



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة العلوم والتكنولوجيا بـهران "محمد بوضياف" كلية العلوم الطبيعية والحياء
قسم البيوتكنولوجيا

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran "Mohamed BOUDIAF"

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biotechnologie

Polycopié de cours

Méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant

**Cours destinés aux étudiants de 2^{ème} année Licence
Filière sciences biologiques et biotechnologie**

Elaboré par :

Dr. CHERIFI Fadila

Maître de Conférences B

Année universitaire : 2023/2024

Avant-propos

La méthodologie de la recherche scientifique du vivant contribue à l'émergence de connaissances nouvelles et à l'élaboration de meilleurs outils pour exploiter les connaissances existantes.

Le domaine de la biologie représente l'un des domaines les plus importants liés à la vie de l'humain, à sa nutrition et à sa santé, donc le métier d'un biologiste reste toujours un intermédiaire entre le vivant et son environnement en faisant appel à l'expérimentation, il contribue à mieux interpréter ses observations par l'analyse et techniques du laboratoire.

Pour répondre aux objectifs souhaités par l'enseignement de la méthodologie scientifiques, nous avons préparé ce polycopié destiné aux étudiants de la deuxième année licence.

Cet enseignement permettra aux étudiants de mieux comprendre les techniques expérimentales du laboratoire en terme pratique et théorique .L'assimilation des méthodes scientifiques aidera les futures biologistes à une bonne conduite dans le domaine professionnel.

Les différentes sections du polycopié englobent les techniques de base utilisées au laboratoire suivant différentes spécialité : la cytologie, la biochimie, la génétique, l'immunologie et l'étude *in vivo*

Nous invitons nos chers étudiants à lire ce document et à l'utiliser comme support pédagogique qui les aidera à mieux acquérir les techniques u laboratoire durant leur cursus universitaire.

Résumé

Les méthodes d'étude en biologie sont multiples et diversifiées selon les objectifs souhaités par leur applications .Pour faciliter l'apprentissage de ces méthodes aux étudiants de la deuxième année LMD, nous avons rédigé ce polycopié de cours intitulé : «méthodologie scientifiques et technique d'étude du vivant».

Le programme des cours est assez consistant comportant ainsi sept chapitres, donc nous avons jugé utile de simplifier l'information et de donner l'essentiel afin d'améliorer l'assimilation des étudiants durant leurs cours.

Ce polycopié est divisé en deux grandes parties: la première partie met l'accent sur les différentes méthodes d'étude de la cellule sur le plan morphologique (méthodes cytologiques), sur le plan composition biochimique (analyses biochimiques, cytochimiques et immunologique) et celui de la génétique (méthodes du génie génétique).

La deuxième partie du programme s'intéresse aux méthodes d'approches aux vivants que ce soit un individu végétal ou animal, cette partie s'intéresse également aux paramètres démographie liés à la répartition de ces individus dans leur habitat naturel .finalement ,ce polycopié est finalisé une liste des références bibliographiques utilisées pour rédigés ce document.

Mots clés : Techniques, Cytologie, Biochimie, Immunologie, Génie génétique, Vivant, herbier, démographie, population.

Table des Matières

Avant-propos	
Résumé	ii
Abréviations	iii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Tables des matières	viii

Introduction	01
---------------------	-----------

Première partie : Méthodes d'études de la cellule

Chapitre I. Méthodes cytologique

1. Le microscope définition et notions importantes	04
1.1 Définition de la résolution	05
1.2 Définition de la distance de travail	05
2. Classification des microscopiques	06
2.1. Les microscopiques photoniques	06
2.1.1. Microscope à lumière directe	07
2.1.1.1. Principe du fonctionnement	07
2.1.1.2. Les composants du microscope	07
2.1.1.3. Préparation des échantillons	09
2.1.1.4. Préparation des coupes anatomiques fixées	09
2.1.2. Microscope à lumière fluorescente	11
2.1.2.1. Principe et fonctionnement	11
2.1.3. Microscope en contraste de phase	13
2.1.4. Microscope confocale	14
2.1.4.1. Définition	14
2.1.4.2. Principe	14
2.1.5. Microscope à fond noir	15
2.1.5. Fonctionnement du microscope à fond noir	15
2.1.6. Microscope à lumière polarisée	16
2.1.6.1. Définition	16
2.1.6.2. Principe et fonctionnement	16
2.2. Avantages et limites des microscopes photoniques	17
2.3. Microscope électroniques	18
2.3.1. Définition	18
2.3.2. Principe de la microscopie électronique	19
2.3.3. Types de microscope électroniques	19
2.3.3.1. Microscope électroniques à transmission MET	19
2.3.3.1.1. Concept et principe	19
2.3.4.1.2. Techniques de préparation des échantillons	19
2.3.3.2. Microscope électroniques à balayage MEB	21
2.3.3.2.1. Définition et principe	21
2.3.3.2.2. Prélèvement d'un échantillon biologique	22
2.3.3.2.3. L'ombrage de l'échantillon	22
2.4. Avantages et limites de microscopie électronique	23

1. Préparation d'un homogénat cellulaire	24
1.1. Définition	24
1.2. Technique de préparation d'un homogénat cellulaire	24
1.2.1. Le broyage mécanique.....	24
1.2.2. Le broyage électrique	24
1.2.3. Lyse par choc osmotique	25
1.2.4. Lyse par sonification	25
2. Le fractionnement des constituants d'un homogénat	25
2.1. La centrifugation	26
2.2. Ultracentrifugation	26
2.2.1. Ultracentrifugation différentielle	26
2.2.2. Ultracentrifugation par gradient de densité	28
3. La spectrophotométrie.....	29
3.1. Principe et fonctionnement	29
3.2. Applications de la spectrophotométrie	30
3.3. Calcul de la concentration d'une substance chimique.....	31
3.3.1. Méthode directe	31
3.3.2. Méthode indirecte	32
4. L'électrophorèse	32
4.1. Principe.....	32
4.2. Description de quelques techniques électrophorétiques	33
4.2.1. L'électrophorèse sur papier	33
4.2.2. L'électrophorèse sur gel	33
4.2.3. L'électrophorèse verticale des protéines	33
4.2.4. L'électrophorèse horizontale des acides nucléiques	36
4.2.5. L'isofocalisation	37
5. Chromatographie	38
5.1. Définition.....	38
5.2. Les types de chromatographie	38
5.2.1. Chromatographie en phase liquide	38
5.2.1.1. Chromatographie sur colonne	38
5.2.1.2. Chromatographie d'échange d'ions	38
5.2.1.3. Chromatographie sur gel perméable	39
5.2.1.4. Chromatographie sur papier.....	39
5.2.1.5. Chromatographie sur couche mince.....	40
5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse	40

Chapitre III. Méthodes cytochimiques et immunologiques

1. Les techniques cytochimiques	41
1.1. Détection par réaction chimique : détection des aldéhydes par le Réactif de Schiff	41
1.2. Technique d'Autoradioactivité.....	42
1.3. Techniques immunocytologiques	43
1.4. Techniques cytoenzymologiques.....	44
1. Méthodes immunologiques	44
2.1. Rappels sur les anticorps et les antigènes	44
2.1.1. Définition d'un anticorps.....	44
2.1.2. Définition d'un antigène	44
2.1.3. Réaction antigène-anticorps.....	44

2.2. Principales Méthodes immunologiques.....	45
2.2.1. Méthodes d'immunoprécipitation.....	45
2.2.1.1. L'immunoprécipitation en solution.....	45
2.2.1.2. Immunoprécipitation d'antigènes en milieu gélifié (immuno-diffusion).....	46
2.2.1.2.1. Technique de Mancini.....	46
2.2.1.2.2. Technique d'Ouchterlony.....	46
2.2.1.2.2. Immuno électrophorèse	47
2.2.2. Méthodes d'immunoagglutination.....	47
2.2.2.1. Histoire et Principe.....	47
2.2.2.2. Différents types de tests d'agglutination.....	48
2.2.2.2.2. L'agglutination passive	48
2.2.3. Méthodes d'immuno radioactivité RIA.....	48
2.2.4. Méthodes immunoenzymatiques	49
2.2.4.1. ELISA direct.....	49
2.2.4.2. ELISA Sandwich	50
2.2.5. Méthodes d'immunofluorescence.....	50
2.2.6. Néphélométrie.....	51

Chapitre IV Les méthodes de la génie génétique

1. Extraction d'ADN.....	52
2. Amplification d'ADN par PCR (polymerase Chain reaction).....	52
2.1. Définition et principe.....	52
2.2. Les étapes de la PCR	53
3. Méthode de Sanger	54
3.2. Histoire et définition.....	54
3.3. Principe et technique.....	54
4. La technique de Maxam et Gilbert	54

Chapitre II : Techniques d'approches au vivant

1. La collecte.....	61
1.1. Définition.....	61
1.2. La notion d'échantillonnage	61
1.3. Les types d'échantillonnage	61
1.3.1. Échantillonnage probabiliste	61
1.3.2.Échantillonnage non probabiliste.....	62
2. La dissection.....	63
2.1. Définition.....	63
2.2. Les étapes de la dissection	64

3. Élevage	64
3.1. Le transport	65
3.2. L'Acclimatation.....	65
3.3. L'Alimentation	65
3.4. L'Abreuvement	65
3.5. L'Hygiène.....	65
4. Culture	65
Références bibliographiques	71

Introduction

Étant une science relativement expérimentale, la biologie implique l'apprentissage en différentes techniques du laboratoire. Cet apprentissage vise la familiarisation du biologiste avec les méthodes de travail, appareils et instruments typiques d'un laboratoire d'analyse ainsi que la capacité de travailler sur paillasse.

Dans ce contexte et pour répondre à ces besoins pédagogiques, l'enseignement de base en biologie offre aux étudiants de la deuxième année biologie un programme de cours intitulée : "méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant".

Le programme de cours a été bien cerné par les comités pédagogiques universitaires en tenant comptes de la possibilité de la réalisation de travaux pratiques et dirigés.

Nous avons eu la chance d'enseigner les cours et les travaux pratiques de ce module durant quelques années, ces cours ont été destinées pour les étudiants de la filière sciences biologiques et filière biotechnologie.

Ce polycopié remis pour expertise constitue une ressource pédagogique pour l'enseignement ainsi que la préparation des cours sur la plateforme en ligne, nous avons préparé les subdivisions des cours et leur contenu suivant le canevas fourni par notre établissement.

Le programme des cours s'articulera autour de deux grandes parties, la première partie s'intitule : Méthodes d'études de la cellule, cette partie est structurée également suivant quatre chapitres dans lesquels différents méthodes ont été illustrées à savoir ; les méthodes cytologiques, biochimiques, cytochimiques et immunologiques et finalement les méthodes du génie génétique.

La deuxième partie du programme met le biologiste au contact avec le vivant sur terrain allant des techniques d'élevage vers l'expérimentation *in vivo*. Dans cette partie également l'étudiant va acquérir les méthodes de préparation d'un herbier.

Le programme de cours s'achève avec un aperçu sur les paramètres démographiques des populations animales et végétales.

Finalement, ce polycopié est finalisé par une bibliographie qui regroupe les ouvrages et les supports utilisés pour la préparation de ces cours.

Les méthodes cytologiques

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle fondamentales des organismes vivants, pour étudier la structure et le fonctionnement de cette unité, nous avons recours à une multitude de méthodes et de techniques classiques et modernes développée suite à l'évolution technologique. Dans ce module , nous allons décrire trois types de méthodes d'études du vivant en traitant les points suivants :Le principe , l'objectif , les appareilles et les techniques utilisées , les avantages et les inconvénients de chaque technique.

L'observation des structures cellulaires est devenu un moyen simple et rapide grâce à la mise au point de nouveaux instruments microscopiques.

Le développement des techniques microscopiques est l'objet des efforts permettant une meilleure détermination de la morphologie cellulaires jusqu'au niveau moléculaire.

Ce chapitre recense les principales techniques de microscopie photonique (optique, polarisant, fluorescente, confocale et microscope à fond noir) et électronique (MET, MEB) appliquées à l'observation d'échantillons biologiques, nous traitons également les techniques de préparations que doivent subir les échantillons avant leur observation, ces dernières varient en fonction de la nature de l'objet à observer et du type d'information que l'on veut en tirer.

1. La microscopie (définitions et notions importantes)

L'étymologie (du grec *mikros*, petit ,et *skopein* ,examiner)renvoie à l'examen d'objets ou de détails d'objets à peine perceptibles ou invisibles à l'œil nu (Salvan et Davoust ,2015).

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures à l'échelle microscopique. Le microscope donne l'accès à la structure microscopique des objets observés, la performance principale de cet instrument est donc sa résolution et ses caractères technologiques.

Il existe plusieurs types de microscope, nous pouvons faire la différence entre eux selon les éléments suivant : la résolution et la distance de travail.

1.1. Définition de la résolution

Le pouvoir résolvant d'un microscope correspond à la capacité que possède cet instrument de fournir des images distinctes de points très rapprochés dans un objet (Fig.1). Ce pouvoir dépend à la fois de la longueur d'onde du rayonnement et des lentilles de l'objectif, les limites du pouvoir résolvant est définie comme étant la distance minimale qui permet une séparation entre deux points de l'objet à examiner (De Robert, 1983).

Exemple : le microscope optique donne une résolution au maximum de 0,2 μm .

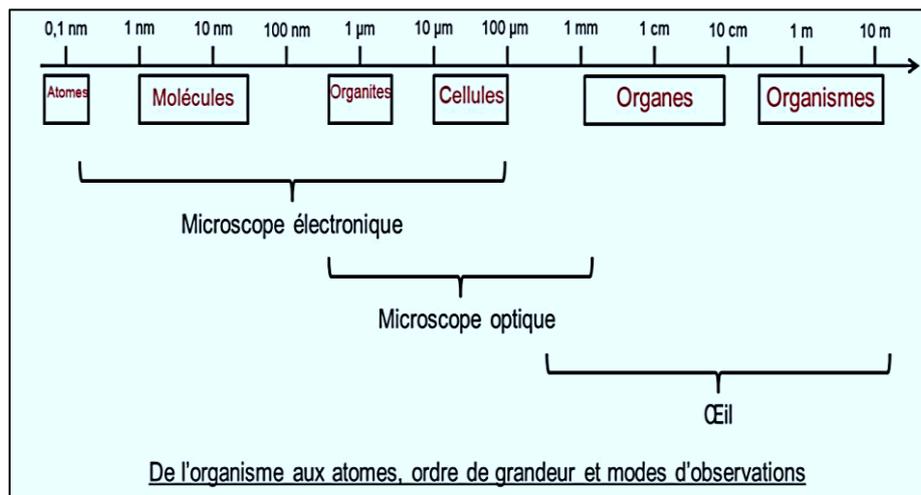


Fig.1 : Comparaison résolution de l'œil et celle des microscopes ⁽¹⁾

1.2. Définition de la distance de travail

La distance de travail correspond à la distance entre l'objectif du microscope et l'objet qu'on veut observer. Si la distance de travail est petite, cela signifie que le grossissement du microscope est plus fort et donne des images plus nettes.

Cette distance, la frontale, ou 'Working Distance' pour les anglosaxons, varie usuellement de quelques millimètres pour les objectifs de faible grossissement ($\times 10$) à quelques Figure 10: Courbes représentant le contraste de l'image d'une mire sinusoïdale en fonction de sa fréquence spatiale pour différente cohérence d'éclairage.

Une grande frontale facilite le travail de l'utilisateur en limitant le risque de collision entre la préparation et l'objectif et permet également l'observation d'objets spéciaux entourés de reliefs, comme les circuits intégrés avec leurs plots de connexion.

Il est cependant très difficile, bien que possible mais très coûteux, de concilier grande distance frontale et forte ouverture numérique. Ainsi, les constructeurs proposent donc en général à côté de la série d'objectifs standard, des objectifs spéciaux à longue frontale pour les utilisateurs intéressés par cette propriété.

L'objectif standard récent de courte frontale possède en général une monture à ressort qui limite la gravité d'une collision objectif/préparation (Sauer et Surrel, 2008).

2. Classification des microscopes et applications :

La classification des microscopes repose sur la nature du rayonnement. On distingue la microscopie optique (ou photoniques) qui utilise les rayons photoniques du spectre visible, infrarouge ou encore ultraviolet. Le deuxième type regroupe les microscopes électroniques qui utilisent les propriétés ondulatoires de faisceaux d'électrons accélérées (Salvan et Davoust, 2015). Les types de microscopes sont divisés en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée, on distingue deux grands types de microscopes suivant leur résolution : les microscopes photoniques et les microscopes électroniques.

2.1. Les Microscopes Photoniques

Les microscopes photoniques servent à contempler des préparations transparentes et très fines. Au plus la préparation est fine, au plus vous pourrez l'observer avec précision. Sur ces types de microscopes le rayon de lumière est normalement projeté d'en bas, en traversant la préparation lorsqu'elle est transparente.

Ces microscopes utilisent différents types de lumière (photons de lumière): blanche (directe), fluorescente ou une lumière en phase

La production d'images en microscopie photonique nécessite

- Une source de rayonnement et un dispositif d'éclairage de l'objet
- Une optique de transmission assurant la fonction d'agrandissement
- Un détecteur traduisant l'image sur un support (œil, plaque photographique, écran d'ordinateur pour des images numérisées) (Salvan et Davoust, 2015).

2.1.1. Microscope à lumière directe

2.1.1.1. Principe du fonctionnement

On constitue donc un instrument de deux parties ; un objectif donne de l'objet une image agrandie et un oculaire qui joue exactement le rôle d'une loupe et au travers duquel on observe l'image agrandie. La lumière blanche est un mélange de radiations de longueur d'ondes comprises entre 0.4 et 0.7 μm environ (Francon, 1988).

Dans ce type de microscopie simple, les lentilles biconcaves sont employés qui participent à l'agrandissement de l'objet observé (Fig.2). Une onde de lumière envoyée sur la préparation puis émise par cette préparation, cette onde est captée et concentrée par l'objectif en dernier l'oculaire va créer une image observable.

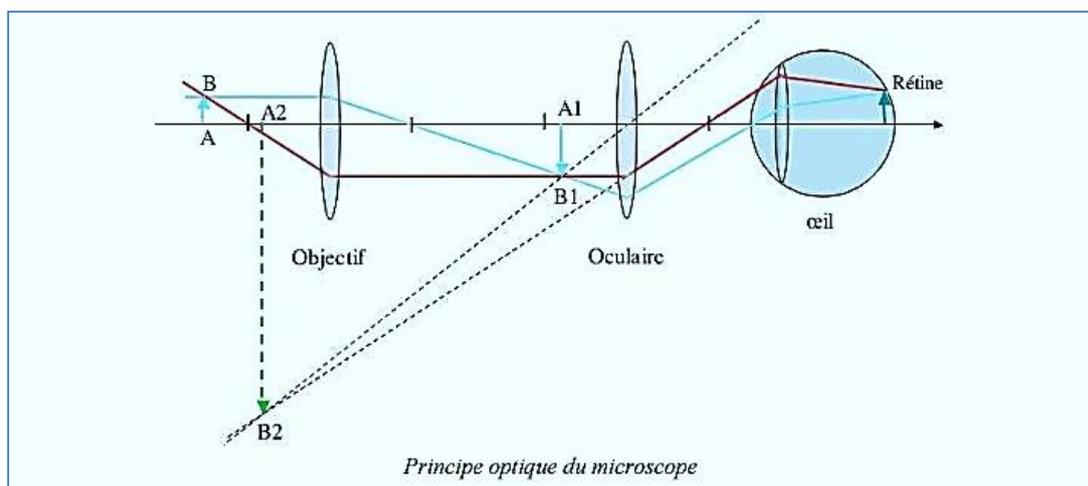


Fig. 2 : Principe de la microscopie photonique (Sauer et Surrel, 2008).

