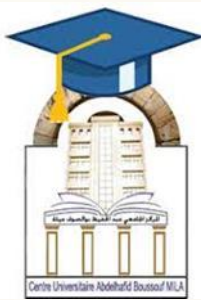


University Center abdelhafid boussouf – Mila – Algeria



Technique de laboratoire 1

Master 1 Biodiversité et Sécurité alimentaire

By Dr. Sahraoui A.S

2023/2024

Dr . SAHRAOUI Aboubakre seddik

Spécialisé en écologie en environnemnt

MAB : Centre universitaire Abdelhafid boussouf – Mila



Chargé de cour et Tp du module Techniques de
laboratoire 1 pour les master 1 protection des
Écosytèmes

Contact:

sah.boubaker@gmail.com

Jours de réception : dimanche et mardi



Généralités sur le module

UEM : Unité Méthodologie

Semestre : 1^{ème}

Public cible : Master 1 Biodiversité et Sécurité alimentaire

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : écologie et environnement

Année universitaire : 2024/2025

Coefficient : 2

Crédit : 4

Volume Horaire Hebdomadaire Total : 45h

Cours (1.30h)

Travaux pratiques (1.30h)



L'objectif de l'enseignement du module "Techniques de laboratoire 1" pour les étudiants en Master 1, spécialité Biodiversité et Sécurité Alimentaire, est de fournir aux apprenants des compétences pratiques indispensables pour la recherche et l'analyse en laboratoire.

Ce module permet aux étudiants de maîtriser les techniques d'analyses biologiques et chimiques nécessaires à l'étude de la biodiversité et à l'évaluation de la qualité des aliments.

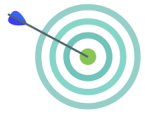
En intégrant des outils modernes de laboratoire, les étudiants seront préparés à aborder des problématiques liées à la sécurité alimentaire, tout en contribuant à la préservation de la biodiversité.



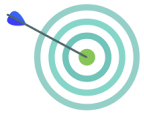
Connaître : Identifier et décrire les principaux instruments et équipements utilisés en laboratoire pour les analyses biologiques et chimiques.



Comprendre : Expliquer les principes fondamentaux des techniques de manipulation d'échantillons et des méthodes d'analyse en laboratoire.



Appliquer : Utiliser correctement les techniques de laboratoire pour réaliser des expériences en lien avec la biodiversité et la sécurité alimentaire.

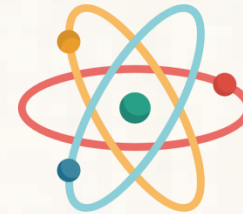


Évaluer : Critiquer l'efficacité des techniques de laboratoire utilisées et proposer des améliorations pour optimiser les processus analytiques

PRÉREQUIS

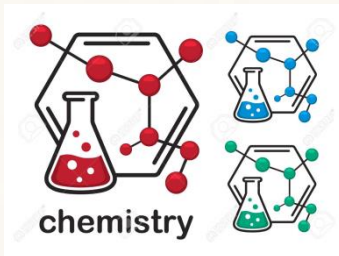
Pour aborder efficacement le module technique de laboratoire1 , les étudiants doivent avoir acquis certaines connaissances de base en sciences biologiques. Il est recommandé d'avoir une bonne compréhension des concepts fondamentaux suivants :

Biologie générale



Physique

**Programmes de cytologie, de microbiologie
et de biophysique dispensés en TCSN**



Chimie



Mathématiques

Méthodologie scientifique

Modalité de fonctionnement

Le cours est organisé :

- En séances théoriques qui se passent en Amphi
- En séances de travaux pratiques qui se passe en au labo



60 % : contrôle finale

40 % : évaluation continue



EVALUATION



Introduction à la microscopie et aux techniques histologiques

1.1. Histoire et évolution de la microscopie



L'histologie est la branche de la biologie qui étudie la structure microscopique des tissus vivants, en analysant les cellules et leur organisation au sein des tissus. Elle utilise principalement des techniques de coloration et de microscopie pour observer et identifier les caractéristiques morphologiques des tissus végétaux et animaux.

Évolution des microscopes :

des premiers microscopes optiques aux microscopes électroniques

1- Microscopes optiques primitifs :

Les premiers microscopes ont été développés au XVII^e siècle par Antonie van Leeuwenhoek et Robert Hooke. Leeuwenhoek, souvent considéré comme le père de la microbiologie, a fabriqué des microscopes à lentilles simples et a été le premier à observer des micro-organismes vivants.

Hooke, quant à lui, a popularisé le terme « cellule » après avoir observé des cellules de liège à l'aide d'un microscope composé rudimentaire.



Microscope optique à miroir, 1875
(XIX^eème Siècle)



Microscope optique avec
éclairage électrique intégré



Microscope électronique

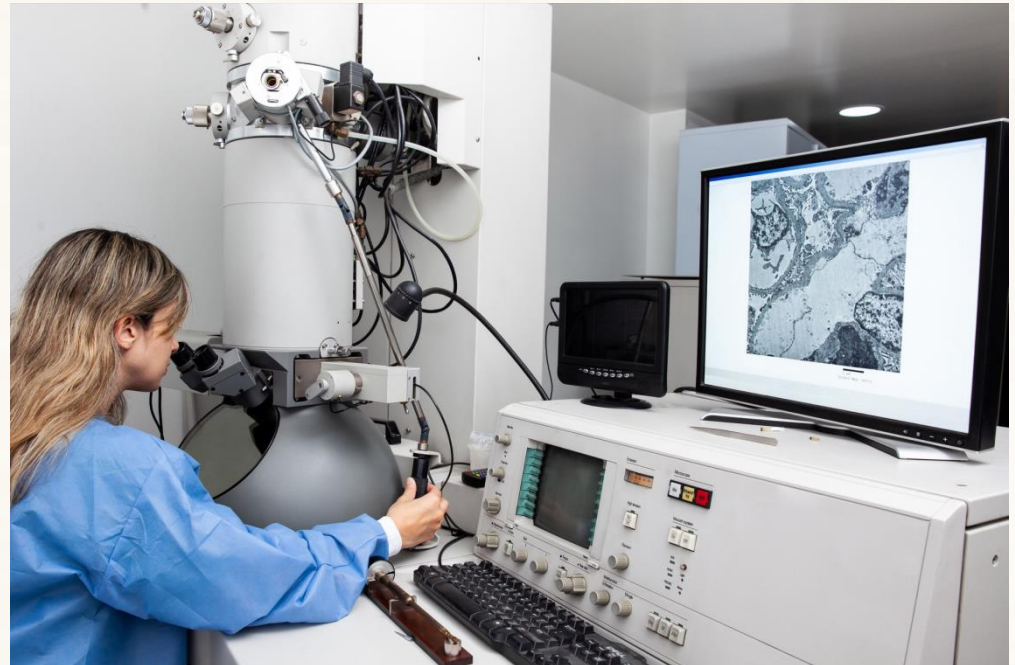
Évolution des microscopes : des premiers microscopes optiques aux microscopes électroniques

2- Microscopes composés : Au XIXe siècle, les microscopes composés ont évolué pour intégrer plusieurs lentilles, améliorant à la fois le grossissement et la résolution. Ce type de microscope a joué un rôle clé dans le développement de la théorie cellulaire et dans la découverte des structures cellulaires telles que le noyau.

