



FFESSM

**ENVIRONNEMENT &
BIO SUBAQUATIQUES**

Guide pratique sur L'utilisation du matériel et les techniques de Laboratoire



Sommaire

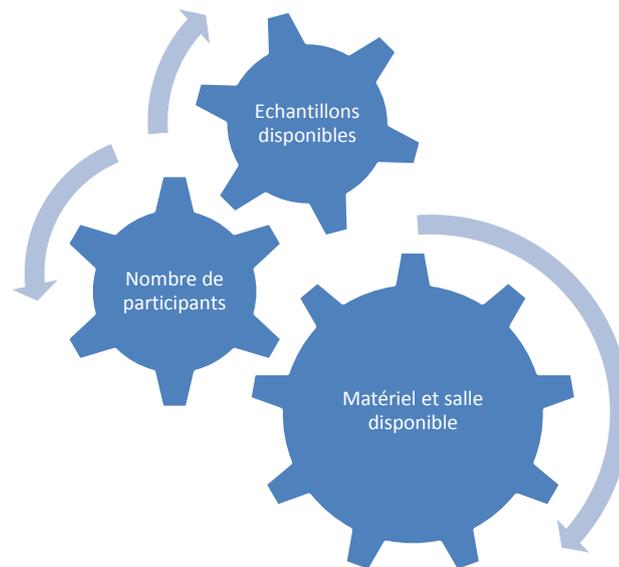
1	Préambule	3
2	Préparation Déroulement d'une séance Labo	4
2.1	Phase 1 : Préparation de la salle	4
2.2	Récolte des échantillons	4
2.3	Tri des échantillons	5
2.4		5
2.5	Observation des échantillons	6
2.5.1	Observation des spicules	8
3	Annexes	9
3.1	Annexe 1 : Le matériel de laboratoire	9
3.1.1	Le matériel de stockage des échantillons	10
3.1.2	Le matériel de manipulation et de dissection	10
3.1.3	La loupe binoculaire	11
3.1.4	Le microscope	12
3.2	Annexe 2 : Montage des lamelles (pour microscope)	13
3.2.1	Matériel nécessaire	13
3.2.2	Etape 1 : fixation du spécimen	13
3.2.3	Etape 2 : lavage du spécimen	13
3.2.4	Etape 3 (optionnelle): Coloration du spécimen	13
3.2.5	Etape 4: lavage du spécimen	14
3.2.6	Etape 5 : Montage lame – lamelle	14
3.3	Annexe 3: Les produits et leur utilisation	15
3.4	Annexe 4 : Préparation des Spicules	16
3.5	Annexe 5 : Préparation des radulas	17
3.5.1	Préparation de radula de patelles (le plus facile)	17
3.5.2	Préparation des autres radulas	17
3.6	Annexe 6 : Mise en eau d'un aquarium	18
3.6.1	Aquarium avec pompe de filtration	18
3.6.2	Aquarium sans pompe de filtration	19
3.6.3	Les animaux de l'aquarium	19
3.6.4	Eviter d'introduire :	19
3.6.5	Nourriture	20
3.7	Annexe 7 : Quelques sites sur Internet	20
3.7.1	Annexe 8 : Sources et illustrations	20

1 Préambule

Une séance labo ne s'improvise pas, il faut se pose quelques questions avant de foncer bille en tête et se faire rapidement déborder (préparation qui rate, matériel ne fonctionnant pas, stagiaires livrés à eux-mêmes,...) :

- Quels sont les objectifs de la séance (prise de connaissance du matériel, enseignement des techniques de laboratoire, tri d'échantillons, classification, ...) ?
- Quelle est la réglementation en matière de prélèvement ?
- Quel est le matériel à utiliser ?
- Quelles sont les expériences que l'on peut mener ?
- Comment organiser la séance ?

Pour monter une séance labo, il faut tenir compte des éléments ci-dessous qui sont interdépendants :



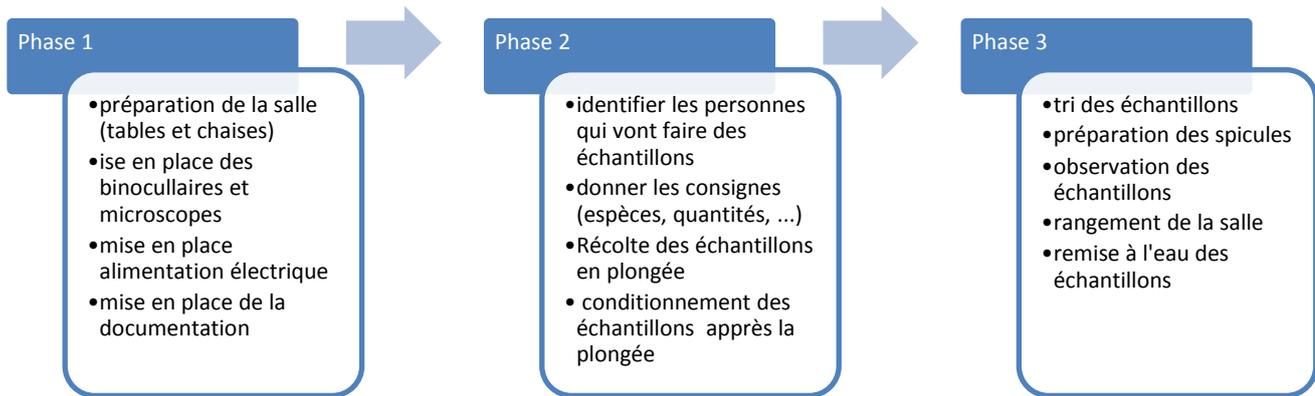
Il est illusoire de vouloir faire une séance labo avec 15 personnes avec une seule binoculaire. Il faut également faire en sorte que tout le monde puisse participer (tri des échantillons, préparation, réglage des instruments, observation, ...). Une solution parmi d'autre est d'organiser la séance en petits ateliers autour d'une binoculaire ou d'un microscope avec un animateur qui dirige l'atelier et de faire tourner les stagiaires d'atelier en atelier.