2.1.1.2. Les composants du microscope à lumière directe

Les microscopes à lumière directe permettent l'observation de cellules vivantes ou mortes, grâce à des coupes très fines de préparation, son pouvoir séparateur ou limite de résolution est de 0,2 μm . On obtient donc un grossissement $\times 1000$.

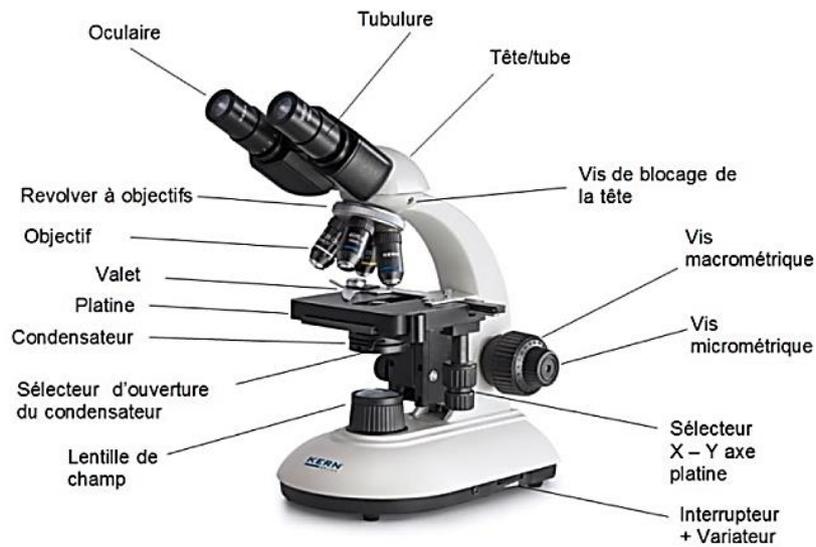
Un microscope à lumière directe comporte principalement les éléments suivants : une source lumineuse, un condenseur, des objectifs et des oculaires (Planche 1).

➤ **Les objectifs** : étant la partie la plus importante du microscope formé de trois lentilles

C'est les éléments les plus importants du microscope, détermine la qualité de l'image qu'on peut obtenir (forme l'image primaire).

L'image formée par l'objectif est agrandie à son tour par l'oculaire qui est forme, l'image finale est observée en fonction des grossissements suivant :

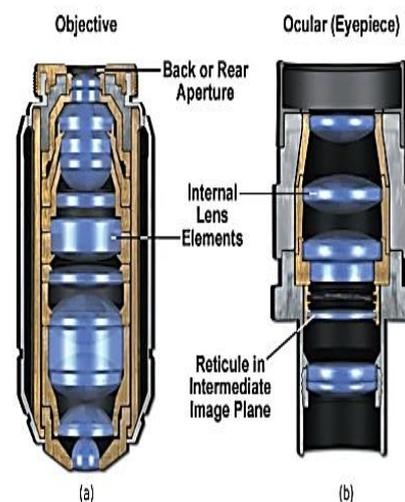
- Objectifs. Grossissements x10, x15 à 25), x 40, x60x et 100x
- Oculaires. Grossissements normalisés : 6.3x, 10x, 16x, 25x



Les composants da microscope photonique



• Les objectifs



Détail de l'objectif et l'oculaire

Planche 1: Les composants du microscope photonique (Murphy et Davison, 2012).

2.1.1.3. Préparation des échantillons

Les observations des échantillons biologiques par le microscope à lumière directe peuvent se faire comme suit:

- Observation d'échantillon vitale sans colorants (naturelles):ex observation des globules rouges.
- Observation après coloration en utilisant des produits chimiques, ex : coloration de tissus végétaux par le rouge Congo.
- Observation après fixation et coloration des tissus (tissus devient non vitale après sa fixation): cette technique nécessite la préparation des coupes au microtome.

2.1.1.4. Préparation des coupes anatomiques fixées

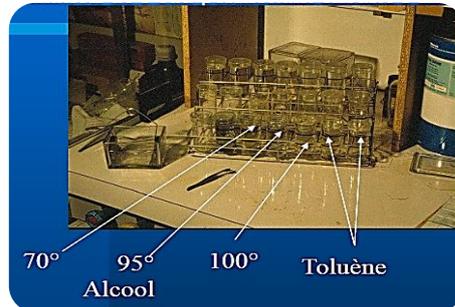
La préparation des coupes anatomiques sous la forme fixée permet de minimiser les altérations tissulaires de préserver les structures cellulaires dans un état aussi proche possible que celui du vivant, ce type de préparation peut être réalisé comme suit :

- **La fixation** se fait par le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, qui sont des aldéhydes très réactifs.
- **La déshydratation** permet l'élimination de l'eau qui sera remplacé par des solvants (xylène et toluène).
- **L'inclusion** dans de la résine, cire ou paraffine, permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.
- **La formation** des coupes ultrafines est réalisée par des **microtomes**.

Les étapes détaillées de la préparation des coupes anatomiques fixées sont regroupées dans la planche 2.



Fixation des échantillons



La déshydratation



L'inclusion



Démoulage des blocs de paraffine



Confection des coupes



Préparation des lames pour l'observation microscopique

Planche 2: Étapes de la préparation des coupes anatomiques fixées (Naciri, 2011).

2.1.2. Microscope à fluorescence

Le microscope à fluorescence fait partie des microscopes photoniques, cet appareil permet d'analyser un échantillon éclairé par une lumière fluorescence caractérisée par une longueur d'onde précise.

La microscopie à fluorescence utilise des colorants fluorescents (fluorophores ou fluorochromes), ces molécules absorbent une lumière monochromatique. La plupart des molécules de la cellule n'étant pas très fluorescentes, les étiquettes fluorescentes à imager sont généralement introduites par l'expérimentation, cela permet de cibler les étiquettes sur la ou les molécules d'intérêt.

2.1.2.1. Principe et fonctionnement

La microscopie à fluorescence est généralement réalisée par épifluorescence (Fig. 3), c'est-à-dire que la lumière d'excitation de la fluorescence éclaire l'échantillon à travers le même objectif que celui utilisé pour détecter l'émission de l'échantillon (Murphy et Davidson, 2012).

Les préparations biologiques à observer (ex : tissus végétale sont traités tout d'abords dans une solution fluorochromes puis placés sous le microscope.

Une solution fluorochromes contient un ou plusieurs produits de type fluorescents, ces produits peuvent colorer des molécules dans la cellule et les rendre fluorescentes c'est à dire émettre une lumière colorée au microscope à fluorescence.

- Ex de solution fluo-chromes : DAPI (4',6-diamidino-2- phénylindole) est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN.

La figure 4 représente une coupe anatomique du rein d'une souris colorée en utilisant trois types de substances fluorochromes, ses derniers se fixent par affinité chimique aux molécules cibles.

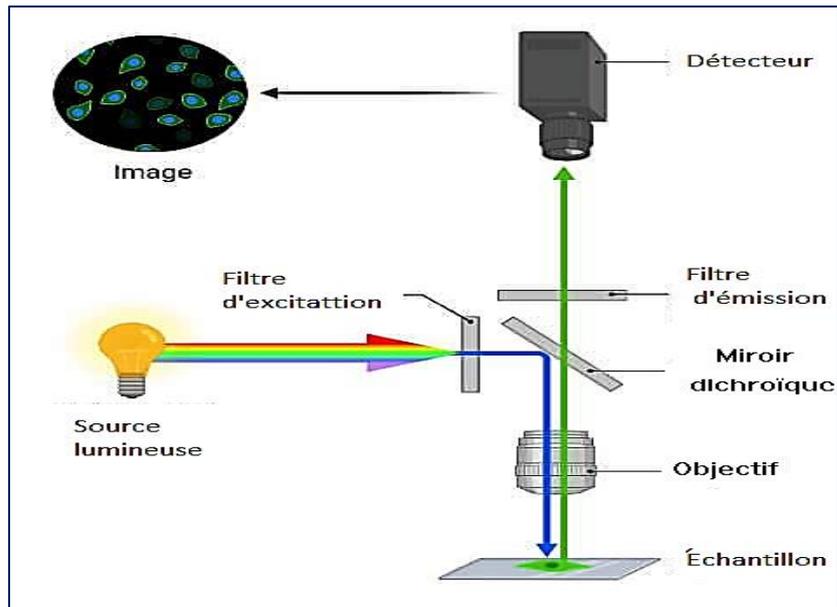


Fig.3: Principe de la microscopie à fluorescence ⁽²⁾

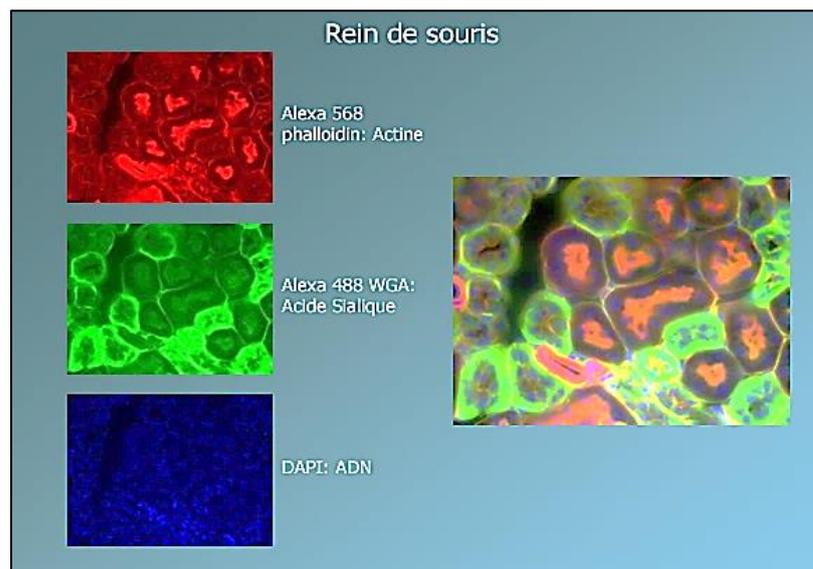


Fig. 4: Effets des substances fluorochromes une coupe anatomique du rein d'une souris (Abramovitz, 1993).

D'autres techniques de microscopie à fluorescence consistent à introduire des anticorps marqués par fluorescence qui se lient à des protéines spécifiques dans les cellules, et l'introduction génétique d'une protéine fluorescente. En immunofluorescence, les cellules sont d'abord fixées pour réticuler les protéines dans la cellule, puis perméabilisées pour permettre aux anticorps d'accéder à la matrice cellulaire.

2.1.3. Microscope en contraste de phase

C'est une technique microscopique qui permet l'observation des cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine, elle a l'avantage de permettre l'observation des cellules vivantes sans fixation.

Le principe consiste à éclairer l'échantillon avec un anneau lumineux, qui donne plusieurs faisceaux lumineux caractérisés par différents indices de réfractons (n), chaque faisceau traverse les cellules à observer dans un temps très réduit :

- **Faisceau 1: en temps T1image 1**
- **Faisceau 2: en temps T2.....image 2**
- **Faisceau 3: en temps T3.....image 3**

Puisque l'appareil est développé et très rapide, les images observées se réunissent en une seule image en contraste si on l'observe sous ce type de microscope.

On peut voir très bien qu'il y a des détails sur l'image suivante par rapport au microscope simple qu'on utilise au laboratoire(Fig.5), cela est due à l'utilisation de plusieurs faisceau de lumière, chaque faisceau caractérisé par un indice de réfraction (n) donne un détail de la cellule et l'image finale obtenue sera très claire avec tous les composants de la cellule.

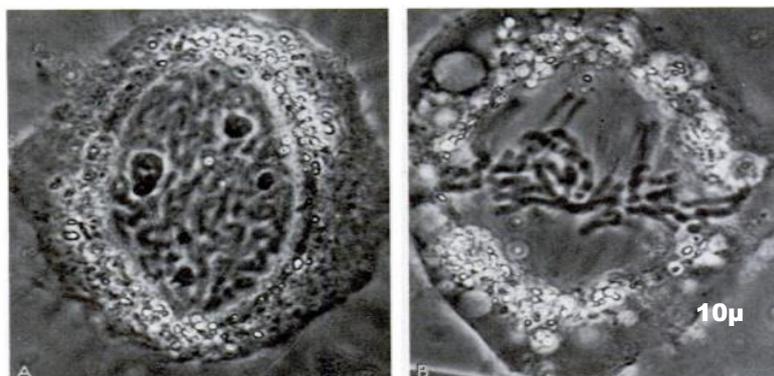


Fig.5 : Observation, par microscopie à contraste de phase, d'une division cellulaire mitotique chez une cellule vivante de l'endosperme de la plante *Haemanthus* , **A** : prophase . **B** : métaphase

Gr X 100 (De Robert, 1983).

2.1.4. Microscopie confocale

2.1.4.1. Définition

L'une des principales limites de la microscopie à fluorescence est que la lumière d'éclairage excite les fluorochromes dans un cône à travers l'échantillon et que la caméra de détection ne peut pas distinguer cette lumière hors foyer de la lumière émise par le plan focal de l'échantillon.

Par conséquent, les informations focales que nous cherchons à imager sont obscurcies par des images floues des régions non focales de l'échantillon. Pour résoudre ce problème, les techniques de la microscopie confocale ont été mises au point, elles permettent d'éliminer cette lumière hors foyer.

La microscopie confocale à laser est devenue un outil précieux pour un large éventail de recherches dans les sciences biologiques et médicales. Elle permet d'obtenir des images de coupes optiques minces dans des spécimens vivants ou fixés, dont l'épaisseur peut aller jusqu'à 100 micromètres (Fig.6),.

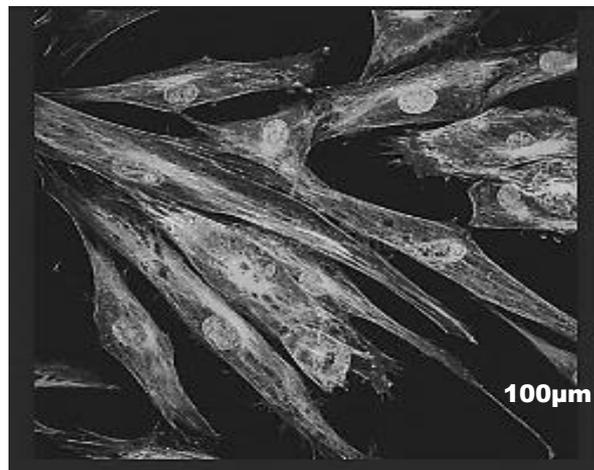


Fig.6: Observation d'un fibroblaste d'organe humain au microscope confocale x1600 ⁽⁴⁾

2.1.4.2. Principe

Dans ce type de microscopie, la lumière émise par le système laser (source d'excitation) traverse une ouverture en sténopé située dans un plan conjugué (confocale) avec un point de balayage sur l'échantillon et une seconde ouverture en sténopé placée devant le détecteur (un tube photomultiplicateur).

Lorsque le laser est réfléchi par un miroir bichromatique et balayé sur l'échantillon dans un plan focal défini (Fig.7), la fluorescence secondaire émise par des points de l'échantillon (dans le même plan focal) repasse à travers le miroir bichromatique et est focalisée en tant que point confocal au niveau de l'ouverture du trou d'épingle du détecteur (Inoué, 2006; Stelzer, 2006).

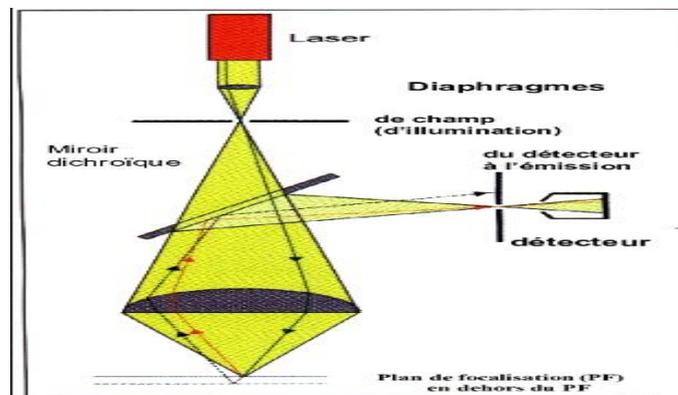


Fig.7 : mode de fonctionnement d'un microscope confocale ⁽³⁾

2.1.5. Microscope à fond noir

Ce type de microscopie est appelée également la microscopie en fond sombre, il s'agit d'une technique qui tire parti de l'éclairage oblique pour améliorer le contraste au niveau des échantillons dont la qualité des images obtenues est insuffisante dans des conditions d'éclairage normales.

Une fois la lumière directe bloquée par un diaphragme opaque dans le condenseur, la lumière traversant l'échantillon selon des angles obliques est diffractée, réfractée et réfléchie dans l'objectif du microscope pour former une image claire de l'échantillon superposée sur un fond noir. (De Grand, 2020)

2.1.5.1. Fonctionnement du microscope à fond noir

L'éclairage en fond noir nécessite de bloquer la majeure partie de la lumière qui passe généralement à travers et autour de l'échantillon (Fig.8), afin que seuls les rayons obliques puissent interagir avec lui.

La lentille supérieure d'un simple condenseur à fond noir est concave, ce qui permet aux rayons lumineux qui émergent de sa surface de former un cône de lumière creux inversé focalisé sur le plan de l'échantillon. Dans les zones en dehors de l'échantillon et lorsque l'ouverture numérique du condenseur est supérieure à celle de l'objectif, les rayons obliques se croisent et ratent l'objectif, ce qui fait que ces zones apparaissent sombres sur l'image.



Fig.8 : Image d'une puce d'eau observée au microscope à fond noir Gr x40 ⁽⁵⁾.

2.1.6. Microscope à lumière polarisée

2.1.6.1. Définition

La microscopie à lumière polarisée est une technique puissante utilisée dans divers domaines scientifiques pour étudier les propriétés optiques de matériaux. En utilisant la lumière polarisée, constituée d'ondes lumineuses oscillant dans une direction spécifique, cette méthode de microscopie peut fournir des informations précieuses sur la structure, la composition et le comportement des échantillons. La microscopie à lumière polarisée est utilisée pour étudier les propriétés optiques des matériaux, elle est appliquée dans divers domaines scientifiques, notamment la géologie, la science des matériaux, la biologie et la médecine : analyse du collagène, examen de la goutte et enquêtes médico-légales.

2.1.6.2.Principe et fonctionnement

Le principe derrière la microscopie à lumière polarisée se trouve l'interaction entre la lumière polarisée et l'échantillon observé. Pour réaliser la polarisation, un polariseur est placé dans la lumière chemin avant l'échantillon. Le polariseur laisse passer uniquement les ondes lumineuses oscillant dans une direction spécifique, tout en bloquant ceux qui oscillent perpendiculairement à cela.

Les échantillons doivent être préparés sous forme de coupes très fines ce qui permettra à la lumière de passer convenablement à travers la préparation, en parallèle le polariseur est placé

sous l'échantillon afin d'orienter la direction unique des rayons lumineux d'où vient l'appellation de ce type de microscope

Une fois l'échantillon est observé, son image est capture par un système d'imagerie numérique, la figure 9 représente un exemple d'observation en microscopie à lumière polarisée, les parties d'aspect lumineux montre la polarisation de la lumière vers la cible dont veut illustrer.

