

CHAPITRE 2

ANALYSE DU PROTOCOLE & PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET MILIEUX

Objectifs :

- Analyser un protocole pour identifier les réactifs et estimer les quantités.
- Choisir le matériel adapté en intégrant une démarche RSE.
- Reconstituer les réactifs et préparer les milieux selon la fiche technique.
- Appliquer les modes opératoires et assurer la traçabilité.

Avant même de mettre une pipette en main, la qualité d'une expérience scientifique se joue dans une étape clé : **la préparation minutieuse des réactifs et des milieux**. C'est à ce moment que l'on transforme un protocole écrit en une réalité concrète, capable de fournir des résultats fiables et reproductibles.

Dans ce chapitre, vous allez apprendre à **décoder un protocole expérimental** : repérer l'objectif, identifier un à un les **réactifs nécessaires**, puis **calculer les quantités exactes à préparer**. Vous verrez comment **sélectionner le matériel adapté** tout en intégrant une démarche de **Responsabilité Sociétale des Entreprises (RSE)**, en limitant les déchets, en choisissant du matériel réutilisable et en réduisant l'empreinte environnementale.

Vous étudierez ensuite la **reconstitution des réactifs à partir de leur fiche technique, la préparation des milieux de culture ou réactionnels**, et l'application rigoureuse des **modes opératoires et procédures internes** pour assurer sécurité et traçabilité.

Cette progression vous donnera les réflexes indispensables pour préparer chaque expérience de manière sûre, économique et durable, garantissant la **fiabilité des analyses biologiques** et la protection de votre environnement de travail.

ANALYSER UN PROTOCOLE POUR IDENTIFIER LES RÉACTIFS ET ESTIMER LES QUANTITÉS

Avant de peser un gramme ou de prélever une goutte, il faut **transformer le protocole écrit en plan d'action précis**. Cette étape garantit la fiabilité de l'expérience et évite les imprévus. Voici une méthode détaillée, expliquée pas à pas.

1 COMPRENDRE LE PROTOCOLE DANS SON ENSEMBLE

Commencez par **lire entièrement le protocole**, sans sauter de section. Demandez-vous :

- **Quel est l'objectif final ?** S'agit-il d'un dosage, de la préparation d'un milieu, d'une mise en culture ?
- **Quel volume ou quelle quantité finale faut-il obtenir ?** Tenez compte du nombre d'échantillons, des contrôles positifs ou négatifs et des répétitions prévues (réplicats).
- **Quelles contraintes techniques sont indiquées ?** Par exemple, une température spécifique, un pH précis, ou une obligation de stérilisation (par filtration ou autoclave). Identifier ces informations vous évitera d'oublier un détail essentiel, comme un temps de repos ou un ordre d'ajout particulier.

2 DRESSER LA LISTE COMPLÈTE DES RÉACTIFS

Reprenez le protocole ligne par ligne pour **repérer tous les produits**. Pour chacun, notez :

- Le **nom exact** (nom chimique ou biologique) et la **forme** (poudre, solution concentrée, lyophilisée...).
- La **qualité ou le grade** (par exemple « pour biologie moléculaire »), gage d'absence d'impuretés.
- La **concentration** indiquée (ex. « solution 10X » qui devra être diluée en 1X).
- Les **conditions de stockage** (réfrigérateur, congélateur, à l'abri de la lumière) et la **date de péremption**.
- Les **dangers CLP** (pictogrammes et mentions H/EUH) afin d'anticiper les protections nécessaires (*cf. Risques professionnels au poste de travail*)

Ajoutez à cette liste les **consommables** (cônes, tubes, filtres) et les **équipements** (balance, pH-mètre, hotte ou sorbonne).

Cette étape est cruciale pour la **traçabilité** : vous devez pouvoir prouver, même plusieurs semaines plus tard, quel lot de produit a été utilisé et dans quelles conditions.

3 CALCULER LE VOLUME TOTAL À PRÉPARER

Déterminez le **volume global** nécessaire en tenant compte de :

- Tous les échantillons et contrôles.
- Les *réplicats* (répétitions destinées à fiabiliser le résultat).
- Une **marge de sécurité** de 10 % pour compenser les pertes (gouttes restantes dans les cônes ou sur les parois).

Par exemple, si vous devez préparer 12 échantillons et 2 contrôles à raison de 4 mL par tube, avec deux réplicats, le volume final sera :

$$14 \text{ tubes} \times 4 \text{ mL} \times 2 = 112 \text{ mL.}$$

Ajoutez 10 % pour les pertes : environ 125 mL à préparer.

4 DÉTERMINER LES QUANTITÉS EXACTES DE CHAQUE RÉACTIF

Une fois le **volume total** à préparer connu, il faut calculer **combien de chaque produit** utiliser. La méthode dépend de la **forme du réactif** : poudre solide, solution concentrée, ou liquide pur à diluer.

Si le réactif est une poudre

On prépare une solution à une **concentration donnée** (exprimée en moles par litre, ou en % masse/volume).