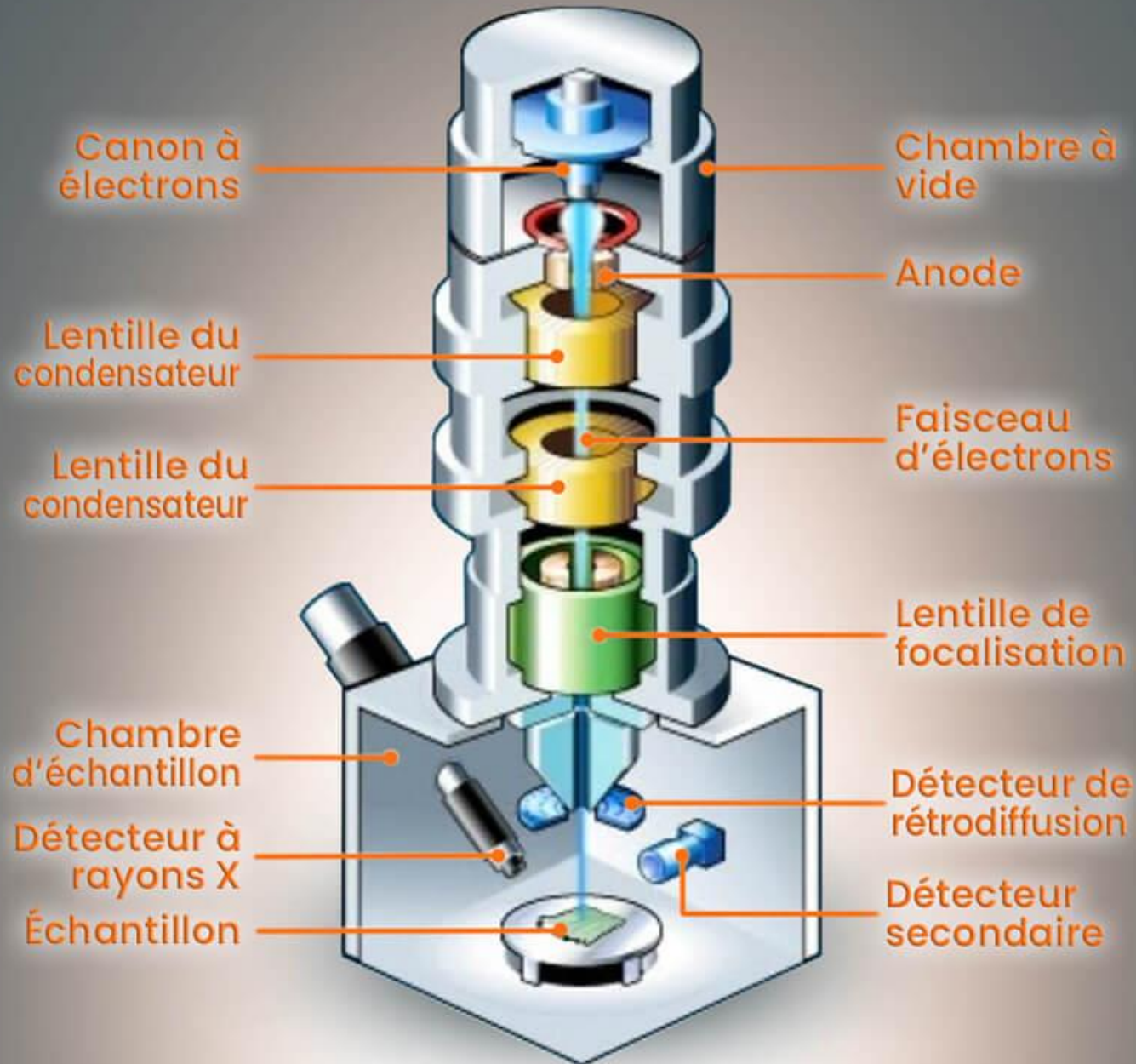


Évolution des microscopes : des premiers microscopes optiques aux microscopes électroniques

Microscopie électronique : L'invention du microscope électronique à transmission (MET) par Ernst Ruska dans les années 1930 a permis une avancée majeure. Contrairement aux microscopes optiques, le MET utilise des faisceaux d'électrons pour atteindre des résolutions bien supérieures, rendant possible l'observation de structures subcellulaires comme les mitochondries et les ribosomes

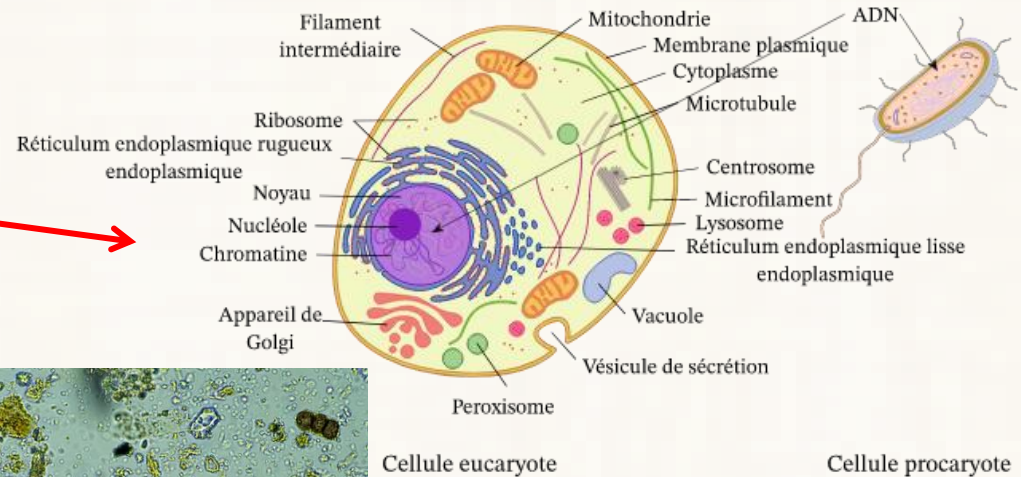
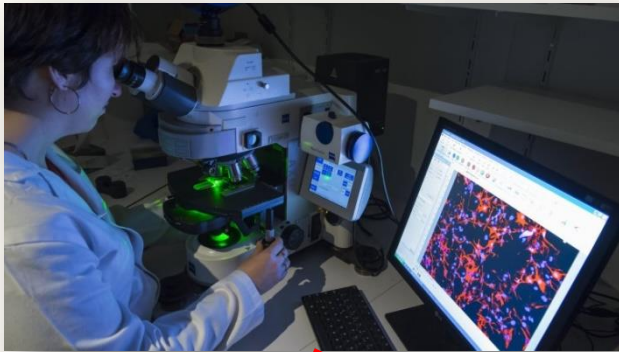


