Document téléchargeable sur le site
https://www.svt-tanguy-jean.com/

EPLEFPA Dijon Quetigny Plombières-lès-Dijon
Site de Quetigny (21) • LEGTA Olivier de Serres
Classe préparatoire ATS (Adaptation Technicien Supérieur) Biologie
Préparation des Concours agronomiques et vétérinaires (voie C)

ENSEIGNEMENT DE BIOLOGIE • TRAVAUX PRATIQUES
Partie A. L'unité et la diversité du monde vivant

TP A1

Observation et organisation de quelques types cellulaires

Objectifs : extraits du programme

TP A1 : Les modèles cellulaires procaryote et eucaryote (3h)	Étudier au microscope photonique la structure des cellules acineuses pancréatiques, des cellules chlorophylliennes du parenchyme palissadique, des Protéobactéries et des Cyanobactéries. Observer des électronographies pour déterminer l'ultrastructure de ces cellules eucaryotes et procaryotes.

Introduction

La **cellule** est ***l'unité structurale et fonctionnelle de base des êtres vivants***. On peut distinguer deux types cellulaires principaux :

- La **cellule eucaryote** : ***cellule compartimentée dont l'ADN est enfermé dans un noyau et dont les compartiments présentent une spécialisation fonctionnelle***. On trouve aussi un peu de **matériel génétique** dans **certains compartiments** (mitochondries, plastes).
- La **cellule procaryote** : ***cellule souvent non compartimentée*** (mais nous verrons la plus belle exception : celle des Cyanobactéries) ***dont l'ADN est situé dans une zone du cytoplasme nommée nucléoïde***. On trouve aussi un peu de matériel génétique dans les **plasmides**, ***petits morceaux circulaires d'ADN***.

Les organismes peuvent être **uni**- ou **pluricellulaires**.

Au sein des cellules eucaryotes, le programme invite à distinguer le **type « animal »** et le type **« végétal (cholorophyllien) »** même si de nombreuses variations existent tant chez les Animaux que chez les 'plantes'.

Comment les observations au microscope photonique et au microscope électronique peuvent-elles nous renseigner sur l'organisation des types cellulaires au programme ?

Nous verrons quelques types cellulaires supplémentaires dans l'intérêt de la construction des notions.

I. Techniques d'observation et d'étude des cellules

A. Préparations microscopiques : lames

1. Principes généraux

- La plupart des **observations microscopiques** se font sur des **lames de verre** généralement recouvertes d'une **lamelle**. L'échantillon doit être de **faible épaisseur** de manière à pouvoir être **traversé par la lumière**. Plus l'on souhaite observer à un fort grossissement, plus l'épaisseur doit être fine.
- Les éléments montés sur une **lame microscopique** peuvent être **frais** ou **séchés**, **hydratés** ou **désyhydratés**… Le **milieu de montage** peut être **l'eau** ou un **milieu de montage plus pérenne** (Baume du Canada, *Eukit*…) lorsque la lame est destinée à être **conservée** ; il faut alors très fréquemment **déshydrater** et **fixer** l'échantillon à l'aide de **solvants organiques**.
- On peut en outre **colorer les lames** de manière à mettre en évidence tel ou tel type de **constituants** (tableau I).

TABLEAU I. Quelques colorants fréquents. *Beaucoup de préparations de biologie végétale seront colorées au **carmino-vert** (le **carmin acétique** colore la **cellulose** en **rose** et le **vert d'iode** colore la **lignine** en vert).* D'après PEYCRU et al. (2013).

