



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : Licence en Toxicologie (L3)



Matière: Techniques d'Analyse
Conduites de bioessais:

Définition d'un bioessai :

- Evaluation en **laboratoire** de la toxicité d'une substance par l'observation de ses effets sur un organisme vivant,
- C'est la détermination de l'effet de toute matière sur des organismes vivants en la testant en **conditions standardisées**,
المصدر الأول للطالب الجزائري
- Par **exemple** l'évaluation de la qualité d'une eau peut être effectuée en utilisant un poisson vivant, afin de déterminer si l'eau est bonne pour un usage en pisciculture,
- En toxicologie, un bioessai concerne l'utilisation d'un organisme vivant (animal, végétal) ou d'une culture de cellules (animales, végétales, microbiennes) pour détecter la présence d'un produit chimique

Buts des bioessais :

- **Evaluer la dangerosité d'une ou plusieurs substances :**

Cela peut être:

- un polluant que l'on trouve dans les milieux naturels (ex. : un pesticide)
- un nouveau produit industriel dont on souhaite connaître les effets potentiels sur l'environnement (ex. : un conservateur de produits cosmétiques)...

- **Evaluer la qualité d'un milieu :**

Par exemple, si un sol a été pollué par des métaux lourds rejetés d'une usine, on souhaite savoir si la pollution de ce sol est dangereuse pour la faune qui y vit...

- **Comprendre les mécanismes d'action d'un polluant :**

Etude de la bioaccumulation d'une substance (= faculté à s'accumuler dans les tissus d'un organisme), compréhension des phénomènes de toxicité du polluant, etc.

Buts des bioessais :

- **Evaluer la dangerosité d'une ou plusieurs substances :**

Cela peut être:

- un polluant que l'on trouve dans les milieux naturels

(ex. : un pesticide)

- un nouveau produit industriel dont on souhaite connaître les effets potentiels sur l'environnement (ex. : un conservateur de produits cosmétiques),

- **Evaluer la qualité d'un milieu :**

Par exemple, si un sol a été pollué par des métaux lourds rejetés d'une usine, on souhaite savoir si la pollution de ce sol est dangereuse pour la faune qui y vit...

- **Comprendre les mécanismes d'action d'un polluant :**

Etude de la bioaccumulation d'une substance (= faculté à s'accumuler dans les tissus d'un organisme), compréhension des phénomènes de toxicité du polluant, etc.

Avantages d'un bioessai par rapport à une analyse chimique classique

- Une analyse chimique donne les concentrations de différents polluants dans un échantillon
Par exemple, elle pourra révéler qu'une rivière a une teneur de 0.2 µg/L en DDT (un pesticide).
Par contre, elle ne pourra pas révéler si le DDT est biodisponible: c'est-à-dire, s'il est assimilable par les organismes vivants, et si ce polluant peut les affecter.
- A l'inverse, en réalisant un « test daphnie* » (vu en TP/TD), on met en contact un échantillon de l'eau de cette rivière avec des organismes et on observe la toxicité sur le crustacé.
- De plus, quels polluants analyser lors d'une analyse chimique ? on peut en oublier ou au contraire en analyser certains qui ne sont pas présents, ce qui coûte cher.
- Au contraire, lors d'un test écotox' peu importe le polluant, seul l'effet est évalué.

Conduite d'un bioessai :

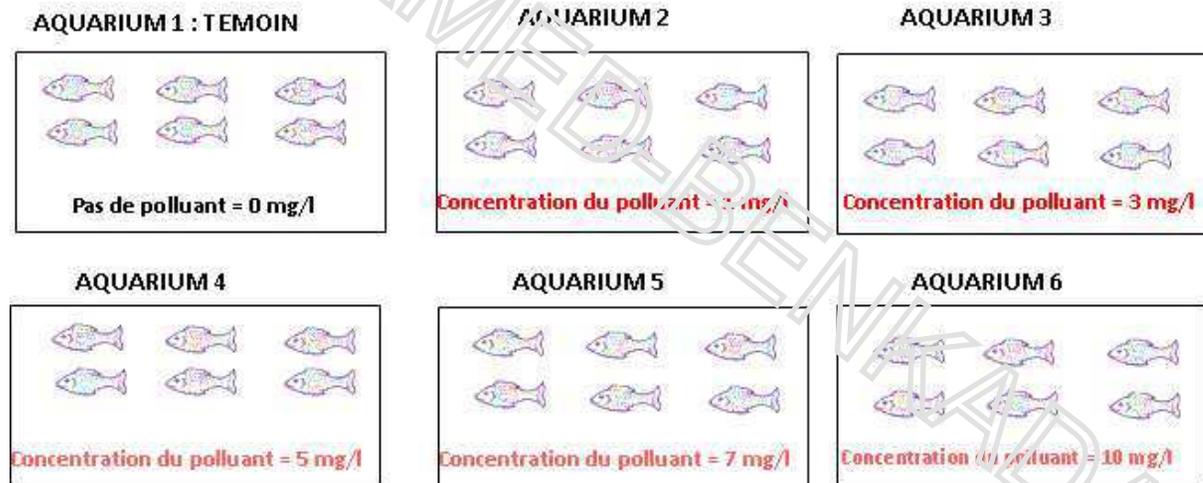
Consiste à exposer un organisme vivant (ou une cellule) à une substance dont on souhaite évaluer la toxicité.

Cette substance peut être:

- ingérée: ajoutée dans la nourriture,
- injectée: directement dans l'animal,
- Inhalée: c'est à dire respirée
- se trouver dans le milieu de vie de l'organisme: par exemple dans l'eau d'un aquarium.

Exemple: Disposer plusieurs aquariums contenant des poissons et de l'eau contenant différentes concentrations d'un polluant.

Un des aquariums ne contient pas de polluant : c'est le témoin qui sert de référence pour détecter d'éventuels effets du polluant.



