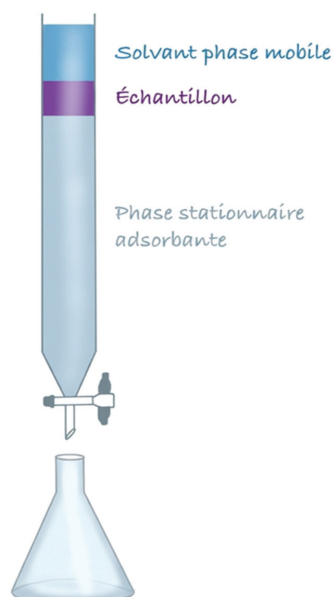


Figure 1. Système de chromatographie

Critères de classification

1. Classification selon l'état physique des deux phases (stationnaire et mobile) dans un système chromatographique

a) Phase stationnaire solide:

- phase mobile: gaz → chromatographie gaz-solide (CGS)
- phase mobile: liquide → chromatographie liquide-solide (CLS)

b) Phase stationnaire liquide:

- phase mobile: gaz → chromatographie gaz-liquide (CGL)
- phase mobile: liquide → chromatographie liquide-liquide (CLL)

2. Classification selon la nature des interactions entre les composants du mélange et les phases (mobile et/ou stationnaire)

La séparation des molécules en chromatographie repose sur leur distribution entre la phase stationnaire et la phase mobile. Cette distribution dépend d'un ou plusieurs des processus fondamentaux suivants: *l'adsorption*, *l'échange d'ions*, *le partage*, et *l'exclusion de taille* (filtration sur gel/tamassage moléculaire).

Ainsi, la chromatographie peut être classée en:

Chromatographie d'adsorption

En chromatographie d'adsorption, la phase stationnaire est un matériau solide, généralement compacté dans une colonne sous forme de très petites billes de diamètre et de porosité contrôlés. Les phases stationnaires courantes comprennent le gel de silice et l'alumine (Al_2O_3), qui possèdent de grandes surfaces et des sites actifs capables d'interagir avec les molécules de l'échantillon. La phase mobile peut être soit une solution aqueuse, soit un solvant organique (non aqueux).

Lorsque le mélange échantillon s'écoule à travers la colonne, les molécules subissent des cycles répétés d'**adsorption (liaison à la surface solide)** et de **désorption (libération dans la phase mobile)**. La vitesse globale de déplacement de chaque molécule dépend de la force de son interaction (adsorption) avec la phase stationnaire:

- Les molécules ayant une adsorption plus forte sont retenues plus longtemps et se déplacent plus lentement.
- Les molécules ayant une adsorption plus faible traversent plus rapidement la colonne.

Cette différence de vitesse de migration permet la séparation des composants du mélange. Par exemple, la chromatographie d'adsorption est souvent utilisée pour séparer les acides aminés, les alcaloïdes, les lipides et les pigments.

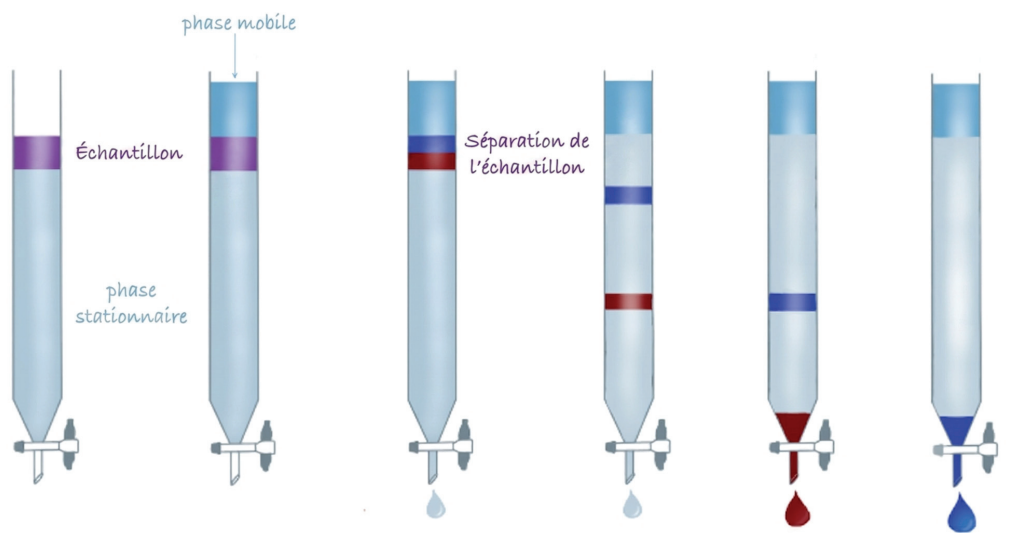


Figure 2. Chromatographie d'adsorption - Les composés à séparer interagissent avec la phase stationnaire. Chaque composé « se lie » (s'adsorbe) à la surface à des degrés divers et traverse donc la colonne à des vitesses différentes. Au bout d'un certain temps, ils se séparent complètement en sortant de la colonne.

Chromatographie d'échange d'ions

En chromatographie d'échange d'ions, les molécules sont séparées selon leur **charge électrique nette**. La phase stationnaire est constituée d'une résine échangeuse d'ions, un polymère réticulé contenant de multiples groupements fonctionnels chargés. La phase mobile est généralement une solution tampon aqueuse, et la méthode est le plus souvent réalisée sous forme de colonne.

La séparation se produit car les molécules interagissent électrostatiquement avec les groupements de charge opposée sur la résine. Lorsque le mélange échantillon traverse la colonne, les molécules chargées subissent des cycles répétés de liaison et de libération, ce qui ralentit leur déplacement à des degrés divers.

Pour une séparation efficace, l'échantillon est appliqué à un pH où les molécules ont une charge nette opposée à celle des groupements fonctionnels de la résine, garantissant qu'elles se lient à la colonne. L'élution peut ensuite être obtenue en : *modifiant le pH* du tampon, ce qui modifie la charge nette des molécules, de sorte qu'elles ne sont plus retenues, ou en *augmentant la force ionique* du tampon (par exemple, en ajoutant des sels), ce qui perturbe les interactions électrostatiques et libère les molécules liées.

Deux types de résines échangeuses d'ions sont couramment utilisés :

- **Les résines échangeuses de cations (échangeurs cationiques)**: résines chargées négativement qui lient les molécules chargées positivement (cations).
- **Les résines échangeuses d'anions (échangeurs anioniques)**: résines chargées positivement qui lient les molécules chargées négativement (anions).

Cette technique est largement utilisée en biochimie pour la purification des protéines, peptides, nucléotides et acides aminés, ainsi que dans les laboratoires cliniques pour la séparation des variants de l'hémoglobine (par exemple, l'HbA1c) et la purification de l'eau.

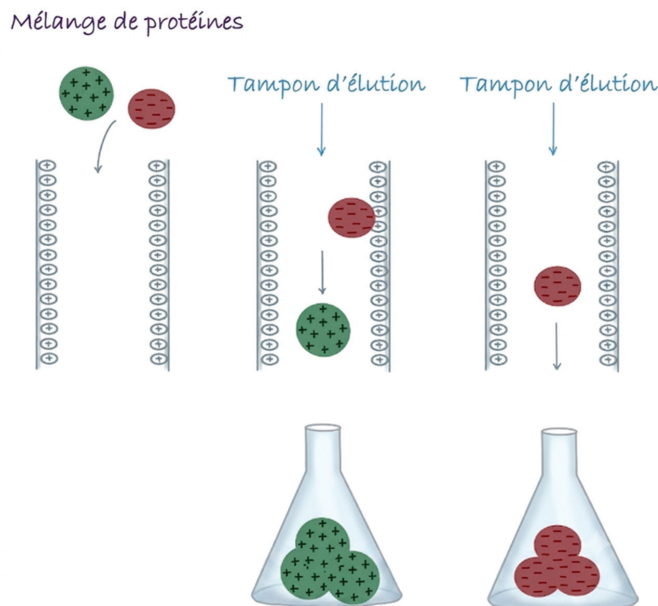


Figure 3. Chromatographie d'échange d'ions – La séparation se produit en raison des différences de charges électriques. Les molécules chargées négativement se lient à la résine échangeuse d'anions, tandis que les molécules chargées positivement sont séparées en premier. Après l'ajout du tampon d'élution, les molécules chargées négativement sont éluées en dernier.

Chromatographie de partage

La chromatographie de partage sépare les molécules selon leur **solubilité relative** dans deux phases non miscibles: une **phase** mobile et une phase liquide stationnaire. Une substance soluble dans les deux phases se distribue, ou se « partage », entre elles selon sa solubilité.

La phase liquide stationnaire est retenue par un support solide poreux, tel que du papier filtre, donnant lieu à la chromatographie sur papier. Dans cette méthode, la phase stationnaire est constituée d'une fine couche de molécules d'eau liées aux groupements hydroxyle de la cellulose du papier (une phase polaire). La phase mobile est généralement un solvant organique moins polaire qui se déplace le long du papier par capillarité.

Lorsque l'échantillon migre avec le front de solvant, les molécules se répartissent de manière répétée entre les deux phases. Les molécules non polaires, étant plus solubles dans la phase mobile, parcourent une plus grande distance sur le papier, tandis que les molécules polaires, qui interagissent plus fortement avec la phase stationnaire, migrent plus lentement.

Le déplacement des molécules en chromatographie de partage est exprimé par le **facteur de rétention (valeur R_f)**, calculé comme suit:

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

La valeur R_f est caractéristique de chaque composé dans des conditions définies et est généralement *proportionnelle à la solubilité de la molécule dans la phase mobile*.

Il existe également une chromatographie de partage en phase inverse, dans laquelle la phase stationnaire est non polaire (hydrophobe) et la phase mobile est relativement polaire.

La chromatographie de partage est utilisée pour la séparation des acides aminés, des pigments et d'autres petites biomolécules.

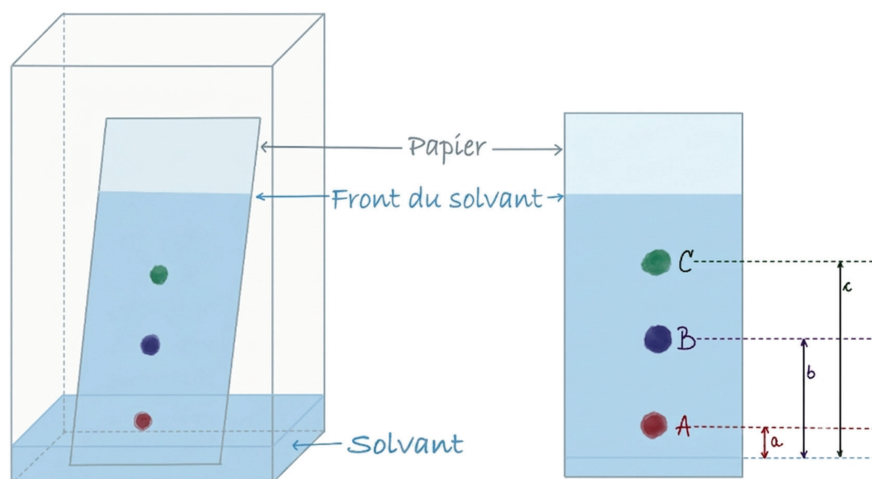


Figure 4. Chromatographie de partage – Les molécules sont séparées selon leurs différentes solubilités relatives. Les molécules plus solubles dans la phase mobile parcourent une plus grande distance (molécules C et B) et ont un R_f plus élevé. Les molécules plus solubles dans la phase stationnaire migrent plus lentement (molécule A) et ont un R_f plus faible.

Chromatographie de filtration sur gel

En chromatographie de filtration sur gel, également appelée **chromatographie d'exclusion de taille ou de perméation sur gel**, la séparation des molécules repose principalement sur leur **taille et forme**. La phase stationnaire est constituée de particules de gel sphériques faites de polymères réticulés à porosité contrôlée, compactées dans une colonne. La phase mobile est un liquide qui s'écoule à travers la colonne et transporte l'échantillon.

Lorsque le mélange échantillon traverse la colonne, les molécules interagissent différemment avec les pores des particules de gel:

- Les petites molécules peuvent diffuser dans les pores des billes de gel. Comme elles entrent et sortent à plusieurs reprises de ces pores, leur passage à travers la colonne est retardé, et elles éluent plus tard.
- Les grosses molécules sont exclues des pores et se déplacent plus rapidement à travers les espaces entre les billes, éluant plus tôt.
- Les molécules de taille intermédiaire pénètrent les pores à des degrés variables, selon leur taille et leur forme, et éluent entre les deux extrêmes.

Ainsi, les molécules sont séparées par taille, les plus grosses éluant en premier et les plus petites en dernier. Le volume d'élution (le volume de phase mobile nécessaire pour éluier une molécule) augmente à mesure que la taille moléculaire diminue.

Bien que le poids moléculaire et la taille soient les principaux facteurs déterminant la séparation en filtration sur gel, des facteurs secondaires tels que les interactions de charge ou l'adsorption à la surface du gel peuvent influencer les résultats dans certaines conditions.

La chromatographie de filtration sur gel est largement utilisée pour: la purification des protéines, peptides et acides nucléiques; le dessalage et l'échange de tampon; l'estimation du poids moléculaire des biomolécules



Figure 5. Chromatographie de filtration sur gel – Les molécules sont séparées en raison de leurs différentes tailles. Les grosses molécules n'entrent pas dans les pores du gel et sont éluées en premier (molécules vertes), tandis que les petites molécules sont éluées plus tard car elles sont retenues dans les pores du gel (molécules rouges).

Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est le type de chromatographie le plus sélectif, reposant sur les **interactions de liaison spécifiques** entre une molécule cible (souvent une protéine) et un ligand. Un ligand est défini comme une molécule, un ion ou un groupement qui se lie, généralement de manière non covalente, à une autre molécule ou à un atome.

Dans cette technique, le ligand est fixé de manière covalente à un support ou une matrice solide (comme des billes d'agarose). Le mélange échantillon est passé à travers la colonne, et seules les molécules ayant une affinité spécifique pour le ligand s'y lient, tandis que tous les autres composants sont éliminés par lavage.

Les ligands utilisés peuvent varier selon la molécule à purifier:

- Un substrat, produit ou cofacteur qui se lie naturellement à une enzyme
- Un anticorps qui reconnaît et lie spécifiquement son antigène
- D'autres biomolécules conçues pour capturer sélectivement la cible

Après élimination des molécules non liées par lavage, la protéine (ou molécule) cible peut être éluée en modifiant les conditions de la phase mobile, telles que le pH, la force ionique, ou par l'ajout d'un ligand compétitif.

Cette haute sélectivité fait de la chromatographie d'affinité un outil puissant pour la purification des enzymes, anticorps, récepteurs et acides nucléiques.

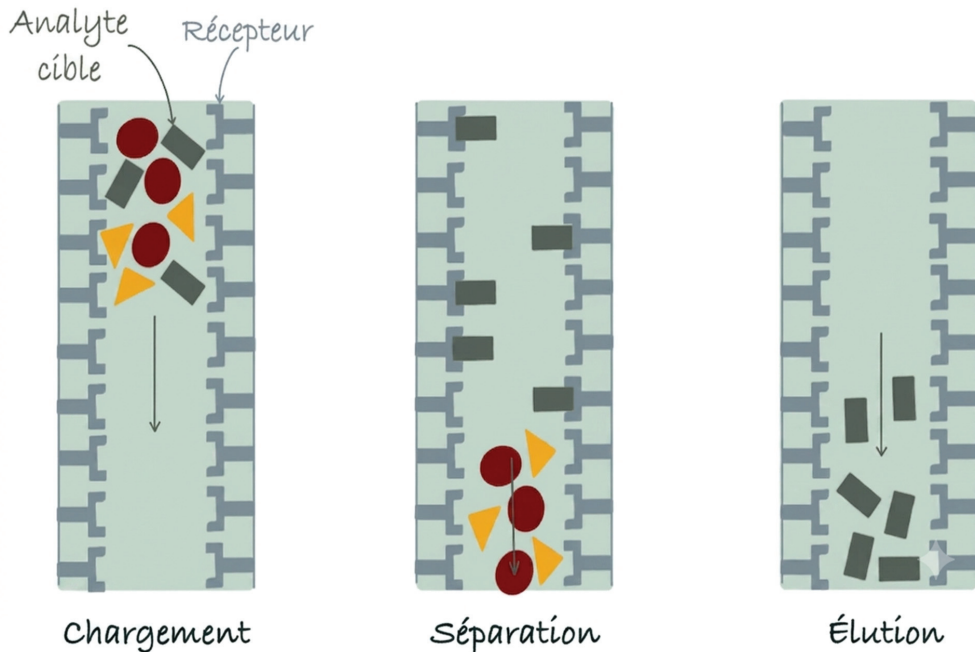


Figure 6. Chromatographie d'affinité – Les molécules sont séparées en raison de leurs interactions de liaison spécifiques. La molécule cible (verte) se lie spécifiquement à son antigène/récepteur, tandis que les autres molécules sont séparées. La dernière fraction d'élution contiendra uniquement la molécule cible.

3. Types de chromatographie selon la forme du lit chromatographique

Chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie sur papier

Dans cette méthode, l'échantillon est appliqué sous forme d'une seule petite tache près d'une extrémité de la feuille de chromatographie, à l'aide d'une microseringue ou d'un microcapillaire. Une fois la tache complètement séchée, la feuille est placée dans une cuve en verre contenant une fine couche de solvant, en veillant à ce que la tache se trouve au-dessus du niveau de solvant. Le solvant monte le long de la feuille par capillarité, entraînant les composants de l'échantillon avec lui. La feuille est retirée une fois que le front de solvant a parcouru environ 80-90 % de sa longueur. Le déplacement de chaque substance peut être quantifié en calculant sa mobilité frontale relative (valeur R_f), comme décrit en chromatographie de partage.