Les loupes et microscopes étant des matériels fragiles et chers doivent être utilisés dans une salle disposant de tables, chaises et électricité et à distance des projections d'eau.

Certaines observations nécessitent une dissection (radula des mollusques, langoustine, ...) ou une préparation chimique (observation des spicules,...) qui peut prendre du temps, il faut prendre en compte dans l'organisation de la séance labo.

2 Préparation Déroulement d'une séance Labo

Globalement la préparation d'une séance de laboratoire s'effectue en 3 étapes (voir ci-dessous)



2.1 Phase 1 : Préparation de la salle



Disposition type :

- Une table pour la zone humide (bacs avec les échantillons, matériel de dissection, ..)
- Une table pour les bouquins
- Un table par binoculaire / microscope ou 2 appareils tête bêche

Nota :

- les tables sont disposées en fonction des prises de courants disponibles dans la salle
- si utilisation d'un vidéo projecteur prévoir un mur pour projeter et la possibilité d'assombrir la salle
- il est indispensable de disposer d'une salle fermant à clé.

2.2 Récolte des échantillons

La récolte des échantillons est un sujet sensible car il est interdit de faire des prélèvements en plongée sans autorisation. Le plus simple est de faire quelques prélèvements sur l'estran. L'organisateur de la séance labo devra identifier les espèces à prélever, la quantité ainsi que les personnes missionnées pour effectuer des prélèvements ceci pour avoir uniquement la quantité dont on a besoin pour travailler.

Quelques idées :

- Des patelles pour l'observation des radulas
- Récolte du pu plancton si l'on dispose d'un filet à plancton
- Des bryozoaires pour l'observation des lophophores (*Electra pilosa* ou des morceaux d'hydriaires pour l'observation

- des morceaux d'Alcyon ou de gorgone pour l'observation des sclérites
- Des fragments d'éponges pour l'observation des spicules
- ...

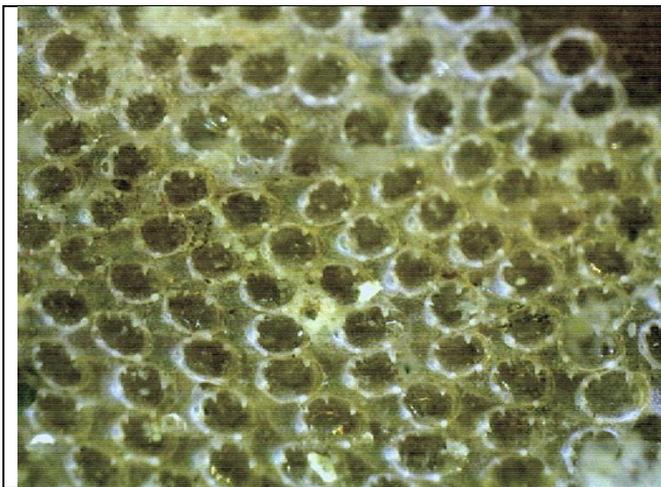
2.3 Tri des échantillons

Après la plongée, mettre les échantillons dans une grande bassine pleine d'eau afin qu'ils soient bien oxygénés et qu'ils se conservent plus longtemps.

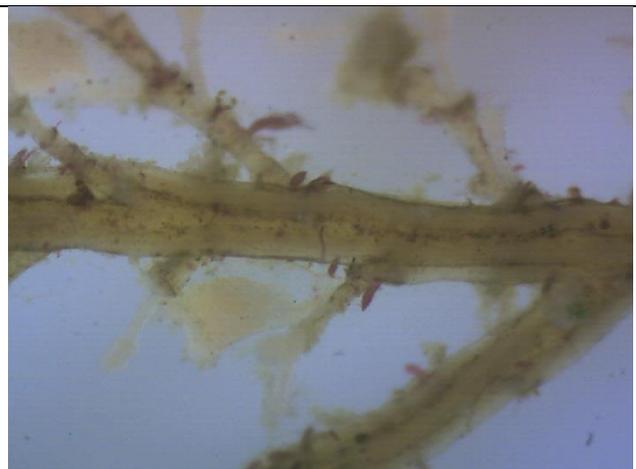


2.4 Observation des échantillons

Le temps de la préparation des spicules, il est intéressant de faire observer aux stagiaires des petits organismes (hydres, bryozoaires, ...). Cela leur permet de se familiariser avec les binoculaires.



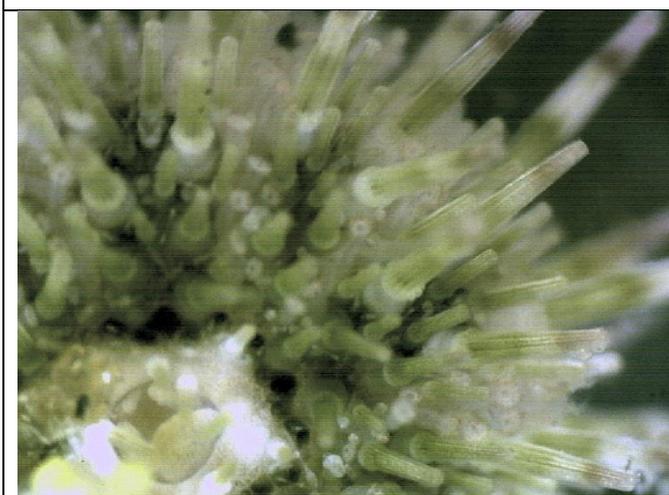
logettes (*Electra pilosa*)