Ce test peut permettre de révéler :

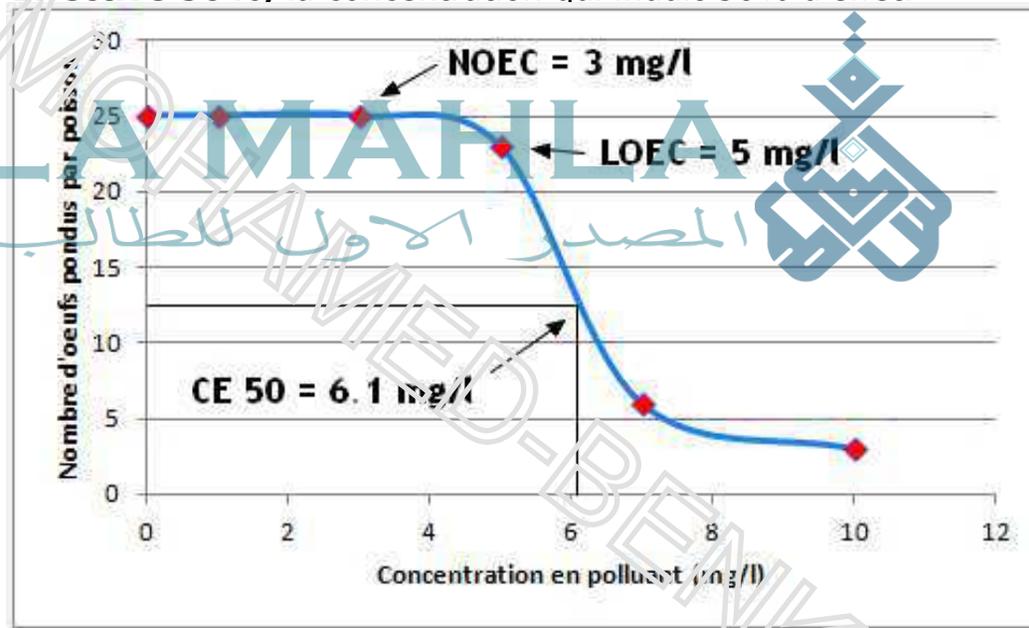
- **une toxicité aigüe du composé testé** : c'est à dire une toxicité à court terme
- **une toxicité chronique du composé testé** : c'est à dire des effets à long terme

Valeurs de référence d'un test écotoxicologique :

NOEC : No Observed Effect Concentration, la plus forte concentration pour laquelle aucun effet n'est observé

LOEC : Low Observed Effect Concentration: c'est la plus faible concentration pour laquelle on observe un effet.

CE 50 : Concentration Effective 50%, la concentration qui induit 50% d'effet.



Un bon test écotoxicologique doit respecter la règle des 5R (en anglais) :

1. **Relevance** : signifie réalisme, pertinence, représentativité.

L'organisme vivant choisi pour le test doit être représentatif du milieu évalué

ex. un ver de terre représente bien les organismes du sol, puisqu'il est très présent et très important dans la « vie d'un sol »

2. **Reliability** : fiabilité. Une méthode fiable peut être utilisée à n'importe quel moment.

3. **Repeatability** : répétabilité. Lorsque le test est répété, il doit donner des résultats qui varient très peu.

4. **Reproducibility** : reproductibilité. Si différents laboratoires à travers le monde réalisent le test sur une même substance, ils doivent trouver des résultats presque identiques.

5. **Robustness** : robustesse. Une méthode robuste est susceptible d'être utilisée par n'importe quel technicien moyennement entraîné ou formé.

Il existe différentes catégories de tests, permettant d'évaluer la toxicité des polluants vis à vis des différents compartiments des écosystèmes:

Bioessais aquatiques :

- **Essais de toxicité aigüe** (toxicité à court terme): essai de mobilité de daphnie, test microtox, test poisson
- **Essais de toxicité chronique** (toxicité à long terme) : essai de reproduction de daphnie, test algues, test Brachionus
- **Essais d'écotoxicité terrestre** : test vers de terre, test végétaux
- **Essais de génotoxicité/cancérogénicité** : essai des comètes, test de transformation morphologique



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : Licence en Toxicologie (L3)



Matière: Techniques d'Analyse **Spectroscopie visible**

Rappels:

Principe des techniques optiques:

Exploitation quantitative des phénomènes d'interactions entre la matière (atomes, molécules, ions) et les rayonnements, dans des conditions expérimentales strictes...

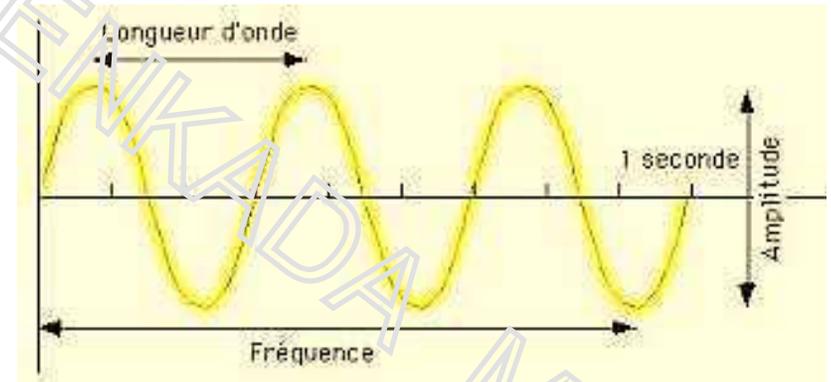
Matière ↔ Rayonnement

Spectroscopie :

- Analyse non destructive
- L'échantillon est simplement exposé à un rayonnement électromagnétique (ultraviolet, visible ou infrarouge)
- Applications : biologie, chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, etc.

Interactions matière/rayonnement:

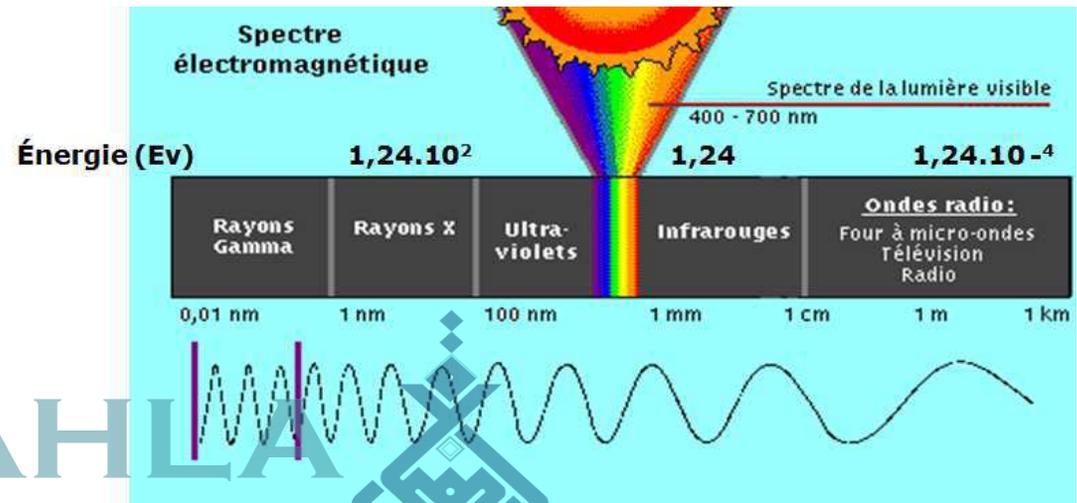
- **La lumière:** vibration se propageant très rapidement dans les milieux transparents
- C'est comme un pinceau de particules (**photons**) de masse nulle, de vitesse égale et d'énergie E
- **La propagation** provoque une onde progressive caractérisée par sa fréquence (ν) et sa longueur d'ondes (λ)
- **$E = h \cdot \nu = h \cdot (C/\lambda)$**
- h: constante de Planck
- ν : fréquence
- C: vitesse de la lumière ($2,998 \times 10^8$ m/s)
- λ : longueur d'ondes en μm ou nm
- **L'énergie** d'un **photon** est inversement proportionnelle à sa longueur d'ondes
- Plus la longueur d'ondes est petites, plus la radiation est forte (danger pour la matière vivante)
- Ce sont des **radiations électromagnétiques** dont les fréquences s'étendent sur une gamme très vaste



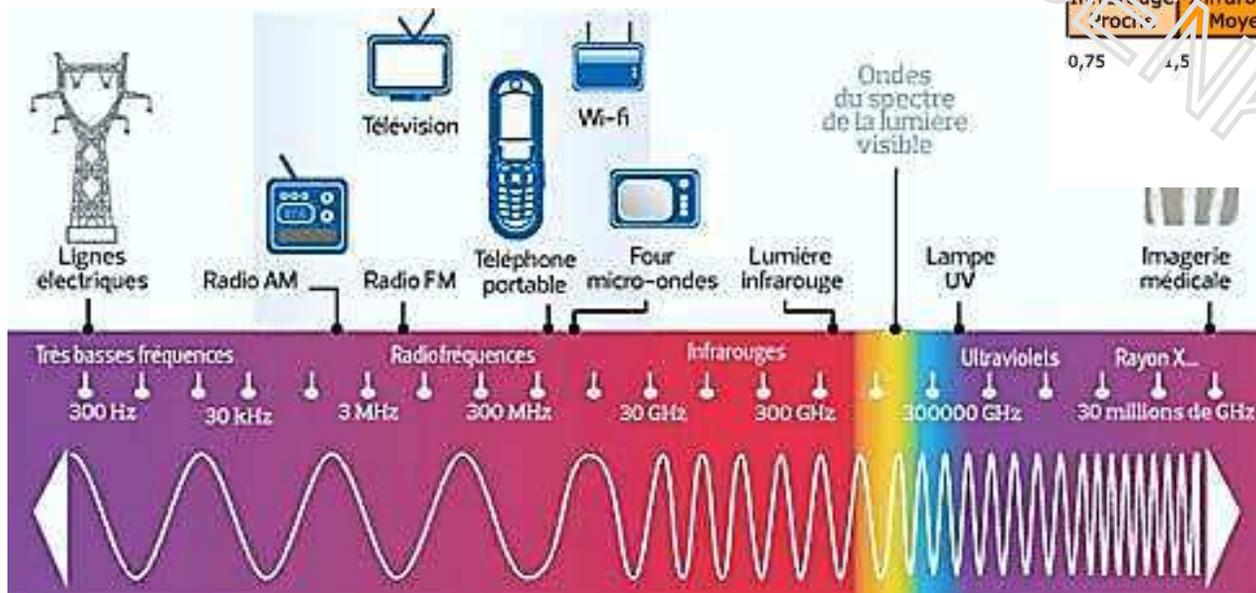
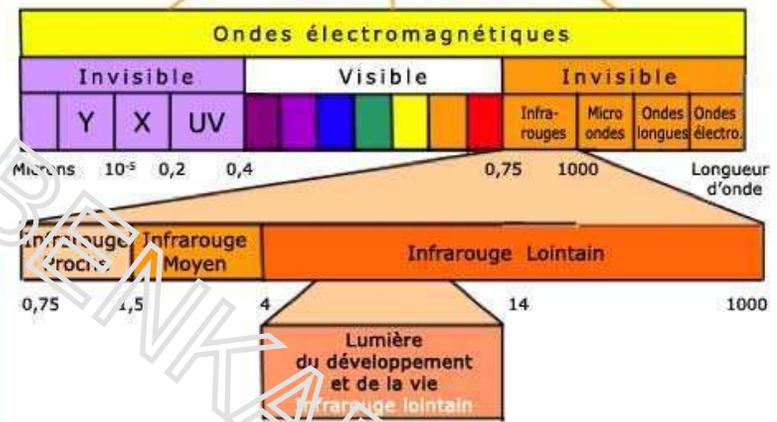
Dr MOHAMMED - BENKALDA M.