Chromatographie sur colonne

En chromatographie sur colonne, une colonne en verre ou en acier est remplie de la phase stationnaire appropriée, et la phase mobile est passée à travers la colonne, soit par gravité, soit à l'aide d'une pompe à basse pression. L'échantillon est appliqué en haut de la colonne sous forme d'une bande étroite, après quoi la phase mobile l'entraîne à travers la phase stationnaire.

Si les substances du mélange migrent à des vitesses différentes, elles se sépareront à l'intérieur de la colonne et élueront à des moments différents. La migration de chaque substance peut être exprimée par son temps de rétention (t), ou alternativement, par son volume d'élution (V_e) - le volume de phase mobile nécessaire pour éluer le composé de la colonne.

Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

À l'origine, la chromatographie sur colonne utilisait de grandes phases stationnaires « molles » qui ne pouvaient pas résister à une pression élevée. Pour éviter de comprimer la phase stationnaire, la phase mobile devait s'écouler sous basse pression. Par conséquent, les séparations étaient lentes et souvent de faible résolution - ces méthodes étaient considérées comme « basse performance ».

Le développement de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a considérablement amélioré la résolution chromatographique. En HPLC, la phase stationnaire est constituée de très petites billes de taille uniforme, étroitement compactées dans la colonne. De ce fait, une pression élevée (jusqu'à environ 10 MPa, soit des centaines de livres par pouce carré) est nécessaire pour faire passer la phase mobile et le mélange échantillon à travers la colonne. Les colonnes HPLC sont généralement en acier inoxydable, et tous les composants doivent être conçus pour résister à ces pressions.

Les avantages de la HPLC comprennent une grande rapidité, sensibilité et polyvalence, en faisant la méthode de choix pour séparer de nombreuses petites molécules biologiquement importantes. Le plus souvent, les séparations sont réalisées à l'aide de chromatographie de partage en phase inverse, où une phase stationnaire non polaire et une phase mobile polaire sont utilisées.

Pour la séparation de macromolécules telles que les protéines et les acides nucléiques, des systèmes biocompatibles spéciaux sont préférés. Ces systèmes utilisent des matériaux tels que le titane, le verre ou les fluoroplastiques au lieu de l'acier inoxydable afin d'éviter la dénaturation induite par les métaux. Ils fonctionnent également à des pressions plus faibles.

Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) moderne utilise couramment des colonnes capillaires d'un diamètre interne de 0,1-0,5 mm et de longueurs allant jusqu'à 50 m. La phase stationnaire est généralement un polymère de silicone réticulé, appliqué en un film mince sur la paroi interne du capillaire. Aux températures de fonctionnement normales, ce revêtement se comporte comme un film liquide mais est bien plus stable et résistant à la dégradation.

La phase mobile (également appelée gaz vecteur) est généralement de l'azote ou de l'hélium. La séparation des composés se produit car les molécules individuelles se répartissent différemment entre la phase gazeuse vectrice et la phase stationnaire de polymère de silicone.

L'efficacité de la séparation en CPG est fortement influencée par la température de la colonne. Celle-ci peut être maintenue constante pendant toute l'analyse (fonctionnement isotherme, généralement entre 50-250 °C) ou, plus couramment, augmentée progressivement selon une rampe de température programmée (par exemple, de 50 °C à 250 °C à un taux fixe par minute). Cela permet une séparation efficace de composés présentant une large gamme de volatilités.

Les échantillons sont introduits par un port d'injection, situé en tête de colonne, scellé par un septum étanche aux gaz.

La sortie de la colonne est surveillée à l'aide de détecteurs sensibles, couramment:

- Détecteur à ionisation de flamme (FID) – largement utilisé pour les composés organiques.
- Détecteur à capture d'électrons (ECD) – très sensible pour les composés halogénés.
- Détecteur à conductivité thermique (TCD) – utile pour une détection générale, y compris les gaz.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Séparation des acides aminés par chromatographie sur papier

Principe

La chromatographie sur papier est un type de chromatographie de partage, largement utilisée entre 1940 et 1960. Aujourd'hui, elle a été pratiquement entièrement remplacée par la *chromatographie sur couche mince*, qui utilise un support solide étalé en une fine couche sur une feuille de plastique ou de verre.

L'échantillon (solution d'acides aminés) est déposé en un point de départ sur la feuille de papier, en très petite quantité (1-10 μl). Le papier est séché puis élué avec un système de solvant (généralement en remontant le papier grâce à sa porosité, ou capillarité). Les acides aminés se sépareront en raison de leurs propriétés hydrophobes ou hydrophiles différentes. Les substances sont mises en évidence par des réactifs colorés spéciaux (ou lumière UV).

Réactifs

1. Solution d'acides aminés: solution à 0,3 % de phénylalanine et d'histidine.
2. Éluant: un mélange de n-butanol, acétone, acide acétique et eau dans un rapport volumique de: 3,5:3,5:1,0:2,0.
3. Solution de ninhydrine: - utilisée pour mettre en évidence les acides aminés ayant migré
4. Papier Whatman.

Matériel et appareillage

1. cuve chromatographique
2. vaporisateur, sèche-cheveux, plaque chauffante
3. éprouvette, pipettes, micropipette

Procédure

1. Introduisez 10 ml d'éluant dans la cuve chromatographique. Fixez le couvercle. Agitez lentement et horizontalement la cuve, afin de créer une atmosphère saturée en vapeurs d'éluant.
2. Tracez une ligne, au **crayon**, sur le papier chromatographique, à 1,5 cm de la base. Placez une goutte de la solution d'acides aminés (environ 5 μl) au milieu de la ligne, à l'aide de la micropipette. Séchez immédiatement le papier avec le sèche-cheveux.
3. Suspendez le papier séché dans la cuve chromatographique de manière à ce qu'il soit immergé dans l'éluant sur environ 5 mm.
4. Maintenez le papier dans la cuve chromatographique couverte jusqu'à ce que l'éluant arrive à environ 2 cm du haut du papier. Retirez ensuite le papier et marquez le front d'éluant au crayon. Séchez à nouveau le papier avec le sèche-cheveux.
5. Vaporisez le papier avec la solution de ninhydrine entre les deux marques, puis séchez-le sur la plaque chauffante jusqu'à l'apparition d'une couleur bleu-violet.

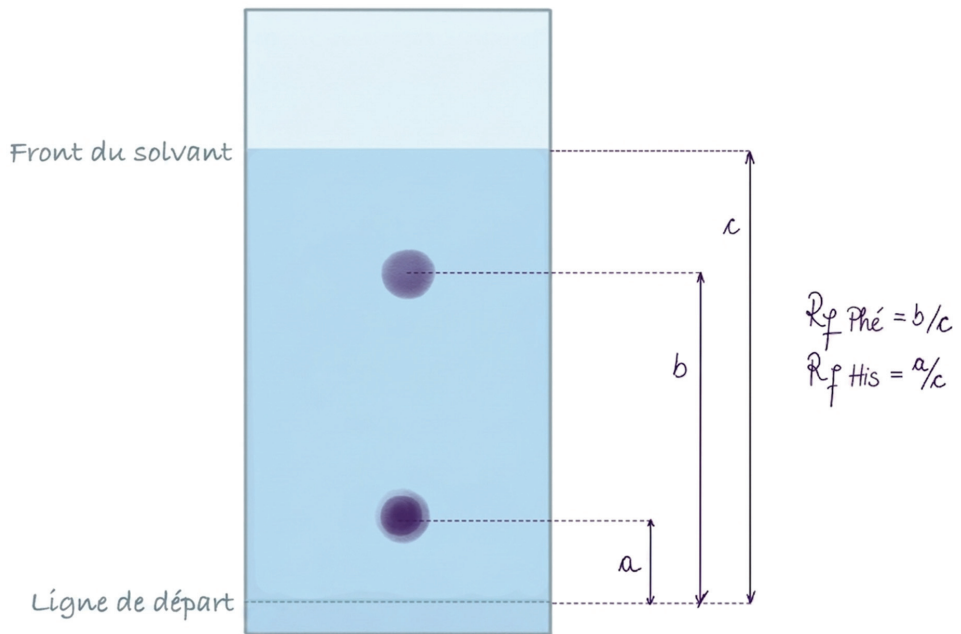


Figure 7. Vue d'ensemble expérimentale - Séparation des acides aminés par chromatographie sur papier

Calcul

Les valeurs R_f pour les deux acides aminés seront calculées.

Selon leur hydrophobicité relative, l'ordre de migration du plus rapide au plus lent est: la phénylalanine (plus hydrophobe, se déplace davantage) suivie de l'histidine (moins hydrophobe, se déplace sur une distance plus courte).

Questions

1. Expliquez ce qu'est la chromatographie et quels sont les composants essentiels d'un système de chromatographie ?
2. Comment peut-on classer la chromatographie selon la nature des interactions entre les composants du mélange et les phases (mobile et/ou stationnaire) ? Décrivez brièvement chaque type.
3. Présentez brièvement l'expérience réalisée au laboratoire.
4. On considère un mélange constitué des protéines suivantes:
 - A - avec un poids moléculaire de 20 000 Da et une charge positive
 - B - avec un poids moléculaire de 100 000 Da et une charge positive
 - C - avec un poids moléculaire de 100 000 Da et une charge négativeQuelles méthodes chromatographiques peuvent être utilisées pour leur séparation, et comment l'élution des protéines est-elle réalisée ? Expliquez.
5. Un mélange d'acide glutamique, de tryptophane et de phénylalanine est séparé par chromatographie sur couche mince. La phase stationnaire est hydrophobe, et la phase mobile est hydrophile.
Lequel des acides aminés a la valeur R_f la plus élevée ? Expliquez.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L9. PROTÉINES. DIALYSE. ÉLECTROPHORÈSE

Les protéines sont des macromolécules biologiques fondamentales qui jouent des rôles essentiels dans pratiquement tous les processus cellulaires. Ce sont des polymères d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques et repliés en structures tridimensionnelles complexes qui déterminent leurs fonctions spécifiques. Les protéines servent d'enzymes, de composants structurels, d'hormones, de transporteurs et d'anticorps, ce qui les rend essentielles au maintien de la vie. Leurs propriétés chimiques et physiques sont déterminées par la nature des acides aminés qu'elles contiennent et la façon dont ces acides aminés sont disposés dans l'espace.

Propriétés des protéines

1. **Poids moléculaire** - Les protéines sont des macromolécules de poids moléculaire élevé, allant généralement d'environ 5×10^3 à 1×10^6 daltons (Da). Il est intéressant de noter que les poids moléculaires de nombreuses protéines se regroupent autour de valeurs proches de multiples de 35 000 ou 70 000 Da, reflétant des schémas évolutifs dans la structure des protéines.
2. **Nature colloïdale** - En raison de leur grande taille, les protéines présentent un comportement colloïdal. Leurs vitesses de diffusion en solution sont lentes, et elles diffusent significativement la lumière, produisant une turbidité visible - un phénomène connu sous le nom d'effet Tyndall.
3. **Dénaturation** - désigne la perte de la structure native d'une protéine et de son activité biologique, souvent due à la chaleur, à des changements de pH ou à des agents chimiques. La dénaturation peut s'accompagner d'une coagulation, au cours de laquelle les molécules protéiques dépliées s'agrègent et précipitent hors de la solution.
4. **Nature amphotère** - Les protéines, comme les acides aminés, sont amphotères, ce qui signifie qu'elles peuvent agir comme des acides ou des bases selon le pH du milieu. Elles portent une charge nette qui détermine leur migration dans un champ électrique: vers l'anode si la charge nette est négative, ou vers la cathode si elle est positive. À un pH spécifique, appelé point isoélectrique (pI), les protéines possèdent un nombre égal de charges positives et négatives, rendant la charge nette nulle. À ce point, les protéines ne migrent pas dans un champ électrique et présentent une solubilité minimale, entraînant souvent une précipitation. Ce principe est largement utilisé pour la purification des protéines.
5. **Capacité de liaison aux ions** - Les protéines peuvent former des sels avec des cations et des anions, selon leur charge nette à un pH donné. Cette propriété est importante dans de nombreuses interactions biologiques et techniques de laboratoire.
6. **Solubilité** - La solubilité des protéines est fortement influencée par le pH. La solubilité est minimale au point isoélectrique, car les molécules ne portent aucune charge nette et s'agrègent facilement. La solubilité augmente en conditions acides ou alcalines car les protéines acquièrent des charges nettes (positives en milieu acide, négatives en milieu alcalin), entraînant une répulsion entre les molécules et une meilleure solubilité.
7. **Activité optique** - La plupart des protéines sont optiquement actives, car elles contiennent des acides aminés chiraux (à l'exception de la glycine). En solution, les protéines font généralement tourner le plan de la lumière polarisée, habituellement vers la gauche (lévrotatoire). Cette propriété peut être mesurée et utilisée pour l'analyse de concentration et de pureté.

DIALYSE

L'**osmose** est le processus par lequel un solvant (généralement l'eau) se déplace à travers une membrane semi-perméable séparant deux solutions de concentrations en soluté différentes. Le solvant s'écoule de la région de plus faible concentration en soluté (solution plus diluée) vers la région de plus forte concentration en soluté (solution plus concentrée), dans le but d'égaliser les concentrations osmotiques de part et d'autre de la membrane.

La **pression osmotique** est la pression exercée par les particules d'une solution sur la paroi d'une membrane semi-perméable, afin d'égaliser les concentrations osmolaires de part et d'autre de la membrane.

La **dialyse** est une technique de séparation qui repose sur les différentes vitesses de diffusion des composants d'un mélange à travers une membrane semi-perméable.

Les **membranes semi-perméables** sont des structures qui séparent deux (ou plusieurs) compartiments. Simplement, une membrane peut être imaginée comme une surface agissant comme une barrière à l'interface entre deux liquides. Cependant, en raison de sa perméabilité, la membrane agit également comme un pont entre les phases qu'elle sépare, et constitue le siège de processus de transport complexes.

Les phénomènes de transport à travers une membrane dépendent de:

- la perméabilité de la membrane,
- la capacité de diffusion des substances,
- d'autres forces physiques (gradient électrochimique, gradient de pression osmotique, gradient de pression hydrostatique),
- la température.

À noter ! La vitesse de dialyse augmente avec la température, mais des températures plus élevées peuvent entraîner une dénaturation des protéines.

Les **membranes de dialyse** sont généralement fabriquées à partir de substances hautement polymérisées qui, en présence de solvants, gonflent et forment des tamis moléculaires. Les pores de ces tamis permettent le passage des solvants et des petites molécules, mais empêchent le passage des grosses molécules (par exemple, les protéines). Pour être utile, la membrane doit être chimiquement inerte, afin qu'aucune liaison des composants de l'échantillon ne se produise. Les membranes de dialyse modernes sont souvent préparées à partir de cellophane (cellulose) traitée.

Procédure de dialyse

Lorsqu'elle est appliquée à des volumes de 1 à 100 millilitres, la dialyse est généralement réalisée comme suit:

1. La solution échantillon (dialysat) est placée dans un petit sac fait de membrane semi-perméable.
2. Ce sac est suspendu dans un volume beaucoup plus grand de solvant, dans un récipient maintenu à la température souhaitée.
3. Les substances diffusibles passent du sac vers le solvant, augmentant leur concentration dans la solution environnante.
4. Une agitation continue est nécessaire pour disperser les molécules diffusantes, réduisant ainsi leur concentration locale autour de l'extérieur de la membrane.

Limites de la dialyse

- Temps relativement long nécessaire pour atteindre l'équilibre entre les compartiments.
- Inefficace pour séparer les macromolécules, telles que les protéines liées à des groupes prosthétiques ou à de grands ligands.

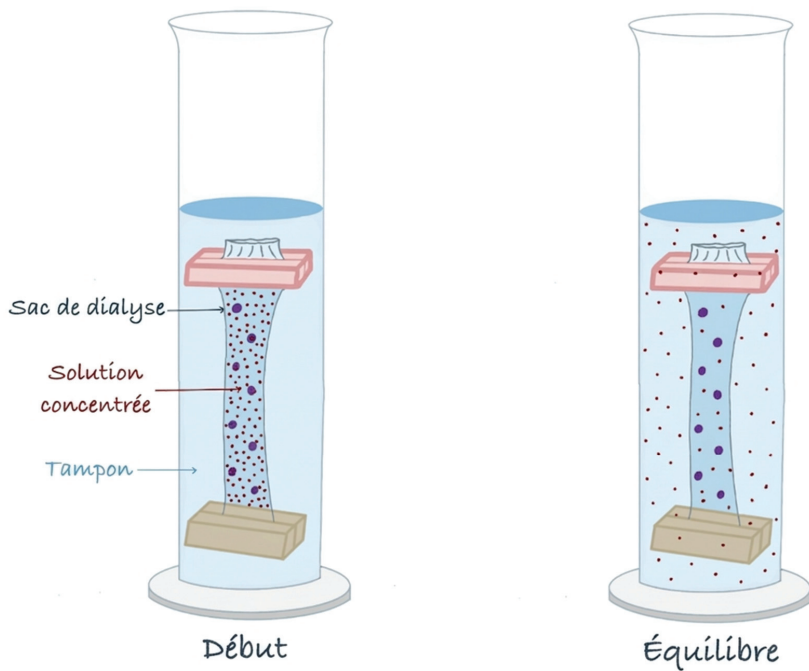


Figure 1. Dialyse

Applications de la dialyse

La dialyse est une méthode simple et largement utilisée dans l'étude des protéines. Elle peut être utilisée pour:

- **démontrer la nature macromoléculaire des protéines** - La dialyse d'une solution protéique (par exemple, l'albumine) contre de l'eau pure montre que la protéine ne traverse pas la membrane, tandis que les sels et autres petits solutés le font. Cela démontre que les protéines sont de grandes macromolécules.
- **déterminer et comparer les propriétés de diffusion des protéines** - Deux protéines de tailles différentes (par exemple, la myoglobine et l'hémoglobine) peuvent être placées dans des sacs de dialyse et surveillées dans le temps. La protéine la plus petite diffuse plus rapidement, permettant de comparer leurs coefficients de diffusion relatifs.
- **séparer les macromolécules les unes des autres** - Séparation de l'ADN et des protéines dans un extrait brut. Une membrane de dialyse avec un seuil de coupure approprié peut retenir les grosses molécules d'ADN tout en laissant passer les protéines ou peptides plus petits.
- **éliminer les contaminants de faible poids moléculaire des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides, etc.** - Après purification d'une protéine par précipitation au sulfate d'ammonium, la dialyse est utilisée pour éliminer l'excès d'ions sulfate d'ammonium, ne laissant que la solution protéique pure. De même, les acides nucléiques peuvent être dialysés pour éliminer les sels, l'urée ou l'éthanol après extraction.