Hydraire



détail d'un vers



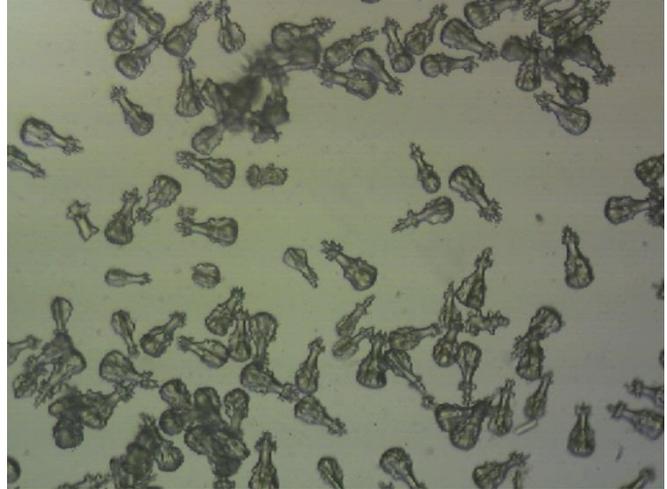
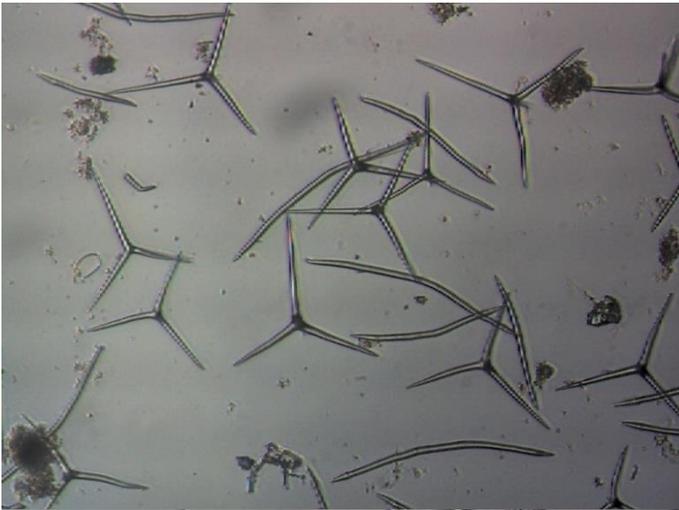
détail des piquants d'un oursin



petit bivalve sur hydraire

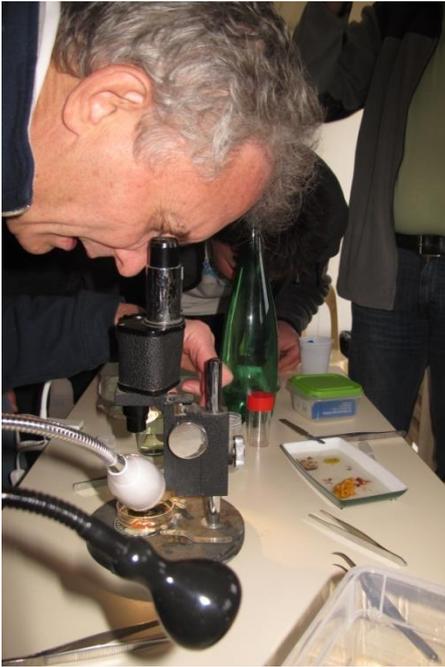


2.4.1 Observation des spicules



3 Annexes

3.1 Annexe 1 : Le matériel de laboratoire



Le matériel de laboratoire peut se découper en 3 groupes :

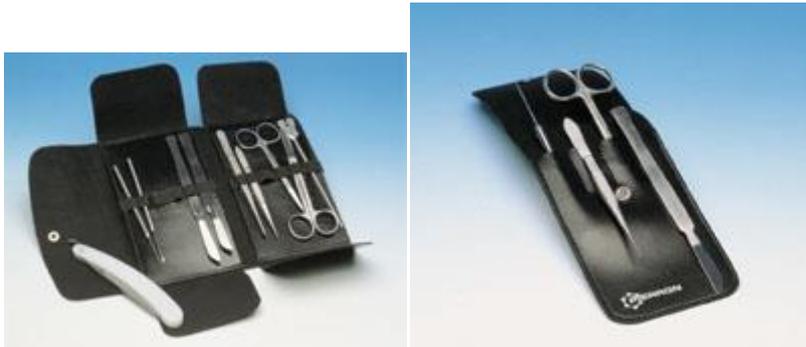
- Le matériel de manipulation et de stockage des échantillons
- Le matériel de dissection
- Le matériel d'observation (loupes et microscope)

3.1.1 Le matériel de stockage des échantillons

Les échantillons doivent être triés, préparés et conditionnés avant l'observation. Pour trier les échantillons, il faut utiliser des petites pinces, des pipettes et des bacs de différentes tailles, des coupelles, des boîtes de Pétri,...

Les échantillons doivent toujours être baignés dans de l'eau de mer sinon ils vont se dessécher.

3.1.2 Le matériel de manipulation et de dissection



Une trousse de dissection comporte des instruments pour :

