

**Diplôme : BTSA ANABIOTEC**

**Module : M 55 Techniques d'analyse biologique,  
biochimique et microbiologique**

**Objectif général du module :  
Maîtriser les principes et la mise en œuvre des techniques  
d'analyse biologique, biochimique et microbiologique**

### Indications de contenus, commentaires, recommandations pédagogiques

Un des objectifs importants de ce module est l'étude des techniques utilisées et leur utilisation dans le milieu professionnel : principes, modes et précautions d'emploi, applications. A l'occasion de cette étude, il faut se préoccuper des qualités des appareils : fiabilité, précision ... et sensibiliser les étudiants aux coûts analytiques.

Il est indispensable de prendre en compte tous les problèmes liés à la sécurité et à l'environnement : connaissance des produits, des pictogrammes (réglementation REACH), stockage, toxicité, élimination des déchets.

Internet est un outil important dans l'actualisation des connaissances (site du CNRS, du BUP, des fabricants ...).

L'outil informatique (ExAO, vidéos, logiciels dédiés) sera utilisé dans la mesure du possible et si cela se justifie.

#### **Objectif 1 - Maîtriser les principes des techniques mises en œuvre**

Il ne s'agit pas ici de développer des cours de biochimie, microbiologie ou de biologie mais d'apporter au fur à mesure des besoins, les connaissances nécessaires à l'étude des principes des techniques à mettre en œuvre dans les contextes professionnels choisis. Il faut éviter, dans la mesure du possible, les monographies fastidieuses ou les développements inutiles.

##### **Objectif 1.1 Identifier les caractéristiques des molécules et des organismes vivants aux différents niveaux d'organisation, en relation avec les besoins analytiques**

###### Microbiologie :

Il s'agit de présenter la diversité du monde microbien en abordant la classification générale des micro-organismes après l'avoir située dans la classification des êtres vivants actuelle (arbre phylogénétique de Woese, Fox et Logan). Indiquer que les critères de classification sont très divers et évolutifs et doivent être adaptés à l'usage prévu. Il ne doit pas s'agir d'un cours sur la classification, mais on doit aboutir à une classification pratique permettant de situer les micro-organismes utilisés en fabrication ou en expérimentation, ceux préjudiciables à la qualité des produits et les

pathogènes responsables de problèmes sanitaires. Cette présentation doit permettre d'aboutir à l'identification des micro-organismes. Insister sur les principaux microorganismes d'intérêt en s'appuyant sur leurs spécificités structurales et ultra-structurales.

La définition de l'écosystème microbien s'appuie sur des exemples dans différents milieux (produits alimentaires fermentés, eaux, sol, intestins...). Les différents éléments de l'écosystème étudiés sont le biotope, les différents paramètres d'état (température, pH, activité de l'eau ( $A_w$ ) ...) et les organismes vivants présents. Il est intéressant de montrer qu'il existe des écosystèmes homogènes (milieux liquides) et d'autres hétérogènes (milieux solides ou semi-solides).

Il s'agit de présenter le comportement des différents microorganismes en fonction de l'évolution des paramètres environnementaux ( $T^\circ\text{C}$ ,  $A_w$ , rH, pH, ...) en évoquant également la réponse cellulaire au stress (sporulation ...). La nutrition et la croissance sont présentées en culture pure et mélangée, en milieu artificiel et dans les divers milieux, ce qui permet de mettre en évidence les interactions microbiennes.

Distinguer la dynamique des écosystèmes et la dynamique des populations (métabiose).

L'étude de ces différents aspects de la microbiologie sont justifiés en s'appuyant sur des cas concrets.

Le métabolisme microbien peut être présenté en insistant sur les caractéristiques des voies métaboliques (enzymes caractéristiques, bilans substrats/produits, bilans énergétiques). Dans ce contexte, la thermochimie (1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> principe, notion d'enthalpie libre et d'équilibre chimique) peut être présentée en relation avec les potentialités réactionnelles.

#### Enzymologie :

Classer les enzymes selon la nomenclature officielle en donnant des exemples appliqués

Définir les types d'enzymes (endogènes, exogènes) retrouvés dans les systèmes biologiques et utilisés en technologie alimentaire (Ex : Clarification des jus/amélioration de la tendreté des viandes...)

Décrire la structure des enzymes holo et hétéroprotéiques et la notion d'isoenzymes et de complexes multienzymatiques.