SAHLA MAHLA

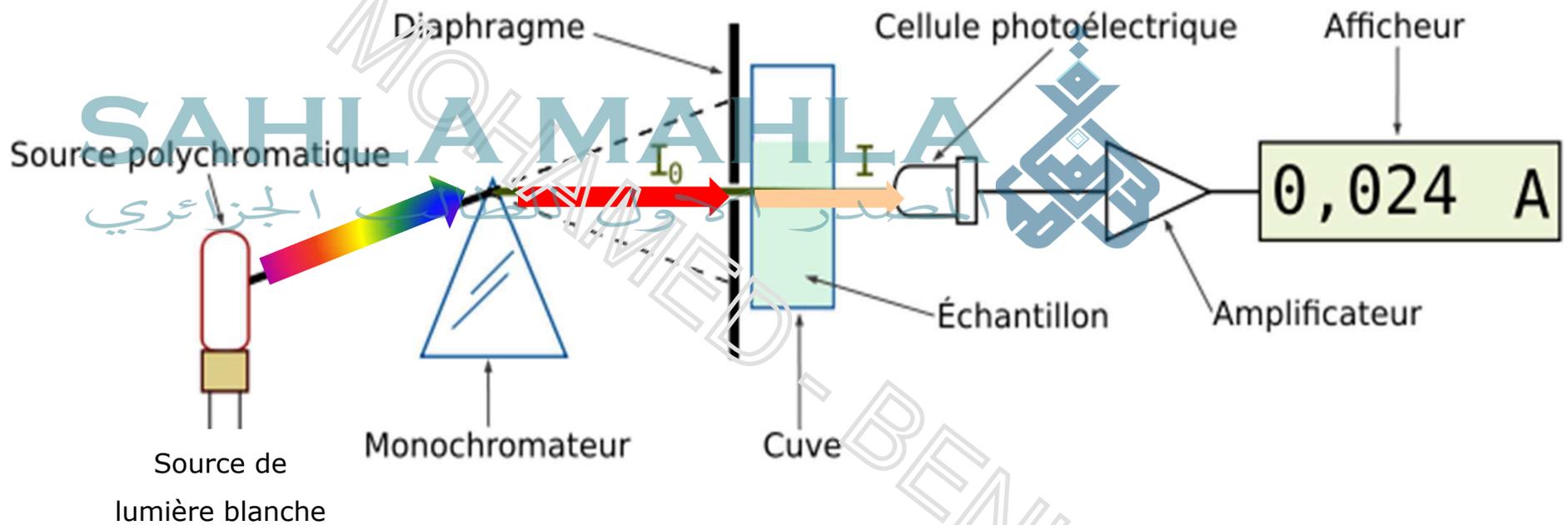
المصدر الاول للطالب الجزائري



SOLEIL



Composants d'un spectrophotomètre à lumière visible



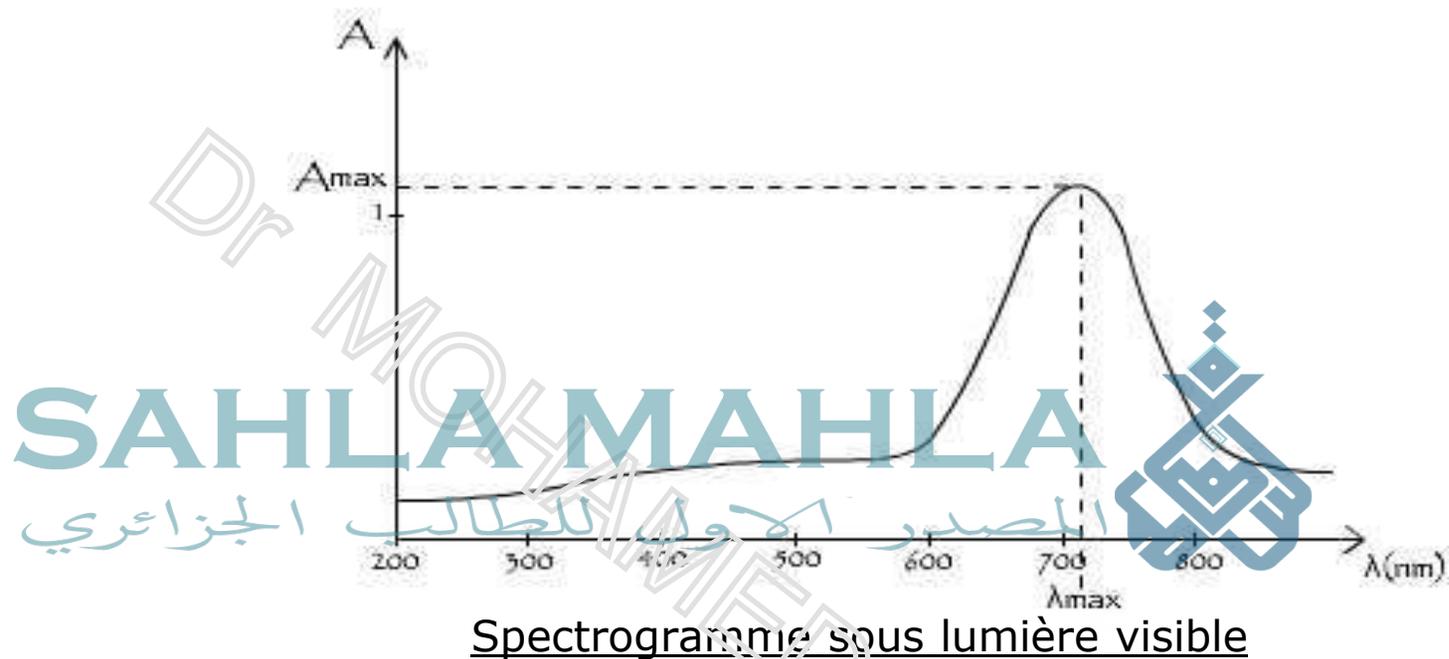
$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

A: absorbance

I: intensité de la lumière **incidente**

I₀: intensité de la lumière **sortante**

On obtient un **spectre de l'échantillon**: $A = f(\lambda)$



- λ_{max} est une **grandeur** caractéristique **propre à chaque espèce chimique**,
- Elle permet donc de **doser** l'espèce chimique en solution.

Dosage d'une solution:

- Une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon d'épaisseur **L**, l'Absorbance vérifie la **loi de beer-lambert**, soit :

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

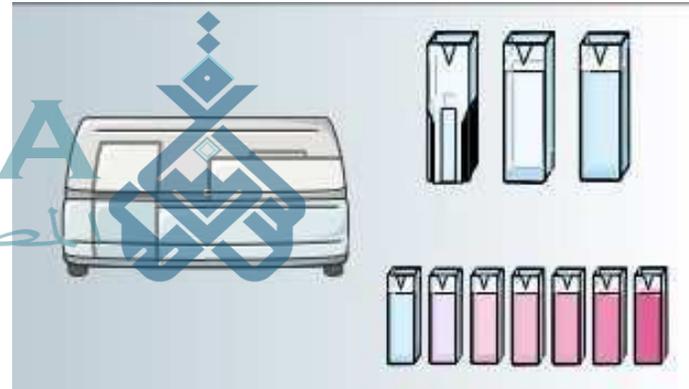
Avec :

- A : absorbance
- ϵ : coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
- L : largeur de cuve en cm
- C : concentration de la solution en mol/L

- Un **spectrophotomètre** : appareil pour mesurer l'**absorbance** d'une **solution de la lumière**.
- Selon la loi de *Beer-Lambert*, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des molécules en solution.
- Ainsi, la longueur d'onde de la source lumineuse du spectrophotomètre **est fixée** en fonction du **type de l'espèce moléculaire à analyser**

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Exemple d'application en Toxicologie: évolution de la concentration d'une toxine (xénobiotique) dans un milieu, en fonction du temps....