Applications cliniques de la dialyse

Une application médicale majeure de la dialyse est le dispositif extracorporel, le « **rein artificiel** », qui purifie le sang en éliminant les composés de faible poids moléculaire normalement excrétés dans l'urine.

L'hémodialyse est une procédure médicale qui utilise un rein artificiel, ou **dialyseur**, pour purifier le sang des patients atteints d'insuffisance rénale. Le dialyseur est un cylindre en plastique transparent, d'environ 20 cm de long et 5 cm de large, contenant des milliers de fibres creuses en membrane semi-perméable synthétique. Ces fibres forment le compartiment sanguin, à travers lequel circule le sang du patient. Autour des fibres se trouve le compartiment du dialysat, rempli de solution de dialyse. Pendant le traitement, le sang est pompé depuis l'accès vasculaire du patient vers une extrémité du dialyseur et distribué à travers les fibres, tandis que la solution de dialyse entre par un autre orifice et s'écoule en sens inverse autour des fibres. Ce flux à contre-courant maximise la diffusion et l'ultrafiltration: les déchets et l'excès de liquide traversent la membrane vers le dialysat, tandis que les composants essentiels restent dans le sang. Au cours d'une séance typique de quatre heures, l'ensemble du volume sanguin circule plusieurs fois à travers le dialyseur, réduisant efficacement l'urée, la créatinine, et corrigeant les déséquilibres électrolytiques.

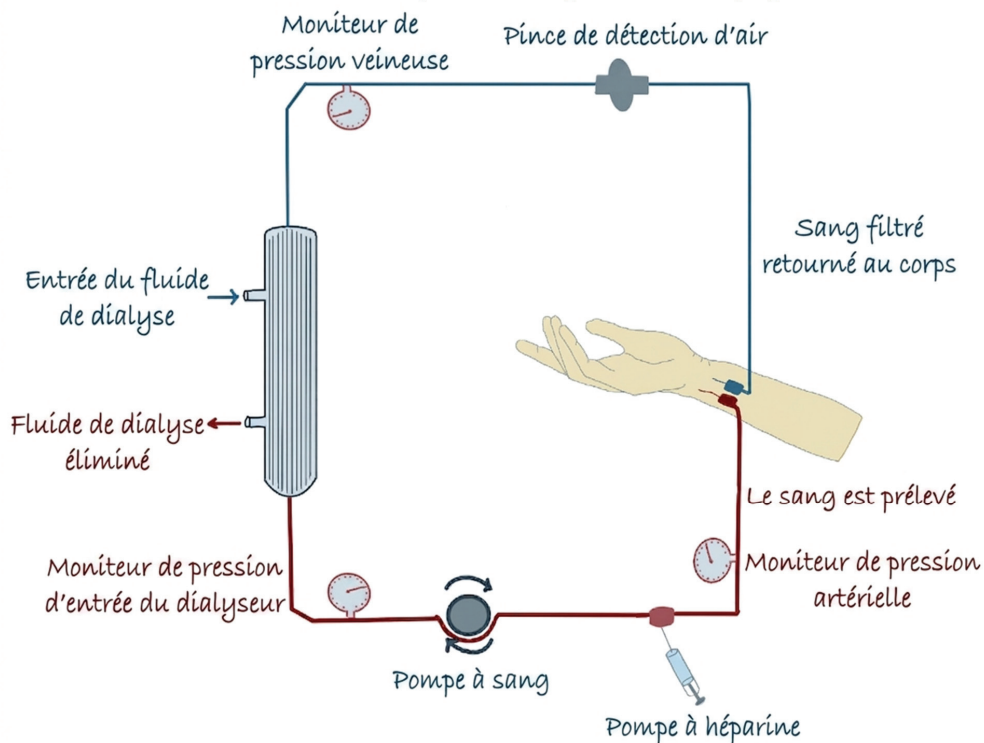


Figure 2. Représentation schématique de l'hémodialyse

La dialyse péritonéale (DP) est une forme de thérapie de suppléance rénale utilisée chez les patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Le traitement consiste à introduire une solution de dialyse stérile (dialysat) dans la cavité péritonéale du patient à l'aide d'un cathéter. La membrane péritonéale agit comme un filtre semi-perméable naturel, permettant aux déchets et à l'excès de liquides de passer du sang vers le dialysat. Le liquide est ensuite drainé et remplacé par une solution fraîche. Il existe deux techniques principales:

1. **La dialyse péritonéale ambulatoire continue (DPAC)** - dans laquelle le patient infuse lui-même le liquide de dialysat.
2. **La dialyse péritonéale automatisée (DPA)** - une machine effectue les échanges automatiquement, généralement la nuit pendant que le patient dort.

Les deux méthodes peuvent être réalisées à domicile ou au travail, à condition de maintenir une hygiène stricte, offrant aux patients une plus grande indépendance par rapport à l'hémodialyse.

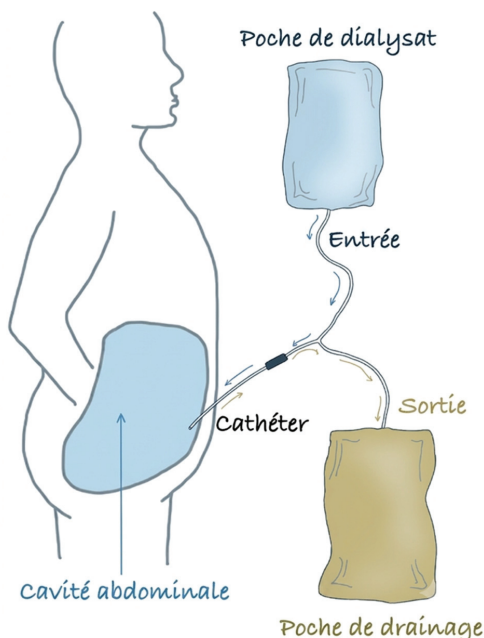


Figure 3. Représentation schématique de la dialyse péritonéale

ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est le processus par lequel des particules chargées électriquement migrent à travers un milieu liquide sous l'influence d'un champ électrique (courant continu). La particule se déplace à vitesse constante, ce qui signifie que la force électrique ($E \cdot q$) doit équilibrer la force de frottement ($f \cdot v$).

$$E \times q = f \times v$$

Où:

E = champ électrique (volts/cm)

q = charge nette de la particule (unités électrostatiques)

f = coefficient de frottement (dépend de la taille et de la forme de la particule)

v = vitesse de la particule (cm/sec)

Le champ électrique **E** peut être exprimé soit par la tension, soit par l'intensité du courant; c'est pourquoi, en électrophorèse, soit la tension, soit le courant est maintenu constant.

La vitesse de la particule v est définie comme:

$$v = \frac{E \times q}{f}$$

Si E est constant, la vitesse dépend du rapport entre la charge de la particule et sa taille/masse. Entre deux particules de même forme, celle ayant la charge nette la plus élevée (q) migrera plus rapidement. Entre deux particules de même masse et de même charge nette, la plus symétrique (plus proche d'une forme sphérique, avec un rapport axial proche de 1,0) migrera plus rapidement que la plus asymétrique (allongée), car cette dernière a un coefficient de frottement plus élevé.

La **mobilité électrophorétique** (μ) est définie comme la distance d parcourue par une particule sous l'influence du gradient de potentiel électrique E pendant l'intervalle de temps t :

$$\mu = \frac{d}{t \times E} \quad \text{or} \quad \mu = \frac{v}{E}$$

Cette relation n'est que partiellement exacte, car elle est influencée par plusieurs facteurs, notamment les effets de la chaleur excessive générée par l'augmentation de l'intensité du courant.

La **vitesse de migration électrophorétique** dépend:

- de la charge électrique de la molécule,
- de la taille et de la forme de la molécule,
- de l'intensité du champ électrique appliqué,
- de la nature du support solide,
- de la température de travail.

La mobilité électrophorétique peut également être exprimée comme suit:

$$\mu = \frac{k \times q}{r \times \eta}$$

Où:

μ = mobilité électrophorétique, cm/(volt·seconde)

q = charge moléculaire

k = constante

r = rayon ionique de la particule migrante

η = viscosité de la solution

Ainsi, la mobilité électrophorétique est directement proportionnelle à la charge de la protéine migrante et inversement proportionnelle à sa taille et à la viscosité du milieu (le tampon utilisé en électrophorèse).

Types d'électrophorèse

Selon la nature du milieu, il existe deux principaux types d'électrophorèse:

A. Électrophorèse en solution – dans cette méthode, la migration des particules se produit dans une solution liquide. Ce système, développé par Tiselius, a une faible résolution et nécessite de grandes quantités de matériel, il n'est donc plus utilisé à des fins analytiques, mais seulement pour les mesures de mobilité électrophorétique.

B. Électrophorèse de zone – dans cette méthode, la solution aqueuse contenant des particules chargées électriquement est appliquée sur un support ou une matrice solide. L'électrophorèse de zone produit des **électrophérogrammes**, où les particules chargées, généralement des protéines, sont clairement séparées les unes des autres sous forme de bandes distinctes. C'est la technique d'électrophorèse la plus largement utilisée en biochimie, en particulier pour l'analyse des protéines du sérum, de l'urine, du liquide céphalorachidien, ainsi que des protéines des globules rouges et des tissus.

Selon le type de support solide, plusieurs variantes existent:

- **Électrophorèse sur papier** - de moins en moins utilisée en raison de sa faible résolution et du long temps nécessaire à la séparation. De plus, la séparation électrophorétique est affectée par des effets chromatographiques causés par l'adsorption des molécules sur les groupements hydroxyle de la cellulose, ce qui ralentit la migration et réduit la qualité de la séparation.
- **Électrophorèse sur acétate de cellulose** - une méthode améliorée par rapport à l'électrophorèse sur papier, car la plupart des groupements hydroxyle de la cellulose sont acétylés, réduisant l'adsorption des molécules sur le support. Cela permet une migration plus rapide et une meilleure résolution. Les avantages supplémentaires comprennent:
 - nécessite des volumes d'échantillon plus petits,
 - support transparent, permettant la quantification directe des bandes par spectrophotométrie,
 - solubilité dans divers solvants, permettant une isolation facile et rapide des bandes séparées.
- **Électrophorèse sur gel** - la forme la plus courante d'électrophorèse, utilisant des gels comme support. Les gels sont chimiquement inertes, ont des structures uniformes et sont faciles à préparer de manière reproductible. Les plus largement utilisés sont les **gels de polyacrylamide**, qui peuvent être modifiés avec précision pour optimiser la séparation. Les gels de polyacrylamide sont formés par polymérisation de l'acrylamide (monomère) et du N,N'-méthylène-bis-acrylamide (agent réticulant) en présence de générateurs de radicaux libres (le persulfate d'ammonium comme initiateur et la tétraméthyléthylènediamine (TEMED) comme catalyseur). Les concentrations d'acrylamide et d'agent réticulant déterminent les propriétés du gel telles que la densité, l'élasticité, la taille des pores et la résistance mécanique.
- Une variante très courante, utilisée principalement pour les protéines, est la **SDS-PAGE** (électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium). Dans cette méthode, la séparation se fait principalement par taille. Le SDS dénature les protéines, tandis que des agents réducteurs comme le β -mercaptoéthanol brisent les liaisons disulfures, transformant les molécules en « bâtonnets » linéaires. Le SDS forme également des micelles chargées négativement avec les protéines, éliminant leurs charges intrinsèques. Ces complexes migrent vers l'électrode positive, les pores du gel de polyacrylamide agissant comme un tamis moléculaire: les petites molécules migrent plus vite que les grandes. **Les gels d'agarose** peuvent également être utilisés, et se rencontrent principalement dans la séparation des acides nucléiques.

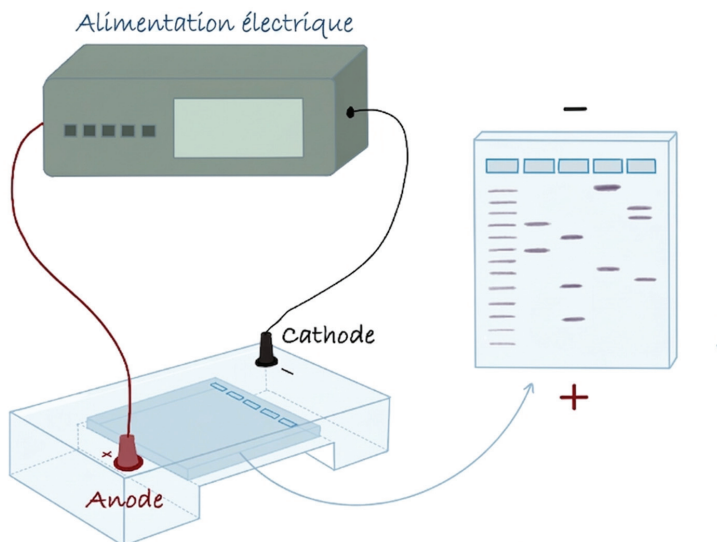


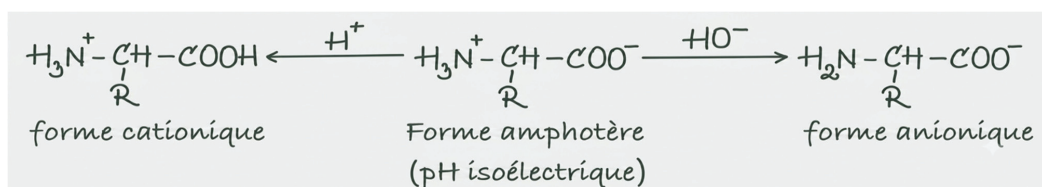
Figure 4. Électrophorèse sur gel

C. Focalisation isoélectrique (IEF) - électrophorèse dans un gradient de pH. Cette méthode est utilisée pour séparer des espèces moléculaires qui ne diffèrent que par leur charge nette. Les protéines migrent à travers le gradient tant qu'elles portent une charge, s'arrêtant au point où le pH est égal à leur point isoélectrique (**pI**). À ce point, la charge nette est nulle, la migration cesse, et les protéines forment des bandes fines distinctes. Le gradient de pH est créé à l'aide de composés amphotères de faible poids moléculaire (ampholytes).

D. Électrophorèse capillaire - ici, la migration des particules se produit dans des tubes capillaires très étroits (diamètre 0,05-0,3 mm) remplis soit d'une solution liquide, soit d'un support solide. Comme la surchauffe est évitée, des tensions très élevées (jusqu'à 10 kV) peuvent être appliquées, augmentant significativement la vitesse de migration.

Électrophorèse des protéines sériques

La migration des protéines, dans un champ électrique, est due à leur nature amphotère, qui permet une charge électrique dépendante du pH de la solution:



L'électrophorèse des protéines est largement utilisée en médecine pour évaluer les protéines sanguines. Le test est généralement réalisé sur le sérum plutôt que sur le plasma, car le plasma contient des facteurs de coagulation, tels que le fibrinogène, qui peuvent interférer avec la séparation et l'analyse des protéines. Le sérum, étant le plasma dépourvu de fibrinogène, offre un profil plus clair pour l'analyse électrophorétique. Cette méthode, connue sous le nom d'électrophorèse des protéines sériques (EPS), sépare les protéines selon leur taille, leur forme et leur charge électrique, permettant aux cliniciens de détecter des fractions protéiques anormales ou manquantes.

Un courant électrique est appliqué à un échantillon de sérum placé sur un support (tel qu'un gel ou de l'acétate de cellulose). Les protéines migrent à des vitesses différentes selon leur charge nette et leur taille moléculaire, formant des bandes distinctes. Les deux principaux groupes de protéines présents dans le sérum sont l'**albumine** et les **globulines**. L'albumine, la protéine sérique la plus abondante, produit le pic le plus important sur le profil électrophorétique et migre le plus près de l'électrode positive. Les globulines, qui représentent une plus petite fraction des protéines sériques totales, sont l'objet principal de l'interprétation de l'EPS. Elles sont divisées en quatre catégories: alpha-1, alpha-2, bêta et gamma, la fraction gamma migrant le plus près de l'électrode négative.