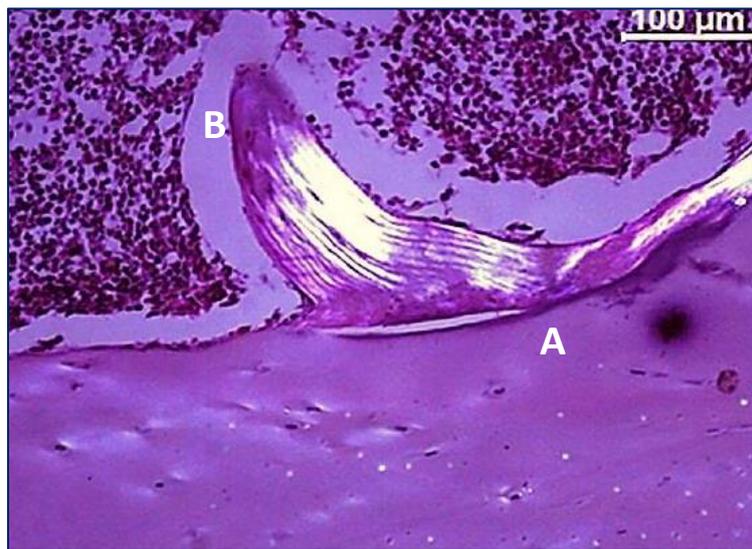


Fig .9: Images de microscopie à lumière polarisée illustrant l'insertion de fibres de collagène dans une zone du plateau vertébral sans séparations (A) et dans une zone avec séparation (B) (Herrero et al .,2014)

2.2. Avantages et limites des microscopes photoniques

Nous avons décrit dans cette section les différents types de microscopes photoniques dont chacun est utilisé pour des objectifs précis, dans le tableau 1, nous allons résumer les avantages et les inconvénients de ces microscopes, cela permettra de bien orienter les manipulateurs vers un meilleur choix d'utilisation.

Tableau 1 : Avantages et limites des microscopes photoniques

Les types de microscope photoniques	Avantages	Limites
Microscope à Lumière blanche (Lauran ,2016)	Manipulation simple et facile Obtention de vus générale de la cellule	faible contraste des cellules observées. L'augmentation du contraste des tissus obtenu sans coloration.
Microscope à Lumière fluorescente (Lauran ,2016)	Microscopes très utilisés dans la cytochimie Meilleur moyen pour la détection La localisation des molécules	convolution des images qui apparaissent flou dû à la fluorescence émise hors focus
Microscope à fond noir (Arsalan, 2022)	Observation en direct d'échantillon non colorés sans avoir besoin de préparation d'échantillons complexes	La résolution réduite ainsi que le potentiel pour les projections dus à la lumière diffusée.
Microscope en contraste de phase	Technique très performant pour les sujets biologiques transparents, d'indice de réfraction proche de celui du milieu environnant.	Il n'est pas utilisable pour les sujets épais et colorés comme des coupes de tissu.
Microscope à Lumière polarisée (Arsalan, 2022)	Performance et précision pour l'imagerie de quelques structures cellulaires : les fibres, collagène ect	Application plus spécialisée en chimie des matériaux et peu utilisé en biologie vue les particularités de son éclairage

2. 3. Le microscope électronique

2.3.1. Définition

Les microscopes électroniques sont basés sur l'utilisation des électrons, ils utilisent un faisceau d'électrons au lieu de lumière.

Les microscopes électroniques disposent d'une longueur d'onde beaucoup plus courte que la lumière visible, et une plus grande résolution est obtenue dans la plage des structures atomiques.

2.3.2. Principe de la microscopie électronique

L'échantillon à observer est bombardé par un flux d'électrons à la place de la lumière, les électrons se déplacent selon une onde de matière, cette longueur dépend de la tension électrique à laquelle sont soumis les électrons. L'image est perceptible grâce à un écran fluorescent, ces images peuvent être photographiées et sont souvent agrandies ensuite.

2.3.3. Types de microscopes électroniques

2.3.3.1. Microscope électronique à transmission MET

2.3.3.1.1. Concept et principe

La microscopie électronique à transmission (MET) est un outil idéal pour étudier la structure interne des cellules et de différents types de matériaux biologiques.

L'objet à observer est placé sur le trajet du faisceau d'électrons, ces derniers traversent l'échantillon, les régions denses de l'échantillon se distinguent donc par des zones sombres sur l'image par contre les électrons qui traversent les zones transparentes de l'échantillon donnent plus de détails sur l'écran fluorescent.

En Biologie, le MET est destiné à l'étude des ultrastructures cellulaires par contre le MEB est utilisé souvent dans d'autres disciplines tel que l'étude de la structure des matériaux.

Le bombardement électronique et l'évaporation sous vide de l'eau structurale nécessitent des méthodes de préparation complexes pour éviter l'endommagement de l'échantillon à observer et garder sa stabilité.

Par exemple, dans les études de recherche biologique, une épaisseur de 300-500 nm est généralement indiquée. Pour stabiliser l'échantillon et préserver les structures de l'échantillon, différentes méthodes de préparation sont utilisées, impliquant différentes étapes en fonction du type d'étude et de la structure de l'échantillon (Tizro et *al.*, 2019).

2.3.3.1.2. Techniques de préparation des échantillons

Les méthodes de préparation sont multiples, elles sont basées sur la fixation puis la déshydratation, l'inclusion et finalement la confection des coupes.

La particularité des MET réside dans le traitement des coupes par un produit de contraste afin qu'il soit visible suite au bombardement d'électrons.

- ***La fixation***

La fixation est considérée comme l'une des plus importantes étapes, elle peut se faire soit par voie chimique, soit par congélation. Pour la fixation chimique, des aldéhydes sont utilisés pour réticuler les protéines.

Une étape de post-fixation à l'osmium est nécessaire pour stabiliser l'échantillon, on utilise généralement le tétr oxyde d'osmium. Le tissu frais est d'abord fixé dans du glutaraldéhyde puis rincer à plusieurs reprises en utilisant l'eau ou des solutions tamponnées (Boutcher, 2012).

- ***La déshydratation***

La présence d'eau provoque l'effondrement des échantillons sous vide dans le microscope électronique, il faut donc la remplacer par un produit organique comme l'éthanol ou l'acétone. (Tizro et al. 2019), cela peut se faire en appliquant la déshydratation.

Cette déshydratation est réalisée en traitant l'échantillon dans une série graduelle de lavages à l'acétone. Les temps de déshydratation peuvent devoir être ajustés en fonction de la taille et du type de tissu, la solution de déshydratation est remplacée par un autre solvant intermédiaire tel que l'épon-acétone (Boutcher, 2012).

- ***Dursicement et inclusion***

Ce processus s'effectue en faisant durcir la résine à une température bien supérieure à la température ambiante (70 C), bien au-dessus de la température ambiante (70 C). Après incubation à 70 C pendant 2 jours, les blocs de résine époxy sont prêts à être sectionnés (Boutcher, 2012).

- ***Confection des coupes***

Les échantillons doivent être sectionnés à une épaisseur appropriée (50-500 nm). Le processus de découpage d'échantillons en sections ultrafines est connu sous le nom d'ultramicrotomie.

Un ultramicrotome muni de couteau diamanté coupe le bloc de paraffine en fines sections, ces sections sont ensuite transférées sur des grilles (porte-échantillon en cuivre de 3 mm de diamètre) recouvert d'un film de carbone de 0,1 µm d'épaisseur.

- **Coloration et obtention de contraste**

L'acétate d'uranyle à 1 % et le citrate de plomb alcalin constituent ensemble la double coloration couramment utilisée pour la microscopie électronique. Cela permet d'obtenir les images classiques en noir et blanc de la plupart des ultrastructures, une congélation par cryofixation est préférable afin de minimiser l'effet indésirable des changements osmotiques sur les protéines.

Les contrastes s'obtiennent par combinaison d'éléments de numéro atomique élevé avec certains constituants biochimiques des ultra-structures. Cette coloration est réalisée avant l'observation en plongeant pendant quelques minutes les grilles supportant les coupes dans des solutions telles que le molybdate d'ammonium, l'acétate (ou le formiate), l'acétate (ou le formiate) d'uranyle ou l'acide phospho-tungstique.

Au fur et à mesure que la solution s'évapore, le métal se concentre et finit par précipiter et former une couche le long de la grille. Ainsi, une image négative est formée à partir du modèle de distribution du métal en raison du contraste par rapport aux électrons émis par les électrons (Boutcher, 2012).

2.3.3.2. Le microscope électronique à balayage MEB

2.3.3.2.1. Définition et principe

La naissance de la microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais), dans les années 30 et 40, représente une percée majeure dans l'étude de la microstructure, la composition et les propriétés des matériaux solides.

Ce type de microscope permet d'avoir l'image superficielle des constituants cellulaires contrairement au MET qui donne le détail de ces cellules (Fig.10).

Le principe de base de la microscopie électronique à balayage est qu'un faisceau très fin d'électrons, monocinétique, balaie la surface d'un échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons (Mortier *et al*, 2011).

Les échantillons devant être placés sous vide pour l'observation, il est nécessaire dans le cas de spécimens biologiques riches en eau de les déshydrater. Les échantillons sont congelés, puis la glace est sublimée sous vide.

2.3.3.2.2. Prélèvement d'un échantillon biologique

Les échantillons sont obtenus par dissection d'un animal ou l'incision d'une plante pour prélever, il est recommandé d'immerger les organes dans le fixateur primaire avant d'effectuer les incisions pour prélever les tissus afin de ne provoquer sa lyse cellulaire.

Toutes les incisions doivent être réalisées avec des lames fraîches et tranchantes afin d'éviter la déformation des tissus, notant également que le fixateur primaire doit être utilisé tout au long du protocole de préparation de l'échantillon jusqu'à l'étape de l'enrobage de l'échantillon avant l'observation de l'échantillon dans le MEB (**Glauert, 1980**).

2.3.3.2.3. L'ombrage de l'échantillon

La technique de l'ombrage est très utilisée dans ce type de microscope, des vapeurs métalliques contenant le plomb, tungstène ou d'uranium, viennent de déposer sur la membrane-support et à la surface des objets, On obtient ainsi un effet d'ombre sur la membrane-support, d'où le nom d'ombrage donné à cette technique.

Lorsqu'un électron du faisceau atteint la surface de l'échantillon, il interagit avec les électrons des atomes rencontrés. En résultent des électrons secondaires, des électrons rétrodiffusés, une émission de rayons X, des électrons Auger, etc.

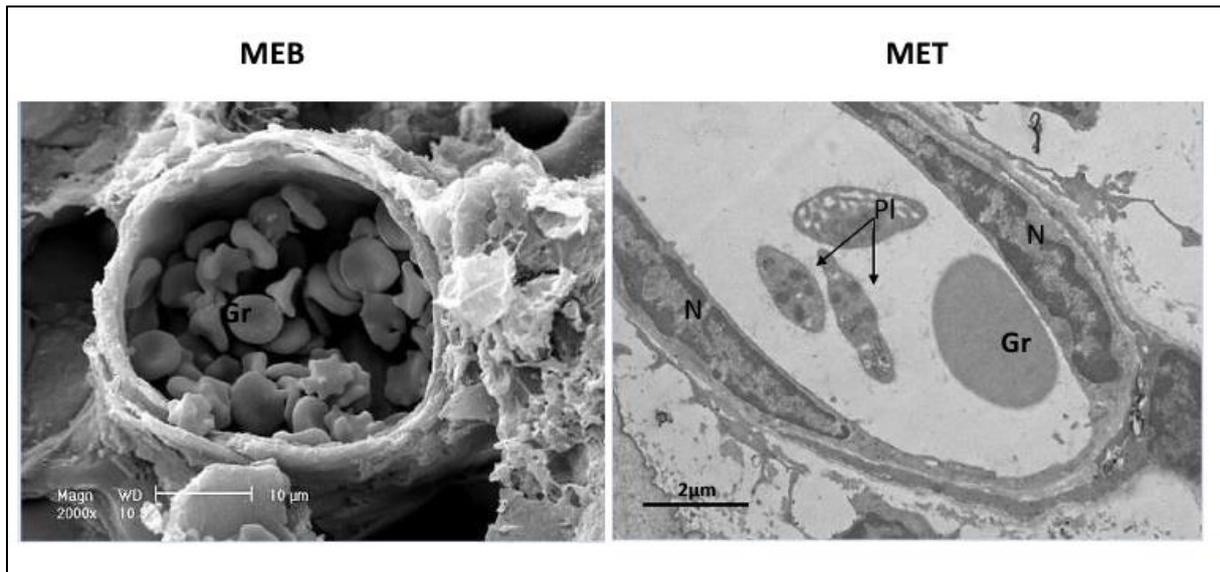


Fig .10: Images de vaisseaux sanguin en MEB et en MET ⁽⁶⁾

2.4. Avantages et limites de la microscopie électronique

La résolution d'un microscope électronique est plus petite et le pouvoir séparateur plus élevé que celui d'un microscope photonique, la résolution d'un tel microscope devrait être d'environ 0,1nm. Les grossissements obtenus sont très élevés 500 000 fois le diamètre pour 1000 fois en microscopie photonique.

Malgré la performance des microscopes électroniques, ces derniers représentent des limites :

- Les électrons ne se propagent que dans le vide très poussé ce qui empêche toute observation sur le vivant
- La pénétration des électrons dans la matière est très faible, donc les coupes doivent être très minces (de l'ordre de 0,06 à 0,09 µm ~ 0,1 µm pour 2 à 5µm en microscopie photonique), cela nécessitent plus de travail et du temps pour la préparation.

Méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules

Les méthodes biochimiques est un ensemble de techniques permettant l'étude des éléments biochimiques de la cellule, ces éléments se trouvent dans les parois, les membranes, le cytoplasme, le noyau et les organites d'une cellule.

La préparation d'homogénat cellulaire et le fractionnement des éléments biochimiques sont les étapes clé avant toute étude biochimique, dans ce chapitre on va décrire les différents techniques de préparations des homogénats cellulaires ainsi la séparation et l'analyse de leur constituants biochimiques par la spectrophotométrie, l'électrophorèse et la chromatographie.

1.Préparation d'un homogénat cellulaire

1.1. Définition

L'homogénéisation est le nom donné aux étapes méthodologiques nécessaires pour libérer les organites et autres constituants cellulaires sous la forme d'une suspension libre de composants individuels intacts.

La plupart des procédures d'homogénéisation utilisées reposent sur la force mécanique pour rompre la membrane plasmique et peuvent être complétées par des modifications osmotiques ou de température pour faciliter la rupture de la membrane (Mariana *et al* ., 2015),la suspension de cellules obtenue est appelée Homogénat ou extrait cellulaire ,ce dernier contient une variété d'organites et des molécules dissoutes dans la solution d'extractions (Ahern et Rajagopal, 2000).

1.2. Techniques de préparations de l'homogénat

1.2.1. Le broyage mécanique

Cette méthode s'adresse à des fragments de tissus. Les fragments de tissu sont très souvent congelés immédiatement par immersion dans de l'azote liquide (- 196°C) puis broyer en utilisant un substrat abrasif

1.2.2. Le broyage électrique

On utilise souvent les broyeurs électriques menu d'un piston ; qui tourne à 1000 ou 2000 tours/min et en même temps que le piston tourne, les cellules qui passent entre le piston et la paroi du tube sont alors soumises à des forces de rotation qui amènent leur éclatement.

1.2.3. Le lyse par choc osmotique

Les méthodes de lyse consistent à abaisser la force ionique du milieu dans lequel les cellules sont conservées. Cela peut provoquer le gonflement et l'éclatement des cellules. Des tensioactifs ou sels minéraux à haute concentration peuvent être utilisés pour améliorer l'efficacité de la lyse. La plupart des bactéries, des levures et des tissus végétaux, qui ont des parois cellulaires, sont toutefois résistants à de tels chocs osmotiques, on utilise généralement cette techniques pour les cellules animales (Mariana *et al.*, 2015)

1.2.4. La lyse par sonification

La sonication (Fig.11), (ondes sonores de 20 à 50 kHz) est une méthode alternative pour lyser les cellules. La membrane plasmique se rompt sous l'effet des vibrations engendrées par la propagation des ondes. Comme pour le choc osmotique, des cellules débarrassées de leur paroi seront fragilisées et donc plus facilement lysées avec ce type de technique. Cette méthode est cependant bruyante et génère de la chaleur qui peut être pour les composés sensibles à la chaleur on peut l'appliquer pour des molécules qui ne pas thermolabiles (Mariana *et al.*, 2015).



Fig .11 : Broyeur de cellules ultrason ⁽⁷⁾

2. le fractionnement des éléments de l'homogénat

Les méthodes de préparation d'homogénat peuvent garder les organites tels que les noyaux, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les lysosomes et les peroxysomes largement intacts. Cependant la séparation de ces éléments cellulaires des composants biochimiques est

nécessaire, le fractionnement des échantillons commence généralement par une centrifugation. (Ahern et Rajagopal, 2000).

2.1. La centrifugation

Fractionnement cellulaire par centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires et de fractionner les organites et le cytoplasme sous l'effet de la force de rotation. L'homogénat cellulaire est placé dans des tubes puis soumis à une force de rotation qui engendre la force de la centrifugation et les molécules sont ainsi sédimenté suivant leur poids moléculaire, solution résultante est dite surnageant tandis que le matériel insoluble formera un culot à la base du tube (Ahern et Rajagopal, 2000).

2.2. L'ultracentrifugation

Le fractionnement cellulaire par ultracentrifugation permet de séparées les différents constituants de l'homogénat, cette technique est devenu possibles qu'après le développement commercial, au début des années 1940, d'un instrument connu sous le nom d'ultracentrifugeuse dans laquelle des extraits de cellules brisées sont mis en rotation à des vitesses élevées. Ce traitement permet de séparer les composants cellulaires en fonction de leur taille et de leur densité (Albert *et al.*, 2002)

2.2.1. Ultra- centrifugation différentielle

On l'appelle ultracentrifugation différentielle puisqu'elle est basée sur la différence de vitesse de sédimentation des organites sous l'effet d'accélération importantes de l'ultracentrifugeuse.

Pratiquement, la technique consiste à soumettre un homogénat de tissu à des centrifugations successives de plus en plus rapides. Les accélérations et les temps de centrifugation sont à adapter en fonction de la nature du matériel biologique étudié.

La vitesse de sédimentation répond à l'équation suivante :

$$V = Kr^2 (dp - dm)g$$

- **V** = vitesse de sédimentation
- **K** = facteur qui dépend de la viscosité du milieu de solubilisation de la molécule
- **r** = rayon de la particule considérée comme sphérique
- **dp** = densité de la particule
- **dm** = densité du milieu
- **g** = accélération de la pesanteur

Initialement, toutes les particules sont réparties de façon homogène (A) et au fur et à mesure que progresse la centrifugation se produit, la vitesse est modifiée afin de faire sédimenter la première molécule ciblée, le surnageant est par la suite est récupéré pour une deuxième ultracentrifugation d'une autre molécule et ainsi de suite jusqu'à l'arrivée à la séparation de toutes les molécules de l'échantillon (Fig.12), (De Roberto, 1983).