Fonctionnement d'un MEB



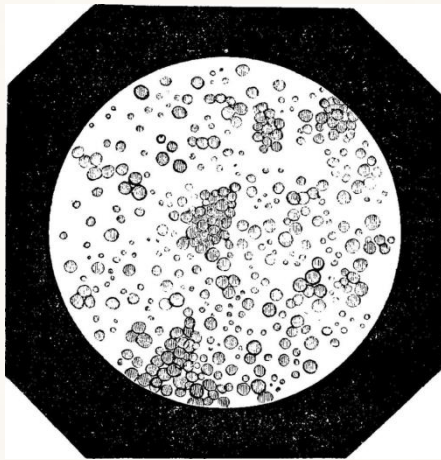
Applications de la microscopie en biologie et en science des aliments

· **En biologie** : La microscopie joue un rôle central dans l'étude des cellules, tissus et micro-organismes. En biologie cellulaire, elle permet l'observation de la structure des cellules, des organites (comme les mitochondries et le noyau), et des interactions intracellulaires. La microscopie électronique, en particulier, est utilisée pour observer des structures à l'échelle nanométrique, telles que les protéines et les complexes de macromolécules.

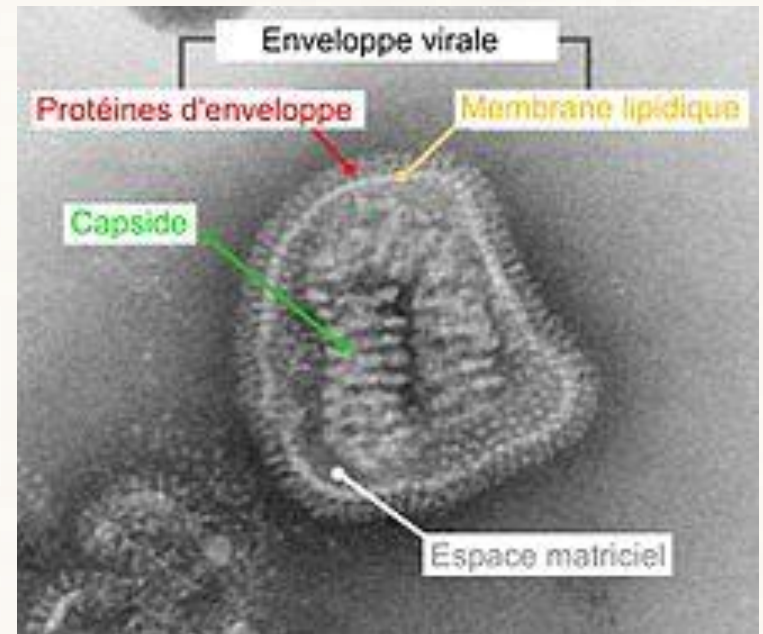


Applications de la microscopie en biologie et en science des aliments

En science des aliments : La microscopie est utilisée pour examiner la texture et la structure des aliments, identifier les contaminants microbiens et analyser la qualité des produits. La microscopie optique et électronique permet d'étudier les propriétés des aliments, notamment la structure des graisses, des fibres, et des protéines dans des produits tels que la viande, les céréales, et les produits laitiers.



[graisse globules](#)



1.2. Principes de base de la microscopie

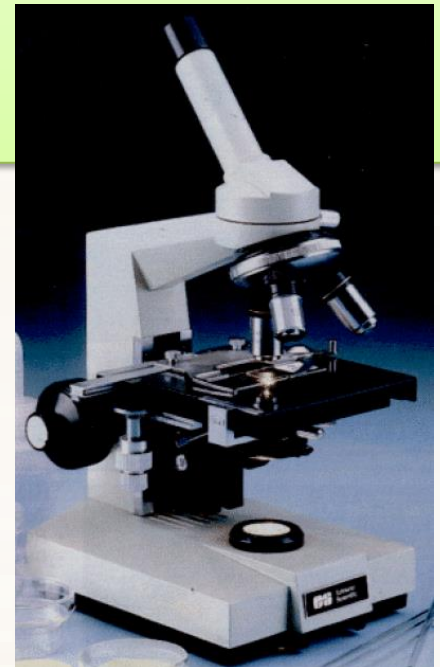
Fonctionnement des différents types de microscopes (optique, électronique, confocal)