BENKADA M.



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : Licence en Toxicologie (L3)



Matière: Techniques d'Analyse **Microscopie optique**

- La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques,
- Le principe : une onde envoyée sur la préparation ou émise par la préparation,
- Cette onde est captée par un objectif qui la concentre puis passe par un oculaire qui crée une image observable,
- Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra et stocké sur ordinateur,
- I. Le microscope optique (photonique)
- II. le microscope électronique (utilise des électrons).

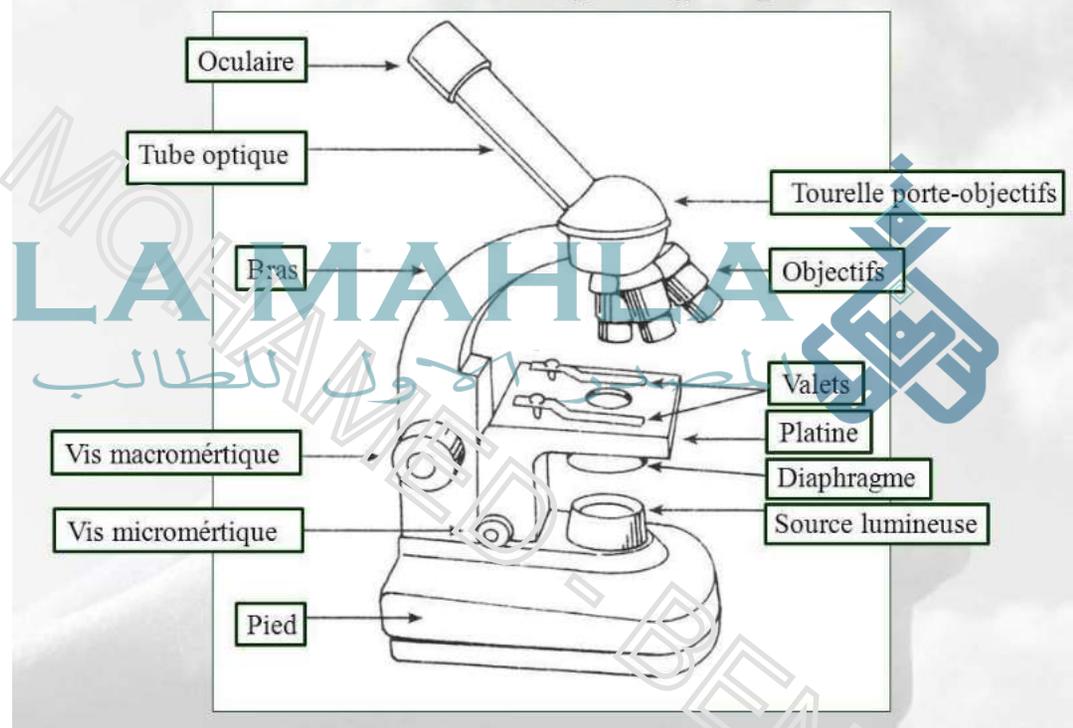
Les principales techniques de microscopie optique:

Principe: la préparation est éclairée par une lampe,

Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons

- en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière:
C'est la **microscopie en lumière directe**,
- en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux:
C'est la **microscopie en contraste de phase**,
- en émettant de la lumière (dont la longueur d'onde est différente de celle de la lampe d'éclairage):
C'est la **microscopie à fluorescence**.

Le microscope optique



Avantages du microscope optique:

- Donner une vue générale des tissus et des cellules
- Permettre l'examen de cellules vivantes

Inconvénients:

Le grossissement maximal est pas plus de 1000 fois.

Caractéristiques du microscope optique :

- Le **grossissement** = puissance de l'objectif x puissance de l'oculaire
- Le **pouvoir de résolution** : désigne sa capacité à séparer des détails très voisins.

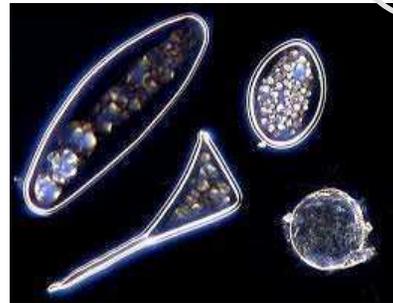
Types de microscopes optiques :

1. Microscope à fond noir:

- le fond du champ d'observation est noir
- La source de lumière est **oblique** par rapport à la préparation cellulaire
- La préparation est donc illuminée sous une incidence **rasante**
- Seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif
- Le moindre objet apparaît brillamment éclairé

Inconvénients:

- Les objets observés devenant des sources lumineuses, leurs formes et dimensions ne peuvent pas être correctement appréciés.



Exemples d'imagerie obtenues par le microscope à fond sombre

2. Microscope à contraste de phase:

- Quand le bord d'une structure produit une **diffraction** suffisante la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Le noyau d'une cellule par exemple apparaîtra sombre dans le cytoplasme environnant.

Avantages:

Permet de visualiser une croissance cellulaire vivante sans usage des colorants

Inconvénients:

Cette technique ne peut être utilisée avec les objets épais.

3. Microscope à fluorescence :

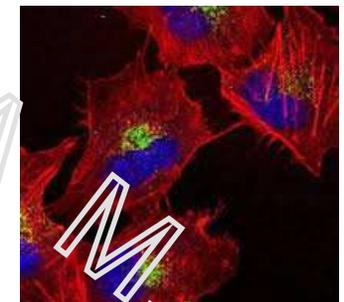
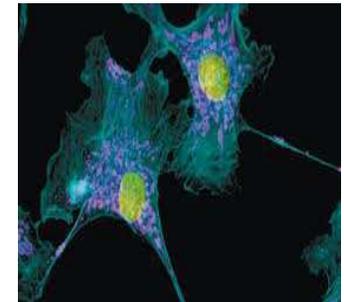
Les molécules fluorescentes absorbent des radiations à une longueur d'onde donnée puis émettent d'autres radiations de longueur d'onde plus élevée.

Ce microscope ressemble au microscope optique ordinaire, mais muni d'une **source d'UV** (lampe) et d'un système de **filtre** qui permet de **choisir la longueur d'onde des UV appropriés** pour chaque substance fluorescente utilisée.

Souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome (Fluorescéine, fluoresce en vert, Rhodamine en rouge, substances largement utilisées dans la biologie cellulaire).