Formule générale :

$$m = C \times V \times M$$

m : masse à peser (g)

C : concentration désirée ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

V : volume final (L)

M : masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Exemple : préparer 200 mL d'une solution de NaCl 0,5 M ($M = 58,44 \text{ g/mol}$)

$$m = 0,5 \times 0,200 \times 58,44 = \mathbf{5,84 \text{ g}} \text{ de NaCl.}$$

Pour un pourcentage masse/volume (% m/V) :

% m/V signifie « grammes pour 100 mL ».

Ex. : 2 % m/V \rightarrow 2 g pour 100 mL.

Pour 250 mL à 2 %, pesez $2 \times (250 \div 100) = \mathbf{5 \text{ g}}$.

Si le réactif est une solution concentrée à diluer

Quand on part d'une solution mère (*stock*) plus concentrée que la solution finale.

Formule de dilution :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁ : concentration de la solution stock

V₁ : volume de stock à prélever

C₂ : concentration finale voulue

V₂ : volume final désiré

Exemple : préparer 500 mL d'un tampon 1X à partir d'un stock 10X

$$V_1 = (C_2 \times V_2) \div C_1 = (1 \times 500) \div 10 = \mathbf{50 \text{ mL}}$$
 de stock

Compléter avec de l'eau : 500 – 50 = **450 mL**

Si le réactif est un liquide pur (solvant, acide, alcool)

On doit calculer le volume ou la masse de ce liquide pur pour obtenir la concentration souhaitée, en tenant compte de sa **densité** (ρ , en g/mL) et de sa **pureté**.

DÉFINITION

> **Densité (ρ)** : c'est la **masse d'un volume donné de liquide**, exprimée en grammes par millilitre (g/mL). Par exemple, une densité de 1,05 g/mL signifie que chaque millilitre de ce liquide pèse 1,05 gramme, ce qui permet de convertir facilement une masse en volume ou inversement.

> **Pureté** : c'est le **pourcentage de substance active réellement présent** dans un produit par rapport à sa masse totale. Ainsi, une solution d'acide acétique à 99 % contient 99 grammes d'acide pur pour 100 grammes de produit commercial.

• Si on veut un pourcentage volume/volume (% v/v) :

% v/v = mL de solvant pur pour 100 mL de solution finale.

Exemple : préparer 100 mL d'éthanol 70 % à partir d'éthanol 96 %

$$V_1 = (70 \times 100) \div 96 = \approx \mathbf{73 \text{ mL}}$$
 d'éthanol 96 %

Compléter avec de l'eau q.s.p. (*quantum satis pro*)¹ 100 mL.

¹ q.s.p. (*quantum satis pro*) signifie « quantité suffisante pour ».

Sur une recette de solution, cela indique qu'il faut compléter avec le solvant jusqu'au volume final exact indiqué (ex. « eau q.s.p. 100 mL » = ajouter de l'eau jusqu'à 100 mL).

Si on veut une concentration molaire à partir d'un liquide pur :

1. Calculer la **masse nécessaire** avec $m = C \times V \times M$.
2. Convertir cette masse en **volume** avec la densité :

$$\text{Volume}(mL) = \frac{m(g)}{\rho(g/mL)}$$

Exemple : acide acétique glacial ($M = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho \approx 1,05 \text{ g/mL}$)

Pour 1 L à 0,5 M :

$$\begin{array}{|l} m = 0,5 \times 1 \times 60,05 = \mathbf{30 \text{ g}} \\ \text{Volume pur} = 30 \div 1,05 \approx \mathbf{28,6 \text{ mL}}. \end{array}$$

Réactifs exprimés dans d'autres unités

Certains protocoles utilisent :

- **mg/mL**

Cela signifie **milligrammes de substance par millilitre de solution**.

Si on doit préparer 50 mL d'une solution à 2 mg/mL, il faut que chaque millilitre contienne 2 mg. Donc quantité totale = 2 mg \times 50 mL = 100 mg de produit.

- **g/L**

Cela signifie **grammes de substance par litre de solution**.

1 g/L est équivalent à **1 mg/mL** car 1 litre = 1000 mL.

Exemple : 3 g/L pour 2 litres $\rightarrow 3 \times 2 = 6 \text{ g}$ de produit.

- **Unités d'activité enzymatique (U)**

Pour certaines enzymes, on ne parle pas en grammes mais en **activité**.

1 U (unité) = quantité d'enzyme qui catalyse une réaction définie (par exemple transformer 1 micromole de substrat par minute).

La fiche technique précise combien d'unités utiliser, par exemple « ajouter 5 U par réaction ». Il faut donc lire l'étiquette pour savoir combien d'unités contient 1 mL de votre stock afin de prélever le bon volume.

CONSEILS PRATIQUES

- **Toujours dissoudre dans un volume d'eau légèrement inférieur** au volume final, puis compléter qsp à la fin (cela évite de dépasser le volume).
- **Mélanger progressivement** : certains sels dégagent de la chaleur (dissolution exothermique).
- Vérifier le **pH** et ajuster avec acide ou base dilués.
- Noter sur votre cahier : date, lot, masse ou volume exact, et vos initiales pour assurer la **traçabilité**.

À RETENIR

- **Solide** → $m = C \times V \times M$
- **Solution stock** → $C_1 V_1 = C_2 V_2$
- **Liquide pur** → calcul de masse puis volume via la densité, ou % v/v.