Expliquer le mode d'action des enzymes en insistant sur la distinction entre site catalytique et site de fixation. Evoquer la cinétique des enzymes allostériques. Les paramètres cinétiques étudiées seront :  $V_M$ ,  $K_m$ ,  $K_m$  apparent,  $K_i$ ,  $V'_M$ ... et autres paramètres pertinents.

#### Immunologie :

Définir un antigène, un immunogène.

Identifier les caractéristiques des antigènes et des anticorps pour comprendre leur utilisation dans les tests immunologiques.

Expliquer ensuite la production des outils de diagnostics immunologiques : les anticorps polyclonaux, monoclonaux, et leur marquage.

#### Biologie cellulaire :

Il s'agit de montrer que la culture des cellules eucaryotes animales et végétales s'appuient sur la connaissance de la structure et de l'ultrastructure cellulaire, du cycle cellulaire, de sa régulation, de la différenciation cellulaire, du déterminisme de la mort cellulaire et de l'influence des facteurs de l'environnement.

Se limiter en histologie à l'étude des épithéliums, des tissus conjonctifs, du tissu musculaire lisse : Utiliser pour cela une méthodologie d'identification des tissus à partir d'exemples de coupes d'organes.

Décrire les colorations spécifiques couramment utilisées.

#### Biologie moléculaire :

L'étude des cellules permet également la présentation de la structure des acides nucléiques ainsi que les mécanismes biochimique de leur synthèse et de leurs fonctions effectrices et régulatrices indispensables à la compréhension des méthodes de biologie moléculaire.

On peut décrire dans le génome les séquences satellites, minisatellites, microsatellites, transposons, séquences consensus....

Décrire les caractéristiques structurales du génome des procaryotes et eucaryotes et expliquer les régulations de ces génomes

### **Objectif 1.2 Identifier les objectifs et les applications des techniques dans différents domaines**

Les différents secteurs présentés dans le module M56 servent de base de travail pour cet objectif. Il s'agit de présenter les principales applications utilisant les notions précédentes.

Exemples :

- étude des écosystèmes microbiens : sol, eaux, aliments... Pour chacun, on peut décrire les paramètres de l'environnement et montrer leurs incidences sur les conditions analytiques à mettre en œuvre.
- présenter les applications analytiques pour les produits alimentaires (contrôles sanitaires, calculs de DLC, tests de vieillissement, microbiologie prévisionnelle, maîtrise des auxiliaires de fabrication, étude des accidents de fabrication...)
- Santé animale et humaine : présenter le cadre des contrôles analytiques et des exemples d'utilisation des techniques (outil de diagnostic viral, étude de l'effet de molécules d'intérêt en pharmacologie, en toxicologie...)
- agriculture : problèmes d'alimentation animale, de qualité de la production végétale et des matières première agricoles en général.

### **Objectif 1.3 Maîtriser les principes des techniques d'analyse biologique, biochimique et microbiologique**

#### - Maîtriser les principes et la mise en œuvre des méthodes d'étude d'un écosystème microbien :

Présenter les techniques bactériennes permettant de visualiser et d'étudier la présence et la croissance. À partir des marqueurs d'identification morphologiques, enzymatiques, physiologiques, antigéniques, génétiques, raisonner la démarche de l'identification microbienne. Les exemples sont pris dans des groupes microbiens d'intérêt.

#### - Observations microscopiques :

Elles sont applicables à des études très diverses tant par rapport aux objectifs analytiques que par rapport aux disciplines concernées.

-On étudiera les différents types de microscopes : microscopes photoniques (fond clair, contraste de phase, fluorescence, confocale), électroniques (MEB et MET) et à force atomique. Il s'agit seulement d'identifier les principes des différents matériels et leurs intérêts et de présenter les techniques de préparation d'échantillons correspondantes.

#### - Techniques immunologiques :

Présenter les différentes techniques de marquage et leurs contraintes. Etudier les différentes techniques utilisées en diagnostic (immunodiffusion, précipitation, couplages avec l'électrophorèse, techniques immunoenzymatiques...) Préciser les caractères physico-chimiques (affinité, zone d'équivalence, potentiel zéta ....), les avantages et les limites des différentes techniques.

#### - Identifier les outils de biologie moléculaire :

- Enzymes : enzymes de restriction, polymérases, nucléases, ligases...
- Vecteurs : plasmides, phages, chromosomes artificiels, vecteur d'expression....
- Sondes nucléiques et leurs marquages
- Notion d'hybridation : Tm...

et présenter les différentes techniques utilisées actuellement pour les manipulations génétiques et pour la recherche ou l'identification microbienne.