Exemple d'imagerie à contraste de phase



Exemples d'imagerie à fluorescence.



Technique très largement utilisée pour séparer et purifier les constituants d'un mélange (biologique ou chimique)

Découverte en 1906 par le botaniste russe Mikhail Semenovitch TSWETT (1872- 1920).

Il a séparé des colorants végétaux en faisant passer un broyat de feuilles dans l'éther de pétrole à travers une colonne remplie de carbonate de calcium (craie).

Principe:

La chromatographie d'**adsorption** (CCM et sur colonne) est une technique de séparation de mélanges de composés,

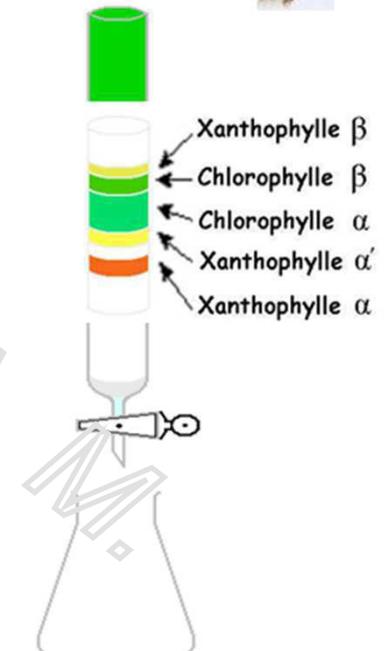
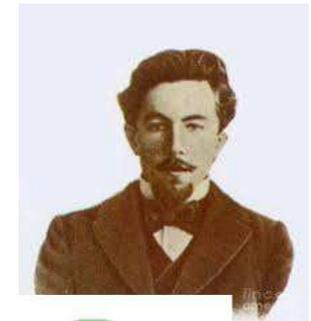
Elle est basée sur la différence d'affinité entre les 3 éléments suivants:

1. les **molécules** qui composent l'échantillon à séparer composés,
2. la **phase mobile**, qui entraîne les composés,
3. et la **phase stationnaire**.

phase mobile ♦♦ **molécules** ♦♦ **phase stationnaire**

Chaque espèce de molécule du mélange (l'échantillon=mélange de molécules différentes) migre à une vitesse spécifique

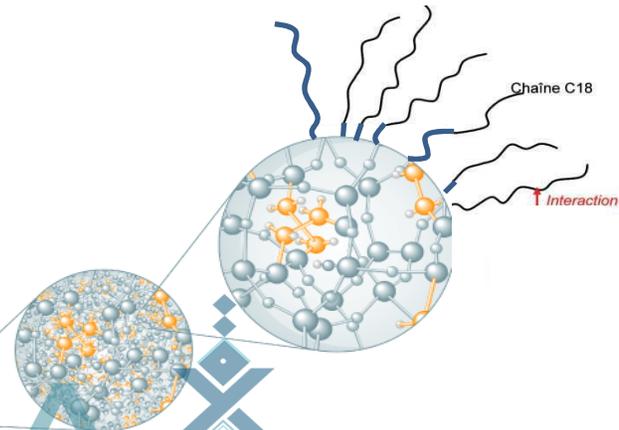
Les différents composant de l'échantillon sont séparés



Expérience de M.S. TSWETT pour la séparation des composants de la chlorophylle

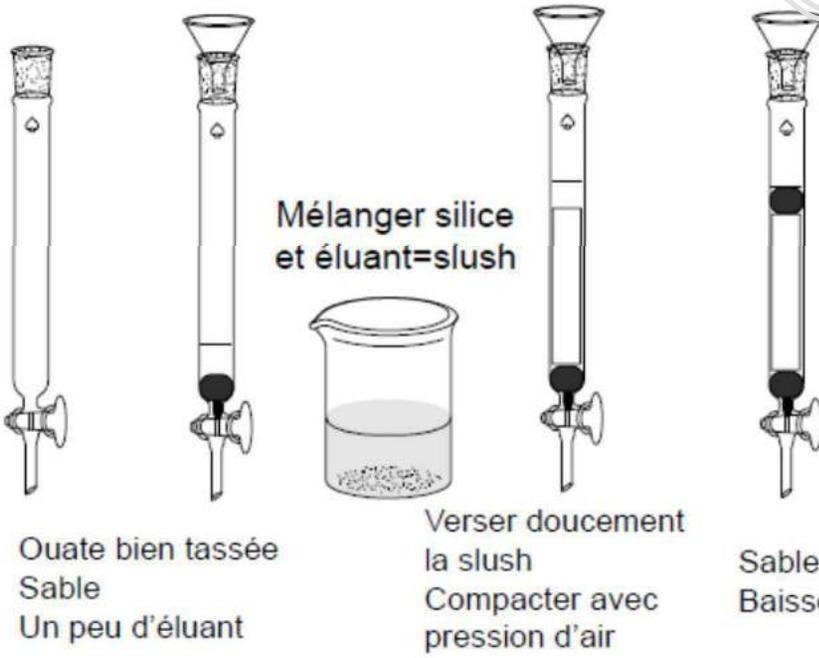
Détails d'une phase mobile (C18) utilisée en chromatographie liquide sur colonne

● Si
● C
● O
● H



SAHLA MAHOLA

المصور والمصمم الجرافيكي
Préparation de la colonne



Les étapes de cette chromatographie ont été très largement détaillées en cours.

Attention à ne pas sécher la silice! Régler le débit d'air: 1-2 gouttes/sec.



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : **Licence en Toxicologie (L3)**
Matière: Techniques d'Analyse
Cours: **Chromatographie Sur Couche Mince**



- La chromatographie sur couche mince (CCM)
- En anglais TLC : Thin Layer chromatography
- Technique de chromatographie planaire
- La phase mobile est liquide.
- Utilisée pour séparer des composants.

CCM :

1. Phase stationnaire : une couche mince de matériel absorbant (gel de silice, oxyde d'aluminium ou cellulose)

L'épaisseur de cette couche:

- 0,2 mm pour plaque analytique
- 1-3 mm pour plaque préparative (expliquée en cours)

C'est **un support** en aluminium

ou en plastique sur lequel a été étalé une phase stationnaire en couche uniforme.

2. Une phase liquide: dite *phase mobile* c'est le solvant éluant; pure ou en mélange de solvants

Cet éluant entraîne les composés à séparer le long de la phase stationnaire.