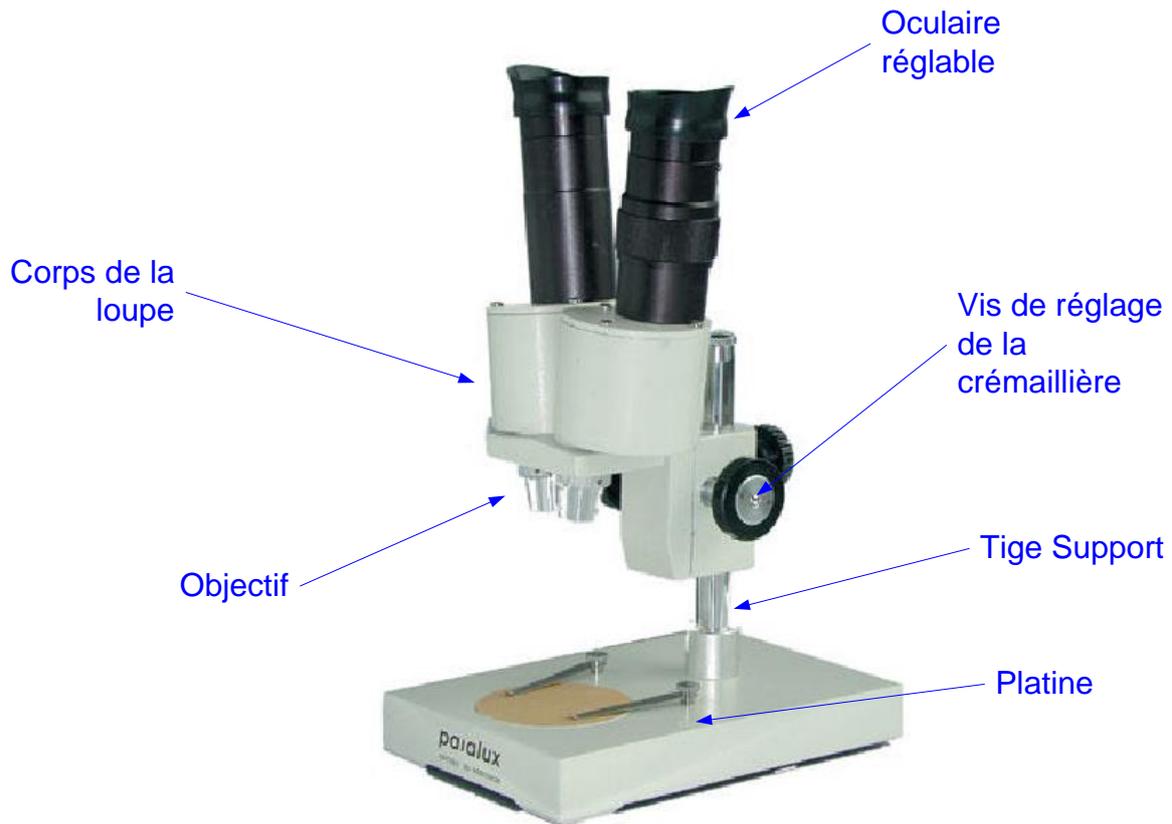
- Ecarter (pince à dissection, pince fine, pince à écarter, pince à mors, pince courbe, ...)
- Dissocier, maintenir (aiguille simple, aiguille emmanchée)
- Couper (ciseaux, scalpel, pointe lancéolée, rasoir, ...)

Une trousse de dissection comporte au minimum :

- Un scalpel
- Une aiguille emmanchée droite
- Une paire de ciseaux fins
- Une pince fine
- Une pipette

 Ce matériel doit être bien protégé dans une boîte métallique ou dans une trousse, attention, il rouille

3.1.3 La loupe binoculaire



Les loupes binoculaires sont conçues pour l'observation en relief des objets opaques ou épais. Le champ observé par l'œil gauche est le même que celui observé par l'œil droit ; les deux champs se superposant l'on obtient une vision stéréoscopique (en relief). Les rapports de grossissement d'une loupe binoculaire sont de X10, X20 ou X40.

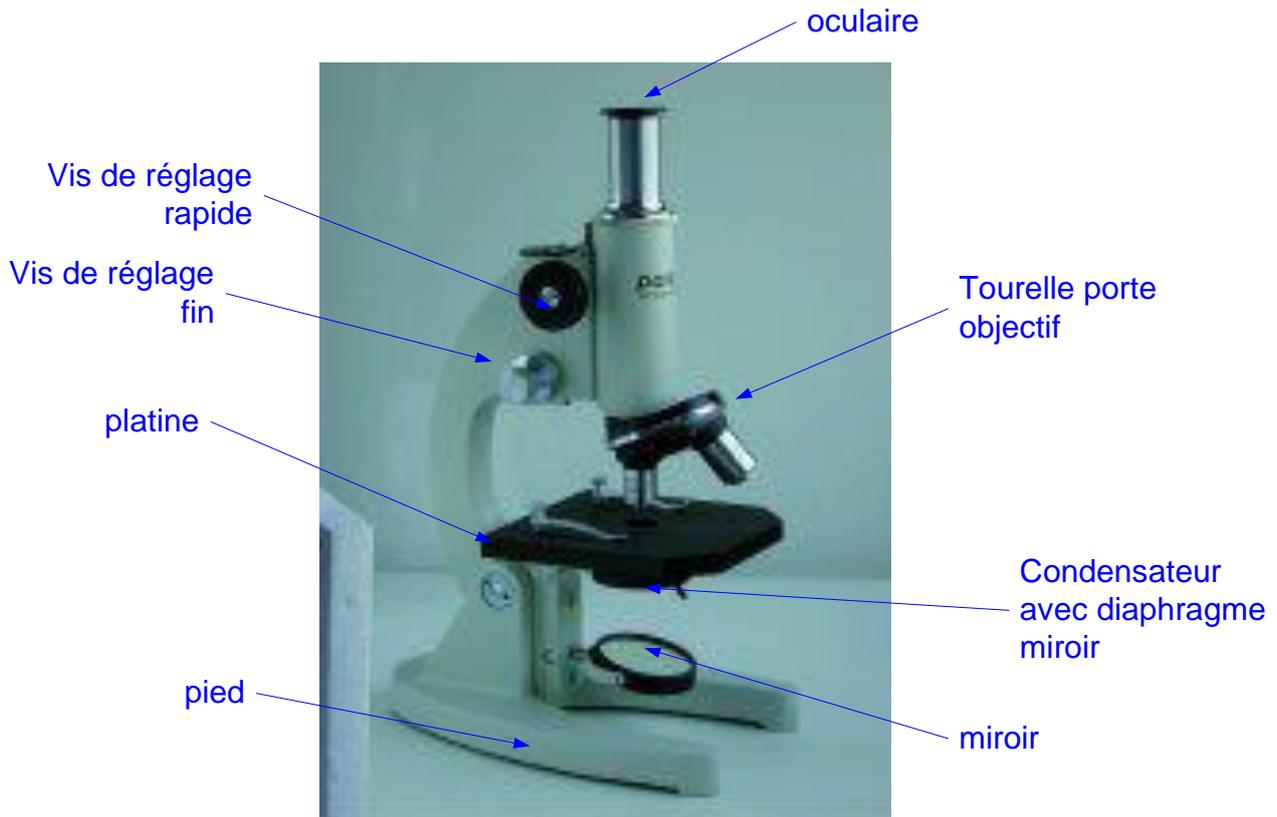
Les loupes binoculaires permettent l'observation de petits organismes (planaires, nudibranches, copépodes, ...) sans préparation particulière ; le spécimen à observer doit être mis dans une petite coupelle remplie d'eau de mer (pour éviter que le spécimen se dessèche).