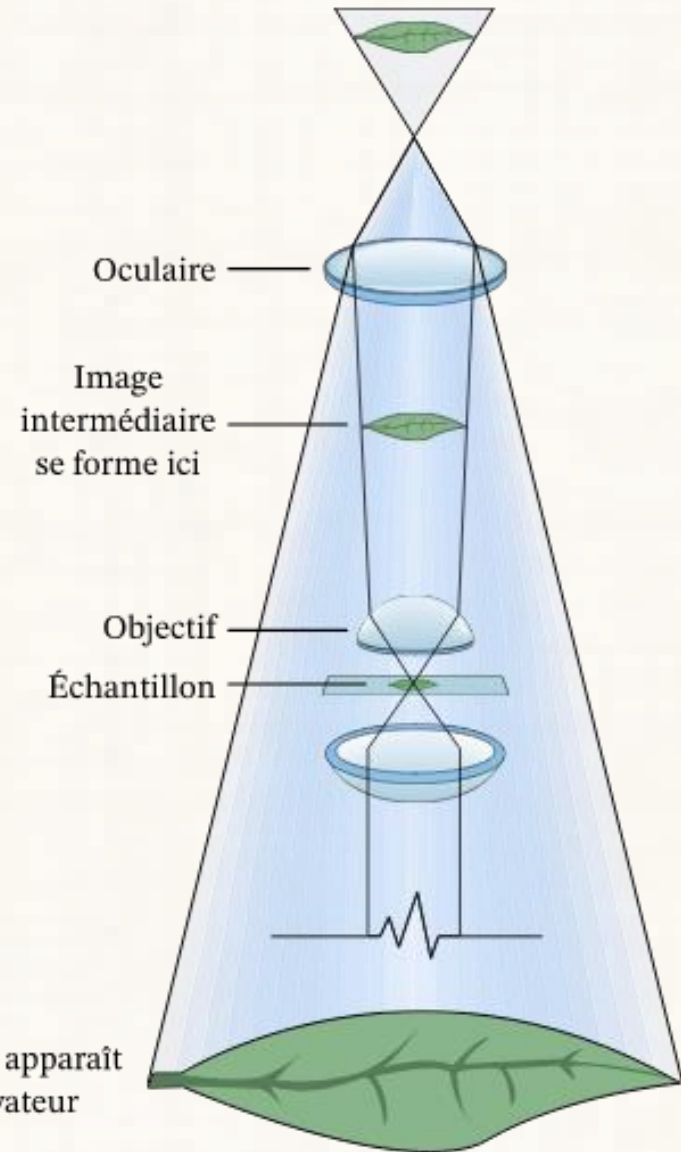
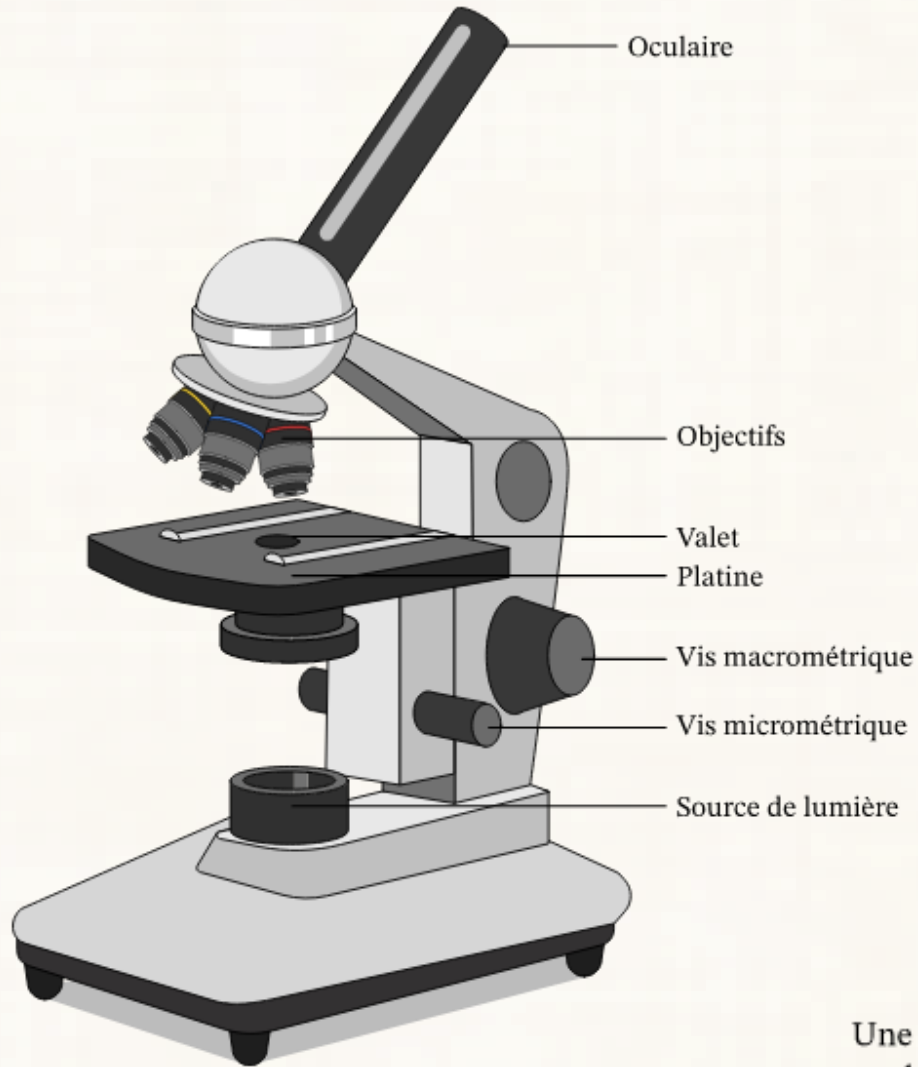
Microscope optique :

Le microscope optique utilise la lumière visible et un système de lentilles pour grossir les objets, permettant ainsi l'observation de structures microscopiques. La lumière traverse ou est réfléchiée par l'échantillon, puis est amplifiée par des lentilles convexes.

Il est principalement utilisé pour observer des cellules vivantes, des tissus et des organismes unicellulaires.

Sa limite de résolution est d'environ 200 nanomètres.





Une image plus grande apparaît dans l'œil de l'observateur

1.2. Principes de base de la microscopie

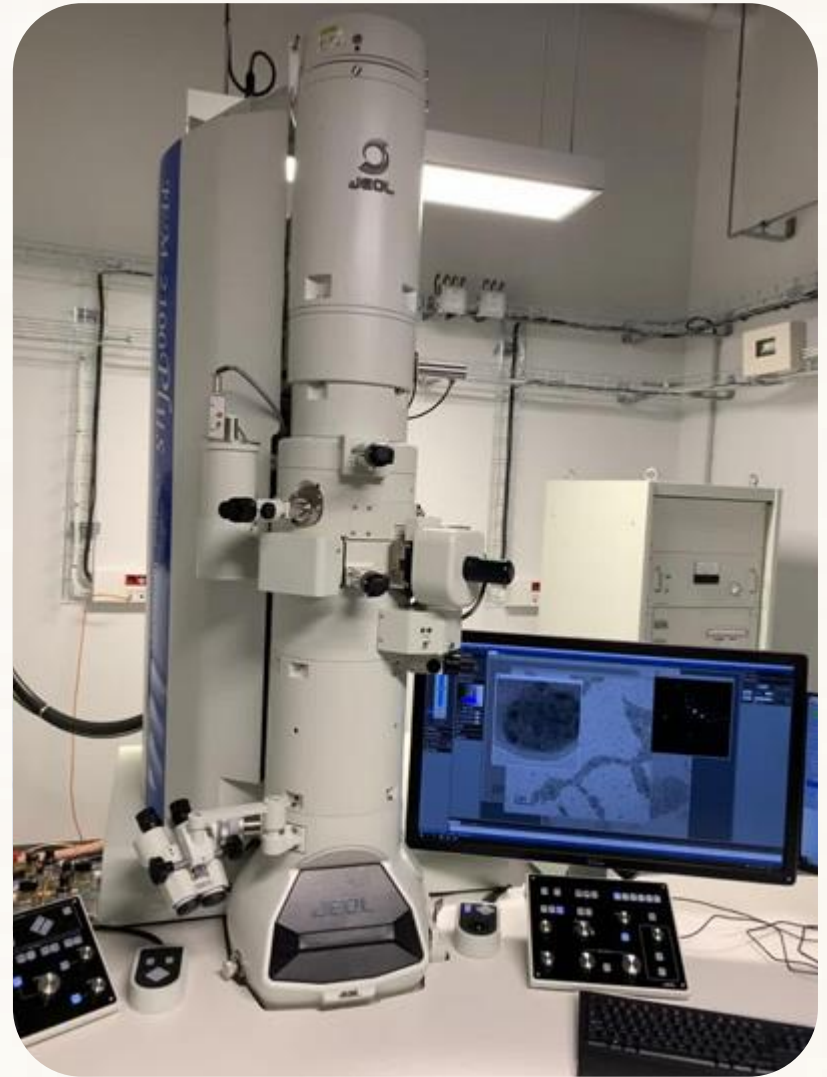
Microscope électronique : Contrairement aux microscopes optiques, les microscopes électroniques utilisent un faisceau d'électrons au lieu de la lumière pour imager les échantillons.