### **Objectif 1.4 Choisir la méthode adaptée à l'analyse**

Il s'agit de présenter les critères et la méthodologie permettant de choisir la méthode la plus appropriée à la situation analytique proposée, en s'appuyant sur les principes techniques.

On abordera cet objectif en lien avec le module M56 .

## **Objectif - 2 Mettre en oeuvre les analyses dans le respect des règles d'hygiène et de sécurité et de la protection de l'environnement**

Cet objectif sert en particulier de support à l'apprentissage des bonnes pratiques de laboratoire en microbiologie : organisation du poste de travail, choix du matériel, travail aseptique, gestuelle, rigueur, précision...

### **Objectif 2.1 Mettre en œuvre les techniques de culture cellulaires, de cytologie, d'histologie, de biologie moléculaire et les techniques enzymatiques et immunologiques dans un objectif analytique**

#### - Utiliser différentes techniques d'observations microscopiques concernant les microorganismes :

(Etat frais, Gram, coloration de Mycobactéries ...)

Présenter et réaliser les techniques bactériennes permettant de visualiser et d'étudier leur croissance. Réaliser l'identification microbienne (bactéries, levures et moisissures, parasites)

Mettre en œuvre des méthodes d'étude d'un écosystème microbien.

#### - Mettre en œuvre des techniques de cultures cellulaires eucaryotes animales :

On réalise des cultures primaires de lignées de cellules animales en assurant leur conservation et leur entretien. On pourra mettre en évidence l'effet cyto-toxique d'une substance sur une culture, l'effet cytopathogène d'une souche virale ou pathogène.

#### - Décrire, expliquer et mettre en œuvre les techniques de cytologie, d'histologie animale et/ou végétale :

Mettre en œuvre les différentes étapes du diagnostic histologique en microscopie photonique à partir d'organes d'animaux et identifier des tissus à partir de coupes d'organes.

A partir d'une autopsie, d'une dissection ou d'un prélèvement d'organe (biopsie), réaliser les différentes étapes du diagnostic histologique : préparer des coupes pour la microscopie optique, du prélèvement à la coloration.

#### - Mettre en œuvre des études de cinétiques enzymatiques :

A réaliser pour des enzymes michaéliennes puis calculer les paramètres d'activité des enzymes (Km, VM ou tout autre paramètre caractéristique) et montrer éventuellement la régulation de leur activité par des effecteurs.

#### - Choisir et mettre en œuvre des techniques enzymologiques en analyse et production :

techniques immunoenzymatiques/ immobilisation d'enzymes/electrodes à enzymes/dosages enzymatiques de métabolites...

Mettre en œuvre des techniques d'extraction et de purification d'enzyme en lien avec des thèmes de recherche.

- Décrire, expliquer et mettre en œuvre les techniques de diagnostics immunologiques :

Réaliser des techniques :

\* d'immuno-agglutination : on réalisera ces techniques en interdisciplinarité avec les applications vues en microbiologie (sérotypage, caractérisation de virus...)

\* d'immuno- précipitation : Recherche et caractérisation de molécules. On illustrera ces techniques par des exemples.faisant intervenir des anticorps marqués : méthodes immunoenzymatiques méthodes en immunofluorescence (Détection et dosage de molécules d'intérêt)

Présenter les techniques de séparation et de purification d'une molécule par des anticorps fixés : techniques de chromatographie (en lien avec le M54).

- Décrire, expliquer et mettre en œuvre les techniques de biologie moléculaire :

Identifier les outils de biologie moléculaire et maîtriser leur mise en œuvre : extraction d'acides nucléiques, dosage et contrôle de la pureté, séparation des acides nucléiques, électrophorèse en gel d'agarose, transferts d'acides nucléiques sur membrane, clonages, amplification (PCR en point final, PCR temps réel...), transgénèse, obtention de fragments ( RFLP, RAPD...), séquençage (méthode de Sanger, automatisation)

**Objectif 2.2 Utiliser de manière raisonnée le matériel et les appareillages adaptés**

Pour être utilisés de façon optimale, les appareillages, du plus simple au plus complexe, doivent être préparés, entretenus, correctement manipulés et stockés dans les meilleures conditions. Cet objectif permet aux étudiants de découvrir les différentes facettes de la mise en oeuvre des appareils de laboratoire.

**Objectif 2.3 Exploiter et interpréter les résultats de manière critique**

Après la mise en oeuvre d'un protocole analytique adapté à l'analyse des résultats, ceux-ci sont interprétés par rapport à la normalisation et à la réglementation. A tout résultat est associée son incertitude. L'analyse et l'interprétation statistique se font en fonction des enseignements du M53.