- S'installer confortablement sur un tabouret pour permettre un travail optimum.
- Placer l'objet à observer sous l'objectif
- Régler la hauteur du corps de la loupe le long de sa tige de façon à ce que l'objectif soit sensiblement à la bonne distance. Cette distance est **fixe** et connue pour un grossissement donné. Elle est d'autant plus petite que le grossissement est fort.
- Mettre les yeux devant les oculaires et régler l'écartement des tubes en prenant en main les boîtes de prismes comme s'il s'agissait d'une jumelle
- Régler plus finement la hauteur du corps de la loupe à l'aide de la crémaillère de façon à obtenir une image nette
- Affiner le réglage de l'écartement des oculaires en reprenant les tubes. S'arrêter dans la position où les deux images aperçues dans les oculaires viennent se confondre en une seule
- Fermer alors l'œil gauche et mettre au point plus finement, au moyen de la crémaillère un détail **fin** de l'objet en le visant donc avec l'œil droit. Puis fermer l'œil droit et **viser** le même détail avec l'œil gauche sans toucher à la crémaillère, mais en tournant la bague moletée du tube porte oculaire réglable gauche.
- Une observation correcte des objets et ceci sans fatigue des yeux, repose sur un bon éclairage : la source lumineuse, quand elle se trouve être extérieure à la loupe binoculaire doit être correctement orientée afin d'augmenter l'effet de relief ou les contrastes.

3.1.4 Le microscope

Les microscopes sont équipés de plusieurs objectifs et oculaires dont la combinaison permet des grossissements de X150 à X700. Les observations s'effectuant par transparence (la lumière doit traverser le spécimen), les spécimens à observer nécessitent des préparations soignées, ce qui en fait un instrument de laboratoire.

Le réglage d'un microscope demande beaucoup plus de minutie que celui de la loupe binoculaire du fait de la faible distance entre l'objet et l'objectif (plus le grossissement est fort, plus la distance objet/objectif est faible).



- Le réglage de l'écartement des deux oculaires (pour un microscope binoculaire) est exactement le même que celui de la loupe binoculaire.
- Choisir un fauteuil de hauteur convenable, afin de regarder sans fatigue dans le microscope
- Abaisser au maximum la platine porte-objet à l'aide de la crémaillère rapide
- Placer la préparation sur la platine et centrer l'échantillon
- Choisir l'objectif de plus faible grossissement
- Mettre les yeux devant les oculaires (ou l'oeil suivant que le microscope possède un ou deux oculaires), puis remonter très lentement la platine au moyen de la crémaillère à mouvement rapide.
- A l'apparition de l'image, abandonner la crémaillère rapide et prendre la vis micrométrique (réglage **fin**) afin de parfaire la mise au point. Les mouvements doivent être peu étendus et lents. Il est préférable également de tenir la vis micrométrique au milieu de sa course (c'est à dire ne pas atteindre les butées de la vis micrométrique).
- Ensuite explorer méthodiquement la préparation en réalisant des mouvements de va et vient et d'avant en arrière avec la platine afin de trouver les détails intéressants
- Pour observer avec un plus fort grossissement, tourner simplement le revolver porte objectif et ajuster la mise au point avec la vis micrométrique

3.2 Annexe 2 : Montage des lamelles (pour microscope)

Toute observation d'un échantillon sous microscope doit se faire avec un montage sous lames et lamelles

3.2.1 Matériel nécessaire

- ✓ Paquet de lames porte objet plates ou concaves
- ✓ Paquet de lames couvre objet
- ✓ Compte goutte ou pipette en verre
- ✓ Du papier absorbant (sopalin, buvard)
- ✓ Seringues

Montage des lamelles

Avant de monter les lames, il convient de fixer le spécimen, c'est à dire s'assurer de sa conservation. On utilise généralement des substances qui stoppent la dégradation (dénaturation des protéines). On utilise généralement du formol mais on peut utiliser de l'acide acétique ou de l'alcool.