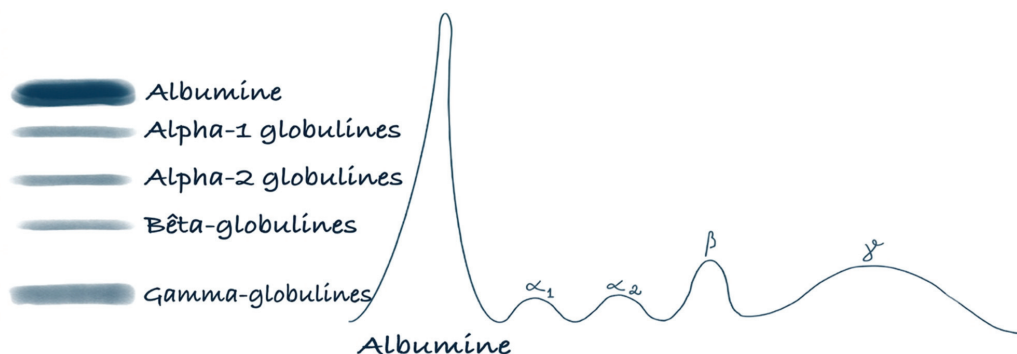
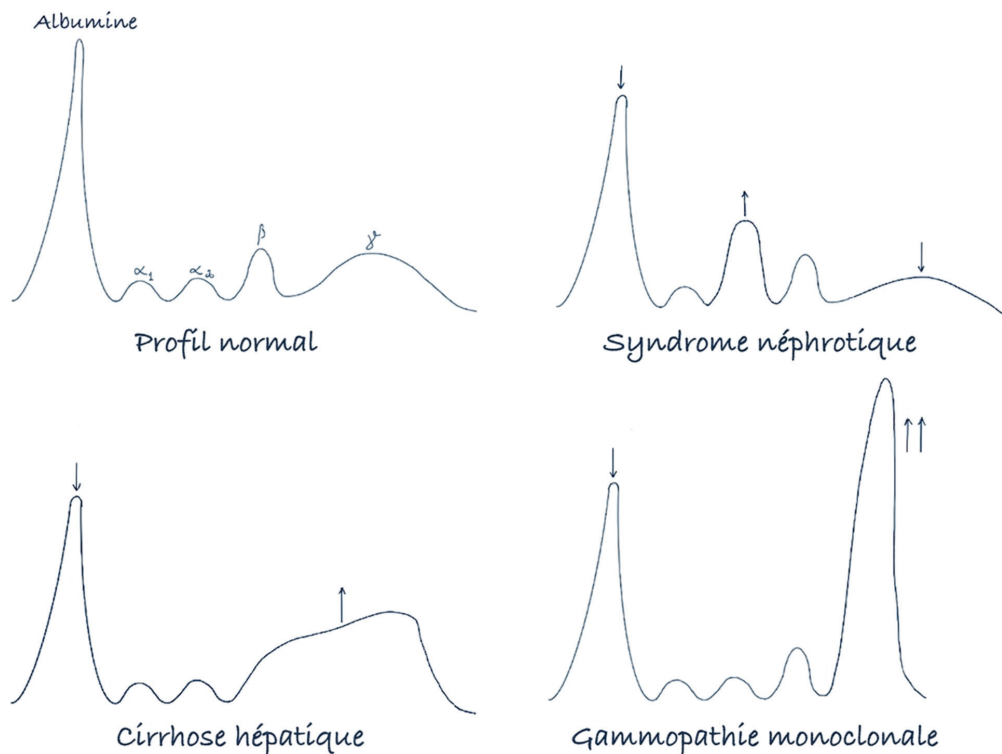


Figure 5. Électrophorèse des protéines sériques - profil normal

Tableau 1. Valeurs absolues et relatives des protéines sériques

Fraction protéique	Valeurs normales (%)	Valeurs absolues (pour un niveau de protéines totales de 7-9 g/dL)
Albumine sérique	50 - 60	4,5 - 5,5
Globuline sérique α_1	3,4 - 5,5	0,3 - 0,8
Globuline sérique α_2	6,0 - 12,0	0,48
Globuline sérique β	9,0 - 15,0	0,55 - 1,11
Globuline sérique γ	15,0 - 21	0,64 - 1,28

Exemples d'électrophorèse des protéines sériques:



Applications cliniques

- Myélome multiple: l'EPS est un outil diagnostique clé pour détecter les protéines monoclonales.
- Autres anomalies protéiques: elle aide à identifier des affections telles que l'hypogammaglobulinémie (faibles niveaux d'anticorps).
- Maladies chroniques: des profils anormaux peuvent indiquer une inflammation, des troubles hépatiques ou un dysfonctionnement rénal, etc.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dialyse d'une solution de protéine et de sulfate d'ammonium

Principe

Un sac de dialyse (MWCO = 1000; MW = poids moléculaire; CO = seuil de coupure) ne laisse passer que les molécules inférieures à 1000 Da à travers ses pores.

Un mélange de protéine (albumine) et de sulfate d'ammonium est placé dans le sac de dialyse. Lorsque le sac est immergé dans un grand volume d'eau distillée (le solvant), la membrane semi-perméable permet l'échange de substances entre les deux phases (le mélange dialysé à l'intérieur du sac et le solvant externe). Seuls les composants de poids moléculaire inférieur à 1000 Da - à savoir les ions sulfate (SO_4^{2-} , MW = 96) et les ions ammonium (NH_4^+ , MW = 18) - diffusent hors du sac vers l'eau environnante. Pendant ce temps, l'eau diffuse dans le sac. L'albumine (MW $\approx$ 47 000 Da) reste à l'intérieur du sac de dialyse.

Ce processus est décrit comme une dialyse de la protéine contre l'eau. La présence d'ions NH_4^+ est détectée avec le réactif de Nessler, les ions SO_4^{2-} avec le chlorure de baryum, et les protéines avec le bleu brillant de Coomassie (CBB).

Réactifs

1. **Solution de protéine (1 %) avec sulfate d'ammonium:** Dissoudre 1 g de protéine dans 100 ml d'eau distillée, puis ajouter progressivement 10 g de sulfate d'ammonium.
2. **Réactif de Coomassie:** Dissoudre 60 mg de bleu brillant de Coomassie G250 dans 1 L d'acide perchlorique à 3 %; filtrer pour éliminer le colorant non dissous.
3. **Réactif de Nessler:** Dissoudre 50 g de KI dans un petit volume d'eau. Ajouter une solution saturée de HgCl_2 jusqu'à formation d'un précipité. Ajouter ensuite 200 ml de NaOH 5 N et diluer à 1000 ml. Laisser décanter la solution et recueillir le surnageant clair.
4. **Solution de chlorure de baryum:** 5 % (BaCl_2).

Matériel

1. Membrane de dialyse semi-perméable (MWCO = 1000)
2. Bécher de Berzelius de 400 ml, tubes à essai, pipettes
3. Pincettes pour la fermeture et le support
4. Baguette de verre et barreau magnétique
5. Agitateur magnétique

Procédure

1. Remplissez les sacs de dialyse avec la solution albumine + sulfate d'ammonium, scellez les extrémités, et conservez-les immergés dans la solution protéine-sulfate d'ammonium au réfrigérateur jusqu'à utilisation.
2. Retirez un sac de dialyse du réfrigérateur et rincez son extérieur à l'eau distillée.
3. Placez 600 ml d'eau distillée dans un bécher de Berzelius de 400 ml. Insérez le sac de dialyse (il flotte) ainsi qu'un barreau magnétique. Placez le bécher sur un agitateur magnétique et commencez à agiter à vitesse moyenne (réglage 3-4).
4. Dans trois tubes à essai séparés, placez 1 ml d'eau distillée et testez pour: les ions NH_4^+ (réactif de Nessler), les ions SO_4^{2-} (BaCl_2), et la protéine (CBB).
5. Dans trois tubes à essai séparés, placez 1 ml du mélange de dialyse initial et testez pour: les ions NH_4^+ , les ions SO_4^{2-} , et la protéine, en utilisant les mêmes réactifs.
6. À intervalles d'une heure, prélevez des échantillons à l'intérieur du sac de dialyse et testez pour NH_4^+ , SO_4^{2-} , et la protéine.
7. Aux mêmes intervalles, prélevez des échantillons de l'eau externe (1 ml chacun) et testez pour NH_4^+ , SO_4^{2-} , et la protéine.

Réactions d'identification

- **Ions ammonium (NH_4^+):** Ajoutez 1-2 gouttes de réactif de Nessler à la solution testée. Un précipité jaune-orangé indique la présence de NH_4^+ .
- **Ions sulfate (SO_4^{2-}):** Ajoutez 2-3 gouttes de solution de BaCl_2 . Un précipité blanc indique la présence de SO_4^{2-} .
- **Protéines:** Ajoutez 1 ml de bleu brillant de Coomassie (CBB). Une couleur bleue se développe, s'intensifiant avec le temps.

Résultats

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant, en indiquant la présence (« + ») ou l'absence (« - ») des composants testés:

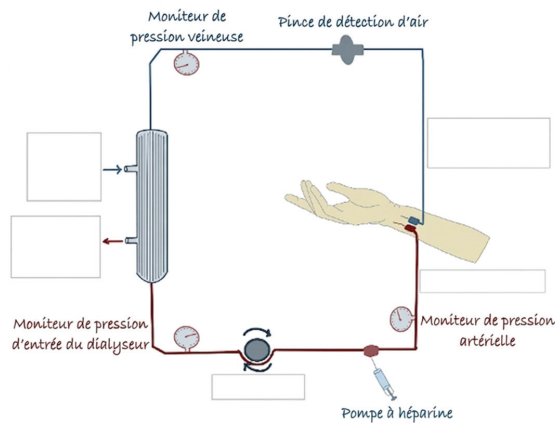
Composant testé	Avant dialyse		Après 1 h		Après 2 h	
	Externe (P ₀)	Interne (P ₀)	Externe (P ₁)	Interne (P ₁)	Externe (P ₂)	Interne (P ₂)
Protéine						
Ions sulfate (SO_4^{2-})						
Ions ammonium (NH_4^+)						

Observations

- Les protéines ne sont présentes qu'à l'intérieur du sac de dialyse, et absentes dans l'eau externe
- Les concentrations de sulfate (SO_4^{2-}) et d'ammonium (NH_4^+) à l'intérieur du sac diminuent à mesure que ces ions diffusent vers l'eau environnante, démontrant la dialyse à travers la membrane semi-perméable.
- Les concentrations de sulfate et d'ammonium dans l'eau externe augmentent avec le temps.

Questions

1. Expliquez le principe de la dialyse.
2. Complétez la représentation schématique suivante d'une procédure d'hémodialyse.



3. Expliquez brièvement l'expérience réalisée au laboratoire.
4. Qu'est-ce que l'électrophorèse ? Décrivez brièvement les facteurs qui influencent la vitesse de migration électrophorétique.
5. Décrivez l'utilité médicale de l'électrophorèse.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L10. MÉTHODES D'ANALYSE OPTIQUE. DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD

Méthodes optiques

Les méthodes optiques reposent sur les propriétés optiques du système étudié, qui se révèlent lors de l'excitation et de l'interaction avec l'énergie rayonnante à travers le spectre électromagnétique.

Caractéristique principale: dans la plupart des cas, les signaux d'entrée et de sortie sont tous deux de nature optique. Ces méthodes sont définies par le type d'interaction entre le système et l'énergie incidente, et le mode d'observation des phénomènes optiques résultants. Ces deux caractéristiques dépendent de la nature du signal d'entrée.

La différenciation entre les méthodes optiques se fait également selon le domaine spectral dans lequel les mesures sont effectuées. À cet égard, il existe: la spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet (UV), le visible (VIS), l'infrarouge (IR) ou la spectroscopie X (absorption ou émission), etc.

Les méthodes d'analyse optique sont utilisées pour la détermination des concentrations (routine clinique), l'élucidation des mécanismes de réaction, les études cinétiques, et l'investigation des aspects structuraux en recherche biochimique.

Méthodes spectroscopiques

Les mesures de l'absorbance de la lumière par les substances en solution sont largement utilisées en biochimie car de nombreux composés d'intérêt absorbent la lumière dans le domaine ultraviolet, visible ou proche infrarouge. La **spectrophotométrie** est la mesure et l'étude quantitatives des spectres électromagnétiques (incluant la lumière visible, l'UV et le proche infrarouge - par absorption de la matière).

Les méthodes spectroscopiques reposent sur la mesure et l'interprétation des spectres d'absorption et d'émission. L'absorbance de la lumière est caractérisée par deux paramètres, la longueur d'onde d'absorption maximale et l'ampleur de l'absorption (coefficient d'extinction).

Le rayonnement électromagnétique est décrit par la longueur d'onde (λ), la fréquence (ν), l'énergie (E).

Les relations sont:

- $\lambda \times \nu = c$, où c est la vitesse de la lumière dans le vide (3×10^{10} cm/s).
- $E = h \times \nu$, où h est la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-27}$ erg.s).

L'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde et directement proportionnelle à la fréquence.

Les positions spectrales d'absorption ou d'émission peuvent être exprimées en termes de longueur d'onde, de fréquence, d'énergie.

Unités de longueur d'onde:

- centimètre (cm),
- millimicron ($1 \text{ m}\mu = 10^{-7}$ m),
- nanomètre ($1 \text{ nm} = 10^{-7}$ cm),
- angström ($1 \text{ \AA} = 10^{-8}$ cm),
- micromètre ($1 \mu\text{m} = 10^{-4}$ cm).

Le rayonnement monochromatique est un rayonnement composé d'une seule longueur d'onde. En pratique, il désigne une bande de longueur d'onde très étroite isolée d'un spectre continu (par exemple, $600 \pm 0,15 \text{ nm}$).

Le spectre visible est la région spectrale relativement étroite perçue comme de la lumière par l'œil humain, s'étendant d'environ 400 nm (violet) à environ 760 nm (rouge).

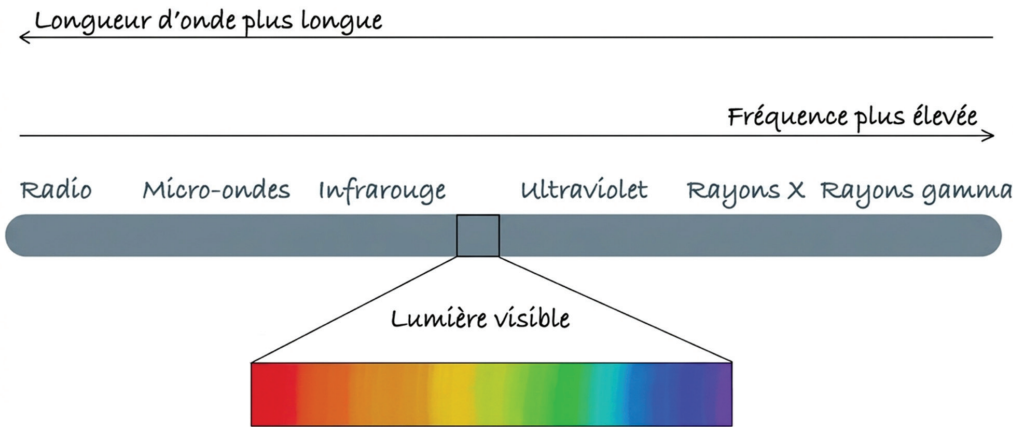


Figure 1. Rayonnement électromagnétique

Tableau 1. Domaine visible avec caractéristiques de longueur d'onde pour quelques couleurs

Couleur	Longueur d'onde de pic (nm)
Bleu	470
Cyan	525
Vert	560
Jaune	585
Orange	600
Rouge	645
Rouge profond	700

Lois d'absorption du rayonnement

L'absorbance (A) - également appelée densité optique ou extinction (E). Elle représente une mesure de la capacité d'une substance à absorber la lumière d'une longueur d'onde spécifiée. Elle peut être calculée à l'aide de la formule ci-dessous:

$$A = \log \frac{I_0}{I_t}$$

Où:

I_0 = intensité de la lumière incidente

I_t = intensité de la lumière transmise

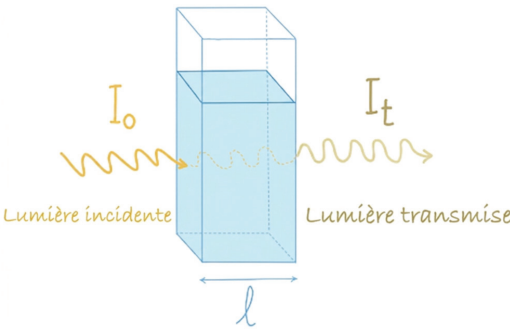


Figure 2. Absorbance de la lumière à travers d'une solution

Loi de Bouguer-Lambert:

Elle décrit comment l'intensité d'un faisceau lumineux diminue exponentiellement lorsqu'il traverse un milieu homogène, la perte d'intensité étant proportionnelle à la longueur du trajet et à l'intensité elle-même. Ainsi, à mesure que l'épaisseur d'un milieu absorbant augmente, l'intensité du rayonnement transmis diminue.

- Le coefficient d'extinction caractérise le pouvoir absorbant du milieu, indépendamment de la longueur du trajet (l) et de l'intensité incidente (I_0).
- Il dépend de la nature du milieu et de la longueur d'onde du rayonnement incident.
- La loi n'est valable que pour un rayonnement monochromatique.

Loi combinée de Bouguer-Lambert-Beer:

La loi de Bouguer-Lambert a été étendue plus tard par Beer pour inclure la concentration de la substance absorbante, formant la loi de Beer-Lambert. La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution) - équations 1 et 2.

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-aCl} \quad \text{or} \quad A = a \cdot l \cdot c \quad (1)$$

Où:

a = absorptivité,

c = concentration de la substance absorbante,

l = longueur du trajet optique.

Lorsqu'exprimée en termes molaires: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (2)

Où: ϵ = absorptivité molaire (coefficient d'extinction molaire), avec les unités $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

À noter:- et ϵ dépendent de la longueur d'onde.

- le coefficient d'extinction molaire est une constante caractéristique d'une substance absorbante et peut être considéré comme analogue, par sa signification, à la masse moléculaire.

Comme mentionné, le **coefficient d'extinction** est un paramètre clé de l'absorption; il peut être défini comme l'*absorbance d'une solution de concentration unitaire mesurée avec un trajet optique unitaire*.

Les unités de mesure du coefficient d'extinction peuvent être nombreuses, mais elles doivent toujours être liées aux unités de concentration et de longueur du trajet optique, de sorte que $\epsilon l c$ soit une grandeur sans dimension. Ceci doit être le cas car l'absorbance, une fonction logarithmique du rapport des intensités lumineuses, n'a pas d'unité de mesure.