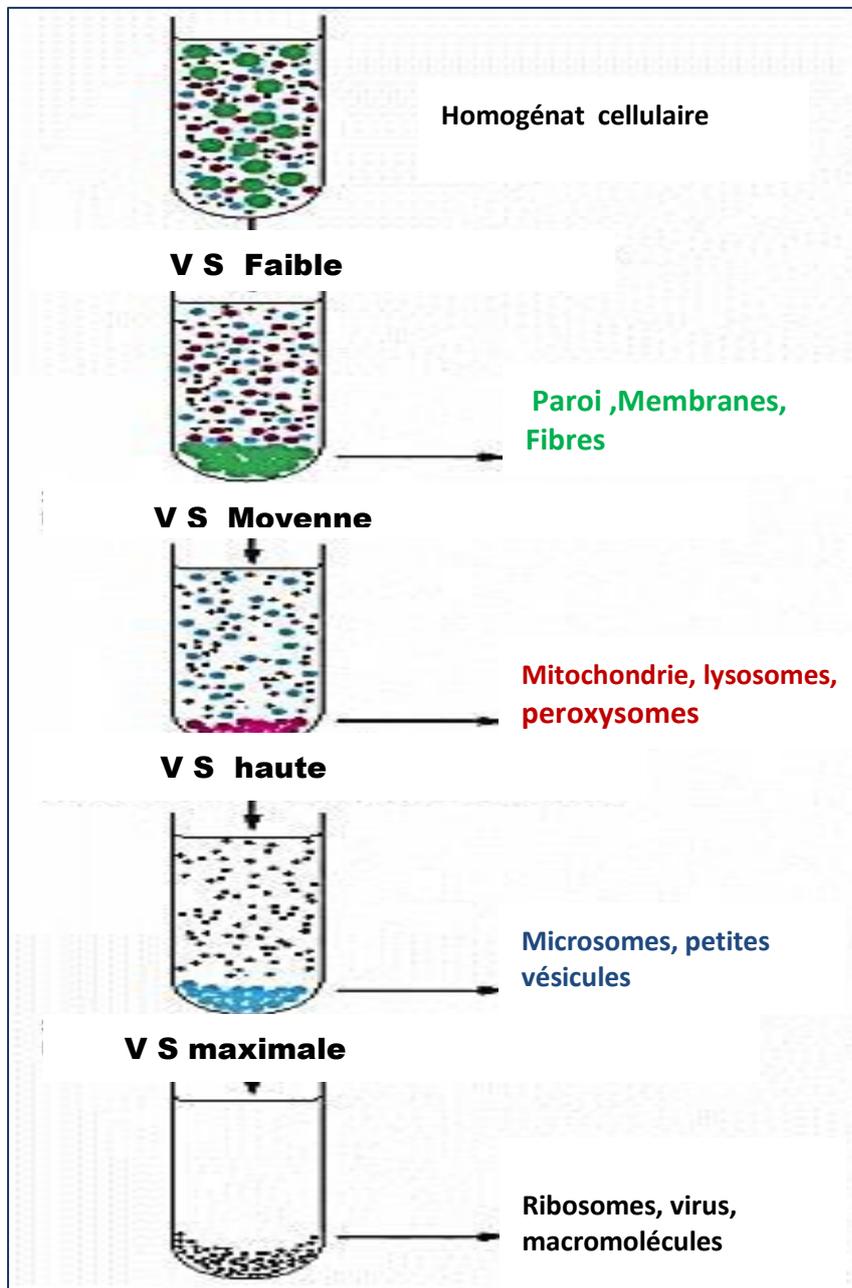


Fig .12: étapes de l'ultracentrifugation différentielle (Alberts, 2002)

2.2.2. Ultra-centrifugation par gradient de densité

Cette technique permet de séparer en une seule fois des organites qui ont des vitesses de sédimentation très voisines (très faibles différences de densité). On travaille dans un milieu présentant un gradient de densité, d'où le nom donné à la technique (Fig.13).

Les différents organites vont donc s'étagier sur toute la hauteur du tube de centrifugation. On travaille généralement sur un gradient de saccharose pour la purification d'organites (il existe une centrifugation sur gradient de chlorure de césium pour séparer les acides nucléiques (Albert *et al.*, 2002).

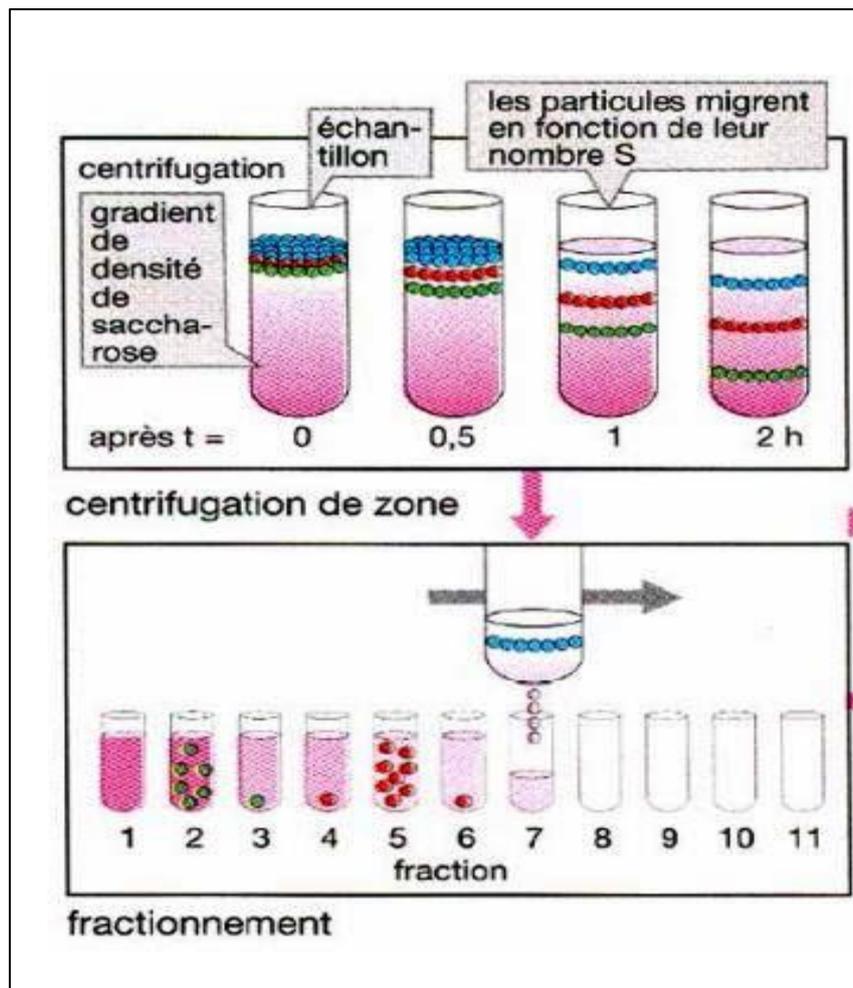


Fig.13: étapes de l'ultracentrifugation en gradient de densité ⁽⁸⁾

3. La spectrophotométrie d'adsorption atomique

3.1. Définition

La spectrophotométrie est une technique d'analyse qui repose sur l'absorption de radiations lumineuses par une ou plusieurs espèces chimiques. C'est une technique d'analyse qualitative et quantitative, elle permet l'estimation l'absorbance d'une substance sous l'effet d'une lumière monochromatique. Les longueurs d'ondes de ces lumières peuvent être comprises entre 220 et 900 nm.

Plus cette substance est en concentration levée en milieu plus elle absorbe la lumière (relation entre la concentration et l'absorbance),on utilise un appareil appelé spectrophotomètre(Fig.14).



Fig .14: Photographie d'un spectrophotomètre

3.2. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est un appareil inventé en 1940 par Arnold J. Beckmann et ses collègues de Technologies des laboratoires nationaux, généralement un spectrophotomètre se compose de quatre parties essentielles:

- Source lumineuse
- lampe au deutérium, utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm;
- lampe à filament de tungstène, utilisée dans le domaine de 350 à 800 nm.

- Monochromateur: composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie, il a pour objet de sélectionner la longueur d'onde de travail (Degallaix,1998).

Le fonctionnement de cet appareil est basé sur le principe suivant: un faisceau de lumière de longueur d'onde donnée, dans le proche UV ou le visible, traverse la solution à analyser, transparente mais colorée(Fig.15). Lorsque la lumière traverse la cuve contenant la solution à étudier, l'amplificateur du spectrophotomètre est capable de comparer l'intensité de la lumière incidente (émise) et celle transmise, puis l'absorbance de l'échantillon sera affichée selon l'équation suivante

$$A = \log (I_0/I)$$

- I_0 : intensité de la lumière émise.
- I : intensité de la lumière transmise.

La détermination de la fraction de lumière absorbée permet de déduire la concentration en substance absorbante de la solution. Il s'agit d'une application de la loi de Beer-Lambert

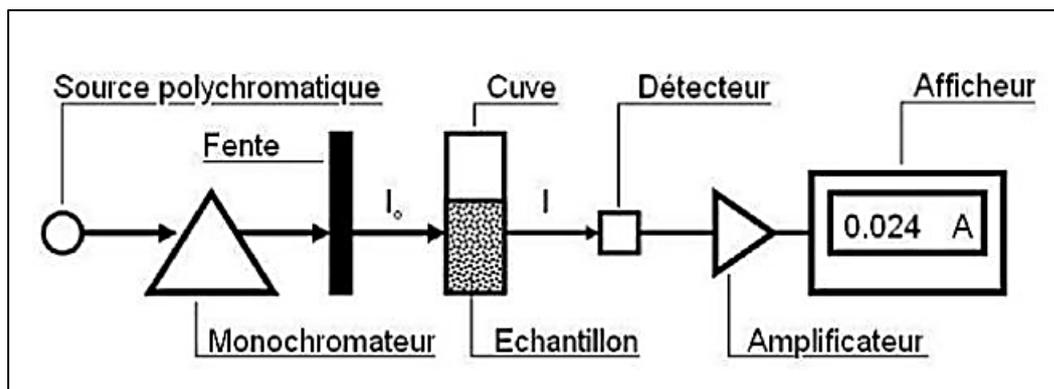


Fig.15: Principe de la spectrophotométrie (Ider, 2017)

3.3. Applications de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est utilisée dans le domaine de la chimie et la biochimie afin de :

- Doser une substance chimique.
- Suivre une cinétique enzymatique
- Le spectrophotomètre peut être utilisé pour doser une solution contenant l'espèce chimique X de concentration inconnue, c'est-à-dire estimer sa concentration C, Ex: glucose, urée, créatinine, calcium, albumine.

- Étude de la cinétique d'une réaction enzymatique (détermination d'activité enzymatique).
- En microbiologie, la densité d'une culture bactérienne est estimée par sa turbidimétrie mesurée par l'absorbance d'un échantillon à 600nm.

3.4. Calcule de la concentration d'une substance chimique

3.4.1. Méthode directe

La loi de Beer Lambert qu'on peut être appliquée pour déterminer la concentration d'une substance, cette méthode est dite directe elle nécessite que la valeur du coefficient d'extinction molaire du soluté soit connue.

Cette loi est définie comme étant une règle qui définit la relation entre les caractéristiques d'une substance et la quantité de lumière absorbée par une substance lorsqu'un faisceau de lumière la traverse.

La loi de Beer Lambert

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C$$

- **A**: l'absorbance des molécules en solution
- **C** : concentration de la molécule (mol.L⁻¹) dans un solvant.
- **ε** : coefficient d'extinction molaire du soluté.
- **L** : longueur de la cuve (cm).

✓ *Exemple :*

Le coefficient d'extinction molaire du diiode (I₂) en solution aqueuse pour un rayonnement de longueur d'onde 520 nm est de 900 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Soit l'absorbance d'une solution analysée est égale à 0.36, notant que l'échantillon a été analysé dans une cuve de 1cm de largeur.

La concentration diiode est calculée comme suit

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C.$$

$$C = A / \epsilon \cdot L.$$

$$C = 0.36 / 900 \cdot 1$$

$$C = 0.15 \text{ mg /mL.}$$

3.4.2. Méthode indirecte

La détermination de la concentration d'une substance peut se faire également par étalonnage, cette méthode est dite indirecte, elle repose sur l'utilisation d'une molécule de référence ayant les mêmes caractéristiques chimiques de la molécule que l'on veut doser.

En pratique, une série de dilutions est préparée en utilisant la molécule de référence puis ces solutions sont soumises à la lecture de leurs absorbances pour établir une courbe d'étalonnage(Fig.16).

La courbe d'étalonnage est une droite de régression linéaire, dessinée suivant la fonction $f(c) = A$, la concentration peut alors être déterminée graphiquement: l'absorbance de la solution de concentration inconnue est reportée en ordonnée et le point de la droite possédant cette ordonnée possède une abscisse ayant pour valeur cette concentration.

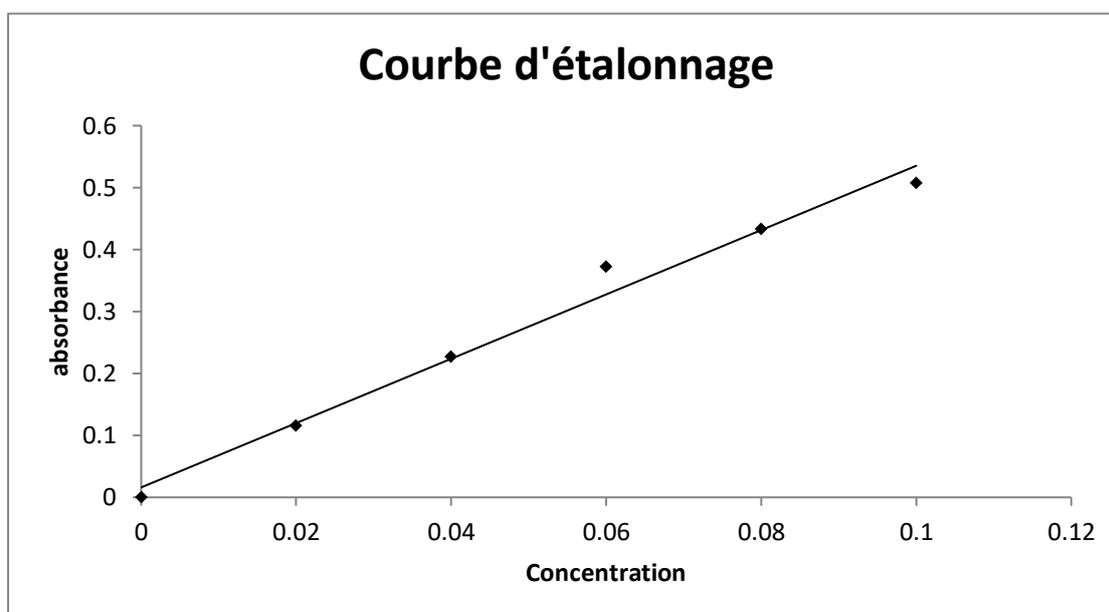


Fig .16 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre

4. L'électrophorèse

4.1. Définition et principe

L'électrophorèse est une technique de séparation des molécules chargées, elle implique le mouvement d'une substance dissoute dans une solution tampon à travers un substrat (gel,

papier, d'acétate de cellulose) sous l'influence d'un champ électrique. Les espèces ioniques migrent soit vers la cathode soit vers l'anode, suivant leur charge (Mendham *et al.*, 2006)

4.2. Description de quelques techniques électrophorétiques

4.2.1. Electrophorèse sur papier

Le terme "électrophorèse de zone" a été appliqué lorsque les mobilités sont examinées sur des bandes de papier, d'acétate de cellulose ou d'acrylamide. Ces dispositifs ont été largement utilisés pendant de nombreuses années pour l'étude de systèmes biologiques ou biochimiques, en particulier pour la séparation des protéines.

Parmi les applications montrant l'importance des méthodes d'électrophorèse modernes, on peut citer la détermination des caryotypes dans les laboratoires de chimie médico-légale et pour l'identification parentale (Mendham *et al.*, 2006)

4.2.2. Electrophorèse sur gel

Dans l'électrophorèse sur gel, le champ électrique fait migrer les molécules d'un échantillon sur l'effet de la force de pulsion exercée sur la molécule durant sa migration. On utilise généralement des gels d'agarose pour les acides nucléiques tandis que les gels de polyacrylamide sont utilisés souvent pour les protéines.

On utilise des tampons pour dissocier les constituants de l'échantillon et pour obtenir des vitesses de migration qui sont proportionnelles à leur taille.

4.2.2.1. L'électrophorèse verticale des protéines

Dans le cas des protéines, on utilise un détergent ionique, le dodecyl sulfate de sodium (SDS), la liaison du SDS aux protéines dénature les chaînes polypeptidiques et leur confère une charge négative uniforme par unité de longueur.

Les molécules de petite taille migrent rapidement et se séparent des molécules de grande taille qui migrent à leur tour plus lentement au sein de la matrice vers l'anode. Lorsque les molécules de petite taille ont atteint l'extrémité du gel, tous les constituants de l'échantillon sont séparés en fonction de leur taille (Pollard *et al.*, 2004).

- Les étapes d'une électrophorèse monodimensionnelle des protéines sont résumées dans la planche 3
- **Extraction des protéines**

La préparation de l'extrait protéique se fait par homogénéisation de l'extrait dans un tampon contenant de les deux agents dénaturants le SDS et le β mercaptoéthanol ;

- **Le β mercaptoéthanol** : composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociés.
- **Le SDS** (sodium dodécyl sulfate) : c'est un composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative et il dénature également les protéines.

L'extrait protéique est obtenu après centrifugation de l'homogénat, le surnageant contient les protéines à séparer.

Le gel d'électrophorèse utilisé dans ce type de manipulation est généralement l'acrylamide et polyacrylamide qui sera coulé dans le dispositif d'électrophorèse.