 **Attention le formol est un produit toxique, qui irrite les voies respiratoires.**

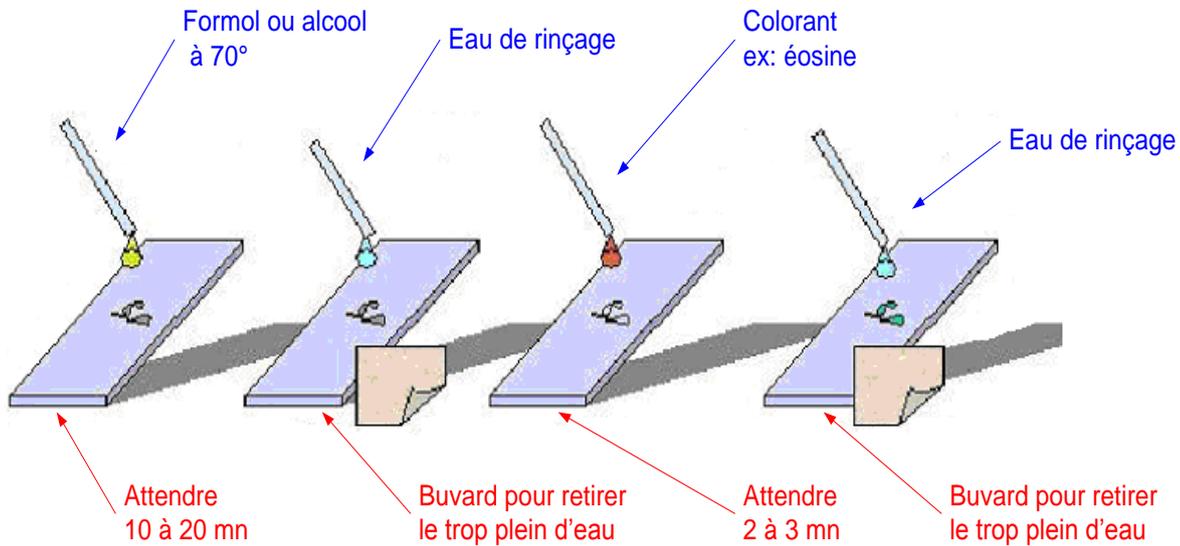
3.2.2 Etape 1 : fixation du spécimen

- Utiliser du formol
- Fixateur de BOUIN

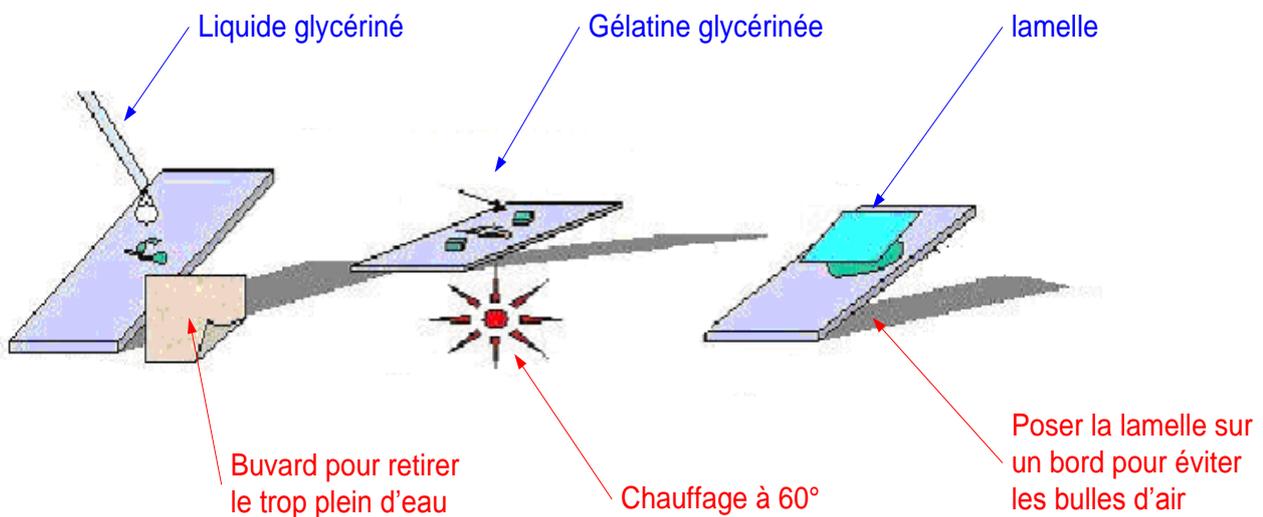
3.2.3 Etape 2 : lavage du spécimen

- Lavage avec de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée surtout si utilisation du formol

3.2.4 Etape 3 (optionnelle): Coloration du spécimen



3.2.5 Etape 4: lavage du spécimen



3.2.6 Etape 5 : Montage lame – lamelle

- Placer la lamelle sur sa tranche sur un coté de la lame, maintenir cette lamelle avec un doigt ou une aiguille
- Laisser tomber doucement la lamelle (pour éviter la formation de bulle d'air)
- Sceller la préparation avec du vernis.



3.3 Annexe 3: Les produits et leur utilisation

Pour les préparations, 3 types de produits sont principalement utilisés :

- Les fixateurs
- Les colorants
- Les transparisants

Famille	Nom	Utilisation
Fixant	Formol	S'utilise dilué dans l'eau de mer (4 ou 10%). Attention le formol est un produit toxique irritant pour les voies respiratoires
	Fixateur de BOUIN	Se trouve dans les maisons spécialisées, ne convient pas pour conserver les objets calcifiés
	Alcool acétique	1/3 d'acide acétique +2/3 alcool à 90° assez facile à faire chez soi en mélangeant de l'alcool à 90° + vinaigre d'alcool
Colorant	Eosine	Eosine à 2% : existe en dose unitaire (pharmacies et grandes surfaces)
	Bleu de méthylène	Colorant bleu (Pharmacie)
	Teinture d'iode	Colore en bleu l'amidon (en pharmacie)
	Rouge neutre	Coloration vitale non toxique pour les protozoaires (maisons spécialisées)
	Vert d'iode	Coloration des tissus ligneux pour les coupes de plantes (maisons spécialisées)
Transparisant	Liquide glyciné	Pour les observations immédiates (composition : 1/3 d'alcool à 70° +1/3 eau + 1/3 de glycérine)
	Hypochlorite	Solution de chlore stabilisée pour dissoudre les tissus organiques (on peut utiliser la solution DAKIN que l'on trouve en pharmacie)
	Solution de soude à 20%	Déboucheur liquide pour évier (permet de dissoudre les tissus des éponges pour récupérer les spicules). Neutraliser en rinçant avec de l'eau vinaigrée
Divers	Vernis	Pour sceller les lamelles (vernis à ongle ou vernis de maquette)
	Alcool isopropylique	Pour nettoyer les instruments, lentille
	Chlorure de magnésium	Pour calmer les animaux marins (dilution à 30g/litre)
	Gélatine glycérine	Pour conserver les préparations aqueuses
	Menthol	Pour anesthésier les animaux (utiliser pur ou dilué dans l'alcool)
	Eau de javel	Pour la préparation des spicules
	Potasse	Pour dissoudre des chairs mortes (dilution 1/10)