Écarts par rapport à la loi de Beer-Lambert

La loi de Bouguer-Lambert-Beer est valable à toute longueur d'onde et dans tout milieu homogène, à condition que la diminution de l'intensité du rayonnement soit causée uniquement par l'absorption, que le milieu soit un gaz, un liquide, un solide ou une solution. En pratique, la plupart des mesures d'absorption analytiques sont effectuées avec des solutions. Ces solutions se comportent de manière idéale et obéissent à la loi tant que leurs propriétés optiques, exprimées par l'absorptivité (a) ou l'absorptivité molaire (ϵ), restent indépendantes de la concentration. La plage dans laquelle la loi est valable doit être déterminée expérimentalement, généralement en traçant l'absorbance (A) en fonction de la concentration (c) et en vérifiant l'existence d'une relation linéaire.

La loi peut être mise en défaut avec:

- des solutions concentrées,
- des solutions très diluées (faiblement absorbantes),
- des trajets optiques très courts (l)

Des écarts se produisent lorsque cette relation est non linéaire. Les causes comprennent:

- Facteurs expérimentaux: température, pression, effets du solvant.
- Facteurs instrumentaux: dispersion du rayonnement, stabilité de la source, performance du détecteur, précision du sélecteur de longueur d'onde, contrôle de la fente, stabilité optique/électronique.
- Facteurs chimiques: déplacements de l'équilibre chimique (par exemple, changements de pH, complexation, réactions concurrentes), et effets de concentration.
- Rayonnement non monochromatique.

Les écarts peuvent être positifs (+) ou négatifs (-).

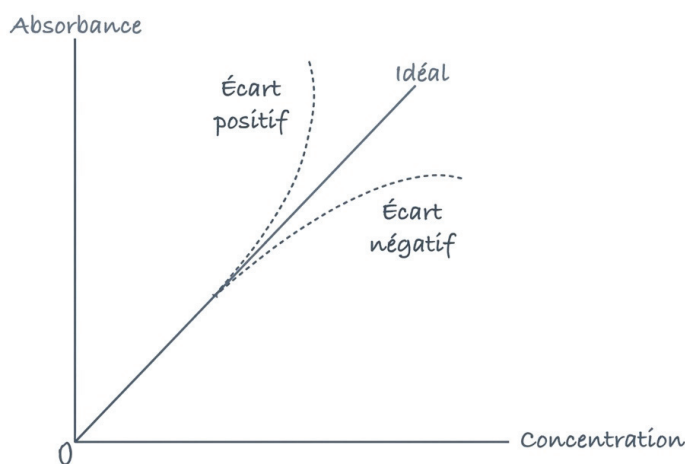


Figure 3. Écarts par rapport à la loi de Lambert-Beer

Bien que les mesures d'absorption puissent être effectuées sur l'ensemble du spectre électromagnétique, les déterminations quantitatives sont principalement réalisées en spectrométrie UV, visible (VIS) et infrarouge (IR), où la loi de Beer-Lambert est largement appliquée.

Appareillage

Les mesures de l'absorbance de la lumière sont effectuées à l'aide d'un **photomètre**, un instrument de mesure directe des intensités lumineuses. Il en existe deux types de base, un photomètre à filtre et un spectrophotomètre. Le premier utilise des filtres pour isoler des bandes passantes relativement larges, et le second utilise un monochromateur, composé de prismes ou de réseaux de diffraction, pour isoler des bandes passantes très étroites. Les parties de base d'un spectrophotomètre sont une source lumineuse (souvent une ampoule à incandescence pour les longueurs d'onde visibles, ou une lampe à arc au deutérium dans l'ultraviolet), un porte-échantillon (cuvette), un monochromateur pour séparer les différentes longueurs d'onde de lumière, et un détecteur. Le détecteur est généralement une photodiode. Les photodiodes sont utilisées avec des monochromateurs, qui filtrent la lumière de sorte que seule la lumière d'une seule longueur d'onde atteigne le détecteur.

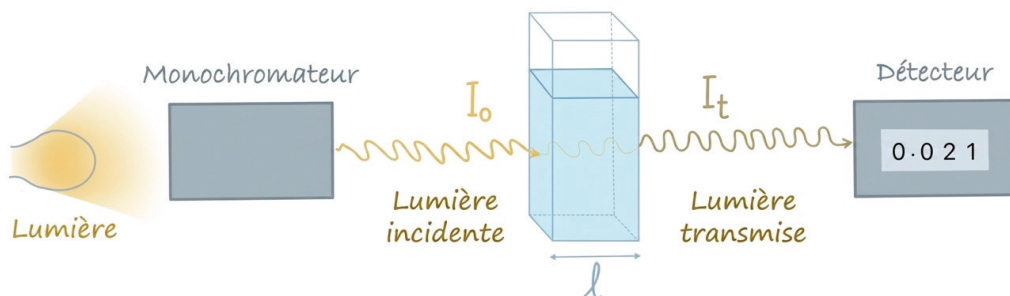


Figure 4. Composants d'un spectrophotomètre d'absorption

Les cuvettes pour les échantillons doivent être fabriquées à partir de substances transparentes pour le domaine d'analyse et leur longueur optique doit être reproductible ou très exacte.

Mesures d'absorption appliquées aux dosages quantitatifs

La concentration des substances peut être déterminée sur la base de mesures de l'absorbance lumineuse par les substances en solution, en particulier dans le domaine visible (réactions colorées), dans plusieurs situations:

- La substance analysée a une couleur caractéristique;
- La substance analysée conduit à un composé coloré qui absorbe la lumière;
- La substance analysée, en réagissant avec un composé coloré, modifie cette couleur.

Pour l'analyse d'un composé donné par mesure de l'absorbance lumineuse:

- L'absorbance obtenue (la couleur) dépend uniquement du composé analysé;
- La couleur doit être stable dans le temps;
- Le développement de la couleur est indépendant des conditions ambiantes;
- La loi de Lambert-Beer doit pouvoir être appliquée;
- Les mesures de l'absorbance lumineuse doivent être effectuées au maximum d'absorption ou à d'autres longueurs d'onde spécifiques λ .

Les méthodes suivantes peuvent être utilisées:

- Méthode de la courbe étalon;
- La méthode du rapport à un étalon unique;
- Le coefficient d'extinction molaire.

Méthode de la courbe étalon

La méthode consiste à utiliser cinq solutions étalons ou plus de concentrations connues. Les étalons et l'échantillon subissent la même réaction colorée spécifique et sont traités de manière identique. Une fois la réaction terminée, l'absorbance de chaque solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, préalablement mis à zéro avec une solution blanche. Le blanc contient tous les réactifs utilisés pour le développement de la couleur, sauf l'analyte, de sorte que leur absorbance est optiquement annulée et ne contribue pas aux mesures finales. Les valeurs d'absorbance des étalons sont ensuite reportées en fonction de leurs concentrations connues (Figure 5). Selon la loi de Lambert-Beer, cela donne une courbe d'étalonnage linéaire. La concentration de l'échantillon inconnu est déterminée en repérant son absorbance mesurée sur la courbe et en identifiant la valeur de concentration correspondante.

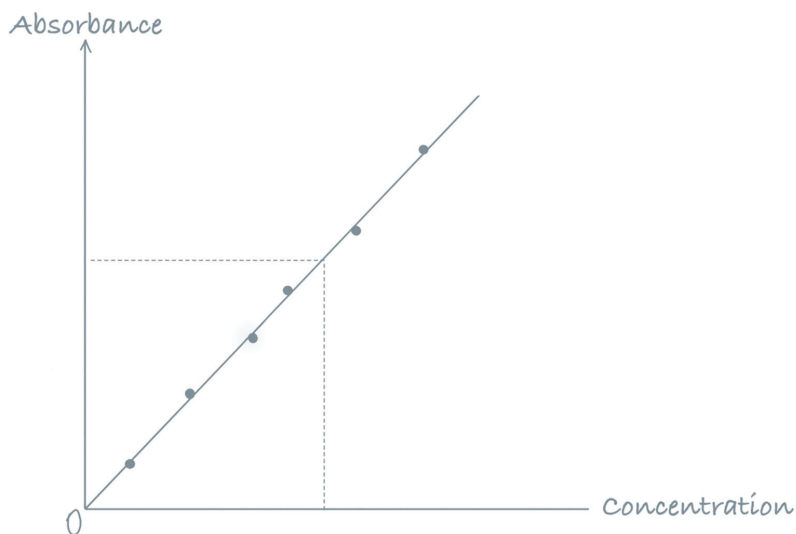


Figure 5. Représentation de la courbe étalon

Méthode du rapport à un étalon unique

Parmi l'ensemble des solutions étalons utilisées dans l'expérience, un seul étalon peut être choisi comme référence. Soit cette solution de référence de concentration connue C_s et d'absorbance mesurée A_s (par exemple, le tube étalon 3). Pour l'échantillon de concentration inconnue C_x et d'absorbance mesurée A_x , le calcul suivant peut être appliqué:

Cette formule repose sur la relation de proportionnalité entre concentration et absorbance décrite par la loi de Lambert-Beer

$$\begin{array}{l} C_s \dots\dots\dots A_s \\ C_x \dots\dots\dots A_x \end{array}$$

$$C_x = \frac{A_x \times C_s}{A_s}$$

Si la solution analysée a un coefficient de dilution D , alors:

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s \times D$$

Rapport au coefficient d'extinction

Cette approche n'est appliquée que lorsqu'un ensemble complet d'étalons n'est pas disponible pour construire une courbe d'étalonnage. Cependant, il convient de noter que la loi de Lambert-Beer n'est valable que dans la plage de concentration spécifique étudiée. Pour garantir l'exactitude, des pipettes précisément calibrées doivent être utilisées pour la mesure des réactifs, et des cuvettes avec une longueur de trajet optique bien définie et constante doivent être employées. Les mesures d'absorbance (A) sont effectuées à une longueur d'onde soigneusement sélectionnée; la concentration peut donc être calculée comme suit:

$$C_x (\text{moles/l}) = \frac{A_x}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_F}{V_A}$$

Où:

A_x - absorbance de l'échantillon

ε - absorptivité molaire

l - longueur du trajet optique

V_F - volume final de l'échantillon

V_A - le volume de liquide biologique analysé

Cette méthode de calcul simplifiée est couramment utilisée pour déterminer l'activité enzymatique ou pour estimer les concentrations d'échantillons lorsque des étalons appropriés ne sont pas disponibles.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Principe du dosage

Les protéines réagissent avec le réactif de Bradford (bleu brillant de Coomassie G250) en milieu acide et forment un composé bleu, dont l'absorbance du rayonnement à 595 nm est proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.

Pour la courbe d'étalonnage, 5 solutions de BSA (albumine sérique bovine) doivent être obtenues, à partir d'une solution mère de concentration 2 mg/ml. Les solutions diluées doivent être préparées à un volume de 1 ml, dans des tubes Eppendorf, aux concentrations suivantes:

P1 = 0,2 mg/ml

P2 = 0,4 mg/ml

P3 = 0,6 mg/ml

P4 = 0,8 mg/ml

P5 = 1,0 mg/ml

Une fois les solutions diluées obtenues, les réactions colorées sont évaluées selon le protocole de travail:

Pour les solutions diluées de BSA:

Réactif, μ l	
Échantillon de BSA dilué	50
Réactif de Bradford	1500

Pour l'échantillon inconnu:

Réactif, μ l	
Échantillon inconnu	50
Réactif de Bradford	1500

Pour le blanc (témoin):

Réactif, μ l	
Eau distillée	50
Réactif de Bradford	1500

Homogénéisez les échantillons et incubez à température ambiante pendant 20 minutes. Lisez l'absorbance des solutions diluées et de l'échantillon inconnu par rapport au blanc à 595 nm.

Avec les valeurs obtenues, tracez la courbe d'étalonnage (A en fonction de la concentration), puis déterminez la concentration de l'échantillon inconnu.

Valeurs normales pour les protéines sériques: 6,2-8,0 g/100 ml.

Valeurs pathologiques

Les variations pathologiques des protéines sériques totales ont une signification clinique limitée en raison de leur incidence relativement faible et de leur faible spécificité.

L'hyperprotéïnémie désigne une augmentation du taux de protéines sériques totales au-dessus de 8 g/100 ml. Elle peut être relative, survenant en cas d'hémoconcentration suite à une déshydratation (par exemple, nausées, vomissements, diarrhée), ou vraie, résultant d'une augmentation marquée d'un ou plusieurs composants du système immunitaire (comme dans le myélome multiple, les maladies du collagène ou la leucémie), ou de la présence excessive de protéines anormales.

L'hypoprotéïnémie est définie comme une diminution des protéines sériques totales en dessous de 6,2 g/100 ml et est toujours associée à un bilan azoté négatif. Elle survient dans des conditions impliquant une perte rénale excessive de protéines, des maladies hépatiques altérant la synthèse protéique, des syndromes d'immunodéficience (où la synthèse protéique est réduite en raison d'une production diminuée d'anticorps), et en cas de brûlures ou de traumatismes, où un catabolisme protéique accéléré est observé. Sur le plan clinique, la carence en protéines causée par la malnutrition ou une absorption protéique altérée entraîne un « œdème de la faim », une condition caractérisée par des niveaux d'albumine réduits et une pression osmotique diminuée. Ces patients peuvent également présenter une immunité réduite, une anémie, une ostéoporose et des troubles gastro-intestinaux.

Questions

1. Que stipule la loi de Lambert-Beer ?
2. Décrivez brièvement les écarts par rapport à la loi de Beer-Lambert.
3. Expliquez brièvement la méthode de la courbe étalon.
4. Dans quelles conditions est-il recommandé d'utiliser la méthode du coefficient d'extinction ?
5. Décrivez l'expérience réalisée au laboratoire.
6. Dans quelles conditions peut-on observer une hypoprotéïnémie ou une hyperprotéïnémie ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L11. COFACTEURS ENZYMATIQUES. LA MÉTHODE DU TEST OPTIQUE

Cofacteurs enzymatiques

Les enzymes sont des biocatalyseurs organiques caractérisés par une haute spécificité. La plupart des enzymes ont une structure protéique, tandis que seules quelques-unes possèdent une structure polynucléotidique.

Selon leur composition, les enzymes se divisent en deux classes principales:

- **Les enzymes simples** - composées uniquement de protéine
- **Les hétéroenzymes** - constituées d'une partie protéique (appelée apoenzyme) et d'un composant non protéique appelé le **cofacteur**. Sans le cofacteur, l'enzyme est catalytiquement inactive. Les cofacteurs peuvent être divisés en trois catégories:
 - **Les ions métalliques**, participent directement au processus catalytique de l'enzyme (par exemple Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mo^{2+} , Se^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , etc.)
 - **Les coenzymes** - molécules organiques non protéiques qui sont faiblement liées à l'enzyme et peuvent facilement se dissocier. Elles sont parfois appelées substrats secondaires ou cosubstrats. La plupart des coenzymes sont des vitamines (par exemple, l'acide ascorbique) ou des dérivés de vitamines, tels que:
 - Le pyrophosphate de thiamine - TPP (à partir de la thiamine - B₁)
 - Le nicotinamide adénine dinucléotide - NAD^+ (à partir de la niacine - B₃)
 - Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate - NADP^+ (à partir de la niacine - B₃)
 - Le coenzyme A (à partir de l'acide pantothénique - B₅)
 - Le tétrahydrofolate - THF (à partir de l'acide folique - B₉)
 - La tétrahydrobioptérine - BH₄ (à partir du GTP)
 - ATP/GTP/UTP (à partir de nucléotides)
 - **Les groupements prosthétiques** - molécules organiques ou inorganiques liées de manière covalente au composant protéique de l'enzyme. Ils sont régénérés in situ au cours du cycle catalytique. De nombreux groupements prosthétiques sont des vitamines ou des dérivés de vitamines, tels que:
 - Le flavine mononucléotide - FMN (à partir de la riboflavine - B₂)
 - Le flavine adénine dinucléotide - FAD (à partir de la riboflavine - B₂)
 - Le phosphate de pyridoxal - PLP (à partir de la pyridoxine - B₆)
 - La biotine (à partir de la biotine - B₇)
 - La désoxyadénosylcobalamine et la méthylcobalamine (à partir de la cobalamine - B₁₂)
 - L'acide lipoïque (composé non vitaminique)

Parmi ces cofacteurs, seuls les dérivés de la niacine (NAD^+ , NADP^+ et leurs formes réduites NADH , respectivement NADPH) sont couramment utilisés pour le dosage quantitatif de l'activité enzymatique, en raison de leurs propriétés optiques caractéristiques.

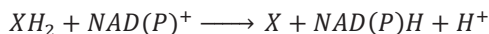
Détermination de l'activité enzymatique

Deux principaux types de dosages sont utilisés dans la pratique de laboratoire pour la détermination des activités enzymatiques:

- **Les méthodes à deux points:** Dans cette approche, un échantillon blanc (contenant l'enzyme inactivée) et un échantillon test (avec l'enzyme active) sont utilisés. Après une période d'incubation fixe, l'enzyme de l'échantillon test est également inactivée. La différence entre l'échantillon test et le blanc est évaluée sur la base de la concentration du substrat ou du produit de la réaction. Ce type de dosage ne permet pas d'évaluer la cinétique du substrat.
- **Les méthodes cinétiques:** Dans ces méthodes, la réaction est suivie en continu, soit numériquement, soit à l'aide d'instruments enregistreurs. Les dosages cinétiques sont plus simples, plus rapides, et fournissent des données en temps réel sur l'activité enzymatique. Le coût des réactifs n'est généralement pas un facteur limitant lorsque les analyses sont réalisées à petite échelle.

Test optique

Le test optique est une méthode cinétique largement utilisée, introduite pour la première fois par Warburg et Christian en 1936 pour déterminer les enzymes qui catalysent des réactions de transfert d'hydrogène impliquant les coenzymes NADH ou NADPH. En principe, la méthode mesure soit l'oxydation du $\text{NADH} + \text{H}^+$, soit la réduction du NAD^+ , car ces réactions s'accompagnent d'une variation mesurable de l'absorbance.