Il existe deux principaux types : le microscope électronique à transmission (MET), qui permet de visualiser des coupes ultrafines d'échantillons, et le microscope électronique à balayage (MEB), qui produit des images en trois dimensions de la surface des objets.

Ces microscopes offrent une résolution bien supérieure, jusqu'à l'échelle atomique (résolution d'environ 0,1 nanomètre pour le MET).



Microscope électronique à balayage (MEB)



Microscope électronique en transmission (MET)

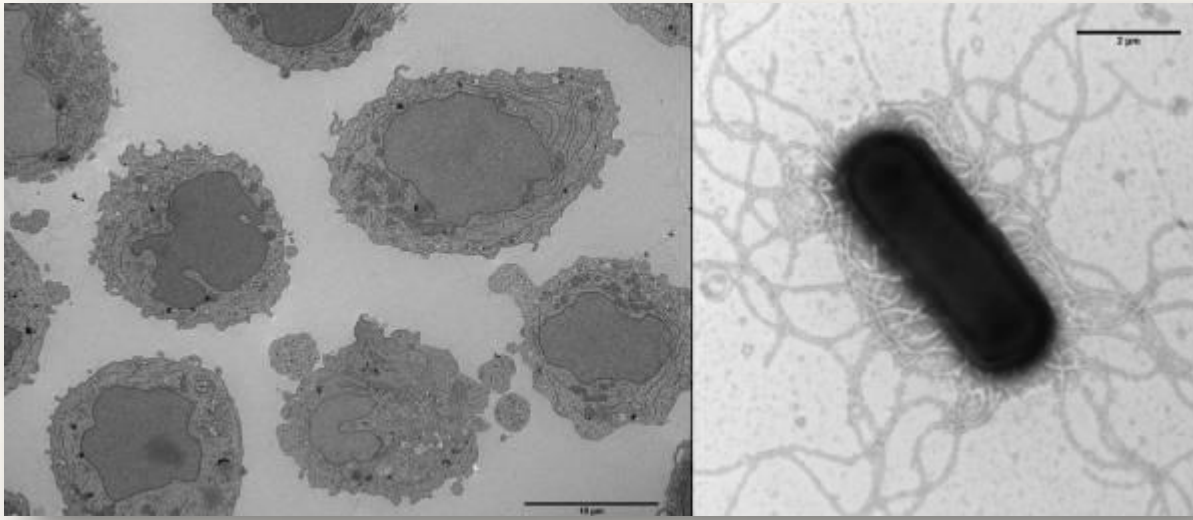
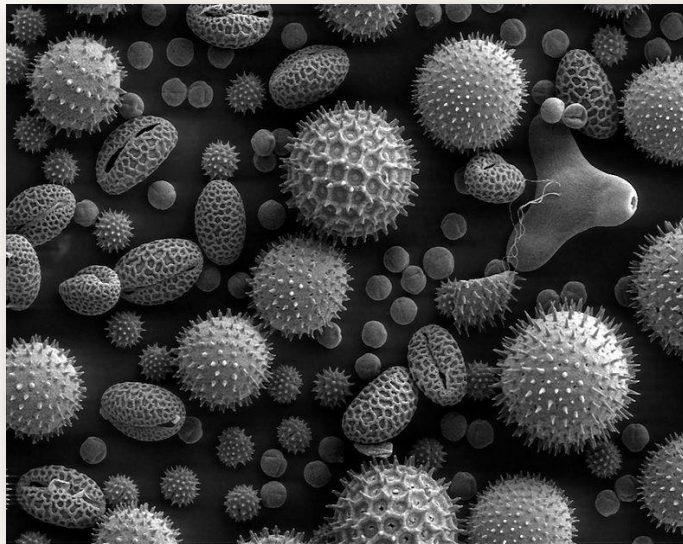
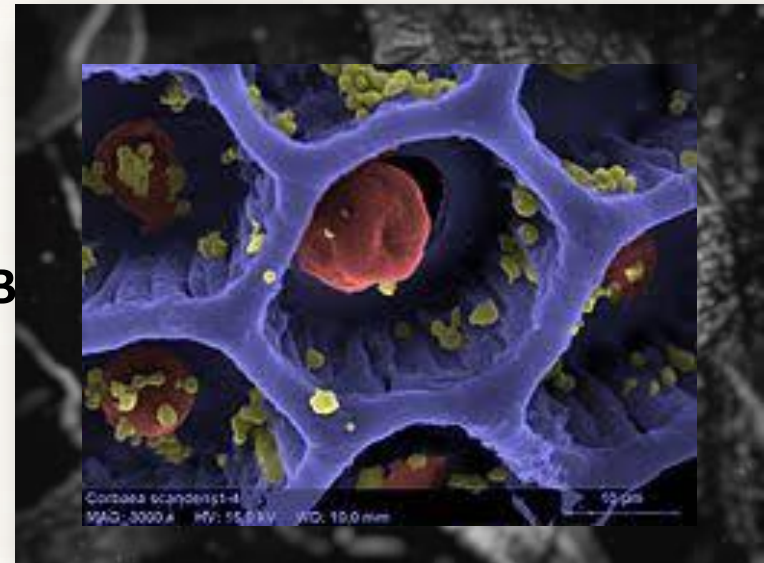