1) Dépôts des échantillons et migration

- 2) Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits en utilisant une micropipette. La préparation est soumise à un champ électrique fournie par le générateur. **Révélation et lecture des résultats**

Après migration, le gel est démoulé puis les bandes de protéines sont révélées par le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible). On obtient donc les profils suivants

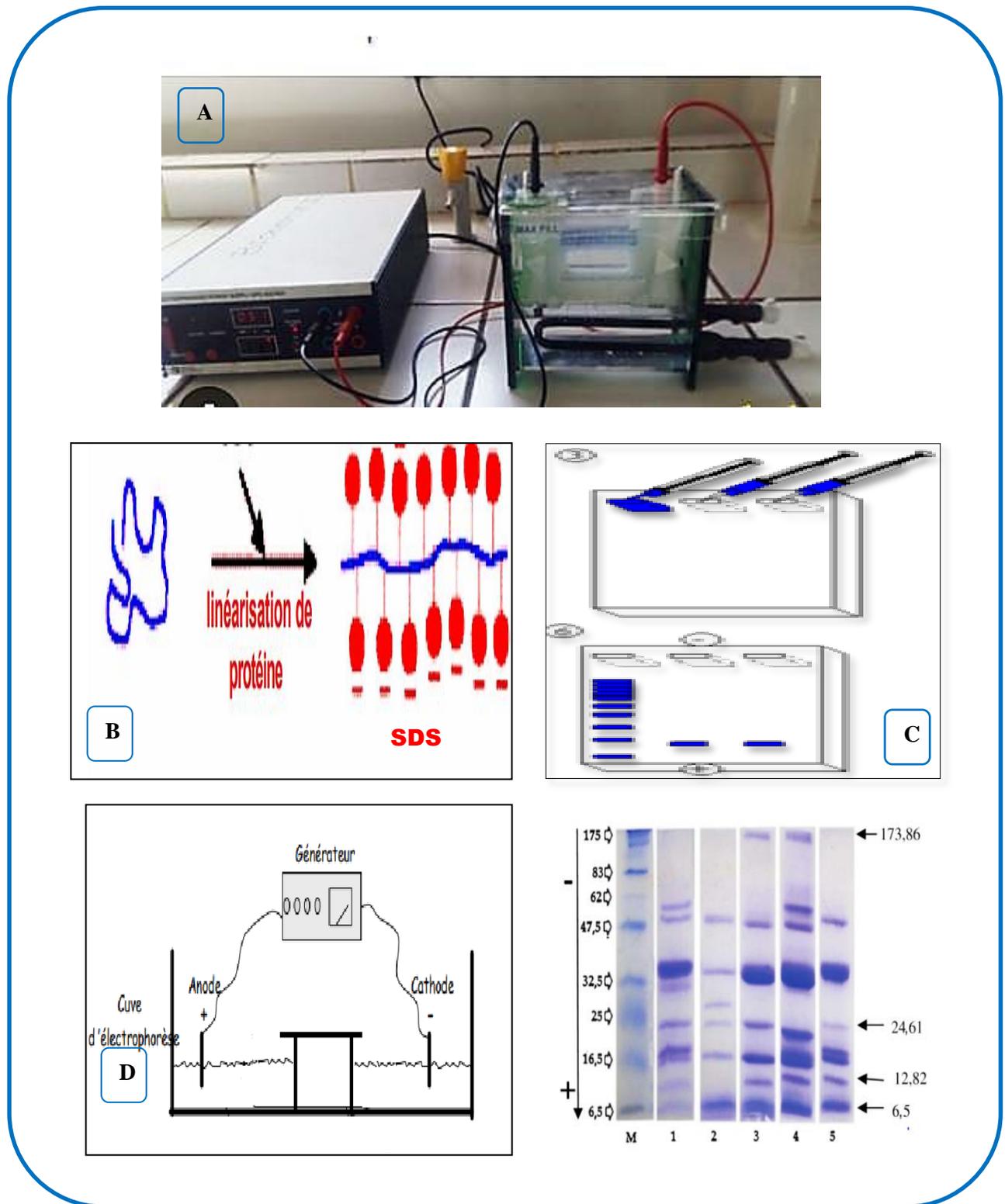


Planche 3 : électrophorèse verticale des protéines, **A** : équipement de l'électrophorèse verticale, **B** : agents dénaturants des protéines, **C** : dépôt des échantillons, **D** : fonctionnement de l'appareillage , **E** : profil électro-phorétique des globulines Anti-hyperglycaémiques des graines de *Cucurbitaceae* (Teugwa et al., 2013)

4.3.Électrophorèse horizontale des acides nucléiques (ADN, ARN) sur gel d'Agarose

Dans l'électrophorèse des acides nucléiques ADN ou ARN, la préparation de l'extrait ne nécessitent pas l'utilisation d'additifs chimiques tels que le SDS puisque ces molécules ont une charge négative naturelle .cela leur confèrent une migration vers l'anode sous l'effet d'un champ électrique donnant un profil de migration (Fig.17). Les étapes de manipulation sont similaires à l'électrophorèse des protéines avec des différences citées le Tableau 2 suivant

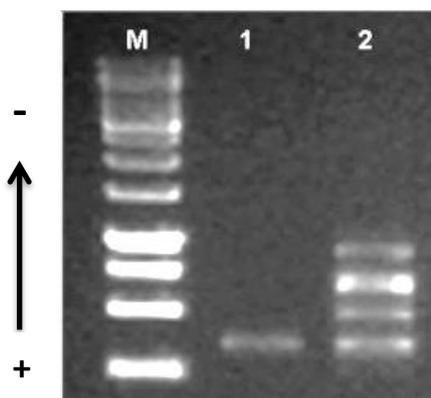


Fig. .17: Profil électro-phorétique d'échantillons d'ADN des feuilles de *Stipa lagascae* BET (bandes électrophorétiques fluorescentes à l'UV sous l'effet du BET) (Abdellaoui ,2012).

Tableau 2 : différences entre l'électrophorèse des protéines et des acides nucléiques

Éléments de comparaison	Electrophorèse des protéines	Electrophorèse d'ADN
Agent gélifiant du gel	Polyacrylamide	Agarose
Cuve	Verticale	Horizontale
Traitement de charge échantillons	SDS	pas de traitement
Coloration après migration	Bleu de Coomasie	Bromure d'éthidium
Lumière de visualisation du gel	Lumière blanche	lumière UV

4.4. L'iso-électrofocalisation

Dans le cas de l'iso électrofocalisation, le mélange de protéines à séparer est appliqué comme une zone de départ très mince à proximité du compartiment cathodique, et forcé à migrer dans un support zonal inerte (acétate de cellulose, amidon, agarose, gel de polyacrylamide, boue de Sephadex, etc).

Lorsqu'elle est introduite dans ce système, une protéine ou une autre molécule amphotère migre en fonction de sa charge de surface dans le champ électrique (Fig.18).

Elle perd ses charges initiales et gagne des charges négatives donc la molécule perdra progressivement ses charges positives et gagnera des charges négatives, Finalement, elle atteindra une zone où sa charge électrique nette est nulle, c'est-à-dire son pI.

Ainsi, au cours d'une séparation IEF, alors que ou elle devient stationnaire ce qui donnera la séparation des protéines du mélange (Righetti, 2000)

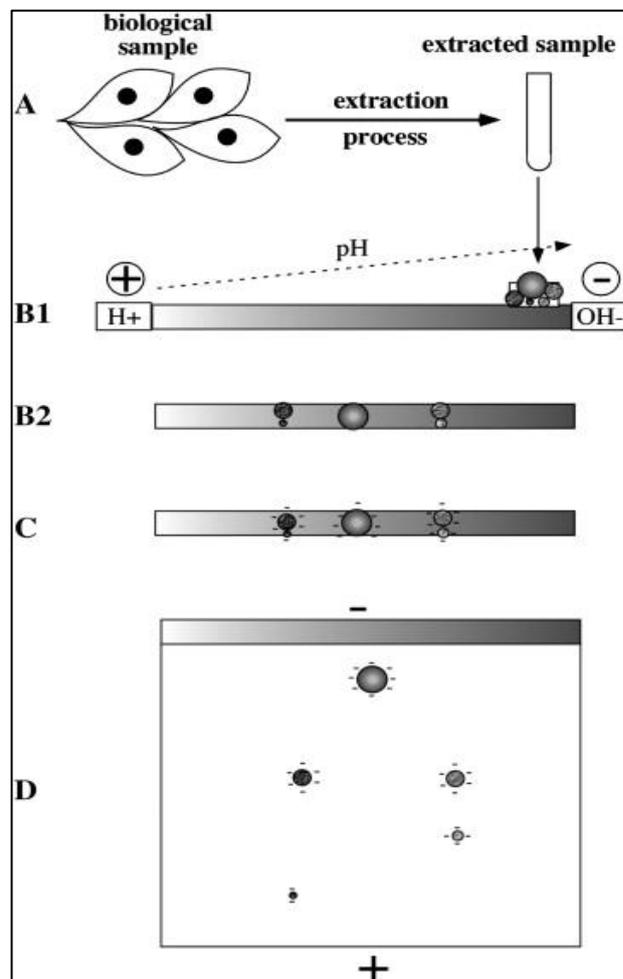


Fig. .18 : Principe de l'électrofocalisation d'échantillons protéiques **A :** échantillon protéique, **B1 :** initiation de la migration, **B2:** migration vers les deux pôles, **C:** stationnement des molécules suivant leur pHi, **E :** profil électro-phorétique global (Righetti, 2000) .

5. La chromatographie

5.1. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide de différentes interactions. L'échantillon est adsorbé puis désorbé sur la phase stationnaire, ou est plus ou moins soluble dans la phase mobile. Deux notions à retenir en chromatographie :

- **La phase stationnaire** : le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- **La phase mobile** : c'est le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté

5.2. Les types de chromatographie

Il existe plusieurs types de chromatographie, leur classification est basée sur le principe de séparation et la nature des phases stationnaire et la phase mobile

5.2.1. La Chromatographies en phase liquide.

5.2.1.1. La chromatographie sur colonne (CPL)

Le substrat actif est tassé dans un tube, il s'agit soit d'un adsorbant (chromatographie liquide - solide : CLS), ou bien d'un substrat agissant par partage (chromatographie liquide - liquide : CLL). Dans les deux cas, la phase mobile est un liquide, peut être soit à la pression ordinaire, soit soumis à une pression pouvant atteindre plusieurs centaines de bars. Dans ce dernier cas, on utilise le procédé de chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).

5.2.1.2. La Chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un « échangeur d'ions ». Ce solide comporte des groupements fonctionnels fixes ionisés ou ionisables. Les ions qui assurent l'électro-neutralité de la structure sont mobiles et échangeables avec ceux de la phase mobile en contact avec l'échangeur (greffé sur des polymères ou des silices).

5.2.1.3. La chromatographie sur gel perméable

La phase stationnaire est un solide, le plus souvent silice ou alumine remplissant une colonne(Fig.19),. L'échantillon est déposé en haut de la colonne. La séparation des molécules chimiques est obtenue par l'écoulement continu d'une phase mobile, ou éluant, à travers la colonne. La séparation est basée sur des différences des vitesses d'entraînement, vers le bas de la colonne, des substances contenues dans l'échantillon. Ces vitesses dépendent de la capacité d'adsorption de la molécule par la phase stationnaire, et de la force d'entraînement de cette espèce par l'éluant.

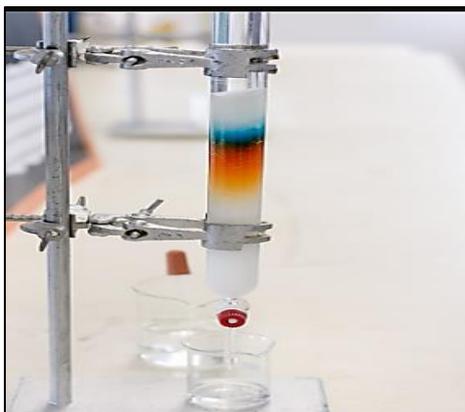


Fig. .19: Chromatographie sur gel colonne ⁽⁹⁾

5.2.1.4. La chromatographie sur papier (CP)

Le substrat est la charge (eau, sels,...) et les fibres d'un papier convenablement choisi, le véhicule se déplaçant dans le papier grâce aux forces capillaires(Fig.20).



Fig.20 : étapes de la migration en chromatographie sur papier⁽¹⁰⁾

5.2.1.5. La chromatographie sur couche mince (CCM)

Répond à la même description, mais le substrat est étalé et fixé sur une plaque inerte, verre ou autre.

5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse.

Le substrat est toujours contenu dans un tube ou colonne (classiques ou capillaires). Là encore, c'est un adsorbant (chromatographie gaz - solide : CGS) ou un support inerte imprégné d'un liquide lourd stationnaire (chromatographie gaz - liquide : CGL). Quand le mélange à analyser est liquide, il est généralement introduit sous cette forme dans l'appareil, conçu pour le vaporiser instantanément (Fig.21).

Le véhicule est toujours un gaz dont la pression d'entrée peut être choisie et éventuellement programmée, de même que la température à laquelle est portée la colonne peut être maintenant constante ou au contraire programmée.

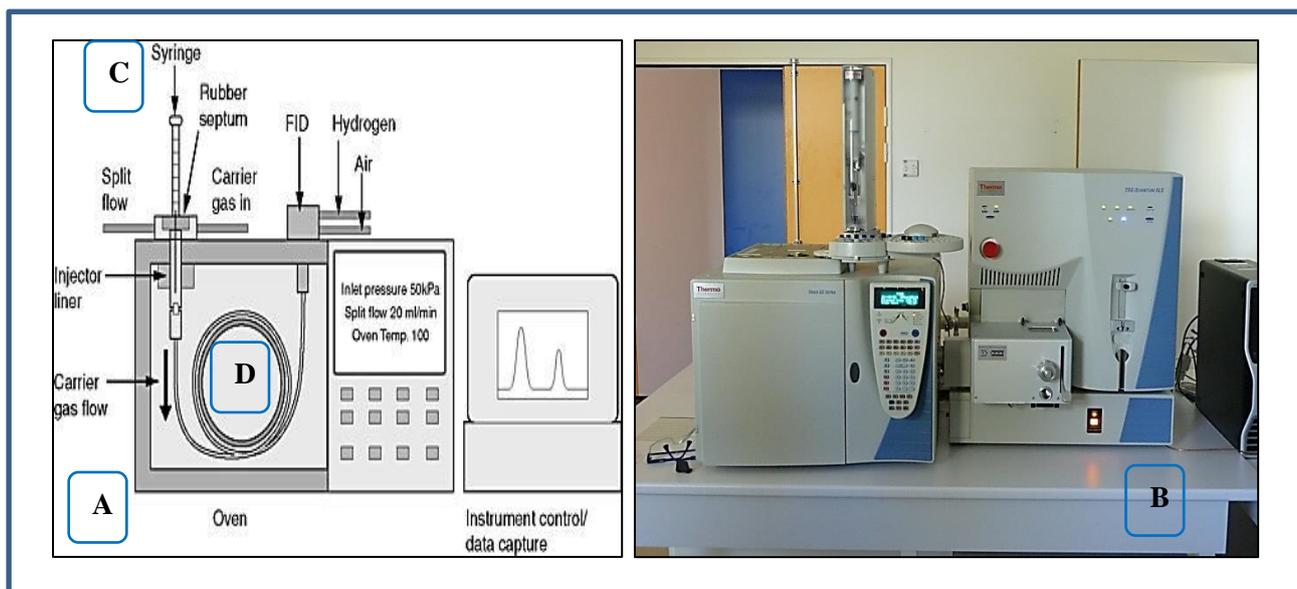


Fig.21 : Chromatographie en phase gazeuse, **A** : schéma générale du trajectoire de l'échantillon, **B**: dispositif de la chromatographie en phase gazeuse, **C** : injection de l'échantillon, **D**: circuit d'éluion⁽¹¹⁾.

Méthodes Cytochimiques et Immunologiques

L'identification d'une substance donnée repose sur la mise en œuvre de réactions chimiques semblables à celles utilisées en chimie analytique, mais adaptées aux conditions tissulaires, ces des réactions qui sont spécifiques à certains groupes de substances.

Les techniques d'histochemie regroupent l'ensemble de techniques permettant de colorer et localiser une substance chimique dans son compartiment cellulaire, cette coloration nécessite l'utilisation de colorants chimiques (histochimie), des enzymes (cytoenzymologie), des anticorps (immuno-cytologie) et des molécules radioactive (autoradioactivité)

Dans ce chapitre, nous allons décrire quelques techniques cytochimiques permettant la détection des molécules suivant leur localisation cellulaire, dans la deuxième partie du chapitre, les techniques immunologiques de détection des complexes anticorps-antigène dans les échantillons biologiques sera illustrer.

1. Les techniques cytochimiques

La mise en évidence des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides et des lipides à l'intérieur de la cellule, peut faire appel à certains agents chromogènes qui se combinent sélectivement à certains groupements spécifiques de ces substances (EL Roberto ,1983). Nous ne présentons ici que quelques méthodes de coloration cytochimiques d'usage très répandu en cytologie.

1.1.Détection par réaction chimique : détection des aldéhydes par le Réactif de Schiff

Le réactif de Schiff, utilisé pour la recherche des groupements aldéhydiques, rend possible à lui seul la mise en évidence de l'acide désoxyribonucléique, de certains glucides et de certains lipides. On prépare ce réactif en traitant la fuchsine basique, qui contient de la parafuchsine (chlorure de triaminotriphenyl-méthane), par un excès d'acide sulfureux.

Dans ces conditions, la parafuchsine se transforme en une substance incolore: l'acide bis-N aminosulfonique (réactif de Schiff). Le réactif en question se recolore finalement sous l'action des groupements aldéhydiques présents dans le tissu (Fig.22).

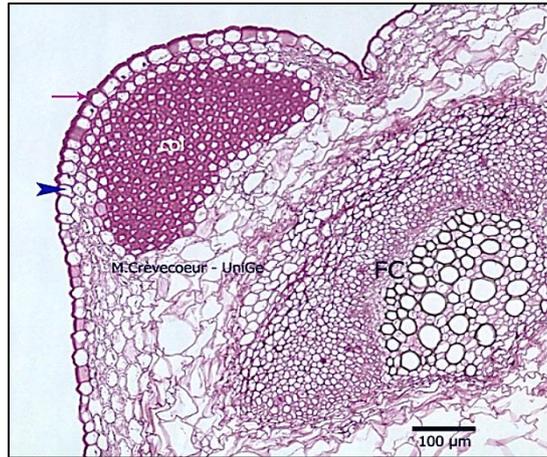


Fig .22: Portion de coupe transversale dans un pétiole de céleri (Crevecoeur, 2023)

1.2. Technique d’Autoradioactivité

La technique d’autoradiographie a pour objectif de marquer l’emplacement des molécules au niveau des organites cellulaires.il existe plusieurs molécules radioactives synthétisées chimiquement au laboratoire, prenant l’exemple du fructose dont le carbone est de type C 14, l’incorporation de cette molécules dans les tissus permet de détecter et de localiser les molécules glycosylées (glycoprotéines ou glycolipides) (Fig.23).

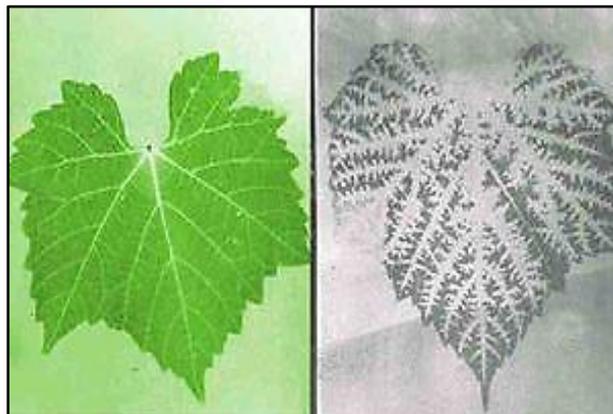


Fig.23: Observation des feuilles d’érable, les zones foncées sur l’image de droite correspondent à la présence de dioxyde de carbone radioactif (Rincourt, 2012).

1.2. Techniques immunocytologiques

Les techniques immunocytologiques ou autrement dites «L'immunohistochimie» trouve son origine en 1942 décrivant pour la première fois une coloration des antigènes du streptocoque bactérien sur du tissu infecté à l'aide d'anticorps conjugué FITC.

C'est en 1966 que Nakane a introduit l'utilisation d'enzymes comme systèmes de révélation pour l'immunohistochimie (IHC) en microscopie optique.

Le terme immunohistochimie a été défini à partir des mots « immunologie » en référence à l'utilisation d'un anticorps et « histologie » qui évoque l'utilisation de tissus. Cette technique permet de démontrer la présence ou l'absence d'une protéine dans les cellules d'une coupe de tissu inclus en paraffine (FFPE) ainsi que sa localisation. Son principe consiste à identifier une protéine d'intérêt grâce à un anticorps primaire spécifique, qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire directement couplé à une enzyme ou lié à un polymère couplé à une enzyme (Owen et al 2013).

1.4. Techniques cytoenzymologie

Ce sont des méthodes de détection des enzymes in situ qui les révèlent par leur activité. La visualisation permet de préciser la localisation intracellulaire de l'enzyme : soit directement (oxydo-reductases), soit indirectement par coloration (hydrolases). En gros, c'est la transformation d'un composé soluble et incolore en un composé insoluble et coloré en présence d'une activité enzymatique particulière.

2. Méthodes immunologiques

Les techniques immunologiques regroupent ensemble de méthodes et de procédures qui utilisent des réactions antigène-anticorps pour étudier et analyser divers aspects du système immunitaire. Ces techniques jouent un rôle crucial dans la recherche médicale, le diagnostic et le développement d'interventions thérapeutiques.

La classification des méthodes immunologiques est multiple mais nous avons choisi la classification de Bidart Lacroix (2008) qui repose sur les réactions antigènes et anticorps et les objectifs de chaque technique ainsi que les résultats souhaités en diagnostic.

2.1. Rappels sur les anticorps et les antigènes

2.1.1. Définition d'un anticorps

Anticorps (Ac) : protéine synthétisée par les lymphocytes B (LB) et les plasmocytes, capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à l'Antigène (Ag) ayant stimulé ce lymphocyte.

Un Ac est une « glycoprotéine, c'est à dire que c'est une addition de glucides sur la chaîne de protéines. Cette glycoprotéine est formé de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) = soit quatre chaînes peptidiques (Fig.24).