Toujours finir en complétant au volume final après dissolution et contrôle du pH.

CHOISIR LE MATÉRIEL ADAPTÉ... EN INTÉGRANT UNE DÉMARCHÉ RSE

L'objectif est double : **assurer la qualité et la sécurité de la préparation** (exactitude des volumes, absence de contamination, conformité au protocole) **tout en réduisant l'impact environnemental** (démarche RSE : Responsabilité Sociétale des Entreprises). Voici une méthode très guidée.

1 CE QUE VOUS DEVEZ GARANTIR AVANT TOUT

- **La justesse et la précision** des volumes/masse mesurés (qualité analytique).
- La **compatibilité** chimique et biologique (le matériel ne doit ni se dissoudre, ni relarguer des composés, ni contaminer la préparation).
- La **sécurité** de l'opérateur et des échantillons (EPI, dispositifs de protection, matériel en bon état).
- La **sobriété** en ressources (moins de plastique/énergie, bon tri des déchets, achats responsables).

DÉFINITION

- > **Justesse** : valeur mesurée proche de la vraie valeur.
- > **Précision** : répétabilité des mesures (peu de dispersion).
- > **Compatibilité** : capacité d'un matériau à ne pas réagir avec le réactif.

2 INSTRUMENTS DE MESURE ET DE DISTRIBUTION

Pour réussir une préparation, il faut **mesurer et distribuer les réactifs avec exactitude**. Chaque type d'instrument a un rôle précis et doit être choisi en fonction de la **précision recherchée et du volume à manipuler**.

Balances de précision

La balance est indispensable pour peser les réactifs solides.

Quelle balance choisir ?

- **0,1 g** : pour des pesées courantes comme plusieurs grammes de sel.
- **0,01 g ou 0,001 g** : pour de petites quantités ou des solutions très concentrées.

Bon usage : laisser la balance se stabiliser, éviter les courants d'air, toujours appuyer sur la touche tare après avoir posé le récipient pour remettre l'affichage à zéro.

Écogeste : l'éteindre après utilisation et l'entretenir prolonge sa durée de vie et réduit la consommation d'énergie.

Fioles jaugées

Une fiole jaugée permet de **préparer un volume de solution exactement défini**.

Elle possède un trait de jauge unique sur le col : on ajoute le solvant jusqu'à ce que le bas du ménisque (surface courbe du liquide) atteigne ce trait.

Cette précision est idéale pour la préparation de solutions mères ou de dilutions à concentration connue.

En démarche RSE, on privilégie les fioles en verre borosilicate, lavables et réutilisables.

Pipettes jaugées et graduées

Les **pipettes jaugées** délivrent un volume unique avec une grande précision (par exemple 10 mL pile).

Les **pipettes graduées**, elles, possèdent une échelle et permettent de mesurer différents volumes avec une précision un peu moindre.

Pour les deux, on lit toujours le volume à hauteur des yeux, au bas du ménisque, pour éviter une erreur de parallaxe.

Ces pipettes existent en verre réutilisable : un choix durable quand on peut les stériliser.

Micropipettes automatiques

Les **micropipettes** servent à prélever ou distribuer de très petits volumes, de quelques microlitres (μL) à 1 millilitre.

Chaque modèle couvre une plage donnée : par exemple P20 pour 2–20 μL , P200 pour 20–200 μL .

On ajuste le volume avec la molette puis on aspire le liquide à l'aide d'un embout stérile.

Pour éviter les contaminations, on utilise des embouts (tips) avec filtre lorsqu'on manipule de l'ADN, des virus ou des solvants volatils.

En démarche RSE, on peut choisir des **racks d'embouts rechargeables ou recyclables** et planifier les manipulations pour limiter la consommation.

Distributeurs automatiques de solvant ou de réactif

Fixés sur un flacon, ces appareils permettent de **prélever plusieurs fois le même volume** (par exemple 10 mL) de façon rapide et sécurisée, tout en réduisant le risque de renversement ou de contamination.

Ils sont particulièrement utiles pour les solvants ou tampons couramment utilisés.

À RETENIR

La **balance** assure la justesse des masses solides.

La **fiole jaugée** garantit un volume final précis.

Les **pipettes et micropipettes** permettent de transférer des volumes exacts, grands ou très petits.

Les **distributeurs** facilitent les prélèvements répétés.

3 MATÉRIEL DE PRÉPARATION ET DE MÉLANGE

Une fois les réactifs pesés ou mesurés, la réussite de la solution dépend d'un **mélange homogène, d'une température maîtrisée, d'un pH correct et d'une stérilité adaptée**. Chaque équipement joue un rôle précis, et son choix influence autant la qualité du résultat que la sécurité et l'impact environnemental.

Les **agitateurs magnétiques avec plaque chauffante** permettent de dissoudre rapidement les poudres et de chauffer en même temps, grâce à un barreau aimanté qui tourne dans le liquide. Il est important de couvrir le bécher pour éviter l'évaporation et d'éteindre la plaque dès la fin de l'opération pour économiser l'énergie. **Les bains-marie thermostatés** offrent un chauffage doux et régulier, utile par exemple pour faire fondre l'agar d'un milieu gélosé ou maintenir des enzymes actives à 37 °C. On vérifie le niveau d'eau, on programme la durée et on utilise un couvercle afin de limiter les pertes de chaleur.