Image sous MET



Images sous MEB



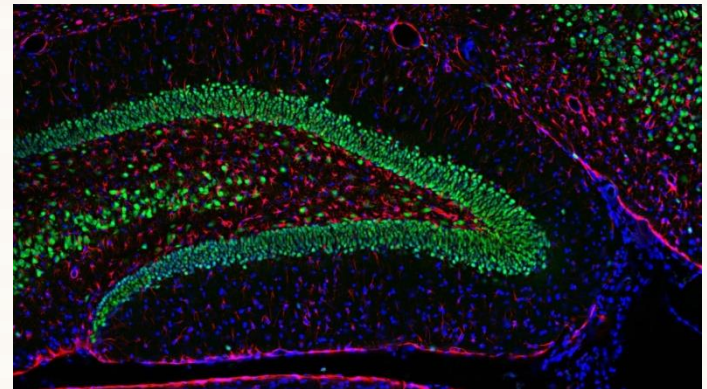
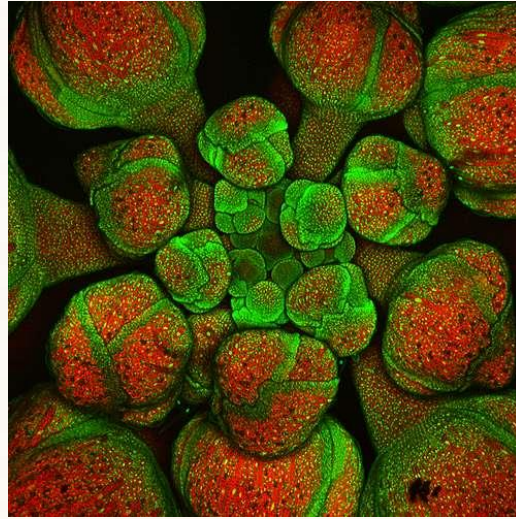
1.2. Principes de base de la microscopie

Microscope confocal :

Le microscope confocal à balayage laser utilise des faisceaux de lumière laser pour scanner un échantillon couche par couche. Contrairement aux microscopes optiques conventionnels, il permet de produire des images en trois dimensions avec une résolution accrue en éliminant la lumière provenant des plans hors focus. Il est largement utilisé pour l'observation de cellules vivantes, en biologie moléculaire et en neurosciences.



Image sous Microscope confocal



Ces différents types de microscopes offrent une variété d'applications, chacun adapté à des besoins spécifiques en fonction du type d'échantillon et du niveau de détail requis.

1.3. Introduction aux techniques histologiques

Principes des méthodes histologiques :

1- Fixation : Stabilisation des tissus pour prévenir la dégradation et préserver la structure cellulaire. Des fixateurs chimiques comme le formol ou la glutaraldéhyde sont couramment utilisés.

2- Inclusion : Après fixation, les tissus sont déshydratés puis inclus dans une substance telle que la paraffine ou des résines, facilitant ainsi la coupe.

3- Coupe : À l'aide d'un microtome, des sections fines des échantillons (environ 5 à 10 μm d'épaisseur) sont obtenues pour l'observation au microscope.

4- Coloration : Les colorants comme l'hématoxyline (qui colore les noyaux en bleu) et l'éosine (qui colore le cytoplasme en rose) sont utilisés pour mettre en évidence les structures cellulaires et tissulaires.

D'autres colorations spécifiques peuvent révéler des composants tels que les fibres, les lipides ou les glucides.

Les **techniques histologiques** sont essentielles pour l'étude des tissus biologiques, car elles permettent de révéler la structure microscopique des cellules et des tissus, offrant des informations précieuses sur la physiologie et la pathologie des organismes vivants.

Importance des techniques histologiques :

- 1. Visualisation des structures tissulaires :** Les techniques histologiques, notamment la fixation, la coupe et la coloration, permettent d'observer et d'analyser les détails cellulaires et subcellulaires qui seraient invisibles à l'œil nu. Grâce à des colorations spécifiques (comme Hématoxyline-Éosine), elles permettent de différencier les divers composants des tissus, comme les noyaux, le cytoplasme, et les fibres extracellulaires.



2- Diagnostic médical : En médecine, l'histologie est utilisée pour diagnostiquer une grande variété de maladies, notamment les cancers. En examinant des coupes de tissus pathologiques, les histologistes peuvent identifier des anomalies cellulaires et tissulaires, ce qui est crucial pour le diagnostic et la planification du traitement.

3- Recherche en biologie et en médecine : En recherche fondamentale, les techniques histologiques permettent d'étudier le développement des tissus, les réponses des cellules aux stimuli et les effets des médicaments. Elles sont également essentielles pour comprendre les mécanismes des maladies et les réponses du système immunitaire.

4- Analyse des tissus animaux et végétaux : Dans le cadre de l'écologie et de la biologie végétale, les techniques histologiques sont utilisées pour étudier la structure des tissus végétaux, l'organisation des cellules au sein des organes et les adaptations des plantes aux environnements variés.

II. Microscopie optique : techniques et applications



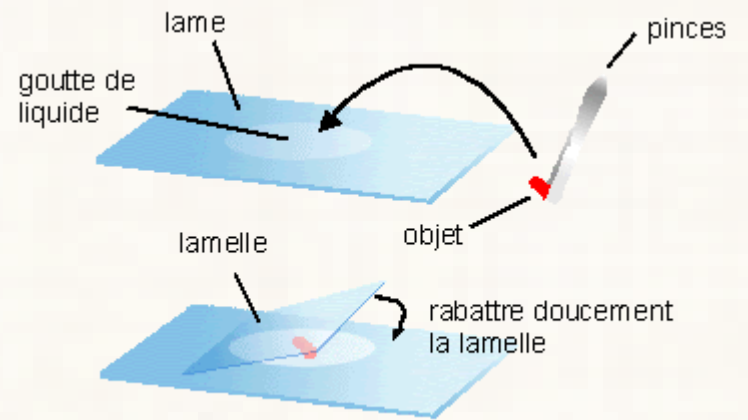
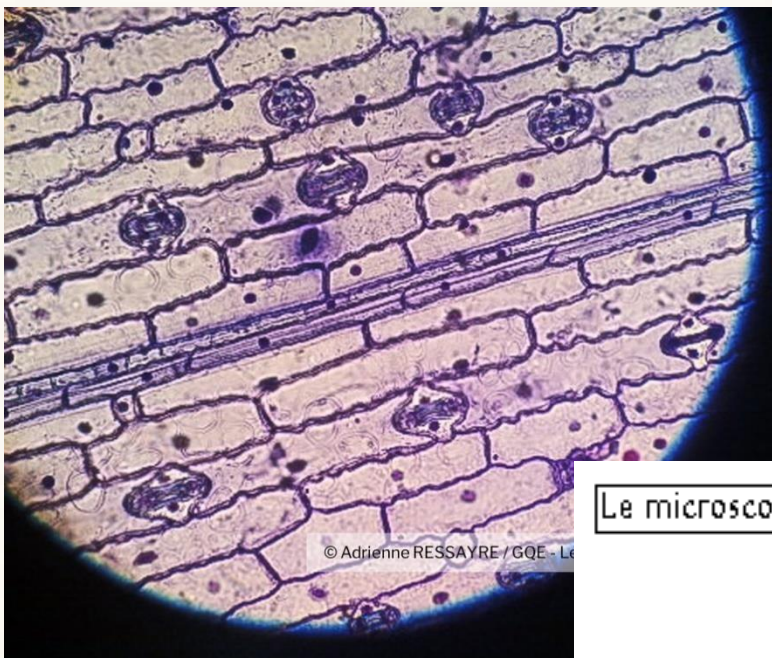
2.1. Microscopie à lumière directe