L'oxydation ou la réduction peut être observée directement car le NADH absorbe fortement la lumière à 300-370 nm et le NAD^+ absorbe très peu la lumière à cette longueur d'onde.

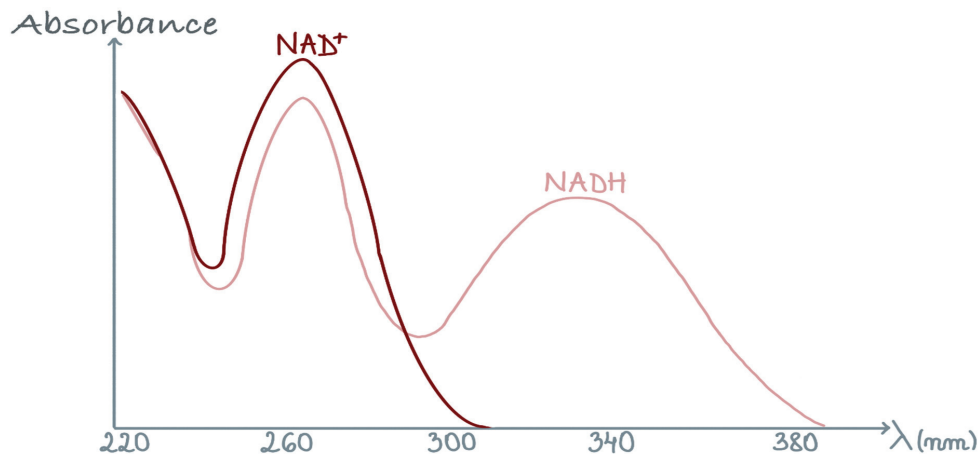


Figure 1. Les spectres d'absorption du NAD^+ et du NADH

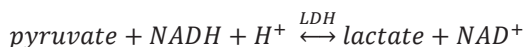
Habituellement, l'expérience est réalisée à 340 nm ou 366 nm.

Le test optique représente le dosage en UV des enzymes dépendant du NAD^+ ou du NADP^+ . En pratique, trois variantes du test optique sont utilisées, permettant le dosage de presque toutes les enzymes en laboratoire clinique.

Variantes techniques du test optique

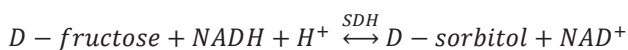
1. Le test optique simple - Si l'enzyme à doser utilise le NAD(P)^+ ou le NAD(P)H comme coenzyme, la réaction se produit entre le substrat, l'enzyme (présente dans le sérum) et le coenzyme, tandis que l'absorbance de la lumière est mesurée sur un intervalle de temps spécifique.

- **Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH):** L'enzyme LDH catalyse la réaction:



L'enzyme est présente dans toutes les cellules, a une activité élevée et est dosée presque exclusivement par le test optique dans les deux sens de la réaction.

- **Dosage de la sorbitol déshydrogénase (SDH):** L'enzyme SDH catalyse la réaction:



L'enzyme est présente dans le foie et les glandes séminales. Ce dosage est utilisé comme test de la fonction hépatique.

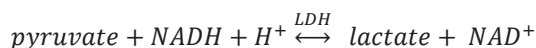
Dans tous ces types de tests, la variation de l'absorbance au cours du temps est mesurée. Au début du test, lorsque le coenzyme réduit (NADH) est ajouté, l'absorbance augmente rapidement puis se stabilise après environ une minute. À ce moment, l'ajout de la solution de substrat au mélange réactionnel initie la réaction enzymatique. La diminution ultérieure de l'absorbance est enregistrée, et cette baisse est directement proportionnelle à l'activité enzymatique. Après environ 3-4 minutes, le coenzyme NADH est complètement consommé. Par conséquent, la vitesse de variation de l'absorbance par minute ($\Delta\text{E}/\text{min}$) est directement proportionnelle à l'activité enzymatique.

2. Le test optique couplé à une réaction indicatrice - Certaines enzymes n'utilisent pas le NADH comme coenzyme. Cependant, leur activité peut néanmoins être déterminée à l'aide du test optique, couplé à une réaction indicatrice spécifique. Dans ce cas, le produit formé dans la réaction primaire (catalysée par l'enzyme étudiée) sert de substrat pour une réaction secondaire, dite indicatrice. Cette seconde réaction est catalysée par une enzyme NADH-dépendante, permettant de suivre l'ensemble du processus par spectrophotométrie. Par exemple:

- **Dosage de l'alanine aminotransférase-ALAT (glutamate-pyruvate transaminase-GPT)**



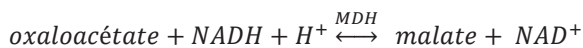
Le pyruvate résultant participe à une seconde réaction (la réaction indicatrice), catalysée par une enzyme NADH-dépendante - la lactate déshydrogénase (LDH):



- **Dosage de l'aspartate aminotransférase-ASAT (glutamate-oxaloacétate transaminase-GOT)**



L'oxaloacétate résultant participe à une seconde réaction (la réaction indicatrice), catalysée par une enzyme NADH-dépendante - la malate déshydrogénase:



Une transaminase (ou aminotransférase) est une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupement amine d'une molécule à une autre, jouant un rôle clé dans le métabolisme des acides aminés. L'aspartate aminotransférase (AST) est similaire à l'alanine aminotransférase (ALT) en ce que les deux enzymes sont associées aux cellules parenchymateuses hépatiques. Cependant, l'ALT se trouve principalement dans le foie, avec des quantités cliniquement insignifiantes dans d'autres tissus, tandis que l'AST est distribuée dans le foie, le cœur (muscle cardiaque), le muscle squelettique et d'autres organes, généralement en quantités plus faibles.

Par conséquent, l'ALT est un marqueur plus spécifique de l'inflammation hépatique que l'AST, bien que les deux enzymes soient couramment mesurées dans le cadre des tests de la fonction hépatique.

De plus, les niveaux d'AST peuvent également être élevés dans des maladies affectant d'autres organes, comme l'infarctus du myocarde ou les troubles musculosquelettiques.

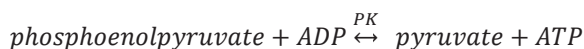
Des élévations des transaminases peuvent survenir secondairement dans des conditions pathologiques affectant des organes autres que le foie, le cœur ou le muscle squelettique; cependant, dans ces cas, les enzymes ne sont pas considérées comme des marqueurs diagnostiques primaires pour ces organes.

3. Le test optique couplé à une réaction auxiliaire et à une réaction indicatrice. Si le produit de la première réaction ne peut pas être le substrat d'une enzyme NADH-dépendante, une réaction intermédiaire est utilisée. Le second produit sera le substrat d'une réaction indicatrice. Par exemple:

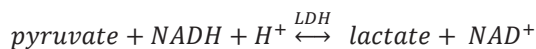
- **Dosage de la créatine kinase (CK).** La réaction catalysée est:



La réaction auxiliaire (deuxième étape) utilise l'ADP comme substrat, et est catalysée par la pyruvate kinase (PK):



La réaction indicatrice (troisième étape) utilise le pyruvate comme substrat, et est catalysée par le lactate déshydrogénase (LDH):



Pour obtenir une proportionnalité directe entre la vitesse de disparition de la créatine et la formation de NAD^+ , tous les réactifs sont ajoutés en excès.

La créatine kinase (CK) est une enzyme présente dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique qui aide à réguler l'énergie en convertissant la créatine en phosphocréatine et inversement. La CK est une enzyme dimérique constituée de 2 sous-unités catalytiques appelées M (muscle) et B (cerveau). Les 3 isoenzymes résultant de l'association des deux sous-unités sont: CK-BB (CK1, contenant 2 chaînes B), CK-MB (CK2, contenant une chaîne B et une chaîne M), CK-MM (CK3, contenant 2 chaînes M).

D'un point de vue clinique, des taux sanguins élevés de CK indiquent des lésions tissulaires, principalement dans les affections cardiaques et les lésions musculaires squelettiques ou la rhabdomyolyse.

Calcul de l'activité enzymatique

Il existe différentes modalités pour le calcul de l'activité enzymatique:

- l'utilisation simultanée d'un étalon
- l'utilisation du coefficient d'extinction molaire
- la méthode graphique

La première méthode utilise des réactifs commerciaux de séries étalons, d'activité enzymatique connue, ou des enzymes purifiées. En pratique, ce système est peu utilisé car l'activité enzymatique n'est pas constante dans le temps et les séries étalons commerciales sont assez coûteuses.

Il est plus pratique d'utiliser une quantité étalon de substrat et de suivre sa consommation dans le temps (ou la formation du produit). La formule de calcul de l'activité enzymatique dans ce cas est:

$$UI = \frac{E_P}{E_S} \cdot C_M \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{V_F}{V_A} \quad \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot L^{-1}$$

Où: V_A = volume du matériel analysé, ml

V_F = volume final, ml

C_M = concentration du substrat (produit), mol/1000 mL

E_P = extinction de l'échantillon, E_S = extinction de l'étalon (absorbance)

t = temps d'incubation, minutes

Les méthodes cinétiques notent l'absorbance à différents intervalles de temps, et la variation d'absorbance par minute est calculée. La formule de calcul est:

$$UI = \frac{\Delta E / \text{min}}{d \cdot \varepsilon} \cdot 10^6 \cdot \frac{V_F}{V_A} \quad \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot L^{-1}$$

Où: $\Delta E / \text{min}$ = variation de l'absorbance de l'échantillon par minute

V_A = volume du matériel analysé, ml

V_F = volume final, ml

d = longueur de la cuvette, cm

ε = coefficient d'extinction molaire du substrat (produit)

PARTIE EXPÉRIMENTALE

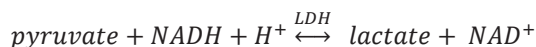
Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase sérique (LDH)

Introduction

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate. Le pyruvate est réduit pour former du lactate, et le NADH est oxydé en NAD^+ . En réalité, l'activité totale de la LDH résulte de l'activité de plusieurs enzymes ayant des structures très similaires, et qui agissent sur les mêmes substrats, dans différents organes. Ces LDH sont appelées *isoenzymes*. La LDH possède deux sous-unités, H (cœur) et M (muscle). En combinant les 2 sous-unités, 5 isoenzymes résultent: LDH₁ (HHHH), LDH₂ (HHHM), LDH₃ (HHMM), LDH₄ (HMMM) et LDH₅ (MMMM).

La réaction se déroule à pH 7,5, de sorte que le pyruvate est réduit en lactate. La disparition du NADH est suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm, mesurée pendant plusieurs minutes soit en continu, soit à intervalles fréquents. La variation de l'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) est directement liée aux micromoles de NADH oxydées et, par conséquent, aux micromoles de substrat transformées par minute (Unités Internationales).

En sens inverse, la transformation du lactate en pyruvate se produit à pH = 9.



Procédure:

- réglez la longueur d'onde à 340 nm;
- étalonnez le spectrophotomètre par rapport à l'eau distillée;
- dans une cuvette, pipetez 100 μl de sérum (contient la LDH) et 1000 μl de réactif de travail, et homogénéisez délicatement en pipetant plusieurs fois;
- placez la cuvette dans le spectrophotomètre, et lisez l'A à 0, 1, 2 et 3 minutes.

Calcul:

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} = [(A_0 - A_1) + (A_1 - A_2) + (A_2 - A_3)]/3$$

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 4127$$

Valeurs normales pour la LDH: 135-225 U/l

Signification clinique:

La LDH sérique est augmentée dans les maladies hépatiques, cardiaques, musculaires squelettiques, rénales, ainsi que dans certaines maladies hématopoïétiques et néoplasiques.

Les maladies hépatiques (*hépatite virale, cirrhose*) provoquent des augmentations d'environ deux fois la limite supérieure de référence (augmentation de l'isoenzyme LDH₅).

Les maladies cardiaques (*infarctus du myocarde-IM*) provoquent un degré d'augmentation similaire (LDH₁ et LDH₂). La LDH sérique commence à augmenter ~12 heures après l'IM et augmente jusqu'à atteindre un pic vers 72 heures. Le taux revient à la normale en environ 10 jours, sauf en cas de nouvel IM.

Les infarctus rénaux et pulmonaires provoquent également une augmentation de l'activité de la LDH.

Les maladies hématologiques telles que *l'anémie pernicieuse et la leucémie lymphoblastique aiguë* entraînent également des augmentations significatives de la LDH sérique.

Questions

1. Écrivez les différences entre un coenzyme et un groupement prosthétique. Donnez des exemples pour les deux catégories.
2. Qu'est-ce que le test optique ? Expliquez pourquoi la détermination de l'absorbance se fait à 340 nm et non à 260 nm.
3. Combien de variantes techniques du test optique connaissez-vous ? Présentez-les brièvement.
4. Présentez brièvement l'expérience réalisée au laboratoire.
5. Quelle est l'utilité clinique du dosage de la LDH, de l'ALAT, de l'ASAT, de la CK ?

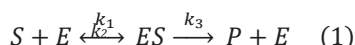
Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L12. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE. DÉTERMINATION DE K_M ET V_{max}

Les réactions chimiques se déroulent à des vitesses variables - certaines se produisent spontanément et très rapidement (bien que jamais instantanément), tandis que d'autres sont si lentes qu'elles nécessitent un facteur activateur, tel qu'une température accrue ou la présence d'un catalyseur, pour se dérouler dans un délai pratique.

Les enzymes sont des protéines qui servent de catalyseurs biologiques, accélérant les réactions biochimiques au sein des cellules vivantes. Elles fonctionnent en se liant à la molécule de substrat pour former un complexe enzyme-substrat (ES), ce qui abaisse l'énergie d'activation nécessaire pour convertir le substrat en produit. Pour une réaction simple impliquant un seul substrat, le processus peut être représenté comme suit:



La vitesse initiale d'une réaction enzymatique peut être déterminée en mesurant la quantité de substrat converti ou de produit formé par unité de temps. Le plus souvent, la vitesse de réaction est exprimée en nombre de micromoles de produit générées par minute ($\mu\text{mol/min}$).

La vitesse initiale (v) de la réaction enzymatique représente la vitesse instantanée de formation du produit (P) ou de disparition du substrat (S) en fonction du temps et peut être exprimée:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

La figure 1 illustre la variation de la vitesse de réaction au cours du temps pour une réaction enzymatique typique. Il est évident que la vitesse de réaction diminue à mesure que la réaction progresse. Ce déclin peut être attribué à plusieurs facteurs, notamment la dénaturation de l'enzyme, l'inhibition par le produit, la diminution de la concentration en substrat (et donc la diminution de la saturation de l'enzyme), l'inactivation du coenzyme, et l'apparition de la réaction inverse à mesure que le produit s'accumule. Il est donc essentiel de mesurer la vitesse de réaction non pas à un moment aléatoire, mais spécifiquement au tout début, lorsque ces facteurs perturbateurs sont minimales. Pour cette raison, la vitesse initiale est utilisée dans les études enzymatiques. Dans la Figure 1, la vitesse initiale correspond à la pente de la courbe à l'origine.

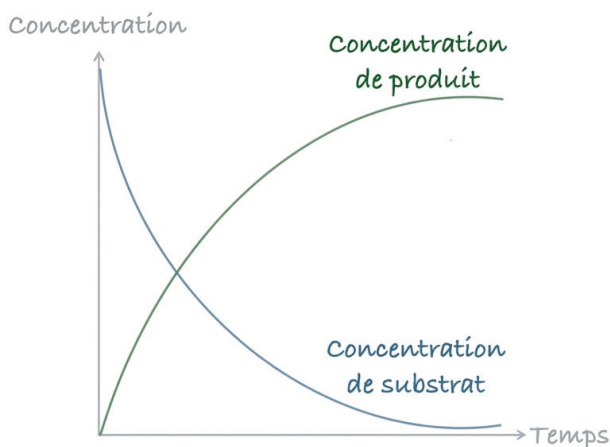


Figure 1. Dépendance des concentrations de substrat et de produit dans le temps

En pratique, la vitesse initiale peut être calculée à l'aide de la formule ci-dessous, qui illustre qu'elle est déterminée au début de la réaction, lorsque la vitesse de disparition du substrat ou de formation du produit est linéaire par rapport au temps.

$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

La figure 2 illustre la variation de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat pour une réaction catalysée enzymatiquement à un seul substrat.

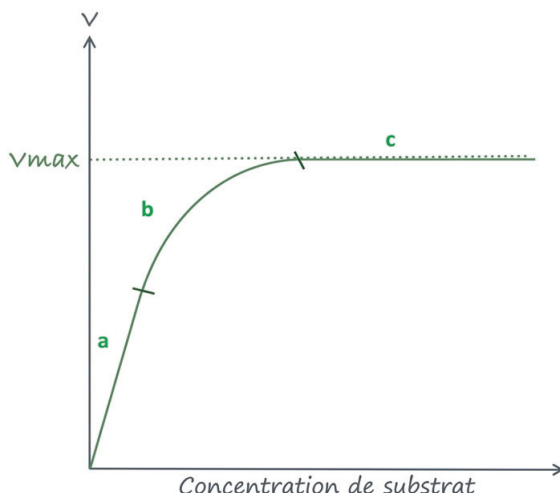


Figure 2. Variation de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat

L'analyse de la courbe présentée dans la Figure 2 conduit aux observations suivantes:

1. **Région « a »** - À des concentrations en substrat relativement faibles, la réaction est approximativement d'ordre un par rapport au substrat. Cela s'explique par le fait qu'il y a beaucoup plus de sites actifs enzymatiques disponibles que de molécules de substrat; ainsi, chaque molécule de substrat est rapidement transformée, et chaque augmentation de la concentration en substrat entraîne une augmentation proportionnelle de la vitesse de réaction.
2. **Région « b »** - À mesure que la concentration en substrat augmente, la vitesse de réaction initiale augmente plus lentement et n'est plus proportionnelle de façon linéaire à la concentration en substrat. Dans cette région, la réaction présente une *cinétique d'ordre mixte*.
3. **Région « c »** - À des concentrations en substrat élevées, la vitesse de réaction devient complètement indépendante de la concentration en substrat et s'approche asymptotiquement d'une valeur constante. Dans cette phase, la réaction est d'ordre zéro, car l'enzyme est saturée en substrat, ce qui signifie que tous les sites actifs sont occupés. À ce point de saturation du substrat, la *vitesse maximale* (V_{max}) de la réaction enzymatique est atteinte, et l'ajout supplémentaire de substrat n'augmentera pas la vitesse de réaction.