Certaines solutions doivent être stériles ou parfaitement limpides : la **filtration** est alors indispensable. Les membranes de **0,22 µm²** retiennent bactéries et champignons pour stériliser une solution qui ne supporte pas l'autoclavage, tandis que celles de **0,45 µm** suffisent à éliminer les particules visibles. Le choix du matériau (PES, PTFE, nylon, etc.) dépend du type de solvant afin d'éviter toute réaction chimique. Pour réduire les déchets, on pri-

2 Un filtre 0,22 µm possède des pores de 0,22 micromètre, soit 0,00022 mm, assez petits pour retenir les bactéries et champignons tout en laissant passer la solution.

On l'utilise pour stériliser à froid les liquides qui ne supportent pas l'autoclave.

vilégie les systèmes de filtration sous vide réutilisables, dans lesquels seule la membrane est jetée.

La conservation des solutions et des échantillons préparés nécessite des **réfrigérateurs (4 °C)** ou des **congélateurs (-20 °C ou -80 °C)**. Un rangement organisé, un dégivrage régulier et le contrôle des joints de porte réduisent la consommation d'énergie et protègent les produits. Le contrôle du pH est tout aussi crucial : un **pH-mètre**, correctement étalonné avec des solutions tampons (pH 4, 7 ou 10), permet de vérifier ou d'ajuster l'acidité ou la basicité. Un entretien soigné de l'électrode (rinçage, stockage dans la solution adaptée) prolonge sa durée de vie et évite des remplacements coûteux.

En résumé, le matériel de préparation (agitateurs, plaques chauffantes, bains-marie, systèmes de filtration, réfrigérateurs, congélateurs et pH-mètres) assure la **qualité, la stabilité et la stabilité** des solutions. Son utilisation raisonnée (couverts, regroupement des préparations, choix de filtres réutilisables, entretien régulier) permet d'allier **fiabilité scientifique, sécurité du personnel et respect de l'environnement**, conformément à une véritable démarche de Responsabilité Sociétale des Entreprises (RSE).

4 COMPATIBILITÉ CHIMIQUE ET SÉCURITÉ

Avant de choisir un récipient ou un instrument, il est essentiel de vérifier sa **compatibilité avec les produits chimiques** que vous allez manipuler. Certains solvants ou acides peuvent attaquer ou fragiliser certains plastiques : par exemple, le polystyrène (PS) se fissure au contact de l'acétone, alors que le PTFE (Téflon®) ou le verre borosilicate résistent très bien. Utiliser un matériau inadapté peut entraîner une fuite, une casse ou une contamination de la solution. La **sécurité** passe aussi par l'environnement de travail : on manipule les solvants volatils ou toxiques sous une **sorbonne chimique** pour évacuer les vapeurs, et on porte systématiquement les **équipements de protection individuelle (EPI)** (gants, lunettes, blouse) adaptés à la nature du produit (acide, base, solvant). Sur le plan environnemental, choisir un matériau durable et résistant évite de remplacer fréquemment le matériel et **réduit les déchets**, tout en assurant la fiabilité des expériences et la protection du personnel.

5 DÉMARCHE RSE INTÉGRÉE

Intégrer une **démarche RSE (Responsabilité Sociétale des Entreprises)** au laboratoire signifie organiser chaque étape du travail pour réduire l'empreinte écologique, tout en maintenant la **qualité scientifique et la sécurité**. Cette démarche repose sur quatre axes principaux : **réduire, réutiliser, recycler, et optimiser l'énergie**.

Réduire

L'objectif est de **limiter à la source la consommation de ressources**.

On prépare uniquement la quantité nécessaire de réactif, on planifie les expériences pour éviter les chauffages ou stérilisations multiples, et on regroupe les manipulations pour utiliser moins de solvants, d'eau ou d'électricité. Cette anticipation évite le gaspillage et diminue la production de déchets.

Réutiliser

Dès que la sécurité le permet, on privilégie la **verrerie lavable et stérilisable**, les racks **d'embouts rechargeables** et les systèmes de filtration où seule la membrane jetable est remplacée.

Réutiliser du matériel robuste (foles, erlenmeyers, béchers) prolonge sa durée de vie et limite l'achat de plastique à usage unique.

Recycler

Le tri sélectif est indispensable.

On sépare les plastiques, les solvants usagés et les déchets biologiques (DASRI) selon les filières prévues.

On choisit des fournisseurs qui reprennent les emballages ou utilisent des matériaux recyclés, et on s'assure que les contenants vides sont orientés vers la filière de recyclage adaptée.

Optimiser l'énergie

La gestion de l'énergie est un levier majeur : fermer la vitre des sorbonnes pour réduire l'aspiration d'air, dégivrer régulièrement les congélateurs, vérifier les joints d'étanchéité des réfrigérateurs et regrouper les cycles d'autoclave pour éviter les démarrages répétés.

On éteint aussi immédiatement les plaques chauffantes, agitateurs ou bains-marie dès la fin de leur utilisation.