3.4 Annexe 4 : Préparation des Spicules



il y a autant de préparations à faire que d'échantillon d'éponges

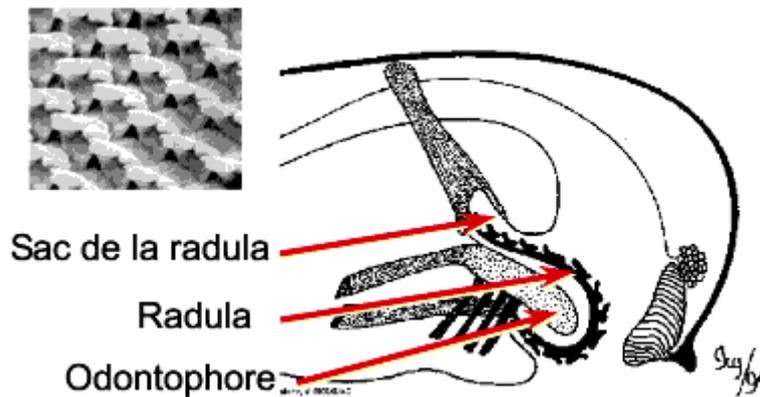
1. Hacher des petits bouts d'éponges
2. Mettre les petits morceaux hachés dans une éprouvette (un seul type d'éponge par éprouvette !). Rajouter de l'eau de Javel non diluée. Fermer le tube et secouer l'éprouvette pendant 10 secondes.
3. Laisser reposer la préparation pendant 15 minutes. Regarder ensuite (sans secouer le tube) si des particules se sont déposées au fond du tube.
4. S'il n'y a pas de dépôts bien déterminés, secouer à nouveau le tube et recommencer l'étape 3
5. A l'aide d'une pipette, remplacer l'eau de Javel par de l'eau en faisant attention de ne pas absorber les spicules au fond de l'éprouvette.
6. Laisser reposer à nouveau le contenu de l'éprouvette
7. Recommencer l'opération au moins 2 à 3 fois jusqu'à ce que l'eau soit limpide
8. Laisser reposer le contenu et retirer l'eau à l'aide d'une pipette.
9. Mettre le dépôt sur une plaquette
10. Mettre la plaquette sous une binoculaire et observer les spicules



L'opération peut être plus ou moins longue suivant les types d'éponges que l'on a choisis au départ

3.5 Annexe 5 : Préparation des radulas

La radula est la langue des mollusques (les bivalves étant des filtreurs, ils ne possèdent pas de radula). La radula se présente sous la forme d'un long ruban hérissé de dents (semblable à une chaîne de tronçonneuse). La forme de la radula dépend du régime alimentaire du mollusque (herbivore, carnivore, foreur,...).



3.5.1 Préparation de radula de patelles (le plus facile)

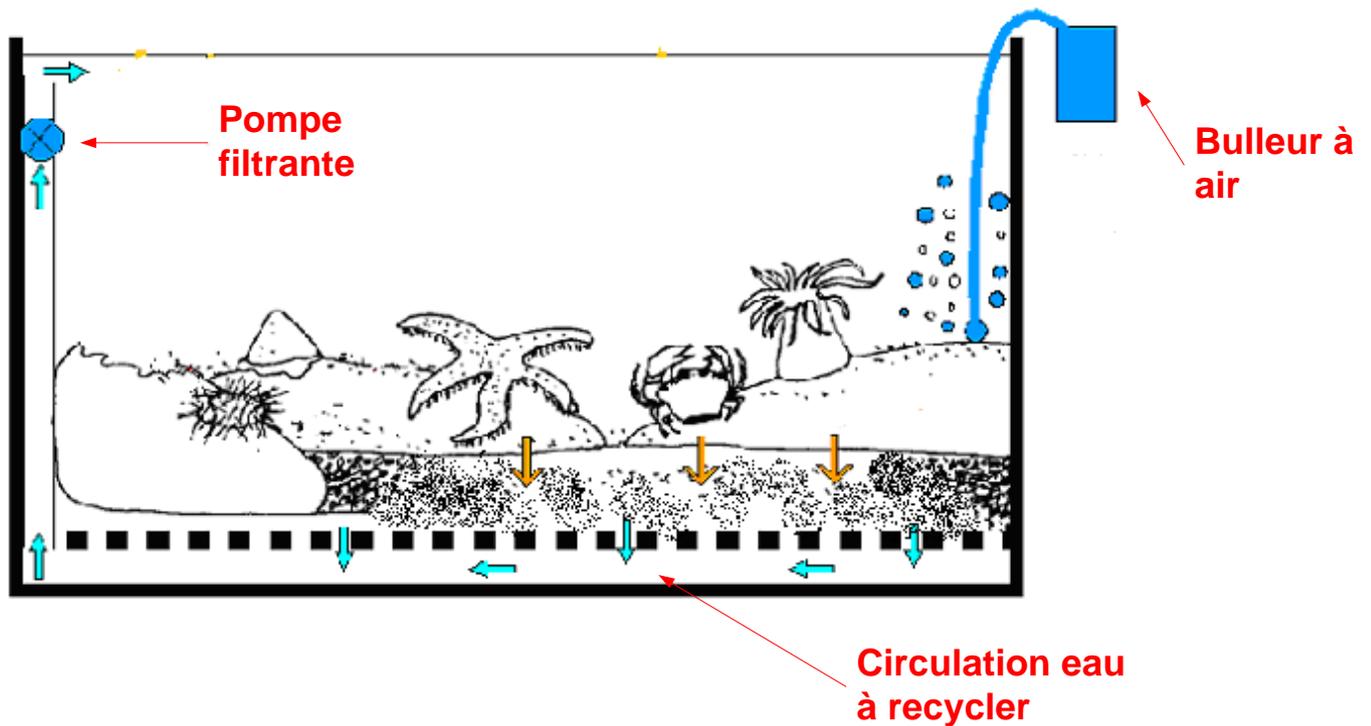
- Détacher l'animal de la coquille
- La radula s'observe sur la partie dorsale sous la forme d'un ruban mesurant 2 fois la longueur de l'animal

3.5.2 Préparation des autres radulas

- Dissoudre l'animal ou la tête de l'animal dans de la potasse au 1/10 à ébullition pendant 10mn
- Rincer soigneusement à l'eau claire
- Les radulas peuvent se conserver au sec

