**Module : Techniques de laboratoire et méthodologie de recherche**

**I/ Module de techniques de laboratoire**

***Chapitre I* : Généralités sur la Verrerie usuelle utilisée au laboratoire de biotechnologie. (voir TP réalisé)**

La verrerie usuelle de laboratoire rassemble tous les récipients et ustensiles nécessaires à vos expériences de chimie, biochimie et biologie. La qualité de verre est un élément important dans le choix de votre matériel de laboratoire, elle doit s'adapter à vos exigences en termes de résistance à la chaleur et aux chocs.

Pour un usage intensif, il est conseillé d'opter pour de la verrerie de marque « Pyrex » ou « Duran » ou labélisée Usage Intensif (UI). Les béchers, erlenmeyers, cristallisoirs, tubes à essais, sont disponibles en différentes qualités de verre ou plastique et dans une large gamme de contenances pour s'adapter aux mieux aux usages choisis.

* 1. **: définitions et mode de fonctionnement du spectrophotomètre. (voir TP réalisé)**



**Schémas de spectrophotomètre**

**Un spectrophotomètre** est un appareil qui permet de mesurer l'[absorbance](https://fr.wikipedia.org/wiki/Absorbance) d'une [solution](https://fr.wikipedia.org/wiki/Solution_%28chimie%29) à une [longueur d'onde](https://fr.wikipedia.org/wiki/Longueur_d%27onde) donnée ou sur une région donnée du [spectre](https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectre_visible).

IL sert à mesurer la capacité d’une substance ou d’un milieu à absorber la lumière qui la traverse. IL est utilisé en médecine, en chimie et en biologie.

La spectrophotométrie est une méthode d'analyse qui permet de déterminer l'absorbance d'une [substance chimique](http://www.futura-sciences.com/sciences/dossiers/chimie-detox-dangers-produits-chimiques-notre-quotidien-535/page/2/) en solution, c'est-à-dire sa capacité à absorber la [lumière](http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-lumiere-326/) qui la traverse.

**L'absorbance ou densité optique** d'une substance chimique dépend de la nature et de la concentration de cette substance ainsi que de la [longueur d'onde](http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-longueur-onde-4575/) à laquelle on l'étudie.

**Principe de la spectrophotométrie**

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une [longueur d’onde](http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/biologie-vision-viennent-superpouvoirs-superman-1566/page/2/) donnée. Dans la pratique, l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière après son passage au travers d'une cuve contenant la solution à étudier. L'intensité de la lumière monochromatique (se dit d’une lumière composée d’une seule couleur) émise est connue. À partir de la mesure de l'intensité de la lumière transmise, l'appareil donne l'absorbance.

L'**absorbance** mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. On utilise aussi les termes densité optique, opacité selon les domaines avec des expressions mathématiques qui diffèrent légèrement.

 Selon la [loi de Beer-Lambert](https://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_de_Beer-Lambert), l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration.

-Le spectrophotomètre UV-visible (UV : ultraviolet) comprend :

* une source ou des sources de lumière
	+ La lampe UV est généralement de type deutérium (domaine de 195 à 380 nm, durée de vie de la lampe de 1 000 h, par exemple).
	+ La lampe visible est généralement de type halogène (domaine de 320 à 1 000 nm, durée de vie de 500 h, par exemple).
	+ Il existe également des spectrophotomètres à lampe xénon  (domaine de 190 à 1 100 nm)
* Un monochromateur formé d'un réseau diffractant la lumière de la source permet de sélectionner la longueur d'onde de la lumière qui traversera la solution à doser
* une fente de largeur fixe ou variable pour régler la bande passante
* un porte-cuvette pouvant permettre le maintien à température souhaitée de la solution à analyser, cette température est maintenue par un circuit d'eau. Ce maintien à température fixée est très utile dans les mesures de cinétique enzymatique, en effet, la vitesse de réaction dépend de la température
* une cuvette transparente dans laquelle on place la solution à étudier. Suivant la qualité et la quantité d'échantillon, il existe différentes cuvettes, généralement en plastique (spectre visible, UV proche) ou en quartz (UV, mais cuvettes très chères).

Il est obligatoire de réaliser un « blanc » ou témoin de compensation, c'est-à-dire une mise à zéro du dispositif (tarer), en ne plaçant que le solvant et le(s) réactif(s) utilisés dans la cuvette, avant la mesure de la cuvette contenant l'échantillon, et ce pour chaque longueur d'onde étudiée.
Les modèles de recherche sont généralement à double faisceau et utilisent deux cuvettes, la cuvette de référence contenant le solvant et le(s) réactif(s), et la cuvette contenant l'échantillon. Le liquide de la cuvette de référence est alors soustrait automatiquement (fonction auto-zéro).