EXEMPLE PRATIQUE

Préparation d'un milieu de culture nutritif stérile (500 mL)

Pour préparer **500 mL d'un milieu nutritif stérile**, il faut commencer par **analyser le besoin**.

Le protocole indique le volume final et la composition du milieu (sels minéraux, extrait de levure, agar, etc.). Cette étape permet de calculer précisément la quantité de chaque composant à peser. Par exemple, si la recette demande 20 g de poudre pour 1 L, il faudra en peser 10 g pour 500 mL.

Choix du matériel

- **Balance de précision 0,01 g** : pour peser exactement la quantité de poudre, en évitant tout excès qui modifierait la composition.
- **Bécher en verre borosilicate** : résiste à la chaleur et aux variations de température lors du chauffage et de l'autoclavage.
- **Agitateur magnétique avec plaque chauffante** : assure une dissolution homogène de la poudre dans l'eau distillée pendant le chauffage.
- **pH-mètre** : permet de vérifier et d'ajuster le pH du milieu, condition essentielle à la croissance microbienne.
- **Filtre 0,22 µm** : utile si la stérilisation à la chaleur n'est pas possible (par exemple pour des milieux contenant des vitamines sensibles à la température).
- **Fiole jaugée de 500 mL** : garantit que le volume final est exactement de 500 mL après dissolution et ajustement.

Déroulement pas à pas

1. Peser la quantité de poudre calculée dans un bécher propre et sec.
2. Ajouter environ 400 mL d'eau distillée (toujours un peu moins que le volume final).
3. Placer le bécher sur l'agitateur magnétique, chauffer doucement et mélanger jusqu'à dissolution complète.
4. Vérifier le pH à l'aide du pH-mètre et ajuster si nécessaire avec une solution acide ou basique diluée.
5. Compléter avec de l'eau distillée dans la fiole jaugée jusqu'au trait de 500 mL.
6. Si le milieu supporte la chaleur, stériliser à l'autoclave ; sinon, filtrer sur une membrane stérile 0,22 µm.

Intégration de la démarche RSE

- **Verrerie réutilisable** : béchers, fioles et barreaux magnétiques sont lavés et stérilisés, évitant le plastique à usage unique.
- **Filtration sous vide avec entonnoir réutilisable** : seule la membrane filtrante est jetée, réduisant les déchets.
- **Volume exact préparé** : en calculant précisément la quantité de milieu nécessaire, on évite le surplus qui finirait en déchet chimique ou biologique.
- **Optimisation de l'énergie** : regrouper les préparations pour un seul cycle d'autoclave, couvrir le bécher pendant le chauffage pour limiter l'évaporation et la perte de chaleur.

RECONSTITUTION DES RÉACTIFS ET PRÉPARATION DES MILIEUX

La reconstitution des réactifs et la préparation des milieux sont des étapes déterminantes pour obtenir des solutions fiables et stériles. Elles exigent **rigueur, lecture attentive des documents techniques et respect des règles de sécurité**.

1 RECONSTITUTION SELON LA FICHE TECHNIQUE

Chaque réactif ou poudre déshydratée est fourni avec une **fiche technique du fabricant** (ou fiche de données de sécurité pour les produits chimiques).

Cette fiche indique :

- **Solubilité** : quantité maximale de soluté que l'on peut dissoudre dans un volume d'eau ou de solvant.
- **Ordre d'ajout** : certains composants doivent être incorporés dans un ordre précis pour éviter des précipitations ou des réactions indésirables.
- **pH recommandé** : important pour la stabilité du produit ou l'efficacité du milieu.
- **Température** : conditions de dissolution ou de stockage (par exemple, eau tiède pour dissoudre certains milieux gélosés).

Avant de commencer, il faut donc **lire intégralement la fiche technique** et préparer le poste de travail : porter les **équipements de protection individuelle (EPI)**, travailler sous sorbonne si le produit dégage des vapeurs ou est irritant, et vérifier que tout le matériel (balance, fiole jaugée, agitateur magnétique) est propre et prêt à l'emploi.

2 PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIONNELS

Pour préparer un milieu fiable, commencez par **peser avec précision** chaque composant selon le volume final visé, puis versez dans un bécher **environ 80 à 90 % du solvant** (eau distillée ou autre) afin de garder une marge pour l'ajustement de pH et le complément au volume. Introduisez les poudres dans **l'ordre indiqué** par la fiche technique : certains sels se dissolvent mieux en premier, d'autres doivent être ajoutés en dernier pour éviter les **précipitations** (formation d'un dépôt solide). Placez un **barreau magnétique**³ dans le bécher et mettez-le **sous agitation** (douce au départ) ; augmentez progressivement la vitesse et, si nécessaire, la **température** sur plaque chauffante pour accélérer la disso-

3 Un barreau magnétique est un petit cylindre en plastique ou en téflon contenant un aimant.

On le place au fond d'un bécher ou d'une fiole ; posé sur un agitateur magnétique, il tourne grâce à un champ magnétique et permet de mélanger la solution automatiquement, sans avoir besoin de remuer avec une tige.

