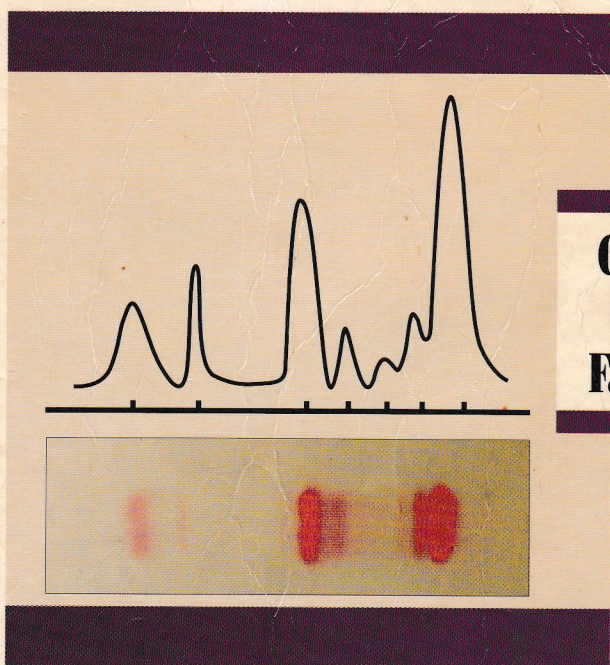


BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Principes des méthodes d'analyse biochimique

Tome I



**Cl. Audigié
G. Dupont
F. Zonszain**

nouvelle édition

doin

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Principes des méthodes d'analyse biochimique

Tome I

Cette nouvelle édition entièrement réactualisée et complétée apportera au technicien biochimiste la connaissance des concepts scientifiques qui lui permettront de comprendre les analyses qu'il pratique et les appareils qu'il utilise.

- Complet, ce livre a été écrit par un physicien et deux biochimistes, de façon à recouvrir les aspects physico-chimiques et biologiques de l'analyse biochimique.
- Simple, il aidera à la préparation aux examens : baccalauréat technologique F7 et F7', classe préparatoire TB', BTS d'analyse biologique, biochimie et biotechnologie, ainsi qu'au DUT de biologie appliquée.

Cl. Audigé
G. Dupont
F. Zonszain



9 782704 007479

ISBN : 2-7040-0747-0

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. UNITÉS UTILISÉES EN ANALYSE BIOCHIMIQUE	1
1. Rappel des unités de base du système international	1
1.1. Unité de longueur : le mètre (m)	1
1.2. Unité de masse : le kilogramme (kg)	1
1.3. Quantité de substance : la mole (mol)	1
1.4. Température : le kelvin (K).....	1
1.5. Temps : la seconde (s)	1
1.6. Courant électrique : l'ampère (A)	2
1.7. Intensité lumineuse : la candela (cd).....	2
2. Unités dérivées portant un nom spécial	2
2.1. Volume	2
2.2. Force : le newton (N)	2
2.3. Pression : le pascal (Pa)	2
2.4. Énergie et puissance.....	2
2.5. Température Celsius : degré Celsius (°C)	3
2.6. Tension superficielle : le newton par mètre (N.m ⁻¹)	3
2.7. Viscosité dynamique : le pascal-seconde (Pa.s)	3
2.8. Activité (rayonnements ionisants) : le becquerel (Bq).....	3
2.9. Dose absorbée : le gray (Gy)	3
2.10. Exposition (rayons X et γ) : le coulomb par kg (C.kg ⁻¹).....	3
3. Autres unités dérivées souvent utilisées en biochimie	4
3.1. Concentrations.....	4
3.2. Coefficients d'absorbance (ou coefficients d'extinction)	4
3.3. Pouvoir rotatoire spécifique.....	6
3.4. Unité internationale d'enzyme	6
 CHAPITRE II. MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT	 7
III. Filtration	7
1. Matériel : les filtres	7
1.1. Les filtres d'épaisseur.....	7
1.2. Les filtres membranes.....	8
2. Méthodes de filtration au laboratoire.....	8
2.1. Filtration gravimétrique.....	8
2.2. Filtration sous vide	8
2.3. Filtration sous pression	9
3. Applications de la filtration	10