Étapes de la CCM



Cuve pour CCM

Préparation :
mettre l'éluant
dans le bêcher
sur
environ
5 mm
de haut

1



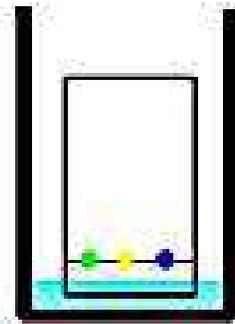
Plaque
chromatographique

Marquer
d'un trait
l'endroit
des dépôts



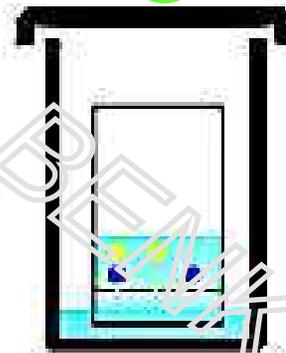
X | solution inconnue
A | solution connue A
B | Solution connue B

2



Placer la plaque
dans le bêcher
contenant l'éluant

3



Refermer
L'éluion commence

4



Lorsque l'éluant
a migré jusqu'en haut
ouvrir rapidement la plaque

Buts de l'utilisation de la CCM:

- Analyse (CCM analytique)
- Purification (CCM préparative).

Voir explications en cours.



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : **Licence en Toxicologie (L3)**
Matière: Techniques d'Analyse
Cours: **Centrifugation différentielle**



Principe de la technique

La centrifugation permet de séparer des constituants, de tailles et de masses très variables, contenus dans un liquide, des molécules ou même des cellules entières.

Les constituants de l'échantillon sont soumis à:

1. La force **de la gravité**, du haut vers le bas,
2. **La poussée d'Archimède**, force qui s'exerce du bas vers le haut

- Dans la cas de la figure 1, la **poussée d'Archimède** (1) et la **gravité** (2) sont faibles comparées à l'**agitation moléculaire** (3) .

- L'agitation de la molécule pourrait causer un mouvement de la particule, mais comme elle n'a pas de direction précise, la particule ne se déplace pas.

Durant la centrifugation les forces de la gravité et de la poussée d'Archimède deviennent **plus fortes**. Ayant une direction privilégiée, elles peuvent entraîner un mouvement des particules de l'échantillon

- Soit vers le haut, si la poussée d'Archimède est supérieure à la gravité
- Soit vers le bas dans le cas contraire

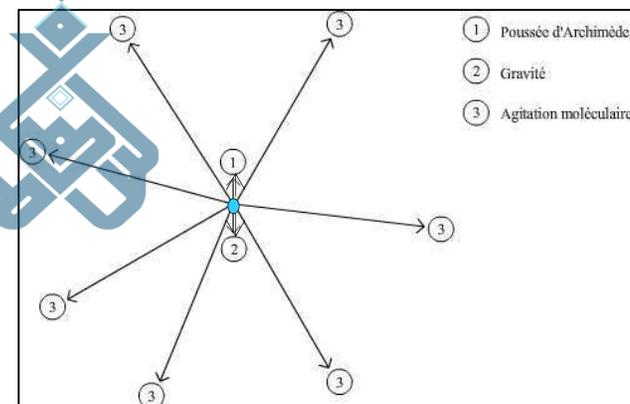


Figure 1 : Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide

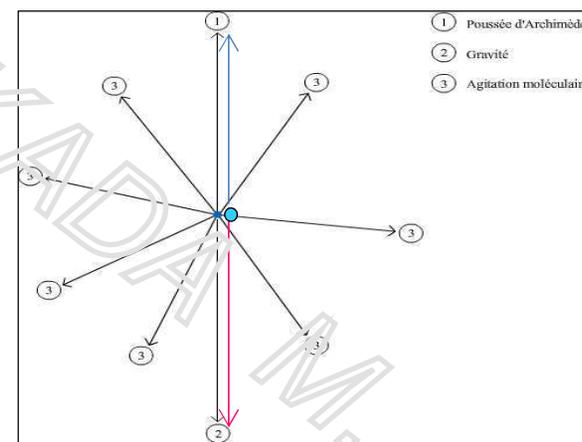


Figure 2 : Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à la centrifugation

- En faisant tourner l'échantillon, une autre force apparaît: la **force centrifuge**,
- C'est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation

Pour l'un ou plusieurs constituants de l'échantillon, l'accélération peut devenir plus forte que l'agitation moléculaire

- Cela entraîne la sédimentation vers le fond du récipient ou sa remontée.

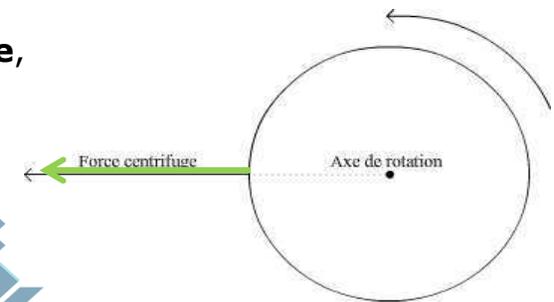


Figure 3 : La force centrifuge

Le matériel

Une centrifugeuse est une machine équipée d'un axe de rotation enfermé dans une enceinte.

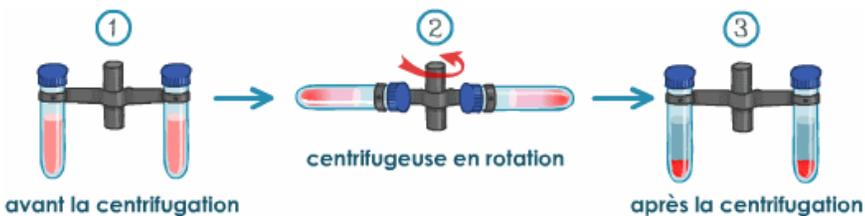
Les centrifugeuses de paillasse ont une vitesse de rotation et un temps d'utilisation limités.

En tournant, l'échantillon chauffe.

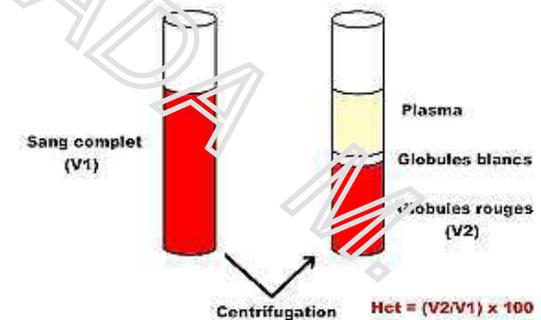
Il faut empêcher cet échauffement grâce à des centrifugeuse réfrigérée et soumises à un vide poussé pour éviter les frottements.