lution, en **couvrant** le récipient pour limiter l'évaporation et les projections. Une fois les composants dissous, **mesurez le pH** avec un pH-mètre **étalonné**⁴ (tampons pH 4/7/10) et corrigez-le **lentement** avec une **base ou un acide dilués** (jamais concentrés, pour éviter de dépasser la cible) en mélangeant entre chaque ajout. Transvasez ensuite la solution dans une **fiolle jaugée** et complétez q.s.p. (quantité suffisante pour) jusqu'au trait de jauge afin d'obtenir le **volume exact**. Choisissez la **stérilisation** adaptée : **autoclave** (vapeur à 121 °C, 15–20 min) pour les milieux compatibles avec la chaleur, ou **filtration stérile 0,22 µm** (pores assez fins pour retenir les bactéries) si le milieu contient des composés **thermosensibles** (vitamines, antibiotiques, facteurs de croissance). Lorsque vous autoclavez, **ajoutez après stérilisation** (sous conditions aseptiques⁵) les additifs sensibles à la chaleur (par exemple un antibiotique filtré stérilement). Travaillez près d'une **hotte à flux laminaire** ou d'un **poste de sécurité microbiologique** pour limiter les contaminations, utilisez des récipients stériles, et pensez à **aliquoter** (répartir en petits volumes) pour éviter de multiples ouvertures et recongelations. Terminez par un **étiquetage complet** (nom, composition, concentration, pH, date, initiales, conditions et durée de conservation) et un **stockage** adapté (température, flacon ambré si photosensible). Cette séquence continue (dissolution contrôlée, pH ajusté, volume exact, stérilisation adéquate et bonnes pratiques d'asepsie) garantit un **milieu homogène, stable et prêt à l'emploi**.

3 CONTRÔLES DE QUALITÉ SIMPLES

Dès qu'un réactif ou un milieu est préparé, réalisez une **vérification rapide et systématique** pour garantir qu'il est conforme avant usage. Commencez par l'**examen visuel** : la solution doit être **claire et homogène**, sans particules ni **précipité**, sans voile, mousse persistante ou **changement de couleur** anormal ; pour un **milieu gélosé**, contrôlez l'**aspect** (surface lisse, sans bulles piégées), la **prise du gel** et l'absence de coulures dans la boîte. Vérifiez ensuite le **pH final** avec un **pH-mètre étalonné** (tampons 4/7/10) ou, à défaut, avec une **bandelette** adaptée à la plage visée : comparez la valeur obtenue à la **spécification** de la fiche technique (tolérance typique $\pm 0,1$ à $\pm 0,2$ pH). Si nécessaire, ajustez **lentement** avec acide/base **dilués**, mélangez, **laissez stabiliser**, puis recontrôlez. Assurez-vous de l'**homogénéité** : mélangez quelques secondes (agitateur doux) et observez qu'aucune zone plus concentrée ne subsiste ; si vous avez complété au volume dans une fiolle jaugée, vérifiez que le **ménisque**⁶ est bien au trait. Pour les milieux **stériles**, effectuez un contrôle simple : prélevez **aseptiquement** un petit volume et **incubez-le** (24–48 h à la température adaptée, par ex. 30–37 °C) ; **toute croissance** indique une contamination

4 Étalonné signifie que l'on a vérifié et réglé la précision d'un appareil de mesure en le comparant à une référence connue.

5 travailler dans un environnement et avec une technique qui évite toute contamination par des micro-organismes.

6 Le ménisque est la courbure de la surface d'un liquide dans un récipient gradué (fiolle, éprouvette, pipette) provoquée par la tension superficielle. Pour lire correctement le volume, on place les yeux à hauteur du trait de jauge et on aligne le bas du ménisque (la partie la plus basse de la courbe) avec le trait marqué sur la verrerie.

et impose la **mise au rebut**. Selon le contexte, un contrôle de **conductivité/osmolalité**⁷ (tampons, solutions salines) peut confirmer la bonne composition ionique ; pour des milieux microbiologiques, un **test de fertilité** minimal (ensemencer une souche de référence et vérifier la croissance attendue) valide la performance du lot. Terminez par **l'étiquetage complet** (nom, concentration, pH, date, initiales, conditions/durée de conservation, n° de lot des composants) et la **traçabilité** dans le cahier/logiciel (quantités, corrections de pH, méthode de stérilisation, résultat des contrôles). En cas de **non-conformité** (pH hors tolérance, particules, turbidité, stérilité douteuse), appliquez la **conduite à tenir** : corriger si c'est possible et **retester**, sinon **éliminer** selon la filière adéquate et **recommencer** la préparation. Cette routine courte (aspect, pH, homogénéité, stérilité/performances) sécurise vos préparations et évite des **erreurs coûteuses** lors des analyses.

À RETENIR

- **Lire la fiche technique avant tout** : connaître solubilité, ordre d'ajout, pH et température recommandés.
- **Préparer avec rigueur** : pesée précise, dissolution sous agitation, ajustement du pH, complément exact au volume.
- **Stériliser selon le produit** : autoclave pour les solutions compatibles avec la chaleur ou filtration 0,22 µm pour les composés sensibles.
- **Contrôler la qualité** : vérifier l'aspect, le pH, l'homogénéité et, si nécessaire, la stérilité avant utilisation.
- **Étiqueter et tracer** : indiquer composition, concentration, pH, date, opérateur et conditions de conservation pour assurer la traçabilité.