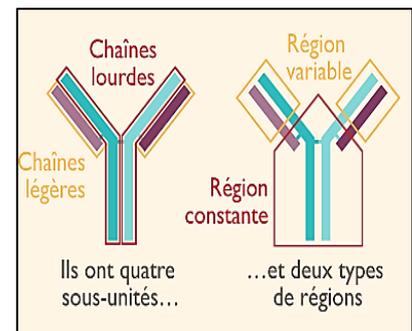


Fig.24: Structure d'un anticorps ⁽¹¹⁾

2.1.2. Définition d'un antigène

Toute structure biologique reconnue par un Ac, peut-être de nature biochimique, protéique, glucidique, lipidique ou acide nucléique. Si l'Ag est trop petit il peut ne pas être reconnu par l'Ac. Très souvent les Ag peuvent être immunogènes c'est-à-dire capables de produire une réaction immunitaire. Il y a alors synthèse d'Ac spécifiques.

2.1.3. Réaction antigène-anticorps.

Les épitopes et paratopes engagent des interactions non covalentes, instables et réversibles, la somme de ces liaisons définit la force d'interaction entre l'antigène et son récepteur (Béné *et al.*, 2014).

Les caractéristiques physiques des réactions antigène-anticorps sont très importantes à connaître pour le développement de techniques qui les utilisent car elles conditionnent de nombreux paramètres de l'expérimentation souhaitée.

- La complémentarité entre épitope et le paratope induisant la formation d'un complexe immunitaire
- Forces attractives entre les **AG- AC** se font par des liaisons Hydrogène, liaisons hydrophobes, forces de Van Der Waal, forces électrostatiques ou ioniques entre deux atomes
- Réaction exothermique libérant de l'énergie
- Réaction réversible car les liaisons sont faibles faciles à rompre.
- Réaction spécifique grâce à la complémentarité entre l'épitope et le paratope. (Massart, 2009).

-

2.2. Principales Méthodes immunologiques

2.2.1. Méthodes d'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation et l'immuno-diffusion sont deux méthodes qui mettent à profit la spécificité de la réaction antigène-anticorps pour analyser et/ou quantifier les complexes immuns. La mise en contact d'une solution de molécules contenant des antigène avec un anticorps a donné le phénomène d'immunoprécipitation en milieu liquide, puis très rapidement les techniques d'immuno-diffusion en milieu gélifié se sont imposées, permettant la discrimination, l'identification ou la quantification de différents systèmes antigène-anticorps précipitants (Béné et *al.*, 2014). Il existe plusieurs techniques utilisées, citant les plus appliquées dans le domaine médicale ;

2.2.1.1. L'immunoprécipitation en solution

Quand les anticorps et les antigènes sont mélangés en solution, la nature bi- ou multivalente des anticorps permet à une seule molécule d'anticorps de se lier à plus d'un seul antigène, l'immunoprécipitation aura lieu lorsque les concentrations en anticorps et antigène sont globalement équivalentes. Finalement, le résultat sera la formation d'un complexe se sédimente dans la solution comme un précipité d'où vient son appellation.

L'immunoprécipitation est généralement utilisée pour détecter de manière qualitative les anticorps ou les antigènes ou purifier des molécules d'antigènes d'un mélange hétérogène de molécules solubles (Owen et *al.*, 2013).

2.2.1.2. Immunoprécipitation d'antigènes en milieu gélifié (immuno-diffusion)

La précipitation peut également être réalisée non seulement en solution, mais aussi dans un gel d'agarose. Le principe repose sur la diffusion des antigènes et l'anticorps l'un vers l'autre dans une matrice de gel, il existe plusieurs façons pour appliquer cette technique :

2.2.1.2.1. Technique de Mancini

C'est une technique de précipitation en gel qui permet la détermination de la concentration d'un Ag ou d'un Ac. Lorsqu'on veut déterminer la concentration d'un Ag, l'Ac correspondant est incorporé à un gel d'agar et l'échantillon d'Ag est déposé dans un puits creusé dans le gel (Fig.25). L'Ag diffuse de façon radiale, et lorsque le rapport entre AG et AC atteint la zone d'équivalence, un cercle de précipitation se forme autour du puits. La surface du cercle est proportionnelle à la concentration d'Ag.

Exemples d'application: dosage des protéines plasmatiques qui existent à des taux relativement élevés : albumine.



Fig .25: techniques de Mancini (12)

2.2.1.2.2 .Technique d'Ouchterlony

C'est la technique la plus fréquemment utilisée d'immunoprécipitation sur gel, l'antigène et l'anticorps diffusent ensemble radialement l'un vers l'autre, et de ce fait établissent un gradient de concentration (Fig.26).À l'équivalence, une ligne de précipitation se forme. C'est une technique qualitative qui permet de comparer des Ag et leur réaction aux Ac : identité totale (2 arcs se rencontrent), pas d'identité (2 arcs se croisent), identité partielle (2 arcs forment un éperon), les tests d'Ouchterlony restent toujours utilisés en clinique (Owen *et al.*, 2013).

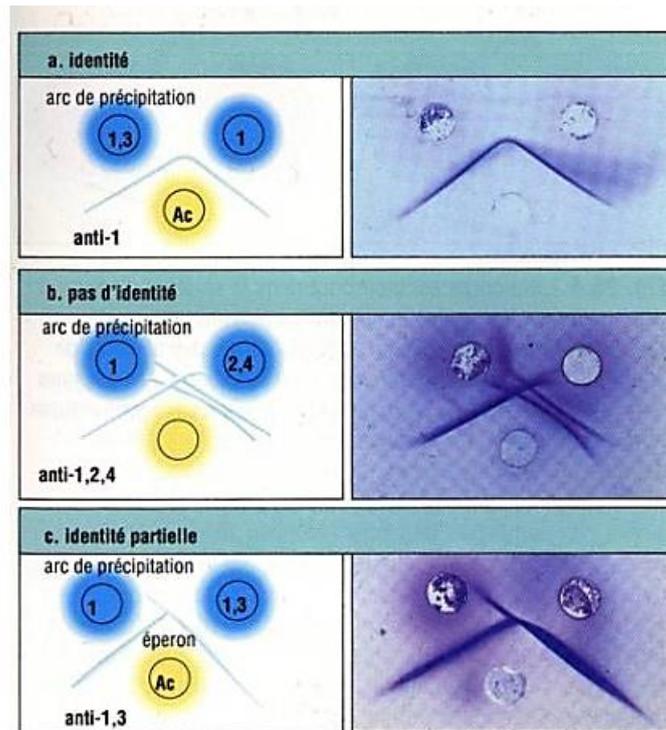


Fig.26 : différents résultats de la techniques d'Ouchterlony

2.2.1.2.2 .Immuno électrophorèse

C'est une technique qualitative qui combine la séparation par électrophorèse et la double immunodiffusion. Un mélange d'Ag est soumis dans un premier temps à une électrophorèse pour séparer ses constituants selon leurs charges électriques. Dans une deuxième étape, les constituants protéiques diffusent dans le gel. Les Anti sérums (Ac) sont alors placés dans des gouttières creusées dans le gel parallèlement au champ électrique. Après diffusion il y a formation d'arcs de précipitation dans la zone d'équivalence. Cette technique est utilisée pour l'exploration des Ig : classe, chaîne lourde, chaîne légère.

2.2.2. Méthodes d'immunoagglutination.

2.2.2.1. Histoire et Principe

Elle a été appliquée pour la première fois au diagnostic de la fièvre typhoïde la même année par le médecin français Fernand Widal, l'inventeur du test de Widal (Mochmann & Köhler, 1989). En 1900, le médecin autrichien Karl Landsteiner a réformé la médecine transfusionnelle en introduisant l'hémagglutination basée sur le typage sanguin ABO (Landsteiner, 1900), l'agglutination visuelle se produit parce qu'un anticorps se lie simultanément à plusieurs antigènes, formant ainsi des complexes plus importants. Dans

l'organisme, l'IgM est particulièrement bien adaptée à cette réaction en raison de sa structure pentamérique et de sa grande avidité (Gurtler et Pavia, 2020)

L'agglutination est une réaction qu'on peut voir à l'œil peut être qualitative pour déterminer l'existence ou pas d'un Ac ou d'un Ag. Elle peut être semi quantitative, elles sont appliquées dans le diagnostic sérologique de plusieurs pathologies infectieuses et le groupage ABO rhésus.

2.2.2.2. Différents types de tests d'agglutination

Les techniques d'agglutination sont réparties en deux types

2.2.2.2.1. L'agglutination active : on peut distinguer dans ce type

- **L'agglutination directe** lorsque les AC spécifique se lie parfaitement à son AG formant un amas visible à l'œil nu.
- **L'agglutination indirecte** se produit lorsque les AC non spécifiques se lient à une faible quantité d'Ag.

2.2.2.2.2. L'agglutination passive

C'est la fixation d'un anticorps soluble sur une surface inerte indépendante de la réaction AC-AG, c'est-à-dire la particule ne possède pas naturellement l'Ag donc on l'introduit manuellement. cette méthode est très sensible et le degré d'agglutination est directement proportionnel à la concentration d'anticorps libres contre les déterminants antigéniques des GR et inversement proportionnel à la quantité d'antigène (Gurtler et Pavia, 2020).

Exemple : Hémato agglutination passive

Des hématies ou des particules inertes peuvent être recouvertes d'antigène et utilisées dans un test d'hémato agglutination passive. Elle est utilisée pour la compatibilité croisée des globules rouges (GR) des donneurs, se réfère à la coagulation des GR, avec des anticorps dirigés soit vers les GR eux-mêmes, soit vers des hydrates de carbone spécifiques recouvrant les cellules (Gyenes et Sehon, 1962).

2.2.3. Méthodes d'immuno radioactivité RIA

On peut mesurer par cette technique les concentrations soit d'antigènes soit d'anticorps, dans le cas de la détection de l'antigène spécifique, ce dernier doit être préalablement marqué à l'iode 125 (traceur). La préparation contenant l'anticorps est alors incubée avec l'antigène marqué. Les complexes Ag/Ac qui se forment en phase liquide sont alors précipités avec une solution de chlorure d'ammonium ou de polyéthylène glycol.

Le culot qui résulte de précipitation précédente est ensuite lavé avec une solution saline et la présence de l'anticorps à doser est déterminée en mesurant la radioactivité présente dans le précipité et en comparant avec une gamme étalon réalisée soit avec un sérum titré soit avec une préparation purifiée d'anticorps de concentration connue.

Cette technique bien que relativement coûteuse et délicate car utilisant des produits radioactifs, présente l'avantage d'une grande sensibilité surtout dans le domaine de recherche de nouvelles maladies infectieuses telles que l'infection au Covid 19 (Owen et al., 2013).

2.2.4. Méthodes immunoenzymatiques

La technique représentative de ce groupe de méthodes est ELISA (enzym linked immuno sorbent assay), et comme le nom de la technique l'indique, les dosages ELISA utilisent des anticorps ou des antigènes liés de manière covalente à des enzymes. Les enzymes conjuguées sont sélectionnées sur la base de leur capacité à catalyser la conversion d'un substrat en produit coloré, fluorescent ou chimioluminescent. Ces dosages approchent la sensibilité des RIA et ont l'avantage de ne pas utiliser de radioactivité et d'être moins coûteux. (Owen et al., 2013). De nombreuses variantes d'ELISA ont été développées. Chaque type d'ELISA peut être utilisé qualitativement pour détecter la présence d'un anticorps antigène.

2.2.4.1. ELISA direct

Un ELISA direct permet de détecter le taux d'antigène sur une plaque en utilisant une enzyme couplée à des anticorps. Cette méthode est la forme la plus simple de cette technique et n'utilise pas d'anticorps de capture (Fig.27), (Gurtler et Pavia, 2020).

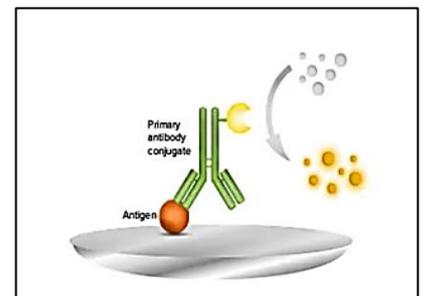


Fig.27 : Elisa directe (Aryal, 2012)

En pratique, Le sérum est déposé dans un puits d'une plaque de microtitration puis l'anticorps couplé d'une enzyme est déposé secondairement dans le même puits permettant ainsi leur fixation avec l'antigène, l'Ac est éliminer par le lavage et un substrat spécifique à l'enzyme est ajouté. La quantité de produit coloré, fluorescent ou chimioluminescent, de la réaction est mesurée par un spectrophotomètre lecteur de plaque. L'absence de la couleur indique un résultat négatif et donc absence des anticorps (Owen et al 2013).

2.2.4.2. ELISA Sandwich

La présence d'un antigène ou sa quantité peut être mesurée par un ELISA sandwich. Dans cette technique, l'anti-corps (et non pas l'antigène) est immobilisé dans un puits d'une plaque de microtitration. Un échantillon contenant des taux inconnus d'antigènes est ajouté pour permettre la réaction avec l'anticorps immobilisé. Après lavage des puits, un second anticorps lié à une enzyme, spécifique d'un épitope différent de l'antigène est ajouté et permet la réaction avec l'antigène lié (Fig.28). Après un deuxième lavage, on ajoute le substrat et on mesure la quantité de produit coloré. Les tests ELISA sandwich ont particulièrement prouvé leur utilité pour la mesure de concentration de cytokines solubles dans les surnageants de tissus de culture.

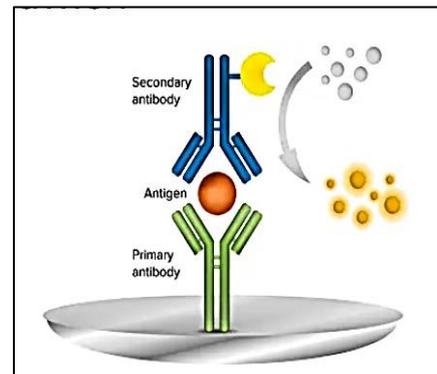


Fig.28 : Elisa sandwich (Aryal, 2012).

2.2.5. Méthodes d'immunofluorescence

Les techniques d'immunofluorescence utilisent des anticorps spécifiques liés à une substance immunofluorescente pour localiser les protéines qui ont été utilisées pour fabriquer ces anticorps. Ces techniques donnent des préparations temporaires et sont inexploitable en MET. L'application de ces techniques à une molécule d'ADN coupée en petits fragments permet, elles sont également appliquées à l'ARN sur cellules fixées: elles permettent, par exemple, de détecter la présence d'un ARN messager spécifique dans tel ou tel type cellulaire (Marc, 1995)

En pratique, l'étalon ou l'échantillon du patient entre en compétition avec l'étiquette marquée à la fluorescéine pour un nombre limité de sites de liaison anticorps (Fig.29).

Après une étape de séparation appropriée (essai hétérogène), l'étiquette libre non liée est mesurée à l'aide d'un fluoromètre. La concentration enregistré chez le patient est directement proportionnelle à la quantité de fluorescéine présente (Kurtz et al., 1983).

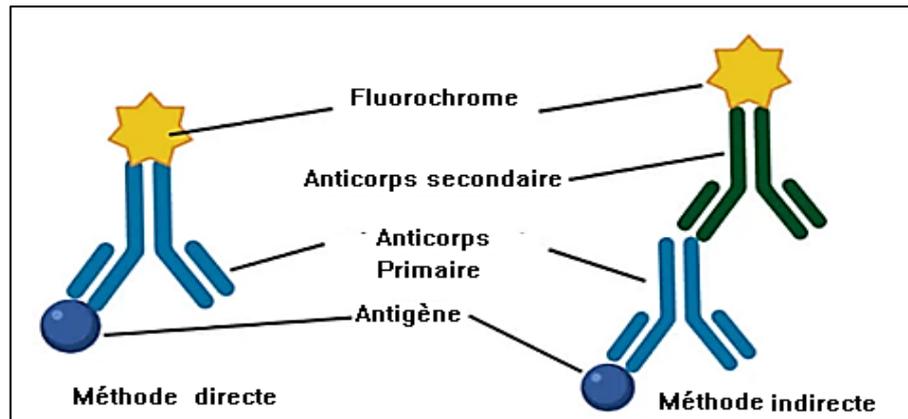


Fig.29: Méthode directe et indirecte de l'immunofluorescence (Aryal ,2022)

2.2.6. Néphélométrie

La néphélométrie est une méthode analytique basée sur la diffusion de la lumière par une solution contenant des particules dispersées. La formation de ces complexes Antigène anticorps entraîne une augmentation de la turbidité du milieu qui, à concentration d'anticorps constante, ne dépend que de la quantité de l'antigène à doser. Ces variations de turbidité du milieu sont mesurées à l'aide d'un néphélomètre, (Burgot G et Burgot J, 2017).

le néphélomètre possède un rayon laser dont le faisceau traverse la cuve où a lieu la réaction antigène/anticorps et déduit par la suite la quantité d'antigène présente dans l'échantillon à doser(Fig.30). Ce principe est couramment employé pour doser une multitude de protéines sériques comme par exemples les immunoglobulines ou les fractions du complément.

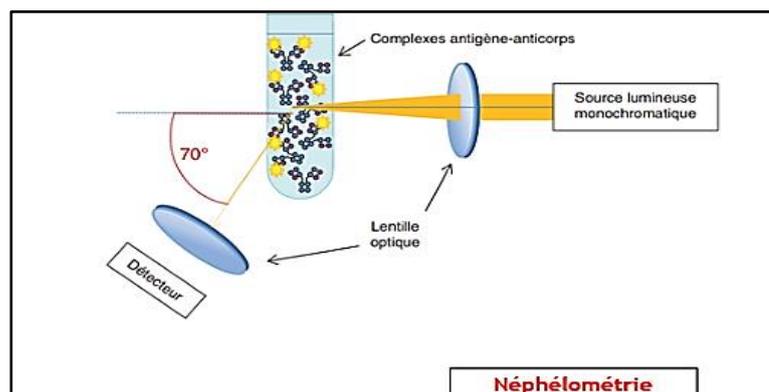


Fig.30: Principe de la néphélométrie ⁽¹⁴⁾.

Méthodes du génie génétique (séquençage)

Les évolutions techniques en matière d'analyses ADN permettent aujourd'hui de déceler et d'analyser ainsi que mieux comprendre le fonctionnement de cette molécule, cependant, il existe une multitude de techniques de génie génétique dont l'ADN fait l'objet d'étude,

Dans cette partie du programme, nous allons citer trois techniques essentielles dans l'étude de l'ADN : l'extraction d'ADN, Amplification d'ADN par PCR (polymerase Chain reaction) et le séquençage par la méthode de Sanger et la méthode de Maxam et Gillbert.

1. Extraction d'ADN

Tous les êtres vivants sont constitués de cellules qui elles-mêmes abritent de l'information génétique sous forme d'ADN. Pour extraire cette molécule, on doit d'abord procéder à l'une des techniques de broyage déjà décrite.

La solution d'extraction doit contenir des enzymes et des détergents chimiques afin d'éliminer les autres constituants de la cellule, on peut alors le débarrasser des protéines qui l'accompagnent à l'aide d'une protéase, mais cette étape n'est pas toujours nécessaire surtout si on ne veut pas utiliser cette molécule (pour une électrophorèse ou le séquençage d'ADN) par exemple).

Le broyat cellulaire doit être centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires puis on récupère le surnageant. Généralement lors de l'extraction de l'ADN, le surnageant est traité avec des alcools afin d'agglomérer les filaments de l'ADN. Une deuxième centrifugation à haute vitesse (de 10000 à 13000T/min) est nécessaire pour récupérer l'ADN sous forme de culot, ce dernier sera récupéré dans des solutions aqueuses qui seront désigné comme extrait d'ADN.