Observation des tissus végétaux et animaux en lumière directe

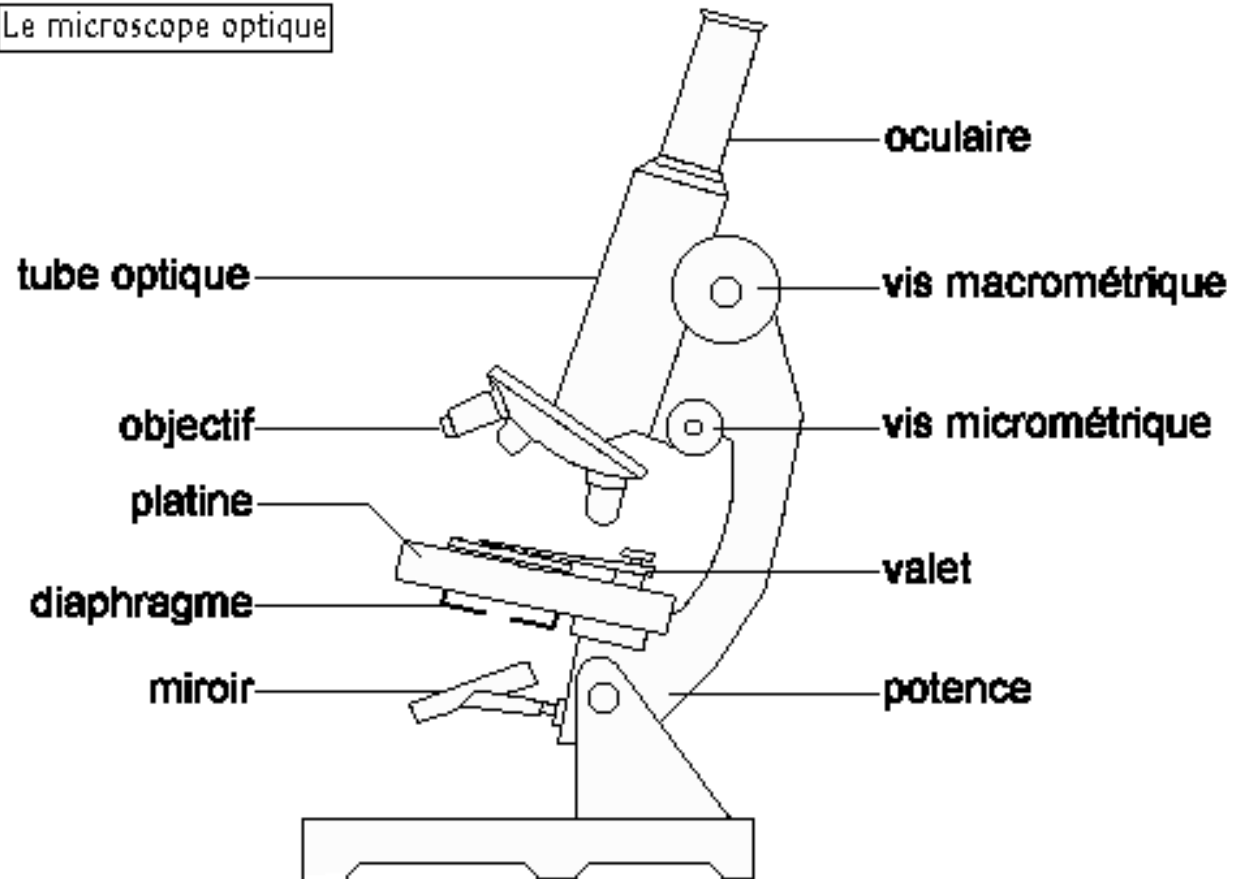
L'observation en lumière directe, sans coloration ni préparation complexe, permet de visualiser certains éléments des tissus végétaux et animaux.

Par exemple, les cellules végétales, grâce à leur paroi cellulaire rigide, sont facilement visibles, tandis que les structures des cellules animales, souvent plus délicates, nécessitent des ajustements précis d'éclairage.

Ce type d'observation est limité en résolution mais utile pour une première analyse des structures générales. Selon Baudoin (2012), cette méthode offre une "approche simple et directe de la microscopie", bien que l'utilisation de techniques complémentaires soit souvent nécessaire pour des analyses détaillées.



Le microscope optique



La préparation des échantillons pour la microscopie optique est cruciale pour obtenir des images nettes et détaillées.

Les principales étapes incluent la fixation, qui préserve la structure des cellules, suivie de l'inclusion dans des milieux comme la paraffine pour les échantillons plus épais.

L'échantillon est ensuite coupé en sections très fines à l'aide d'un microtome.

Enfin, la coloration, par exemple avec l'hématoxyline-éosine (HE), permet de distinguer les différentes structures cellulaires.

Comme le souligne Pineau (2015), "ces méthodes assurent une préservation optimale des tissus et améliorent le contraste des images microscopiques."

Les étapes de préparation des échantillons pour l'observation au microscope optique sont cruciales pour obtenir des images de qualité et bien visualiser les structures cellulaires.