APPLICATION DES MODES OPÉRATOIRES ET PROCÉDURES INTERNES

Le respect rigoureux des **procédures internes**, ou SOP (*Standard Operating Procedures*), est indispensable pour garantir des résultats constants et sûrs. Ces documents détaillent chaque étape d'une manipulation afin que tous les membres de l'équipe puissent travailler de la même façon. Avant toute préparation, il est important de parcourir la SOP dans son intégralité afin d'anticiper le matériel et les produits requis. Pendant l'exécution, on avance dans l'ordre prescrit en cochant mentalement ou sur une fiche les actions effectuées : mesures exactes, dissolution complète, ajustement éventuel du pH, puis mise au volume final. Cette discipline évite les oublis, les erreurs de séquence et les variations entre préparations.

⁷ Conductivité : mesure la capacité d'une solution à conduire l'électricité, qui dépend de la quantité d'ions dissous (sels, acides, bases). Elle indique donc la concentration en électrolytes d'une solution. Osmolalité : mesure la concentration totale de particules dissoutes (ions, sucres, protéines) par kilogramme de solvant. Elle reflète la « force osmotique » d'une solution, importante pour maintenir l'équilibre d'eau dans les cellules et les milieux biologiques.

La **traçabilité** fait partie intégrante de la procédure. Chaque préparation doit être consignée dans un cahier ou un logiciel de suivi, en notant la date, les quantités utilisées, les éventuels ajustements, la méthode de stérilisation et l'identité de la personne qui a réalisé la manipulation. L'étiquetage des contenants doit être soigné et durable : nom complet de la solution, concentration, date de fabrication, conditions de conservation et, si nécessaire, date de péremption. Cette organisation permet de retrouver rapidement l'origine d'un problème, de reproduire fidèlement une préparation ou de répondre à un contrôle qualité. En appliquant ces règles, le laboratoire assure la **fiabilité et la reproductibilité** de ses réactifs tout en maintenant un haut niveau de sécurité.

FICHE TECHNIQUE

Réaliser un étiquetage parfait

Un étiquetage précis et durable est indispensable pour la traçabilité, la sécurité et la qualité des analyses. Avant de commencer, assurez-vous que la surface du flacon ou du tube soit parfaitement **propre et sèche** afin de garantir l'adhérence. Choisissez une **étiquette adaptée** à l'usage prévu : papier ou plastique résistant à l'humidité, aux solvants, au froid (cryogénique si stockage à -80 °C) ou à l'autoclave. Utilisez un **stylo indélébile** ou une imprimante avec encre résistante à l'eau et aux produits chimiques.

Chaque étiquette doit comporter des **informations essentielles** : le nom complet de la solution ou du réactif (sans abréviations ambiguës), la concentration exacte (par exemple « NaCl 0,5 M » ou « 2 mg/mL »), le pH si nécessaire, la date de préparation et la **date de péremption**, ainsi que vos initiales ou votre code opérateur. Indiquez également les **conditions de stockage** (4 °C , -20 °C , protéger de la lumière) et, pour les substances chimiques ou biologiques à risque, ajoutez les **pictogrammes de danger CLP** correspondants. Si l'espace est limité, un code-barres ou QR code peut renvoyer à une fiche complète.

Pour la **lisibilité**, écrivez en lettres claires ou imprimez en police lisible (au moins 10 pt). Collez l'étiquette bien droite sur la partie la plus large du flacon ou à la base d'un tube, en évitant les plis, les bulles d'air et les bouchons ou capuchons qui peuvent être remplacés. Vérifiez immédiatement le contenu, la justesse des données et la bonne adhérence, surtout si le flacon sera conservé au froid ou stérilisé. Enfin, reportez toutes les informations dans le **cahier ou le logiciel de traçabilité** : numéro de lot, date, emplacement de stockage.

Dans une démarche de **Responsabilité Sociétale (RSE)**, privilégiez des étiquettes écologiques, retirez les anciennes avant recyclage et imprimez uniquement le nécessaire pour réduire les déchets. Un étiquetage parfait est donc **clair, complet, durable et traçable**, garantissant à la fois la sécurité du personnel, la fiabilité des résultats et le respect des normes réglementaires.

Check-list rapide

- Nom complet et concentration
- pH (si applicable)
- Date de préparation + date de péremption
- Initiales de l'opérateur
- Conditions de stockage
- Pictogrammes de danger (si besoin)
- Étiquette propre, lisible, bien collée

CONCLUSION

Ce chapitre vous a guidé pas à pas depuis la **lecture critique d'un protocole** jusqu'à la réalisation concrète de réactifs et de milieux fiables. Vous avez appris à **identifier les réactifs nécessaires, à calculer avec précision** les quantités en tenant compte des différentes unités, puis à **sélectionner le matériel adapté** tout en intégrant une démarche de **Responsabilité Sociétale des Entreprises (RSE)** pour réduire déchets et consommation d'énergie.