2. Amplification d'ADN par PCR (polymerase Chain reaction)

2.1. Définition et principe

C'est une technique permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon d'ADN, d'importante quantité d'une séquence d'ADN spécifique.

Cette technique est basée sur la répétition de cycles de réplication d'ADN, in vitro à partir d'amorces spécifiques, elle a été mise en évidence en 1985, elle repose sur l'amplification d'ADN en présence d'enzymes purifiées et thermostable isolées à partir de *Thermus aquaticus* « *Taq polymerase* » c'est une enzyme thermostable. Plusieurs copies d'ADN seront synthétisées dans un temps réduit grâce à l'utilisation d'un appareil appelé le Thermocycleur.

La PCR représente des particularités qui lui donne une large application dans différents domaines génétique, microbiologie : détection de très faibles quantités d'acides nucléiques, utilisation d'ADN polymérase thermostables la Taq polymérase extraite à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus*, Spécificité basée sur la complémentarité des amorces avec l'échantillon (Grzych, 2017).

2.3. Les étapes de la PCR

Après extraction de l'ADN, ce dernier est soumis à un cycle d'amplification qui comporte trois étapes(Fig.31):

1. **Dénaturation** : c'est la séparation des deux brins d'ADN suite à leur dénaturation à 95°C, cette température les liaisons d'hydrogène des molécules d'ADN bicaténaire sont rompues, l'ADN devient monocaténaire.
2. **Hybridation** : en abaissant la température les amorces spécifiques s'hybrident sur les molécules simples brins d'ADN complémentaires de la séquences d'ADN à amplifier, l'hybridation des amorces, se situe en général entre 55 et 65°C.

3.Élongation:

C'est la synthèse du brin d'ADN complémentaires, une enzyme polymérase, la Taq polymérase à 72°.À partir d'un cycle, on obtient 2ⁿ copies d'une molécule d'ADN (Grzych, 2017).

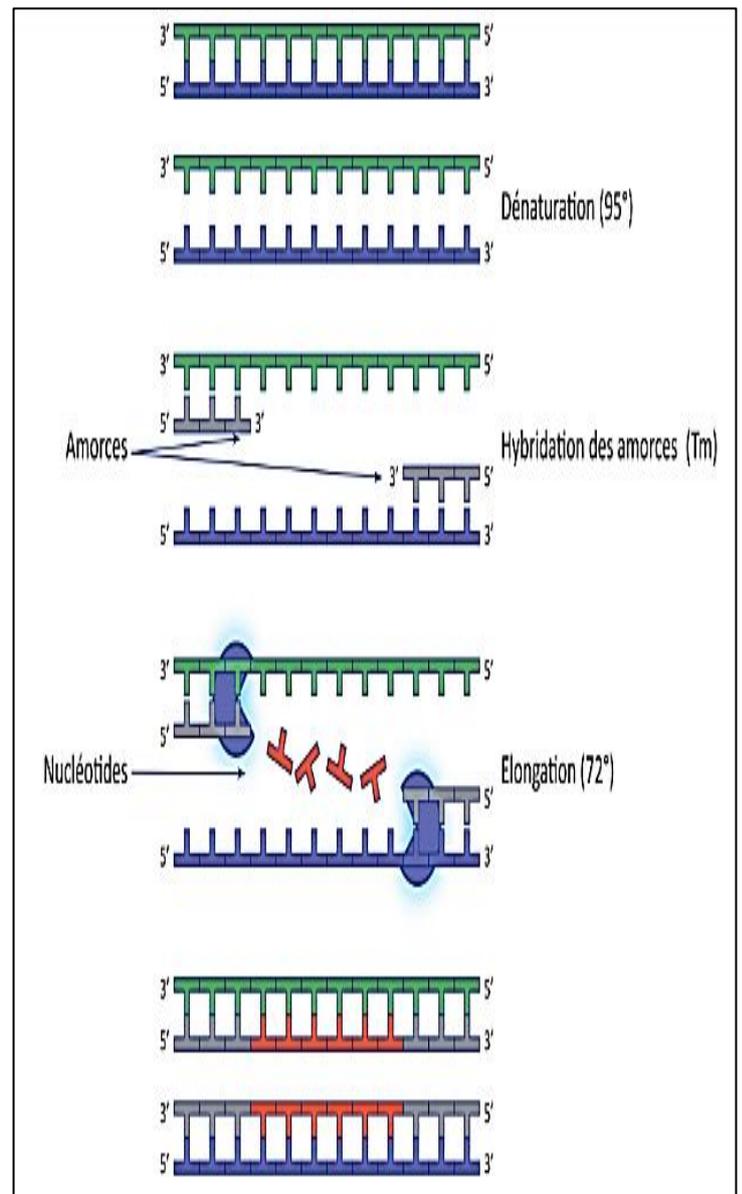


Fig.31: étapes de la PCR (Grzych2017).

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques, les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de Maxam-Gilbert et celle de Sanger (Lamoril et al., 2008).

3. Méthode de Sanger

3.2. Histoire et définition

La méthode de Frederick Sanger est historiquement capitale puisqu'elle a permis les premiers séquençages de génomes complets. Ce type de manipulation a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Cette méthode a été développée par Frederick Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) en Grande-Bretagne. Sanger a été récompensé par le prix Nobel de chimie en 1980, cette technique a été appliquée pour la première fois sur l'ADN le bactériophage varphiX174.

3.3. Principe et technique

Processus de séquençage de Sanger. (A) L'ADN du génome consiste tout d'abord à couper l'ADN en différents fragments par ultrasons ou par enzyme. Le système réactionnel est un mélange de matrice, d'amorce, d'ADN polymérase et de dNTP. Quatre types de ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP) portant des marques radio-isotopiques sont respectivement ajoutés à quatre systèmes réactionnels. Si le ddNTP est incorporé dans la chaîne oligonucléotidique, les 2' et 3' du ddNTP ne contiennent pas de groupes hydroxyle et ne peuvent pas former de liaisons phospho-diester, alors l'extension de la chaîne d'ADN est terminée.

La polymérase nécessitant un court fragment complémentaire du brin à séquencer pour initier la synthèse du brin copie. Cette méthode de séquençage de Sanger utilisait une amorce marquée ou non marquée (Fig.32).

Quatre produits du système de réaction PCR sont ajoutés à l'électrophorèse sur gel et l'autoradiographie a été utilisée pour déterminer la séquence d'ADN en fonction de l'emplacement de l'électrophorèse. (Zhang et al., 2021).

La synthèse du deuxième brin se fait en tube, lorsque la Taq polymérase utilise l'un des nucléotides ddTtp, ddATP, ddCTP et ddGTP la chaîne de synthèse s'arrête en formant des fragments qui seront analysés par l'électrophorèse, la séquence sera établie selon les résultats de l'électrophorèse.

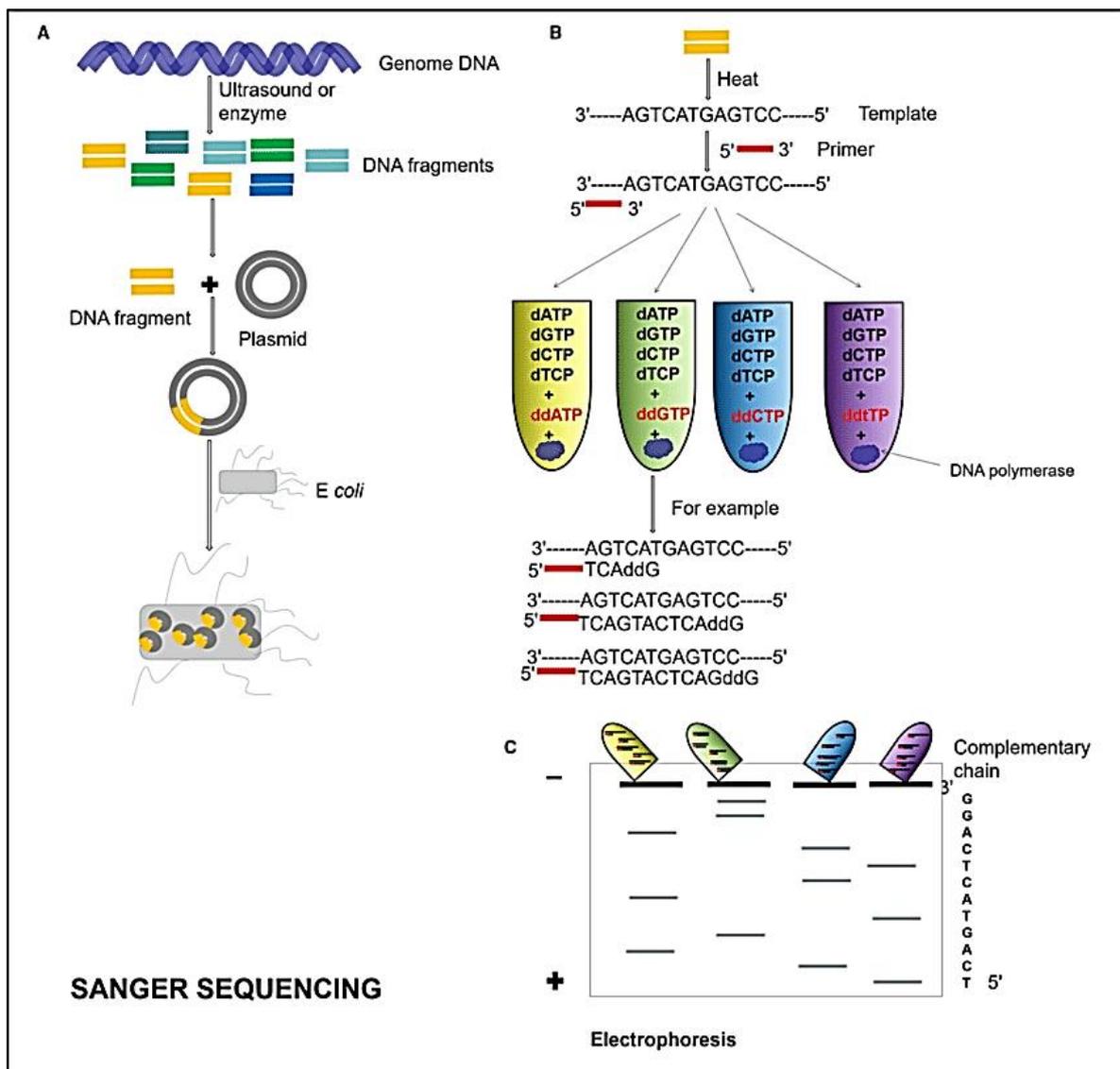


Fig .32: étapes de la technique de Sanger (Zhang et a.,2021)

La technique de Maxam et Gilbert

Le séquençage par dégradation chimique, également connu sous le nom de séquençage chimique, a été publié en 1977 par Allan Maxam et Walter Gilbert, nécessitant des modifications chimiques de l'ADN ainsi qu'un clivage et une électrophorèse supplémentaires (Maxam et Gilbert, 1977). Cette technique permet de séquencer l'ADN sans étapes préalables de *clonage in vivo*. Bien que cette méthodologie ait été très populaire à l'époque, elle utilise des produits chimiques dangereux et est techniquement complexe, car elle est également difficile à mettre à l'échelle. Ainsi, il a finalement été remplacé par des alternatives plus propres et plus pratiques ; à savoir l'approche Sanger, telle que décrite ci-dessous (Dorado et Hernández, 2019).

Principe

Elle repose sur les modifications spécifiques des bases azotées de l'ADN (A, C, G et T) et sur le clivage ultérieur du squelette phosphate de l'ADN simple brin au niveau de ces sites spécifiquement modifiés sous l'effet de molécules chimiques : l'hydrazine, le diméthyl sulfate (DMS) et l'acide formique. Les fragments obtenus coupés aléatoirement et au moins une fois après chaque base spécifique sur l'ADN cible sont de taille différente. La migration de ces derniers dans un gel d'acrylamide spécifique suivie d'une autoradiographie permet de déduire la séquence de l'ADN au cours de la lecture du gel dans le sens 5' → 3' de bas en haut du gel (Fig.33).

Dans quatre tubes différents, l'ADN cible est traité par chacun des produits de modification spécifique de base (hydralazine C + T ; hydralazine C en milieu alcalin ; diméthyl sulfate G ; acide formique A + G), suivi d'un traitement par la pipéridine (Lamoril et *al.*, 2008).

Techniques d'approches au vivant

La démarche expérimentale implique des étapes à savoir : l'exploration, l'observation, la manipulation et l'expérimentation, pour que cette démarche s'approche réellement à l'état du vivant, le biologiste doit faire recours à des techniques d'approche du vivant.

Les techniques d'approche au vivant regroupent donc des concepts qui supposent une rencontre avec le vivant plus ou moins de proximité (élevage, culture) et sous des formes vivantes dans leur milieu (collecte) ou mortes (dissection). Nous allons découvrir dans cette partie du chapitre ces techniques et leur applications dans le domaine biologique.

1. La collecte

1.1. Définition

La collecte des échantillons est l'étape cruciale pour toute recherche en biologie, elle doit suivre les critères pour laquelle l'échantillonnage est demandé. Cela va déterminer la nature et le nombre d'échantillons devant être prélevés pour valider les résultats d'analyse. On peut collecter des échantillons végétaux comme a été déjà décrit dans la section «herbier», comme on peut faire une collecte à partir d'un échantillon animal tel que : le sang, frottis de cellules muqueuses ou fragment de formation tumorale.

1.2. La notion d'échantillonnage

Ensemble des méthodes permettant de réaliser un sondage (de prélever un échantillon de données) au sein d'une population, de manière à reproduire un échantillon aussi représentatif que possible de cette population. La démarche d'échantillonnage aura donc pour objectif que cette estimation se rapproche le plus possible de la vraie valeur de la population. Pour cela, l'échantillonnage doit être conduit en suivant un processus rigoureux. cela fait appelle à différents types d'échantillonnages suivant les objectifs souhaités de l'étude.

1.3. Les types d'échantillonnage

Il existe deux principaux types de méthodes d'échantillonnage que vous pouvez utiliser dans une recherche :

1.3.1. Échantillonnage probabiliste

L'échantillonnage probabiliste signifie que chaque membre de la population a une chance d'être sélectionné. Il est principalement utilisé dans la recherche quantitative, si vous souhaitez produire des résultats représentatifs de l'ensemble de la population, les techniques d'échantillonnage

probabiliste constituent le choix le plus valable (Fig.34). Il existe quatre principaux types d'échantillons probabilistes (McCombes,2019).

- la méthode d'échantillonnage aléatoire simple
- la méthode d'échantillonnage aléatoire systématique
- la méthode d'échantillonnage stratifié
- la méthode d'échantillonnage en grappe

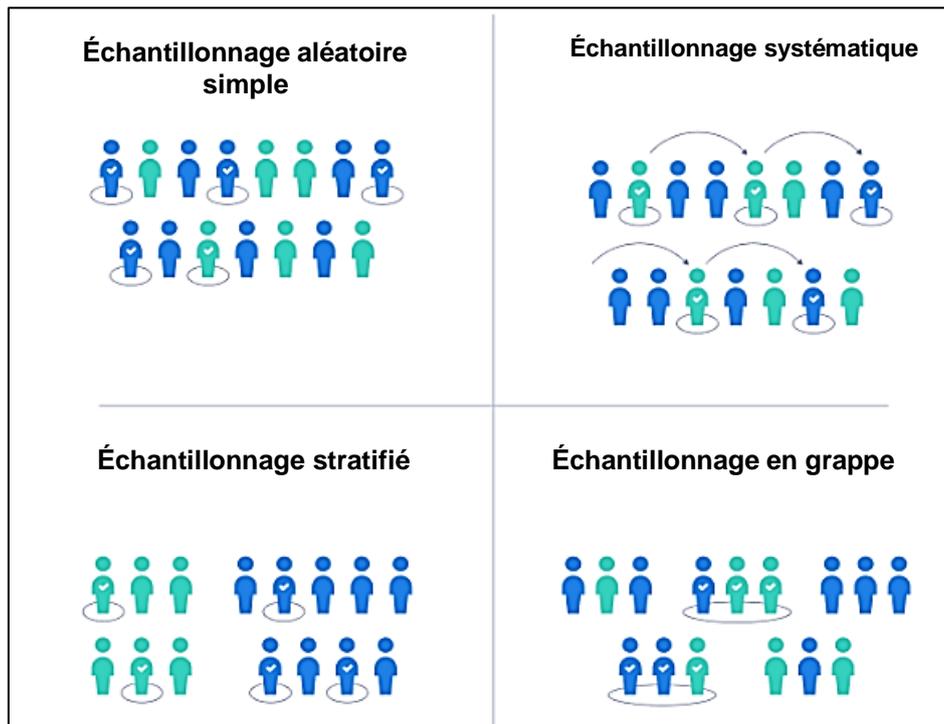


Fig.34 : les méthodes d'échantillonnage probabiliste (McCombes,2019).

1.3.2.Échantillonnage non probabiliste

Contrairement à la méthode d'échantillonnage probabiliste, la technique d'échantillonnage non probabiliste utilise des méthodes non aléatoires pour tirer l'échantillon, elle implique non probabiliste principalement implique la sélection au lieu de prendre des échantillons sans spécificité (Fig.35) , les échantillons sont sélectionnés parce qu'ils répondent à certaines paramètres de la recherche.

L'échantillonnage non probabiliste constitue un méthode utile et pratique de sélection d'un L'échantillon non probabiliste est utilisé pour étudier les connaissances théoriques existantes ou en développer de nouveaux, il a également quatre méthodes pour le réaliser :

- Échantillonnage raisonné
- Échantillonnage par quotas
- Échantillonnage de commodité
- Échantillonnage en boule de neige

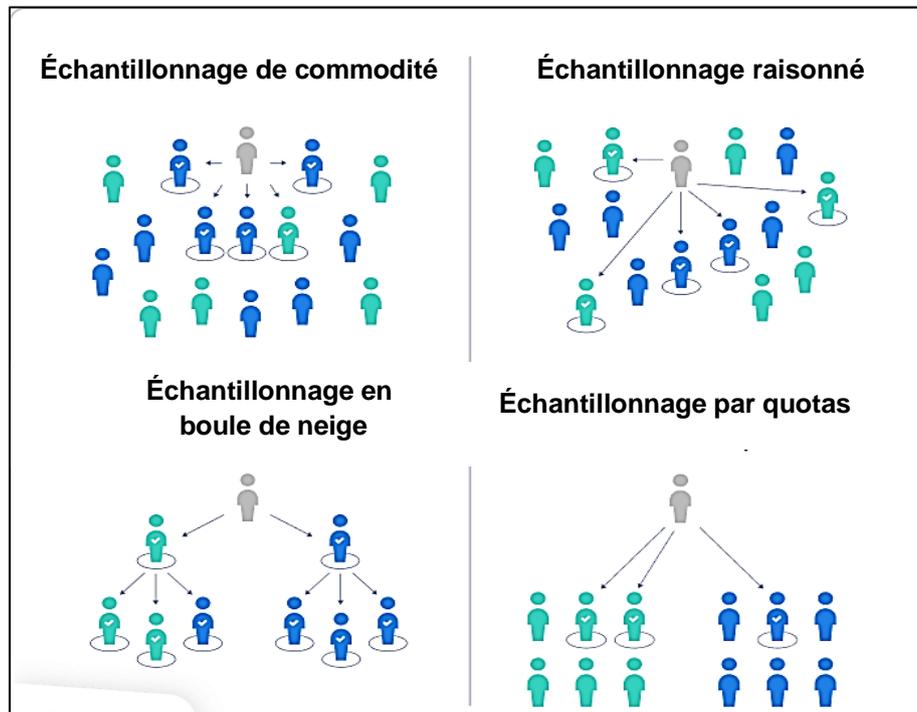


Fig.35: les méthodes d'échantillonnage non probabiliste (McCombes,2019).