II.2. Sédimentation (centrifugation et ultracentrifugation)	11
1. Étude théorique	11
1.1. Sédimentation sous l'effet de la pesanteur	11
1.2. Centrifugation	12
2. Appareillage	14
2.1. Centrifugeurs horizontaux	14
2.2. Centrifugeurs obliques	14
2.3. Conditions d'utilisation d'un centrifugeur	15
2.4. Mesure de la vitesse de sédimentation (ultracentrifugation)	16
3. Applications	18
3.1. Détermination d'une constante de sédimentation	18
3.2. Détermination d'une masse moléculaire	18
3.3. Séparation d'un mélange	18
3.4. Vérification de la pureté d'un extrait macromoléculaire	18
3.5. Analyse quantitative	18
4. Centrifugation en gradient de densité	19
II.3. Dialyse et électrodialyse	20
1. Étude théorique de la dialyse	20
1.1. Le phénomène de diffusion libre	20
1.2. Diffusion à travers une membrane	21
1.3. Osmose	22
1.4. Le coefficient de dialyse	23
2. Appareillage	23
2.1. Le dialyseur de Graham	23
2.2. Le dialyseur de Monod	23
3. Électrodialyse	24
II.4. Électrophorèse	25
1. Généralités	25
1.1. Définition	25
1.2. Mobilité électrophorétique en milieu liquide	25
1.3. Mobilité apparente d'une macromolécule en électrophorèse sur support	26
2. Électrophorèse des protéines sériques sur bandes d'acétate de cellulose	28
2.1. Principe	28
2.2. Description sommaire de la technique	29
2.3. Analyse des résultats	29
2.4. Révélation spécifiques	30
3. Immunoélectrophorèse	32
3.1. L'immunoélectrophorèse unidimensionnelle	32
3.2. L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle	33
3.3. Électroimmunoquantification des protéines	33
4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	34
4.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide	34
4.2. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS Sodium Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE)	37

TABLE DES MATIÈRES

5.	Électrophorèse en gel d'agarose	37
6.	Électrofocalisation	38
7.	L'électrophorèse capillaire haute performance	39
7.1.	Principes généraux	39
7.2.	L'électrophorèse capillaire de zones	42
7.3.	Les autres techniques d'électrophorèse capillaire haute performance	43
5.	Chromatographie	44
1.	Généralités	44
1.1.	Définition	44
1.2.	Les différents types de chromatographie	45
2.	Chromatographie de partage	46
2.1.	Principe	46
2.2.	Technologie de la chromatographie de partage	50
2.3.	Analyse des fractions	51
3.	Chromatographie d'adsorption	51
3.1.	Principe	51
3.2.	Éléments de la chromatographie d'adsorption	53
4.	La chromatographie en phase inversée	56
5.	Chromatographie par échange d'ions	57
5.1.	Définition	57
5.2.	Propriétés des échangeurs d'ions	57
5.3.	La réaction d'échanges d'ions	59
5.4.	Les différentes étapes d'une chromatographie sur échangeur d'ions	60
5.5.	Les polysides chargés : celluloses et dextrans (SEPHADEX)	61
5.6.	Applications de la chromatographie par échanges d'ions	62
6.	Gel-filtration (ou chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire)	62
6.1.	Principe	62
6.2.	Les gels	63
6.3.	Étude théorique de la gel-filtration	64
6.4.	Technique du tamisage moléculaire	65
6.5.	Applications	67
7.	Chromatographie d'affinité	67
7.1.	Principe	67
7.2.	La phase stationnaire : le gel d'affinité	68
7.3.	Les effecteurs	69
7.4.	Rôle des différents facteurs	69
7.5.	Applications de la chromatographie d'affinité	71
8.	La chromatographie liquide haute performance HPLC (en anglais), CLHP (en français)	71
8.1.	Généralités	71
8.2.	Analyse et traitement des signaux	72
8.3.	Technologie	74
8.4.	Les principales phases d'une HPLC	77
8.5.	Applications	79
9.	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	80
9.1.	Généralités	80
9.2.	Principe de la chromatographie en phase gazeuse	81