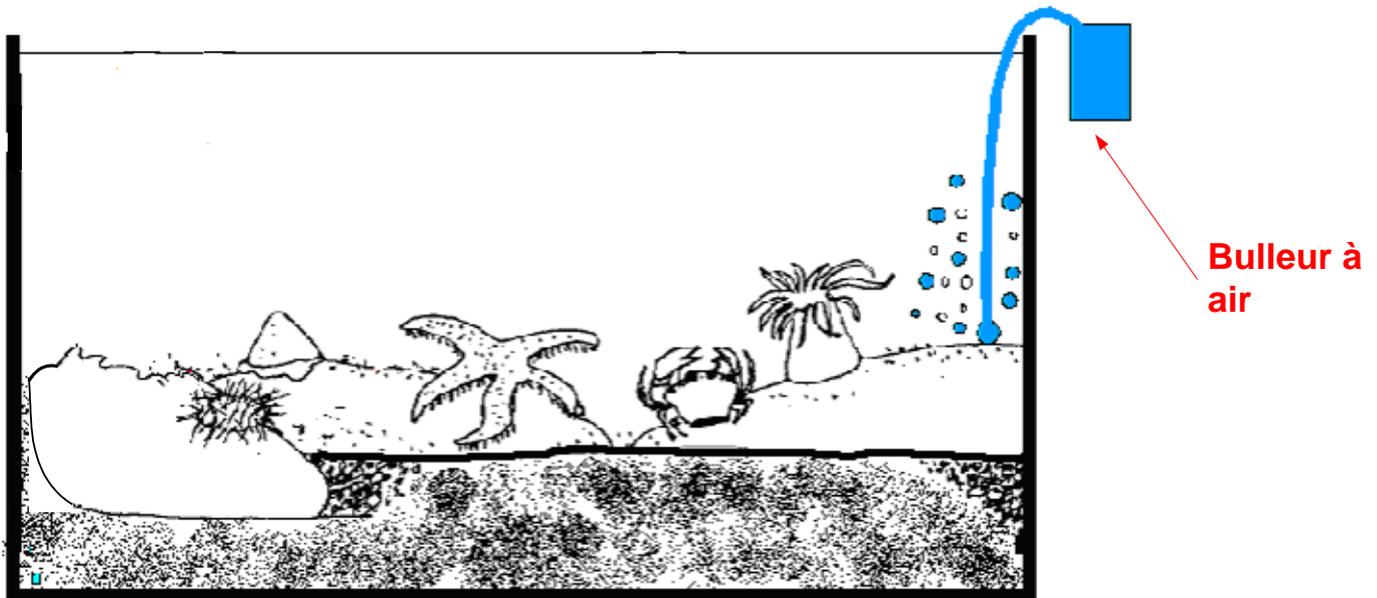
3.6 Annexe 6 : Mise en eau d'un aquarium

3.6.1 Aquarium avec pompe de filtration



- Une bonne couche de sable grossier siliceux de plage non lavé donc vivant (c'est un sédiment qui contient de nombreuses bactéries essentielles pour le maintien de l'écosystème contrôlé de l'aquarium) qui repose sur une grille fine (plastique) soutenue par des montants en bois de façon à ce qu'un courant d'eau permanent soit maintenu à travers le sable grâce à une pompe aspirante immergée placée sur le côté de l'aquarium (350 L/h) et à un bulleur à air
- Si l'évaporation est trop importante il est préférable de renouveler l'eau par moitié environ plutôt que de réaliser de petits apports.

3.6.2 Aquarium sans pompe de filtration



- Une bonne couche de sable grossier siliceux de plage lavé qui repose sur le fond de l'aquarium
- Un bulleur à air
- Les animaux que l'on introduit sont volontairement de petite taille car ils s'accliment mieux et peuvent aisément être observés :
- Si vraiment l'évaporation est importante il est préférable de renouveler l'eau par moitié environ plutôt que de réaliser de petits apports.

3.6.3 Les animaux de l'aquarium

- Des étoiles de mer (petites, éviter les étoiles glacières) ou ophiures
- Des gobies ou blennies
- Des anémones (genre fraise de mer)
- Des crustacés de petite taille (étrilles, crabe vert, crevettes, Bernard l'ermite)
- Des doris avec quelques bryozoaires comme nourriture
- Quelques nasses réticulées (éboueurs)

3.6.4 Eviter d'introduire :

- Des éponges dans l'aquarium (certaines éponges dégagent de l'ammoniaque)
- Des algues
- Des oursins qui supportent mal une élévation de température et qui sont difficiles à nourrir car herbivores
- Des syngnathes qui sont difficiles à nourrir (Artémias).
- Les ormeaux qui sont des herbivores

3.6.5 Nourriture

- Récupérer des patelles, des moules pour nourrir les étoiles, les crustacés et les anémones
- Des bryozoaires pour les nudibranches

3.7 Annexe 7 : Quelques sites sur Internet

<http://www.plancton-du-monde.org/>

Loupes binoculaires & microscopes

- www.astronomie-paralux.com
- www.pierron.com
- www.nikon.fr
- www.leica.com (site en anglais)

Aquarium

- www.cyberaqua.org
- www.aquarionaute.com
- www.bleu-et-vert.com
- www.entraquariums.com

Photo-numérique - Webcam

- <http://www.optique-unterlinden.com/televue/televue.htm> - adapt → site présentant des adaptateurs pour appareils photos reflex et numériques
- http://perso.wanadoo.fr/roannemineraux/prise_de_vue.htm → site présentant des exemples de photographies numérique depuis des binoculaires
- <http://www.pearl.fr/article-PE1305.html> → site présentant une caméra microscope avec un grossissement jusqu'à 200

3.7.1 Annexe 8 : Sources et illustrations

- Hors série n°1 Subaqua
- Rapport de stage MF1 Bio / Marion Cornu
- Site Web canadien « Biodidac »
- Marc Floury (préparation des spicules)