 **1-2 : L’équipement du laboratoire de biologie, chimie et de médecine doit être labellisé**

Définition d’un label :

Étiquette ou marque spéciale créée par un syndicat professionnel ou un organisme parapublic et apposée (appliquée) sur un produit destiné à la vente, pour en certifier l'origine, la qualité et les conditions de fabrication en conformité avec des normes préétablies. (On dit aussi label de qualité)

II**/ Techniques de dosages par spectrophotométrie**

**2-1** **: techniques de Dosage des chlorophylles**

Il a été effectué selon la méthode de Mackinney (1941) qui consiste à l’extraction de 1g du végétal dans un mortier avec 25 ml d’acétone à 80%, filtré avec un papier Whatman puis mis dans une cuve en verre. La lecture des densités optiques est réalisée au spectrophotomètre à 2 longueurs d’onde λ1=663 nm et λ2=645 nm après étalonnage de l’appareil (Arnon, 1949).

Les teneurs en chlorophylles (a), (b), (a+b) et (a/b) sont données à partir de ces formules et exprimées en µg/g MF.

chl(a) = 12,7Do663 – 2,69Do645

chl(b)= 22,5Do645 – 4,68Do663

chl(a+b)= 8,02Do663 + 20,20Do645

Do: densité optique.

**2-2**: **techniques de Dosage des protéines totales**

La méthode utilisée est celle de Bradford (1976) qui utilise le BSA (Bovine Serum Albumine). On prend 100 mg d’échantillon dans un mortier, auxquels on ajoute 5 ml d’eau distillée. Après filtration, on met la solution dans un tube à essais avec 5 ml d’eau distillée.

Préparation du réactif de Bradford :

On mélange 100 mg de BBC (Bleu brillant de Coomassie) à 50 ml d’éthanol à 95%. On agite pendant 2 heures. On ajoute 100 ml d’acide orthophosphorique à 85%, puis de l’eau distillée pour arriver à 1000 ml. Le tout est conservé dans un flacon sombre au réfrigérateur. On prend 0,2 ml du réactif que l’on ajoute à 0,2 ml de la solution à analyser et 1,6 ml d’eau distillée. Le tout est agité au Vortex.

L’étalonnage de l’appareil s’effectue en prenant 0,2 ml du réactif + 1,8 ml d’eau distillée. Après 5 min à 1 heure de temps, on mesure la densité optique (DO) à l’aide d’un spectrophotomètre à une longueur d’onde de 595 nm. La quantité de protéines totales est déterminée à partir de l’équation :

Y= 0,011X-0,005

X : Est la quantité de protéines totales en (µg/mg MF).

Y : Est la densité optique.

**2-3 : techniques de Dosage de la proline**

 La proline est quantifiée selon la technique de Troll et Lindsley (1955) simplifiée et mise au point par Dreier (1973) et modifiée par Monneveux et Nemmar (1986). Des prélèvements de 100 mg de matière fraîche sont effectués. Ces échantillons sont placés dans des tubes à essai, auxquels on ajoute 2 ml de méthanol à 40%. On chauffe au bain marie à 85°C pendant 60 mn et pour éviter la volatilisation de l’alcool, les tubes sont couverts de papier aluminium pendant le chauffage. Après refroidissement, on prélève 1 ml de l’extrait auquel on ajoute 1 ml d’acide acétique, 80 ml d’acide orthophosphorique (H3PO4) de densité 1,7) et de la ninhydrine (25 mg/échantillon). Le mélange est porté à ébullition durant 30 mn. La solution vire au rouge. Le tout est refroidi, et on rajoute 5 ml de toluène par échantillon. Deux phases se séparent après agitation, la phase supérieure qui contient la proline et la phase inférieure sans. Après avoir récupéré la phase supérieure, on ajoute du Na2SO4 à l’aide d’une spatule pour éliminer l’eau qu’elle contient. On procède enfin à la détermination des densités optiques des échantillons à l’aide d’un spectrophotomètre réglé sur une longueur d’onde de 528 nm. La lecture finale se fait après étalonnage. Les quantités de proline sont calculées d’après l’équation suivante :

Y= 0,00368X - 0,108.

X : Est la quantité de proline en (µg/mg MF).

Y : Est la densité optique.

Les valeurs sont exprimées en µg/mg MF.

***2-4 :* techniques *de* Dosage des sucres solubles**

Le dosage des sucres solubles a été réalisé selon la méthode de (Schields et Burnett 1960), elle est aussi dite méthode à l’anthrone en milieu sulfurique. L’extraction des sucres solubles se fait après macération du végétal dans l’éthanol (3 ml) à 80% pendant 48 heures. Après chauffage au bain marie à 70°C pendant 30 mn, la solution à l’anthrone est préparée 4 heures avant les dosages avec les proportions suivantes : 0,2 g d’anthrone dans 100 ml d’acide sulfurique.

Le réactif (4 ml) est ajouté à 2 ml de la solution à analyser et le tout est maintenu à 0°C dans de la glace pendant l’opération. Après agitation, les tubes sont mis au bain marie à 90°C pendant 8 mn puis refroidis pendant 30 mn dans de la glace. L’absorbance est alors lue au spectrophotomètre à une longueur d’onde de 585 nm.

La lecture se fait d’après la courbe d'étalonnage établie avant le dosage.

Y= 0,0035x - 0,025

X : Est la quantité de sucres solubles en (µg/mg MF).

Y : Est la densité optique.

Les résultats sont exprimés en µg/mg MF.

**.**