La relation mathématique entre la vitesse initiale de réaction, la concentration en substrat et les caractéristiques de l'enzyme a été établie par L. Michaelis et M.L. Menten, puis affinée par E.G. Briggs et J.B.S. Haldane. L'équation résultante, connue sous le nom d'**équation de Michaelis-Menten**, s'exprime comme suit (équation 2):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

K_M représente la concentration en substrat à laquelle la vitesse de la réaction enzymatique atteint la moitié de sa vitesse maximale ($V_{\max}/2$) dans les réactions impliquant un seul substrat. À ce point ($v=V_{\max}/2$ et $[S]=K_M$), l'enzyme est liée au substrat dans la moitié de ses sites actifs disponibles, ce qui signifie que la moitié des molécules d'enzyme existent sous forme de complexes enzyme-substrat (ES). Par conséquent, K_M correspond à la constante de dissociation du complexe ES et reflète la force de liaison de l'enzyme à son substrat.

Par conséquent, K_M fournit une mesure quantitative de l'*affinité* d'une enzyme pour son substrat - plus la valeur de K_M est faible, plus l'affinité de l'enzyme est élevée.

Par exemple, en considérant une enzyme E agissant sur trois substrats différents (S_1 , S_2 , et S_3), la relation entre la vitesse de réaction (v) et la concentration en substrat ($[S]$) peut être représentée graphiquement comme indiqué dans la Figure 3.

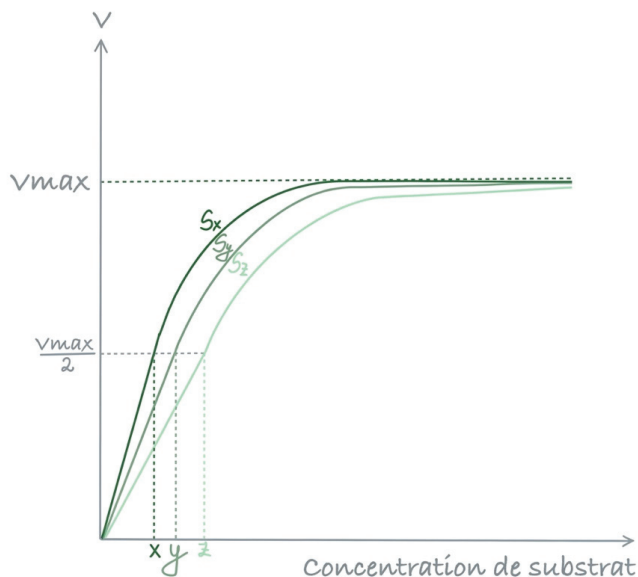


Figure 3. Représentation de $v=f[S]$

En comparant les valeurs calculées de K_M à partir du graphique avec les points $V_{\max}/2$ correspondants, on obtient la relation suivante: $K_{M1} < K_{M2} < K_{M3}$. Cela indique que l'affinité de l'enzyme pour les substrats diminue dans l'ordre $S_1 > S_2 > S_3$. En d'autres termes, pour le substrat S_1 , une concentration plus faible est nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale ($V_{\max}/2$) par rapport à S_2 et S_3 . Par conséquent, une enzyme avec une valeur de K_M faible atteint une efficacité catalytique maximale à des concentrations en substrat plus faibles, reflétant une affinité plus élevée pour le substrat.

Généralement, les valeurs de K_M se situent entre 10^{-1} et 10^{-8} M. Les enzymes avec des valeurs de K_M comprises entre 10^{-1} et 10^{-2} M présentent une *faible affinité* pour leurs substrats, tandis que celles ayant des valeurs de K_M comprises entre 10^{-5} et 10^{-8} M présentent une *affinité élevée*.

À la fois K_M et $V_{\max}$ sont déterminés expérimentalement à partir du graphique $v = f([S])$. La vitesse maximale ($V_{\max}$) est estimée en extrapolant l'asymptote de la courbe hyperbolique, et K_M est ensuite calculée à partir du point correspondant, comme illustré dans la Figure 4.

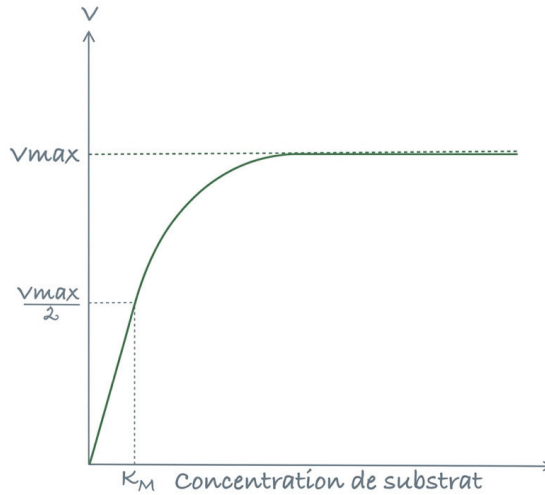


Figure 4. Détermination de $V_{\max}$ et de K_M

La détermination des deux constantes peut être effectuée avec une plus grande précision en utilisant une transformation mathématique. Si l'équation de Michaelis-Menten est valide, alors sa forme réciproque doit également l'être. En prenant l'inverse des deux côtés, l'**équation de Lineweaver-Burk** est obtenue:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

La représentation graphique de $1/v$ en fonction de $1/[S]$ donne une droite, permettant une détermination plus précise de $V_{\max}$ et de K_M , comme indiqué dans la *Figure 5*. Sur ce graphique, la droite coupe l'axe des x à $-1/K_M$ et l'axe des y à $1/V_{\max}$.

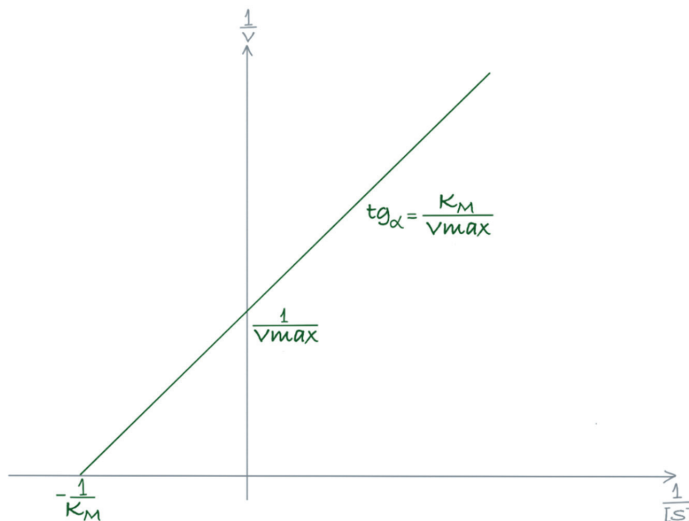


Figure 5. Représentation de Lineweaver-Burk

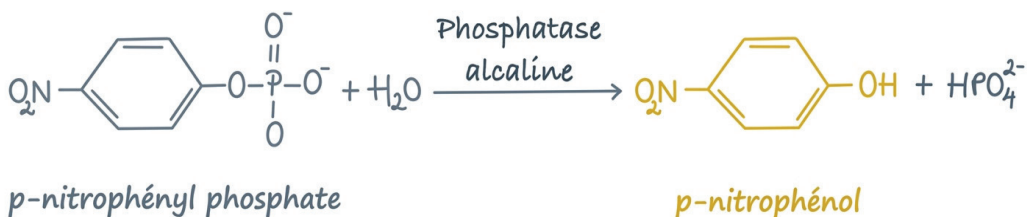
PARTIE EXPÉRIMENTALE

Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction, catalysée par la phosphatase alcaline

Principe

La phosphatase alcaline sérique (ALP) est une enzyme présente dans divers tissus, notamment le foie, les os, les reins, les intestins, les glandes mammaires et le placenta. Une activité élevée de l'ALP survient dans les troubles hépatiques (tels que l'obstruction biliaire ou les métastases hépatiques), les maladies osseuses (dont le rachitisme, l'ostéomalacie et les métastases osseuses), ainsi que dans certaines affections néoplasiques. À l'inverse, une diminution de l'activité de l'ALP peut être observée en cas d'anémie et de malnutrition.

La phosphatase alcaline (ALP) catalyse l'hydrolyse des esters phosphoriques, éliminant un groupement phosphate des molécules substrats. Un substrat couramment utilisé dans les dosages colorimétriques est le p-nitrophénylphosphate (p-NPP). Dans cette réaction, l'ALP catalyse la conversion du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol (un composé jaune) et en phosphate inorganique:



La variation de l'absorbance de l'échantillon dans le temps, mesurée à 405 nm, est directement proportionnelle à l'activité de l'ALP sérique. Le p-nitrophénolate de sodium (obtenu en milieu alcalin) a une absorbativité molaire de $18\,496 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'objectif de cette expérience est d'évaluer l'influence de la concentration en substrat (pNPP) sur la vitesse de réaction pour la détermination de K_M et de $V_{\max}$ de la réaction enzymatique.

La méthode d'analyse de l'activité enzymatique (vitesse de réaction) est une méthode cinétique, par suivi continu dans le temps des variations d'absorbance du mélange réactionnel à $\lambda=405$ nm.

Matériel et équipement:

1. Micropipette de 20-200 μL ;
2. Micropipette de 100-1000 μL ;
3. Tubes Eppendorf de 1,5 mL;
4. Cuvettes de spectrophotomètre de 1 mL;
5. Spectrophotomètre.

Réactifs:

1. R1: Tampon diéthanolamine 1 M, pH = 9,80: Dissoudre 100 mg de MgCl_2 et 97 ml de diéthanolamine dans 800 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 9,80 avec une solution de HCl 10 M, puis compléter à un volume final de 1 litre avec de l'eau bidistillée dans une fiole jaugée.
2. R2: Solution de substrat - solution de para-nitrophénylphosphate (pNPP) 2 mM
3. R3: Le réactif de travail R3 est obtenu en combinant R1 avec R2 selon le protocole du tableau ci-dessous
4. R4: Solution de phosphatase alcaline (à partir de sérum sanguin)

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
R1 (μL)	599	598	597	580	460	250
R2 (μL)	1	2	3	20	140	350
Concentration en substrat (mmol/L)						

Procédure:

Chaque groupe réalise une courbe de Michaelis-Menten comportant six points. Six concentrations croissantes de substrat (S1-S6) sont préparées, pour lesquelles les vitesses de réaction sont déterminées selon le protocole ci-dessous.

- Dans les 6 tubes Eppendorf (notés S1 à S6), les volumes décrits dans le tableau pour la solution tampon (R1) et la solution de substrat (R2) sont pipetés. Les solutions R1 et R2 forment ensemble un volume total de 600 μL.

- Réglez la longueur d'onde à 405 nm sur le spectrophotomètre.
- Insérez une cuvette avec la solution tampon dans le spectrophotomètre et remettez le spectrophotomètre à zéro.
- 600 μL de S1 + 100 μL de R4 sont pipetés dans une autre cuvette (en mélangeant facilement avec la pipette pour homogénéiser).
- Insérez la cuvette dans le spectrophotomètre et lisez l'absorbance A_0 au temps 0 (la lecture se fait lorsque la valeur d'absorbance est stabilisée).
- Démarrez le chronomètre et après 3 minutes, lisez l'absorbance A_3 au temps 3 minutes. La même procédure est réalisée pour les solutions S2-S6.

Détermination des vitesses de réaction

Pour chacun des échantillons S1-S6, les vitesses de réaction V_1 - V_6 sont calculées selon l'équation ci-dessous:

$$\text{Vitesse de réaction } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{V_F}{V_A \cdot \varepsilon} \times \frac{10^6}{10^3}$$

Où:

$\Delta A / \text{min}$ - variation de l'absorbance de l'échantillon par minute;

V_F - volume final (mL);

V_A - volume R3 (sérum) (mL);

ε - coefficient d'absorption molaire ($\text{L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 18496;

$l = 1 \text{ cm}$

$$\text{Vitesse de réaction } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{0.7}{0.01 \cdot 18496} \times \frac{10^6}{10^3}$$

$$\text{Vitesse de réaction } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 3.7846$$

La concentration en substrat pour [S1]-[S6] est calculée en tenant compte du volume de pNPP à 2 mM ajouté dans chaque échantillon et du mélange final (700 µL). Exemple de calcul de la concentration en substrat [S] (mM) pour l'échantillon S1:

$$\begin{aligned}
 &2 \text{ mmol pNPP} \dots\dots\dots 10^6 \text{ }\mu\text{L} \\
 &x \text{ mmol pNPP} \dots\dots\dots 1 \text{ }\mu\text{L} \\
 \\
 &x \text{ mmol pNPP/échantillon} = 2 \times 10^{-6} \\
 &2 \times 10^{-6} \text{ mmol pNPP} \dots\dots\dots 700 \text{ }\mu\text{L} \\
 &y \text{ mmol pNPP} \dots\dots\dots 10^6 \text{ }\mu\text{l} \\
 \\
 &y = 2 \times 10^{-6} \times 106/700 = 0,00286 \text{ mmol / L} \\
 &[S] \text{ (mM)} = (\text{mmol pNPP / échantillon} \times 10^6) / 700
 \end{aligned}$$

Les résultats sont présentés dans le tableau:

Substrat	A ₀	A ₃	ΔA = A ₃ -A ₀	Vitesse de réaction (µmoles/min)	[S] (mM)	1/Vitesse de réaction (min*µmol)	1/[S] (mM ⁻¹)
S1							
S2							
S3							
S4							
S5							
S6							

Pour étudier l'influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique, la courbe de Michaelis-Menten est tracée soit selon les paramètres [S] et V, soit selon les paramètres 1/V = f (1/[S]).

L'importance de la détermination de la constante K_M

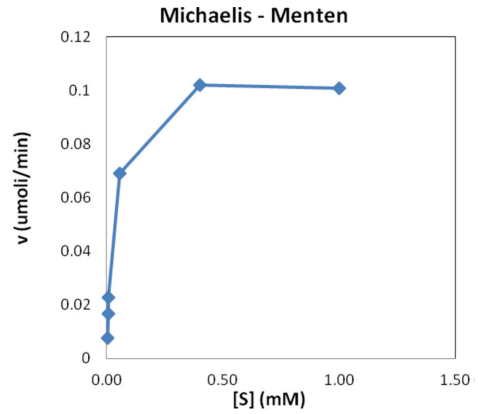
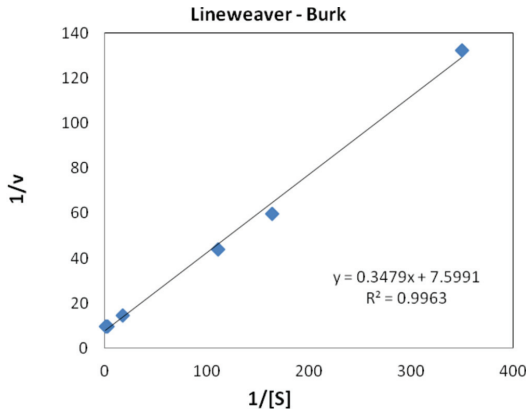
K_M représente une mesure de l'affinité de l'enzyme pour un substrat. Ainsi, K_M est inversement proportionnelle à l'affinité pour le substrat. Une **valeur de K_M plus faible** indique une **affinité pour le substrat plus élevée**, tandis qu'une **valeur de K_M plus élevée** reflète une **affinité plus faible**.

Par exemple, dans le contrôle physiologique du métabolisme du glucose, il existe deux types d'hexokinases, l'une avec un K_M élevé (du foie) et l'autre avec un K_M faible pour le glucose (des tissus glucodépendants, tels que le cerveau et les muscles), toutes deux contribuant au maintien de l'état stationnaire du glucose dans le sang. Ces deux enzymes travaillent ensemble pour maintenir une concentration sanguine de glucose stable.

Un exemple bien connu illustrant la signification physiologique de K_M concerne la moindre tolérance à l'alcool dans de nombreuses populations asiatiques. Comparés aux Européens, les individus d'origine asiatique présentent souvent une vasodilatation (rougeur du visage) et une tachycardie après avoir consommé de plus petites quantités d'alcool. Ces effets sont dus à l'accumulation d'acétaldéhyde, produit lorsque l'alcool déshydrogénase transforme l'éthanol dans le foie. Normalement, l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale (ALDH2) oxyde l'acétaldéhyde en acétate. Cependant, de nombreuses personnes d'origine asiatique possèdent un variant de l'ALDH2 avec un K_M élevé (faible affinité) pour l'acétaldéhyde, entraînant un métabolisme incomplet et une accumulation d'acétaldéhyde, le composé responsable de la rougeur caractéristique et d'autres symptômes.