Ce que vous voulez mettre en évidence	Colorants à utiliser	Coloration obtenue
Les cellules de façon non sélective	Bleu de méthylène	Cellule en bleu
	Rouge neutre	Cellule en rouge
Noyau (ADN, ARN) ou chromosomes	Carmin acétique	ADN en rose
	Vert de méthyle acétique en présence de pyronine	ADN en vert ARN en rose
Paroi cellulosique	Carmin - vert d'iode	Cellulose en rose
	Rouge Congo	Cellulose en rouge
Paroi lignifiée	Carmin - vert d'iode	Lignine en vert
Vacuole	Rouge neutre	Vacuole en rouge
Amidon	Lugol ou eau iodée (pur ou dilué)	Amidon en bleu, violet ou marron
Glycogène	Lugol	Glycogène en brun acajou
Lipides	Rouge Soudan III	Gouttelettes lipidiques en rouge

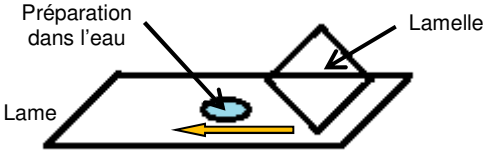
2. Préparations simples

- **Certaines préparations** ne nécessitent **pas de coupe** mais supposent un **frottis** ou une simple **mise en suspension** de l'échantillon.
- En ce qui nous concerne dans ce TP, nos préparations seront en **milieu aqueux** (point technique).

Point technique : le montage entre lame et lamelle dans l'eau

➢ Pour ***réaliser un montage entre lame et lamelle en milieu aqueux***, **respectez** le protocole suivant :

- **mettez** une petite goutte d'eau (ce peut être de l'eau glycérinée si l'on veut limiter un peu l'évaporation) sur la lame ;
- **prélevez** l'élément à monter de la façon adéquate (utilisation de pinces fines, utilisation de moelle de sureau et d'un scalpel pour faire une coupe de tissu…) ;
- **disposez** l'élément à monter dans la goutte d'eau sur la lame ;
- **couvrez** d'une lamelle, en approchant la lamelle latéralement et obliquement comme sur la figure ci-dessous et en lâchant lorsque la goutte d'eau adhère à la lamelle (cela permet une bonne cohésion lame-lamelle et évite les bulles d'air) :



Avancez obliquement la lamelle jusqu'à toucher la goutte, puis lâchez délicatement, surtout en cas de préparation fragile

- **Si besoin** : **écrasez** la lamelle verticalement et délicatement (l'épaisseur de l'objet à observer doit être la plus fine et la plus homogène possible), sans rompre la lamelle, ni évacuer toute l'eau.
- *On peut utiliser un peu de papier Joseph pour éponger le trop-plein d'eau (sans aspirer toute l'eau néanmoins !). On peut rajouter un tout petit peu d'eau par le côté de la lamelle en cas de déshydratation.*

3. Réalisation de coupes par microtome

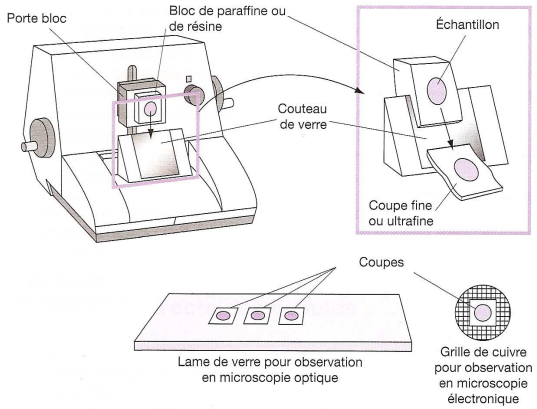


Figure 4

Préparation des tissus pour la microscopie

Après avoir fixé, déshydraté et inclus l'échantillon dans de la paraffine pour la microscopie optique et dans de la résine pour la microscopie électronique, le bloc à couper est déposé sur le bras du microtome dont l'avancée est réglée selon l'épaisseur de la coupe à réaliser.

FIGURE 1. Coupes d'échantillons par microtome. D'après BREUIL (2007).

- De **nombreuses préparations microscopiques** supposent la ***réalisation de coupes***. L'échantillon est préalablement inséré dans un **milieu solide** (c'est l'**inclusion**), souvent après **fixation**. Le milieu solide est souvent la paraffine.