Centrifugeuse de paillasse



Étapes de la centrifugation



Centrifugation du sang

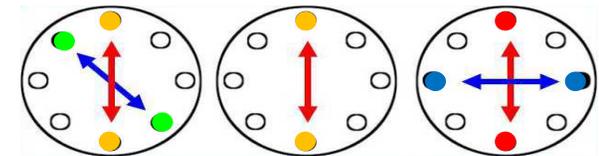
Conditions de sédimentation pour quelques constituants cellulaire

- | | |
|--|---------------------|
| • Noyau | 10 minutes à 500 g |
| • Mitochondries, lysosomes, peroxysomes | 10 minutes à 5000 g |
| • Réticulum endoplasmique, Appareil de Golgi | 1 heure à 100 000 g |

N'oublions pas !! un rotor qui tourne à haute vitesse (jusqu'à 100 000 rpm) à une grande énergie cinétique. Il peut donc causer **d'importants dégâts** s'il se brise pendant qu'il tourne.

Un rotor doit être **parfaitement équilibré**, c'est à dire que la **masse** en chaque point doit être idéalement identique à celle du point symétrique par rapport à l'axe de rotation.

- L'enceinte de la centrifugeuse est blindée.
- Les normes actuelles imposent qu'un rotor se détachant de son axe à pleine vitesse de rotation doit rester confiné dans l'enceinte de la centrifugeuse.



Équilibrage du rotor de centrifugeuse



La centrifugation différentielle:

Son principe est de séparer les différents constituants à l'aide de **plusieurs cycles de centrifugation**, à accélération croissante.

- Dans une première centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter (ex. cellules) et former un culot au fond du tube.

Tous les autres éléments pour lesquels l'accélération a été trop faible ou pour lesquels le temps de centrifugation a été trop court vont rester dans la fraction liquide (surnageant).

-On récupère alors séparément le surnageant, pour recommencer un second cycle de centrifugation avec, mais avec une accélération plus importante.

Progressivement, on sépare les différents constituants en terminant par les éléments les plus petits et ayant le moins de différence de densité avec le solvant.

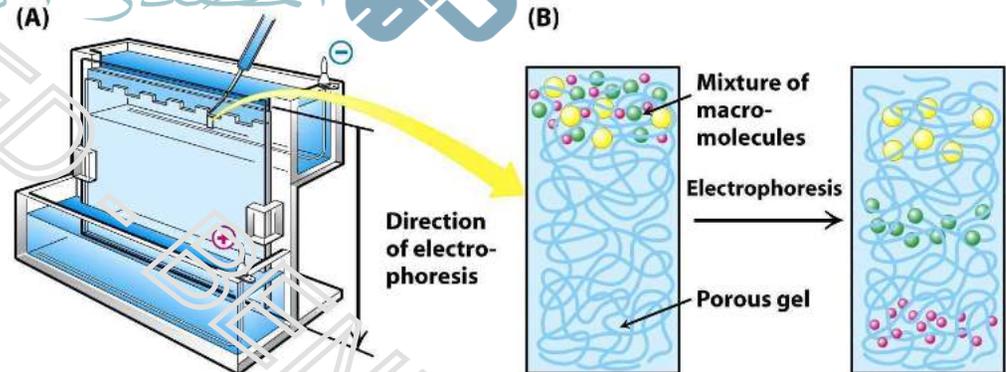
Les fractions obtenues ne sont pas pures, puisque les échantillons biologiques sont complexes (ex. broyat total d'un tissu).

Électrophorèse des protéines

- L'électrophorèse permet la **séparation** de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides.
- Dans certaines conditions (emploi de détergents), elle permet de séparer des molécules non ioniques, telles les hormones stéroïdes.

L'électrophorèse : cas des protéines

Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un **tampon** conducteur



Les protéines portent différents types de groupements ionisables:

1. Groupements chargés **négativement**:

Glutamine, Asparagine et extrémité C-terminale peptidique: (groupe carboxyle $-\text{COOH}$), Cystéine (fonction thiol $-\text{SH}$)

Sérine, Thréonine et Tyrosine: fonction alcool ($-\text{OH}$)

2. Groupement chargés **positivement** :

Arginine, Histidine (fonction imidazole), Lysine (fonction amine $-\text{NH}_2$) et l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique.

La charge nette d'une protéine dépend donc de sa composition en acides aminés et du pH.

Permet de séparer soit:

- Des protéines natives
- Ou bien de protéines dénaturés, en leur ajoutant:
 - un **détergent anionique**, ex. Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, CH₃ - (CH₂)₁₀ - CH₂ - O - SO₃⁻, Na⁺) défait la structure spatiale des protéines et se fixe sur elles.
 - Un **agent réducteur**, qui coupe les ponts disulfure, ex. le mercaptoéthanol.

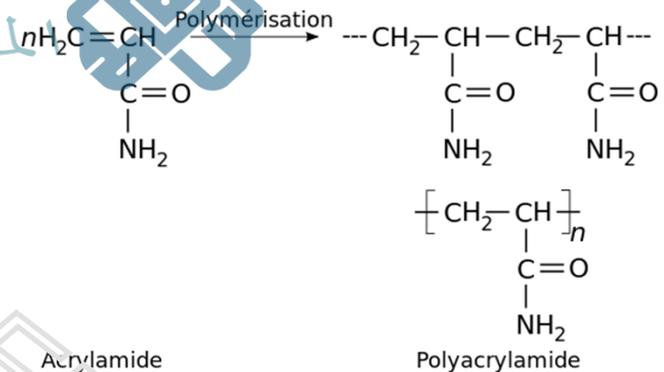
Les protéines deviennent chargées positivement et leur séparation se fait selon leur masse molaire.

Le gel de polyacrylamide (PAG)

Obtenu par polymérisation de l'acrylamide :

*L'acrylamide :

- *Produit de synthèse,*
- *Toxique et reprotoxique,*
- *Affecte la fertilité masculine ,*
- *Provoque des malformations congénitales*
- *Cancérogène pour l'Homme*
- *Classement OMS: dangereux pour la santé humaine*



Résultats

On obtient des **électrophorégrammes**

Voir explications du cours