Les résultats d'une expérience similaire sont présentés ci-dessous:

Substrat	A ₀	A ₃	ΔA = A ₃ -A ₀	Vitesse de réaction (μmoles/min)	[S] (mM)	1/Vitesse de réaction (min*μmol ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)
S1	0,049	0,055	0,006	0,757 x 10 ⁻²	0,00286	132,100	349,65
S2	0,041	0,055	0,014	1,67 x 10 ⁻²	0,00571	60,024	163,93
S3	0,037	0,055	0,018	2,27 x 10 ⁻²	0,00857	44,038	111,11
S4	0,130	0,183	0,053	6,69 x 10 ⁻²	0,05710	14,957	17,51
S5	0,751	0,832	0,081	10,22 x 10 ⁻²	0,40000	9,787	2,50
S6	1,537	1,617	0,080	10,09 x 10 ⁻²	1,00000	9,909	1,00



En utilisant l'équation:

$$1/V = 34.753 \times 1/S + 773.73$$

Lorsque

$x=0$, $1/V_{\max} = 0,775 \times 10^3$, $V_{\max} = 0,13 \mu\text{moles/min}$

$y = 0 - 1/K_M = -22,263$, $K_M = 4,46 \times 10^{-5} \text{ M}$

Influence de la température sur l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique

Principe

Étant des protéines, les enzymes sont très sensibles à la température. Chaque enzyme a une température optimale, la température à laquelle son activité catalytique est maximale, généralement entre 35°C et 40°C. À des températures supérieures à 50-60°C, l'activité enzymatique diminue ou cesse entièrement en raison de la dénaturation de la structure protéique.

La réaction colorimétrique utilisée dans cette expérience implique la phosphatase alcaline (ALP) catalysant la conversion du p-nitrophénylphosphate (p-NPP) en p-nitrophénol (un composé jaune) et en phosphate. L'intensité de la couleur jaune formée pendant la réaction est proportionnelle à l'activité de l'ALP.

L'activité de l'ALP sera mesurée à 0°C (bain de glace), 37°C et 95°C afin d'observer l'influence de la température sur l'activité enzymatique.

Réactifs, ml	0°C	37°C	95°C
Solution de pNPP 2 mM	1	1	1
Maintenir à la température correspondante pendant 10 min			
Solution d'ALP	0,2	0,2	0,2
Maintenir à la température correspondante pendant 15 min			
NaOH	1	1	1

Lorsque la réaction se déroule à 37°C, la couleur est plus intense par rapport aux 2 autres tubes à essai. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à l'activité de l'ALP.

Influence du pH sur l'activité de l'ALP

Principe

Les enzymes ne présentent une activité que dans une plage de pH limitée. Chaque enzyme possède un pH optimal, la valeur de pH spécifique à laquelle son activité catalytique atteint un maximum. Le pH optimal dépend de divers facteurs tels que la force ionique, la température et la concentration en substrat. Les écarts par rapport à ce pH modifient la structure et la répartition des charges de l'enzyme, réduisant progressivement son activité et conduisant finalement à son inactivation.

L'intensité de la couleur jaune produite lors de l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (p-NPP) est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline (ALP). Dans cette expérience, l'activité de l'ALP sera mesurée à différentes valeurs de pH en utilisant trois systèmes tampons: tampon diéthanolamine (pH 9,8), tampon barbiturate (pH 7) et tampon acétate (pH 4).

Réactifs, ml	pH 9,8	pH 7	pH 4
pNPP 2 mM	1	1	1
Tampon pH =10	2	-	-
Tampon pH = 7	-	2	-
Tampon pH = 4	-	-	2
Solution d'ALP	0,20	0,20	0,20
Incuber à 37°C pendant 15 minutes			
NaOH 1M	1	1	1

On peut observer que la couleur la plus intense a été obtenue dans le tube à essai où la valeur de pH était 9,8.

Influence des effecteurs sur les vitesses de réaction enzymatique

Les enzymes peuvent modifier leur activité catalytique en présence de divers composés dans le milieu réactionnel. Ces composés peuvent se lier soit au site actif, soit à d'autres résidus d'acides aminés de l'enzyme. Il en résulte une modification de la conformation de l'enzyme, ce qui peut altérer ou inhiber son activité enzymatique.

Dans le cas des métalloenzymes, l'ajout d'agents chélatants peut également affecter l'activité en se liant aux ions métalliques essentiels à leur structure et à leur fonction.

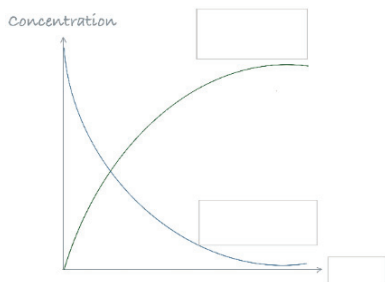
La phosphatase alcaline (ALP) contient des ions zinc (Zn^{2+}) comme cofacteurs. Lorsque l'EDTA est introduit, il chélate ces ions zinc, entraînant une diminution ou une perte d'activité enzymatique. La réaction colorimétrique utilisée pour évaluer cet effet implique la conversion, catalysée par l'ALP, du p-nitrophénylphosphate (p-NPP) en p-nitrophénol, un composé jaune dont l'intensité reflète l'activité de l'enzyme.

Réactifs, ml	Sans EDTA	Avec EDTA
pNPP 10 mM	1	1
Solution d'EDTA	-	0,20
H ₂ O	0,20	-
Solution d'ALP	0,20	0,20
Incuber à 37°C pendant 15 minutes		
NaOH 1M	1	1

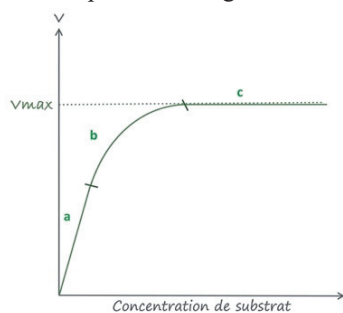
Sur la base des résultats obtenus, l'influence de l'EDTA sur l'activité de l'ALP sera commentée. Dans le tube à essai où l'EDTA était absent, la couleur jaune est plus intense que dans l'autre. Cela s'explique par le fait que l'EDTA a chélaté l'ion Zn, affectant ainsi l'activité enzymatique de l'ALP.

Questions

1. Complétez les cases dans l'image, et interprétez brièvement la figure

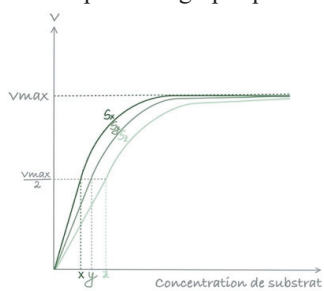


2. Interprétez la « région c » de la figure suivante.



3. Écrivez l'équation de Michaelis-Menten et expliquez la signification de K_M . Illustrez la représentation graphique de K_M et de V_{max} .

4. Interprétez le graphique suivant



5. Illustrez la représentation de Lineweaver-Burk.

6. Expliquez brièvement l'influence de la température, du pH et des effecteurs sur l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

L13. DOSAGE DES VITAMINES

Les vitamines sont des composés bioorganiques nécessaires en petites quantités pour maintenir les fonctions physiologiques normales du corps humain. La plupart des vitamines proviennent principalement de l'alimentation, comme les vitamines A, B₆, B₁₂, C, E, la thiamine, la riboflavine, l'acide folique et l'acide pantothénique. Certaines peuvent également être synthétisées de manière endogène, notamment la vitamine D et la niacine. De plus, la flore intestinale contribue à la production de vitamines, en particulier la vitamine K et la biotine.

Une grande proportion des vitamines agit comme cofacteurs enzymatiques, jouant des rôles essentiels dans des voies métaboliques vitales. Selon leur solubilité, les vitamines se divisent en deux grandes classes:

- Vitamines hydrosolubles: le groupe du complexe B (thiamine - B₁, riboflavine - B₂, niacine - B₃, acide pantothénique - B₅, pyridoxine - B₆, biotine - B₇, acide folique/folate - B₉, cobalamine - B₁₂) et la vitamine C.
- Vitamines liposolubles (dérivés isoprénoïdes): les vitamines A, D, E et K.

Les besoins quotidiens en vitamines sont très faibles. Lorsque l'apport est insuffisant, des perturbations métaboliques surviennent; dans les cas graves, la carence peut entraîner des conditions mettant la vie en danger. Le maintien de niveaux vitaminiques adéquats dépend d'une alimentation équilibrée ou, si nécessaire, d'une supplémentation par des préparations pharmaceutiques. Cependant, un apport excessif doit être évité, car des effets toxiques peuvent se développer, en particulier avec les vitamines liposolubles qui s'accumulent dans les réserves de l'organisme.

La carence comme l'excès peuvent être détectés par l'analyse en laboratoire des niveaux de vitamines dans le sang. En raison de leur complexité structurelle, les méthodes de dosage purement chimiques sont chronophages et peu pratiques. Par conséquent, dans la pratique moderne, elles sont généralement remplacées par des méthodes physico-chimiques de haute performance (par exemple, chromatographie, spectrométrie).

Vitamine C

La vitamine C, également connue sous le nom d'**acide ascorbique**, est une vitamine hydrosoluble essentielle à la santé humaine. Contrairement à de nombreux animaux, l'être humain ne peut pas synthétiser la vitamine C en raison de l'absence de l'enzyme *L-gulonolactone oxydase*. Pour cette raison, elle doit être obtenue exclusivement à partir de l'alimentation.

Sources

Les principales sources alimentaires de vitamine C sont les fruits et légumes frais. Les agrumes tels que les oranges, les citrons et les pamplemousses en sont particulièrement riches. D'autres sources importantes comprennent les baies, le kiwi, la goyave, les poivrons, les tomates, le brocoli, le chou et les épinards. Cependant, la vitamine C est sensible à la chaleur, à la lumière et au stockage prolongé, de sorte que sa teneur peut être réduite lors de la cuisson ou d'une exposition prolongée.

Absorption

Après ingestion, la vitamine C est absorbée principalement dans l'intestin grêle par transport actif et diffusion simple. Dans le sang, elle circule principalement sous forme libre. Étant hydrosoluble et non stockée en quantités significatives, les excès sont rapidement excrétés dans l'urine.

Rôles biologiques

La vitamine C joue plusieurs rôles biologiques cruciaux. Elle agit comme cofacteur pour les réactions d'hydroxylation, en particulier dans la synthèse du collagène, où elle est nécessaire à l'hydroxylation des résidus de proline et de lysine. Cela la rend vitale pour le maintien de l'intégrité du tissu conjonctif, la cicatrisation correcte des plaies et la santé osseuse. Elle fonctionne également comme un puissant antioxydant, neutralisant les radicaux libres et régénérant la vitamine E à partir de sa forme oxydée. La vitamine C soutient le système immunitaire en améliorant la fonction leucocytaire et la résistance aux infections. De plus, elle favorise l'absorption du fer dans l'intestin en réduisant le fer ferrique (Fe^{3+}) en forme ferreuse plus facilement absorbable (Fe^{2+}), et joue un rôle dans la synthèse des neurotransmetteurs, notamment la conversion de la dopamine en norépinéphrine.

Dose quotidienne

Le besoin quotidien en vitamine C chez l'adulte est d'environ **75-90 mg/jour**, avec des besoins plus élevés chez les fumeurs en raison d'un stress oxydatif accru. Une carence en vitamine C entraîne le **scorbut**, une condition caractérisée par de la fatigue, de l'irritabilité, des saignements des gencives, une cicatrisation altérée, des douleurs osseuses, des hémorragies périfolliculaires et une anémie due à une absorption altérée du fer. Dans les cas graves non traités, le scorbut peut être mortel.

Bien que la vitamine C soit généralement considérée comme sûre, un apport excessif peut provoquer des effets secondaires car les doses élevées dépassent la capacité d'absorption intestinale et d'excrétion rénale. Les symptômes courants d'un apport excessif comprennent des troubles gastro-intestinaux tels que la diarrhée et les nausées. Une surconsommation chronique peut également conduire à la formation de calculs rénaux en raison d'une excrétion accrue d'oxalate.

Titrez lentement avec la solution d'iode 0,005 M, en agitant la solution dans la fiole d'Erlenmeyer, en observant l'apparition d'une couleur bleue. Lorsque la couleur bleue persiste pendant 30 secondes, le titrage est arrêté, et le volume final de titrage est noté.

Partie 1 : Étalonnage - Détermination du volume de solution d'iode pour la solution étalon $V(\text{étalon})$

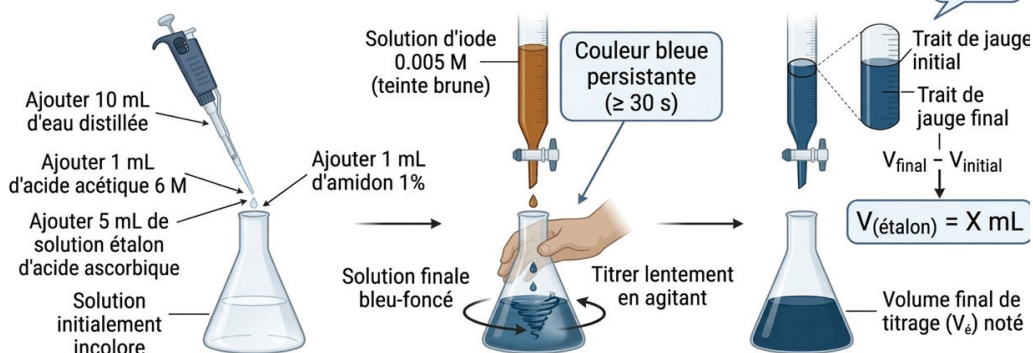


Figure 1. Détermination du volume de solution d'iode nécessaire au titrage d'une solution étalon d'acide ascorbique

2. Détermination du volume de solution d'iode nécessaire au titrage d'un échantillon d'acide ascorbique

a. Le jus frais obtenu à partir d'une orange est considéré comme le premier échantillon - solution A d'acide ascorbique (concentration inconnue)

b. Le jus d'orange du commerce est considéré comme le second échantillon - solution B d'acide ascorbique (concentration inconnue)

Ajoutez les solutions suivantes dans deux fioles d'Erlenmeyer:

- 10 mL d'eau distillée
- 1 mL de solution d'acide acétique 6 M
- 5 mL de solution d'acide ascorbique de concentration inconnue (A, respectivement B)
- 1 mL de solution d'amidon 1 %.

La procédure de titrage est similaire à celle de la solution étalon d'acide ascorbique. Les volumes obtenus sont notés: V_A et V_B .

Partie 2: Dosage des Échantillons

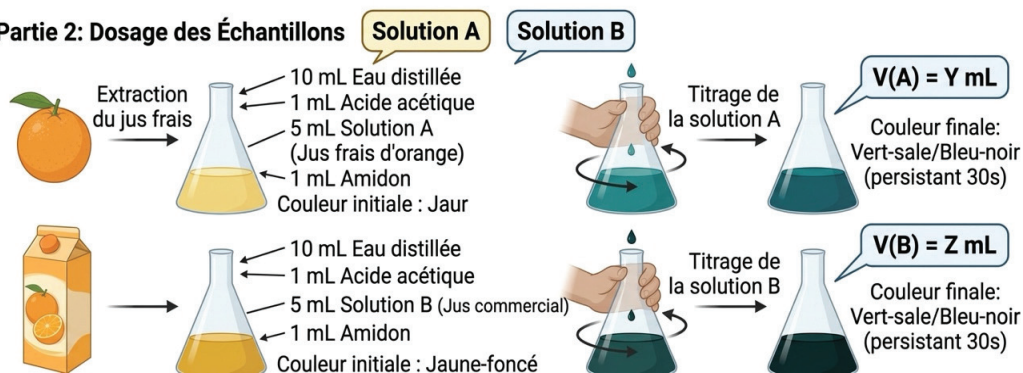


Figure 2. Détermination du volume de solution d'iode nécessaire au titrage d'un échantillon d'acide ascorbique

Calcul

La concentration en vitamine C des deux échantillons est calculée à l'aide des formules suivantes:

$$C_A(mg/ml) = \frac{V_A}{V_{std}} \times 100$$

$$C_B(mg/ml) = \frac{V_B}{V_{std}} \times 100$$

Questions

1. Quelles sont les principales vitamines hydrosolubles et liposolubles ?
2. Nommez les « vitamines » qui peuvent être synthétisées par l'organisme humain.
3. Présentez brièvement les principaux rôles de la vitamine C.
4. Expliquez brièvement le dosage de la vitamine C dans un jus par titrage.
5. Quel est le rôle de l'amidon dans l'expérience que vous avez réalisée ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance de travaux pratiques.

RÉFÉRENCES

1. Anghel A, Şeclăman E, Tămaş L, Motoc M, Şişu E, Kaycsa A, David D, Sîrbu IO, Marian C, Samoilă C, Grecu D, Sfrijan F, Georgescu A, Marcu A, Buzatu R, Bonţe D, Gurban C, Alexa A, Bujor G, Mărieş L, Mihala A, Sala-Cîrtog M, Practical works of medical chemistry and biochemistry for medical students, Victor Babeş Publishing House, 2019.
2. Anghel A, Kaycsa A, Tămaş L, Georgescu A, Marcu A, Buzatu R, Mihala A, Sala-Cîrtog M, Moatăr A, Chiş A, Practical works on pharmaceutical biochemistry, Victor Babeş Publishing House, 2019.
3. Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, Radnai L, Reményi A, Venekei I. Introduction to practical biochemistry. Eötvös Loránd University. 2013.
4. Devlin TM, editor. Textbook of biochemistry with clinical correlations. John Wiley & Sons; 2010.
5. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, and Correlations. The Netherlands: Wolters Kluwer; 2018.
6. Meisenberg G, Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry E-Book: Principles of Medical Biochemistry E-Book. Elsevier Health Sciences; 2016.
7. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer L, Biochemistry, 9th Edition, 2019
8. Ciaccio M, editor. Clinical and laboratory medicine textbook. Springer Nature, 2024.
9. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2017
10. Murphy M, Srivastava R, Deans K. Clinical biochemistry: an illustrated colour text. 7th ed. Elsevier; 2023.
11. Ahmed N, editor. Clinical biochemistry. 3rd ed. Oxford University Press (Fundamentals of Biomedical Science); 2025.
12. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM. Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. 3rd ed. Elsevier; 2014.
13. Rifai N, Chiu RWK, Young I, Wittwer CT. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. 9th ed. Elsevier; 2024.