2. La dissection

2.1. Définition

Le terme "dissection" signifie que l'on ouvre l'animal afin de déterminer la structure de ses parties. L'objet de la dissection est de séparer les différentes parties les unes des autres, afin de définir leurs limites et de montrer clairement leurs relations mutuelles.

La dissection consiste principalement à enlever le tissu conjonctif qui lie les différentes parties entre elles (Verma et al., 2000), la dissection d'organes animaux est une méthode d'enseignement de la biologie qui offre une vision directe et authentique des structures morphologiques et permet des activités pratiques et des expériences multi-sensorielles.

2.2. Les étapes de la dissection

Le premier temps de dissection commence par l'ouverture de la peau, l'animal couché sur le dos est fixé par des épingles dans une cuvette à fond de liège. Elle se fait à l'aide de ciseaux fins et de pinces fines. Elle commence par une petite incision de la peau dans la région du pubis. Elle se poursuit par une ouverture qui correspond au plan de symétrie de l'animal, puis au quatre membres, Les volets ainsi formés sont rabattus et fixés puis la paroi musculaire est incisée, on peut repérer le trajet de la veine cave postérieure depuis les reins jusqu'au foie ; le trajet des veines caves antérieures gauche et droite et la fin on peut dégager le cœur ainsi que les autres organe pour une éventuelle étude ,les organes de l'animale apparaissent séparés ce qui facilite leur prélèvement(Fig.36).

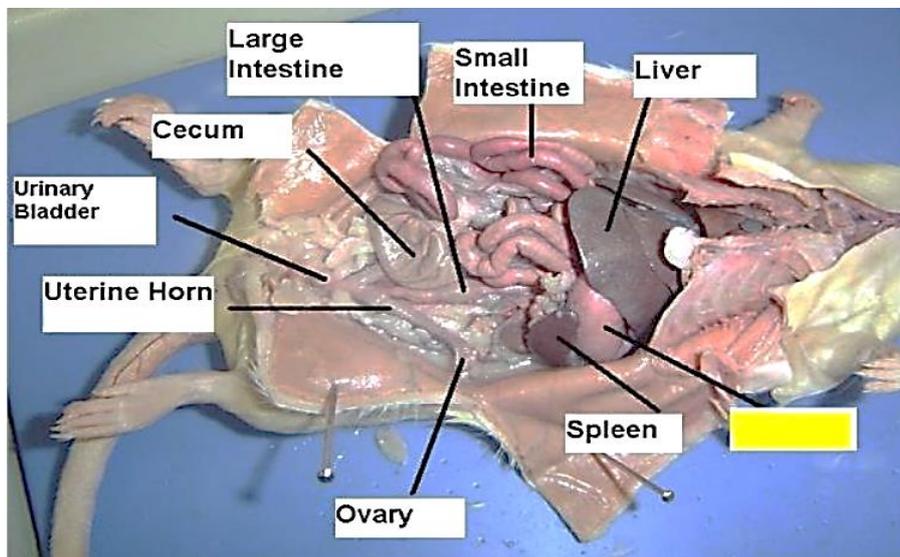


Fig.36: La dissection anatomique d'un rat (Dalga et Aslan , 2021)

3. Élevage

Toute expérimentation qui repose sur l'étude *in vivo* nécessite l'élevage du vivant en conditions artificielles afin de dégager l'étude des facteurs extérieur pouvant remodeler les résultats : de bonnes conditions de fonctionnement permettent d'améliorer la santé et le bien-être des animaux d'expérimentation et contribuent à valider les résultats exprimé aux obtenus. Lors de l'exécution des procédures de fonctionnement de l'animalerie, le personnel doit être conscient de l'impact potentiel des exactions sur le bien-être animal en tenant

compte des conditions de vie de l'animal (transport, acclimatation, alimentation, abreuvement et hygiène).

3.1. Le transport

Le transport des animaux doit être loin de tout stress chez les *animaux* qui pourrait résulter d'une mauvaise ventilation, de températures extrêmes, de l'absence de nourriture ou d'eau de boisson, après inspection, les *animaux* doivent être transférés dans des cages ou enclos propres et être convenablement nourris et abreuvés.

3.2. L'Acclimatation

À leur arrivée dans l'établissement, les *animaux* doivent bénéficier d'une période de stabilisation physiologique et comportementale préalablement à toute utilisation. Les cages et les enclos doivent être fabriqués à l'aide de matériaux qui se prêtent facilement aux opérations de nettoyage et de désinfection.

3.3. L'Alimentation

Des dispositions doivent être prises pour que chaque *animal* puisse avoir accès à la nourriture de façon à satisfaire ses besoins physiologiques. Des précautions doivent être prises lors de l'emballage, le transport, l'entreposage et la préparation de la nourriture afin de prévenir toute contamination chimique, physique et microbiologique, détérioration ou destruction.

3.4. L'Abreuvement

De l'eau potable non contaminée doit être mise à disposition en permanence. Les abreuvoirs, tels que les biberons et les fontaines automatiques, doivent être vérifiés quotidiennement afin d'en assurer l'entretien, la propreté et le fonctionnement.

3.5. L'Hygiène

Le bon fonctionnement d'une animalerie repose principalement sur des bonnes pratiques d'hygiène. Il est nécessaire de mettre en place des procédures de lavage, et *désinfection*. Il est également nécessaire de maintenir un degré très élevé de propreté ainsi qu'une bonne organisation dans l'ensemble de l'établissement.

4. Culture

La préparation de cultures sur terrain est une démarche importante dans l'étude des plantes dans leur milieu naturel. Les modèles de culture et de reproduction des plantes utilisent des systèmes contrôlés, cela constitue un outil important pour assimiler les connaissances acquises lors d'expériences sur le terrain et pour favoriser la compréhension des comportements des systèmes végétaux et leur relation avec les fonctions éco-physiologiques.

Parmi les techniques de large utilisation nous citons en premier lieu les cultures sous serre, ce type de culture nécessite le contrôle des paramètres suivant

- La nature et à l'état physique du sol (texture, humidité, perméabilité, degré de tassement).
- La nature et à la quantité d'amendements et d'engrais et des résidus de la culture précédente.
- Les exigences propres de la culture à implanter (taille de la semence, sensibilité des racines à la structure du sol).
- Les risques phytosanitaires liés à la présence de résidus rémanents ou d'agents pathogènes liés au sol ou aux résidus de la culture précédente (Vilan ,1997).

Références Bibliographiques

1. Abbott laboratories, TdX operators manual, April 1984; 2.04.
2. Abdellaoui A., Sayah A., Gouja H. and Ouled Belgacem A. (2012). Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*. Acta Botanica Gallica. 159:1, 73-78.
3. Abramowitz, M. (1993). Fluorescence Microscopy, The Essentials. Volume .Olympus America. 43 p.
4. Alberts B. and Johnson A. and Lewis J., Raff M., Roberts k., and Peter W. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th edition .New York.
5. Arsalan A (2022) ,Microscopie En Lumière Polarisée : Révéler Des Structures Cachées ED ,TechieScience Core PME
6. Aryal S .(2022). Immunofluorescence- Definition, Principe, Types, Uses, Limitations in Microbe Notes; <https://microbenotes.com/?s=immunofluorescence>
7. Aryal S.(2022).in Microbe Notes.<https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>
8. Bach. C. (2012). Immunologie .6e édition. Lavoisier. 490 p.
9. Barbault R.(2001).biologie des populations animales et végétales .Ed .Dunod. Paris.France.708 pages.
10. Béné MC., Drouet C., Fisson S., Seillès E .(2014).Méthodes en immunologie: Des principes à la bonne application Collège des Enseignants d'Immunologie Elsevier masson France. 232 p.
11. Besnard A. (2022) .L'échantillonnage pour l'étude de la biodiversité. Planete vie.
12. Bouttcher B (2012). Transmission electron microscopy: preparation of specimens. In:John Wiley and Sons Chichester.<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002998>.
13. Burgot G et Burgot J-L.Turbidimétrie et néphélogométrie, Chimie analytique Ed.Lavoisier(2017). p 387 à 394.
14. Carlos Fernando P. S Herrero ,Sergio Britto Garcia,Luis Garcia,Helton L A Defino, (2014) Endplates Changes Related to Age and Vertebral Segment;BioMed Research International (1):545017.

15. Claxton, N.S., Fellers, T.J., and Davidson, M.W. (2005). Laser scanning confocal microscopy, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, 37 p., Unpublished (<http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>).
16. Crèvecoeur M.(2023).Plant Microscopy of Sansevieria leaf.
17. Dalga S et Aslan K.(2021).ISPEC.8th international conference on agriculture animal science and rural development.24-25, 2021 Bingol .Turkey.
18. De Robertis E D. P. et De Robertis E. M. F.(1983) .Biologie cellulaire et moléculaire.Éd.Presses de l'Université Laval Traducteurs.Clément Delis. 758p.
19. Dorado G. et Hernández P.(2019) .Anatomy of digestive system in experimental animals .Encyclopedia of Biomedical Engineering.
20. Durand G, Beaudeau J-L.(2011) .Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. Lavoisier. 643 p.
21. Faure A. (2011). Herbiers publics et privés. Herbiers Tela Botanica. Inventaire des herbiers de la région Languedoc-Roussillon.
22. Franco M, (1988) .La microscopie. première Ed .Presse universitaire de France. Paris.
23. Geenfield E.(2024).Écologie des populations.Sigmaearth.
24. Glauert, A. M. (1980). Fixation, Dehydration and embedding of biological specimens, in: Practical methods in electron microscopy. North-Holland. Amsterdam
25. Grzych G.(2017). Génétique.Ed. De Boeck supérieur .86p
26. Ha M. and Schleiger R.(2024).Biology and Ecology.Ed.ASCCC Educational.Resources.Initiative.in.[https://query.libretexts.org/Francais/Sciences_de_l'environnement \(Ha et Schleiger\)/02%3A_%C3%89cologie/2.02%3A_Populations/2.2.03%3A_A_Croissance_et_r%C3%A9gulation_de_la_population](https://query.libretexts.org/Francais/Sciences_de_l'environnement_(Ha_et_Schleiger)/02%3A_%C3%89cologie/2.02%3A_Populations/2.2.03%3A_A_Croissance_et_r%C3%A9gulation_de_la_population).
27. Hanzen C.(1994).Étude des facteurs de risque de l'infertilité et des pathologies puerpérales et du postpartum chez la vache laitière et la vache viandeuse, Thèse d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur, University of Liège ,France.
28. Hayat, M. A. (Ed.), (2000).Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. Cambridge University Press. 4th ed.:1-80, 400–431
29. Heurck V .et Fernande H.(1909) .3^{ème} Ed .Le microscope sa construction ,son application à l'anatomie des végétaux et aux diatomées.

30. Ider M. (2017). Elaboration et caractérisation des nanomatériaux à base de métaux nobles. These de doctorat .Université Le Man.
31. Inoué S.(2006). Ed. JB Pawley. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy In: Handbook of Biological Confocal Microscopy, New York: Springer, 1-19.
32. Kaiser L-M, Polte S.,Kirchhoff K., Großmann N. and Wilde.(2023).Dissection in biology education compared to alternative methods in terms of their influence on students' emotional experience Front Psychol.14: 1138273.
33. Kurtz M J, Billings M., Koh T. (1983).Inexpensive double-antibody fluoroimmunoassay for amino glycoside antibiotics, phenytoin, and theophylline in serum. *Clin Chem*; 29: 1015-19.
34. Lamoril J., Ameziane N., Deybach J C., Bouizegarène P. et Bogard M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie.Immunanalyse & Biologie Spécialisée. 23(5): 260–279.
35. Laurans F.(2016).Panorama des techniques microscopiques adaptées à l'imagerie descriptives des cellules Workshop « bois et imagerie » - GDR Sciences du bois intrascience et impact.
36. Mariana E.G Araújo D E.,Lamberti G. and Huber L .A.(2015). Homogenization of Mammalian Cells Cold Spring Harbor Protocols .doi:10.1101/pdb.prot083436
37. Massart C., Alcaraz-Galvain D., Bordenave L., Boux de Casson F., Charrié A., Chikh K.(2009).Immunoanalyse : De la théorie aux critères de choix en biologie clinique. Bonchamp-lès-Laval: EDP Sciences. 261 p.
38. McCombes S . (2019).Sampling Methods.Techniques & Examples . Scribbr .
39. McDowell, E. M., and Trump, B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Archives Pathology and Laboratory Medicine.100 : 405
40. Mendham J.,Denney RC.,Barner JD and Thomas M.(1995).Analyse chimique quantitative de Vogel.Éd.De Boeck Supérieur bruxelles Belgique.889p .
41. Mortier E., Jager S ., Gerdolle D.,Dahoun A.,(2011).La microscopie électronique à balayage environnementale:application à l'observation des tissus dentaires minéralisés. Actualités Odonto-Stomatologiques. University of Lorraine .

42. Murphy DB. et Davidson MW.(2012). Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 549p.
43. Naciri M. (2011) .Planche microscopie à partir des cours de professeur Histologie-Embryologie .Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies optique et électronique mohammed V-Agdal.Faculté des Sciences de Rabat Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale.
44. Naciri M.(2011). cours d’Histologie-Embryologie ; Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies optique et électronique.Univ .Mohammed V-Agdal Faculté des Sciences.Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale.Rabat .
45. Odum E P. (1983).Basic ecology. Holt Saunders international edition. Philadelphia.
46. OIE- Code sanitaire pour les animaux terrestres : Utilisation d’animaux pour la recherche et l’enseignement PDF (www.woah.org);
47. Owen J.A.,Punt J.,Stranford S.A.Immunologie .(2013).Les cours de Janis Kuby .
48. Pollard T D.,Earnshaw W. , Housset C. (2004). Biologie cellulaire.Elsevier France 853p.
49. Praither JD. (1985). Basic Principles of Radioimmunoassay Testing: A Simple Approach. American Medical Laboratories, Inc., Fairfax, Virginia.Vol 13(1),43p.
50. Rabilloud T. et Lelong C. (2011) .Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial Journal of Proteomics Vol 74, (10) ; 1829-1841
51. Rafelski SM, Viana MP, Zhang Y, Chan Y-HM, Thorn KS, Yam P, Fung JC, Li H, Costa L da F, Marshall WF (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. Science 338, 822-824.
52. Reversat G., Rossi J P. et Bernhard P. (1996). Analyse. des courbes de survie de nématodes phytoparasites selon le modèle de Teissier. Biologie des populations. Académie des sciences / Elsevier, Paris.
53. Righetti P G.(2000).Isoelectric Focusing: Theory, Methodology. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology .Vol 11.385p.
54. Rincourt S L.(2012).L'autoradiographie IN <http://www.lebioblog.com/article-1-autoradiographie-113615149.html>
55. Salvan F et Davoust J. (2015) .Encyclopaedia Universalis Les Grands Articles,ISBN :9782341001809, 2341001807p60.
56. Sauer H et Surrel J.(2008).Principes et utilisations de base du microscope .Ed .optique pour l’instrumentation.

57. Showkat N. and Parveen H.(2017). Non-Probability and Probability Sampling .Media & Communication Studies .p461,408.
58. Simons H., King A., Ludwig W., Detlefs C., PantleonW., Schmidt S.and Stohr F. (2014).Dark-field X-ray microscopy for multiscale structural characterization. Nature communication.6:6098.10.1038/ncomms098.
59. Teugwa C M., Boudjeko T., Tchinda BT., Mejiato P C., et Denis Z .(2013).Anti-hyperglycaemic globulins from selected *Cucurbitaceae* seeds used as antidiabetic medicinal plants in Africa,*BMC Complementary and Alternative.Medicine* volume 13, (63).
60. Tizro P., Choi C., and Khanlou N. (2019).Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy.
61. Valentin P.and Choi C (2014) “Routine Tissue Processing for Electron Microscopy.” UCLA Department of Pathology and Laboratory Medicine.
62. Verma P.S.(2000).A Manual Of Practical Zoology: Chordates.Ed.S. Chand.627p.
63. Verma PS.,Tyagi BS . and Agarwal VK.(2000). Animal Physiology. Classes of All Indian Universities. Ed.S Chand and company limited, P 389.
64. Vilan M.(1997). La production végétale : "les composantes de la production", Tome 1, 3e édition, Agriculture d’aujourd’hui. 45p.
65. Voelkl A.(2002).Ultracentrifugation.ENCYCLOPEDIA.Ed ,Life sciences , John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net ;Universität Heidelberg.
66. Weill B ., (2024). Méthodes en immunologie .cours en ligne. Laboratoire d’immunologie faculté de médecine Cochin port Royal.
67. Zhang L., Chen F.X., Zeng Z and Xu M. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*.Vol (3)12.

Biblionet

- 1) <https://th.bing.com/th/id/R.238a5e3df427ece19cf0798348166198?rik=FXw1aeAWhI3QDQ&riu=http%3a%2f%2flesitedemonprofdesvt.wifeo.com%2fimages%2f1%2f1es%2f1es-t1-ciii-ii-doc-frise.jpg&ehk=j%2bGwPb4818D4TBGH7ZFREy62OMIbCsao5BP64jxSrUY%3d&risl=&pid=ImgRaw&r=0>
- 2) <https://linvisible.dealersdescience.com/wp-content/uploads/2022/11/Fluorescence-Microscopy.jpeg>
- 3) <https://www.researchgate.net/profile/Dominique-Dumas-2/publication/237712850/figure/fig1/AS:340379636387844@1458164237237/Geometrie-de-loptique-confocale-a-balayage-laser.png>
- 4) <https://thumbs.dreamstime.com/b/confocal-microscopy-fibroblast-cells-real-fluorescence-microscopic-view-human-skin-culture-nucleus-blue-actin-filaments-122620704.jpg>
- 5) https://cdn.futura-sciences.com/cdn-cgi/image/width=1520,quality=60,format=auto/sources/images/glossaire/microscope-fond-noir_nebarnix-cc.jpg
- 6) [https://encymedicale.weebly.com/uploads/5/5/6/4/55646567/m%C3%A9thodes_d%C3%A9tude_de_la_cellule_3\).pd](https://encymedicale.weebly.com/uploads/5/5/6/4/55646567/m%C3%A9thodes_d%C3%A9tude_de_la_cellule_3).pd)
- 7) https://fr.ollital.com/lab-mini-vertical-type-high-quality-ultrasonic-cell-crusher_p185.html
- 8) http://aurelien.chateigner.free.fr/-%20Biologie%20moleculaire%20-%20Semestre%203/SCL3BH01_chap_7.pdf
- 9) [https://www.news-medical.net/life-sciences/Life-Science-Applications-of-Chromatography-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Life-Science-Applications-of-Chromatography-(French).aspx)
- 10) <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/chromatographie/fiche-sur-la-technique-de-la-chromatographie-sur-papier>
- 11) <https://www.multiplesklerose.ch/fr/actualite/detail/nouvelles-possibilites-de-traitement-les-anticorps-monoclonaux/>
- 12) <https://forumsvt.site.ac-strasbourg.fr/viewtopic.php?t=6937>
- 13) <https://www.isto-orleans.fr/wp-content/uploads/2017/11/P10104951.jpghttps://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>

- 14) chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/immuno3an03-reactions_precipitation_agglutination.pdf
- 15) <https://clinicalsci.info/dna-sequencing-technologies/>
- 16) [http://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://parc-cotentin-bessin.fr/sites/default/files/2019,05/PNRMCB_DOSSIER_PEDAGOGIQUE MIGRATION.pdf](http://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://parc-cotentin-bessin.fr/sites/default/files/2019,05/PNRMCB_DOSSIER_PEDAGOGIQUE_MIGRATION.pdf)