Voici les intérêts des étapes de préparation :



Fixation

Immobilisation des constituants de tissulaires / cellulaires

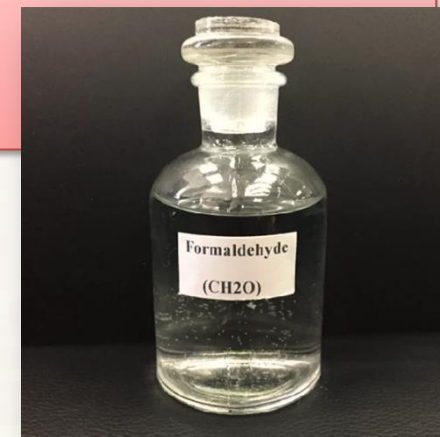
Blocage des réactions enzymatiques et prévenir l'autolyse des cellules

Prévenir **la putréfaction** bactérienne post-mortem

Permet **la technique histologique** et les colorations ultérieurs

Le fixateur le plus commun en microscopie optique (MO) est le formol (**pénétration rapide + fixation lente**)

Quantité : au moins **10 fois** plus importante que le volume de tissus à fixer



DESHYDRATATION



Pour l'inclusion en paraffine (indispensable pour pouvoir couper des tissus mous), les échantillons doivent être déshydratés en passant dans différents bains d'alcool de concentration croissante (**70 %, 90 % et trois passages dans du 100 %**), puis dans du **toluène** (deux bains). C'est une étape ingrate et fastidieuse, et les laboratoires professionnels utilisent des automates pour cette raison.

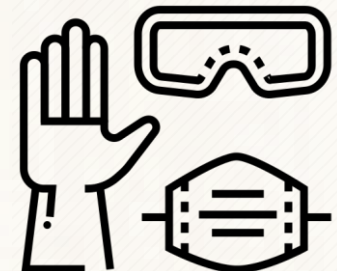
DESHYDRATATION



Déshydratation finale : En tant qu'intermédiaire, **le toluène** permet de retirer l'excès d'eau des échantillons en remplaçant les solvants alcooliques (comme l'éthanol). Il assure une transition avant l'inclusion en milieu hydrophobe (ex. paraffine).



Précaution : **Le toluène** est toxique et volatil. Il doit être manipulé en environnement ventilé avec les équipements de protection appropriés.



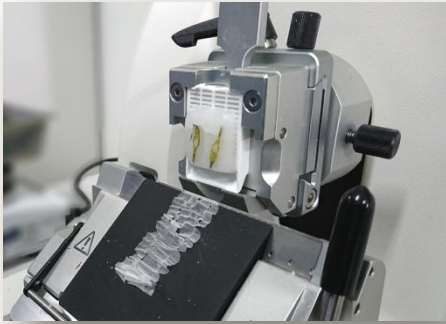
INCLUSION



- Une fois le tissu est complètement imprégné ,
- On porte la paraffine à **56/58°C** et on la place dans des petits moules et à mi remplissage on met le tissu
- À température ambiante, la paraffine durci ce que provoque **la rigidification** des fragments tissulaires prélevés
- **Démoulage** : on obtient des fragment tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.



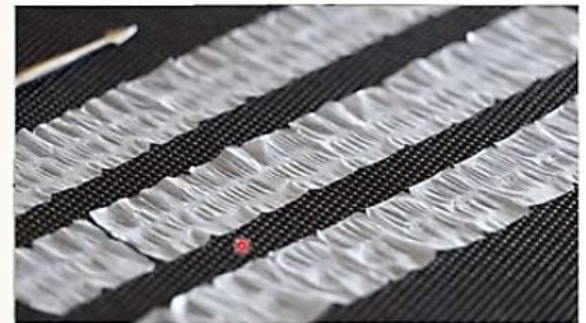
MICROTOMIE



Le microtome

On utilise pour un **microtome**, qui fait avancer un bloc sur un rasoir : le bloc avance environ 2 à 3 μm à chaque fois (les coupes mesurent environ 5 μm)

L'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire



ETALEMENT ET COLORATION



Etalement : on chauffe les lames sur une plaque chauffante et ainsi la paraffine colle à la lame



Déchauffage: on passe les lames dans le bain de toluène afin de déssoudre la paraffine

Réhydrardation: on passe les lames dans d'alcool de degré décroissant (de 100% à 70 , voire 50 et 40 %)

COLORATION



La coloration la plus utilisée est **HES** :

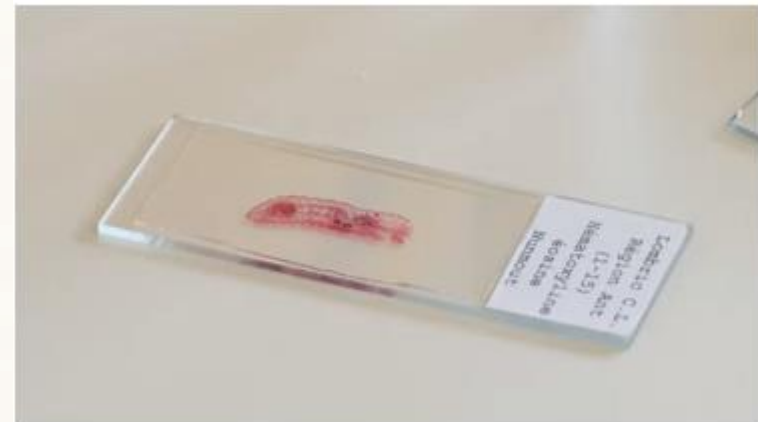
- L'**hématène** colore les noyaux en **violet** (colore les acides nucléiques)
- L'**éosine** colore les cytoplasmes en **rose** (colore les protéines)
- Le **safran** colore les fibres de collagène **en jaune**.

OBSERVATION



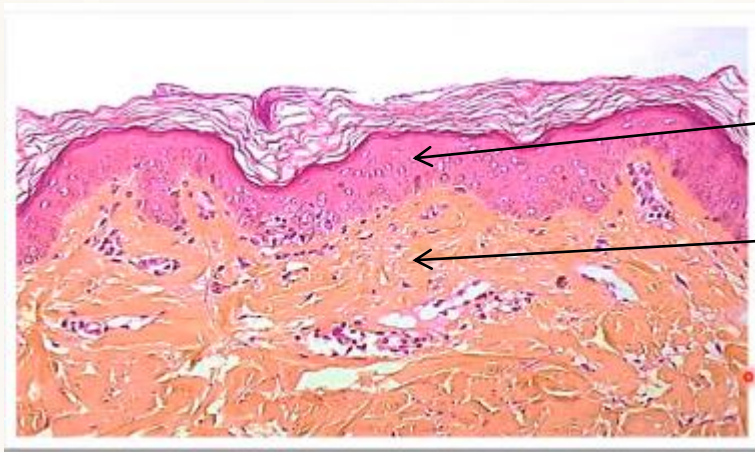
- **Montage** : les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réflexion est voisin de celui de verre

Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.





On dispose alors une préparation microscopique prête à être observée au microscope optique.



L'épiderme :

- Noyau en violet
- Cytoplasme en rose
- Les fibres de collagène en jaune

Biopsie de la peau