9.3. Technologie.....	83
9.4. Exploitation des résultats.....	84
9.5. Domaine d'application de la CPG.....	84
CHAPITRE III. MÉTHODES OPTIQUES.....	85
III.1. Photométrie.....	86
1. Généralités.....	86
1.1. Ensemble des radiations électromagnétiques.....	86
1.2. Différents types d'interaction avec la matière.....	88
1.3. Analyse des spectres.....	90
2. Spectroscopie d'émission ; émission atomique.....	100
2.1. Principaux types d'excitation.....	100
2.2. Le laser.....	101
2.3. Différents types de spectres d'émission.....	103
2.4. Mécanisme de l'émission atomique : énergie électronique.....	104
2.5. Photométrie d'émission atomique.....	106
3. Absorption moléculaire visible.....	110
3.1. Mise en évidence de l'absorption.....	111
3.2. Loi quantitative : loi de Beer-Lambert.....	111
3.3. Différents appareillages.....	113
3.4. Principe des dosages.....	118
4. Photométrie des milieux troubles.....	123
4.1. Généralités sur la diffusion.....	123
4.2. Techniques expérimentales.....	124
III.2. Polarimétrie.....	127
1. Nature vibratoire de la lumière.....	127
1.1. Lumière naturelle.....	127
1.2. Lumière polarisée.....	127
1.3. Polariseurs.....	129
1.4. Pouvoir rotatoire.....	132
1.5. Origine du pouvoir rotatoire.....	134
2. Mesure du pouvoir rotatoire : polarimètres.....	138
2.1. Polarimètres visuels.....	138
2.2. Polarimètres photométriques.....	140
2.3. Applications.....	142
III.3. Réfractométrie.....	143
1. Définition de l'indice de réfraction d'une substance.....	143
2. Facteurs principaux dont dépend l'indice de réfraction.....	144
2.1. Température.....	144
2.2. Pression.....	144
2.3. Longueur d'onde.....	144
2.4. Cas des solutions.....	145
3. Réfraction.....	146

TABLE DES MATIÈRES

3.1.	Généralités	146
3.2.	Réflexion totale	146
3.3.	Réfraction limite.....	146
3.4.	Cas d'un milieu hétérogène.....	147
4.	Mesure de l'indice de réfraction.....	147
4.1.	Généralités	147
4.2.	Réfractomètres type Abbe	149
4.3.	Réfractomètres différentiels	151
5.	Applications.....	152
5.1.	Réfractométrie simple	152
5.2.	Réfractométrie différentielle	152
CHAPITRE IV. MÉTHODES POTENTIOMÉTRIQUES		153
IV.1. Potentiométrie		154
1.	Potentiel redox	154
1.1.	Expérience fondamentale.....	154
1.2.	Potentiel absolu : électrodes de référence	155
1.3.	Relation de Nernst	156
1.4.	Électrodes ioniques	157
1.5.	Applications : prévision des réactions d'oxydo-réduction.....	157
2.	Dosages potentiométriques	158
2.1.	Généralités sur les dosages potentiométriques.....	158
2.2.	Détermination du point d'équivalence	159
2.3.	Dosages potentiométriques d'oxydo-réduction.....	161
2.4.	Dosage potentiométrique par précipitation.....	163
IV.2. pHmétrie		165
1.	Définition du pH.....	165
2.	Mesure du pH.....	166
2.1.	Méthode colorimétrique.....	166
2.2.	Méthode potentiométrique	166
3.	Dosages protométriques	169
3.1.	Acide fort - base forte : acide chlorhydrique par la soude	169
3.2.	Acide faible - base forte : acide acétique par la soude.....	170
3.3.	Dosage d'acide aminé : dosage de la glycine par la soude.....	171
CHAPITRE V. ANALYSE ENZYMATIQUE		173
1.	Notions d'enzymologie générale.....	173
1.1.	Définition et caractères généraux des enzymes	173
1.2.	Cinétique enzymatique	177
1.3.	Facteurs physiques et physico-chimiques affectant la réaction enzymatique	183
1.4.	Effecteurs d'enzymes	185
1.5.	Coenzymes	192

TABLE DES MATIÈRES

2. Mesure de l'activité des enzymes	197
2.1. Méthodes de détermination de l'activité d'une enzyme	197
2.2. Conditions de mesure de l'activité	198
2.3. Dosage des produits	200
2.4. Unités enzymatiques	200
2.5. Méthodes cinétiques.....	200
3. Dosage des substrats par voie enzymatique : les dosages enzymatiques	203
3.1. Les différentes méthodes de dosages enzymatiques	203
3.2. Les réactions indicatrices.....	206