Nous avons détaillé la **reconstitution des réactifs et la préparation des milieux**, en insistant sur la lecture des fiches techniques, la pesée, la dissolution, l'ajustement du pH, la stérilisation appropriée et les **contrôles de qualité** (aspect, pH, homogénéité, stérilité). Enfin, vous avez vu comment **appliquer les procédures opératoires standardisées (SOP)** et assurer une **traçabilité complète** grâce à un étiquetage précis et à l'enregistrement des données.

En maîtrisant ces étapes, vous êtes désormais capable de transformer un protocole écrit en une préparation sûre, précise et reproductible, garantissant la **fiabilité des analyses biologiques** et le respect des bonnes pratiques de sécurité et d'écoresponsabilité.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

Analyse du protocole & préparation des réactifs et milieux

Étape clé	Actions principales	Points essentiels / Bonnes pratiques
1. Analyse du protocole	Lire le protocole, identifier les réactifs et leurs quantités, noter les unités.	Vérifier concentration, volume final, conditions particulières (pH, température)
2. Choix du matériel (RSE)	Sélectionner balances, pipettes, verrerie, dispositifs de sécurité.	Précision adaptée, compatibilité chimique, réutilisation de verrerie, optimisation de l'énergie.
3. Reconstitution des réactifs	Lire la fiche technique, préparer le poste, porter les EPI.	Respecter l'ordre d'ajout, la solubilité, le pH et la température recommandés.
4. Préparation des milieux	Peser, dissoudre, ajuster le pH, compléter au volume exact.	Utiliser agitateur magnétique, pH-mètre étalonné, stériliser (autoclave ou filtration 0,22 µm).
5. Contrôles de qualité	Vérifier aspect, homogénéité, pH et stérilité.	Corriger si nécessaire, éliminer toute préparation non conforme.
6. Application des SOP	Suivre la procédure opératoire standardisée pas à pas.	Ne pas sauter d'étape, cocher les actions, éviter toute improvisation.
7. Traçabilité et étiquetage	Inscrire date, lots, quantités, opérateur dans le cahier/logiciel.	Étiquette lisible : nom complet, concentration, pH, date, conditions de stockage, pictogrammes si besoin.

LEXIQUE



Autoclave : équipement qui stérilise à la vapeur sous pression (121 °C) pour détruire bactéries et spores.

Compatibilité chimique : capacité d'un matériau (verre, plastique) à résister sans se dégrader au contact d'un produit chimique donné.

Conductivité : mesure de la capacité d'une solution à conduire l'électricité, liée à sa teneur en ions dissous.

Étalonnage : opération qui consiste à vérifier et régler la précision d'un instrument de mesure (pH-mètre, balance) en le comparant à une référence connue.

Fiole jaugée : verrerie graduée permettant de préparer un volume de solution parfaitement exact grâce à un trait de jauge unique.

Filtration stérile 0,22 µm : passage d'une solution à travers un filtre aux pores de 0,22 micromètre, taille suffisante pour retenir bactéries et champignons.

Homogénéité : état d'une solution parfaitement uniforme, sans zones plus concentrées ni particules visibles.

Osmolalité : concentration totale de particules dissoutes (ions, sucres, etc.) par kilogramme de solvant, reflétant la force osmotique d'une solution.

pH-mètre : appareil électronique qui mesure l'acidité ou la basicité d'une solution.

Précipité : dépôt solide qui se forme lorsqu'un soluté devient insoluble dans le solvant.

Procédure opératoire standardisée (SOP) : document interne détaillant étape par étape la méthode de réalisation d'une tâche pour garantir la reproductibilité.

q.s.p. (quantum satis pro) : mention indiquant qu'il faut compléter la préparation « jusqu'à la quantité suffisante pour » atteindre le volume final.

Responsabilité Sociétale des Entreprises (RSE) : démarche visant à réduire l'impact environnemental et à améliorer les conditions sociales dans l'organisation du travail.

Sorbonne chimique : hotte aspirante qui évacue les vapeurs toxiques ou inflammables lors de manipulations chimiques.

Traçabilité : ensemble des informations enregistrées (dates, opérateur, lots, méthodes) permettant de retrouver l'historique complet d'une préparation.



Entraînez-vous !

Corrigés en fin d'ouvrage

QCM

1 La mention q.s.p. sur un protocole signifie :

- Chauffer sous pression
- Compléter jusqu'au volume final requis
- Solution quasi pure
- Quantité de solvant précise

2 Quelle est la fonction principale d'une fiole jaugée ?

- Mélanger des solutions
- Chauffer un liquide
- Stériliser une solution
- Préparer un volume précis de solution

3 Un barreau magnétique sert à :

- Mesurer la masse d'un solide
- Maintenir une solution au froid
- Mélanger un liquide grâce à un champ magnétique
- Ajuster le pH d'une solution

4 Pour stériliser une solution contenant des vitamines sensibles à la chaleur, on utilise :

- L'autoclave à 121 °C
- Une filtration sur membrane 0,22 µm
- Une incubation à 37 °C
- Une étuve de séchage

5 L'étalonnage d'un pH-mètre consiste à :

- Vérifier et régler sa précision avec des solutions tampons
- Remplacer l'électrode
- Ajuster le pH d'une solution inconnue
- Nettoyer la sonde avec de l'eau distillée