*En classe, on peut réaliser des coupes à la main avec une **lame de rasoir** en plaçant l'échantillon à coupe dans de la **moelle de sureau**.*

- Les préparations sont alors coupées par un **microtome** (figure 1). Les coupes font de **0,5 à 100 µm d'épaisseur**. Elles sont ensuite souvent **colorées**, **déshydratées** et **montées** dans un milieu pérenne.

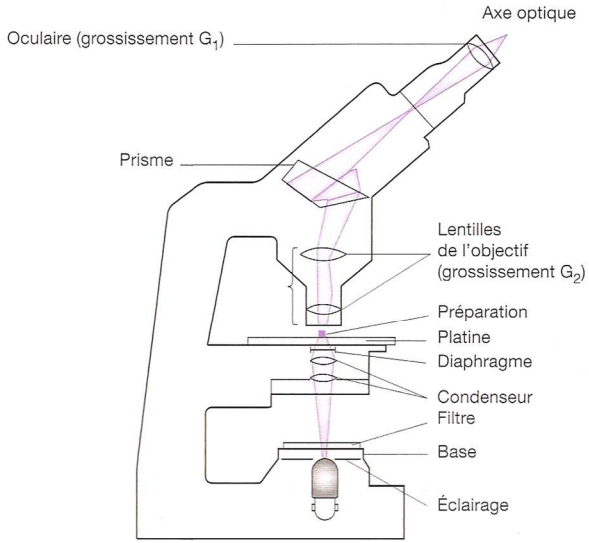
*En **microscopie électronique**, un traitement particulier de l'échantillon est nécessaire. Les coupes pour le **MET** sont **très fines (de l'ordre de 50 nm !)** et réalisées avec un **ultramicrotome**. Le dépôt se fait non sur du verre mais sur un **grillage métallique**.*

B. Observation directe par microscopie

- Tout système de microscopie permet, ***par l'utilisation d'un rayonnement (lumineux, électronique), d'observer des structures invisibles à l'œil nu***.

1. Le microscope optique

- Le **microscope optique (MO)** ou **microscope photonique (MP)** repose sur la **traversée par des ondes lumineuses** de l'échantillon sur une **lame de verre**, le **grossissement** de l'image par la **déviation des ondes lumineuses** et un système de **réflecteurs** amenant l'image jusqu'aux **oculaires** (d'un à trois), eux aussi munis d'une **lentille** (figure 2).
- Principes d'utilisation : voir point technique.



Principe de fonctionnement d'un microscope optique

Le grossissement du dispositif est $G = G_1 \times G_2$. Plus le grossissement est important, plus il faut de lumière et plus il faut baisser l'objectif pour le rapprocher de la préparation pour augmenter α (Fig. 3).

FIGURE 2. Microscopie optique. D'après BREUIL (2007).

Point technique : l'utilisation du microscope optique (MO)

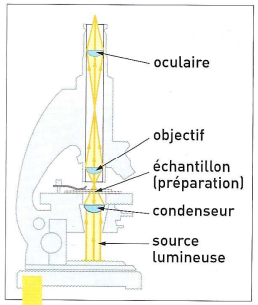
Utiliser un microscope optique

Principe

Afin d'observer des structures de petite taille, on utilise un microscope (étymologiquement : « voir ce qui est petit ») permettant de grossir l'image de l'objet étudié. Pour cela, les microscopes sont équipés de lentilles grossissantes. La qualité d'un microscope est donc liée à la qualité de ses lentilles, mais aussi à son dispositif d'éclairement.

Comme le montre le schéma ci-contre, le faisceau lumineux traverse l'objet à observer. Celui-ci doit donc être le plus fin possible.

L'utilisation de différents colorants permet d'améliorer le contraste et la reconnaissance des structures étudiées.



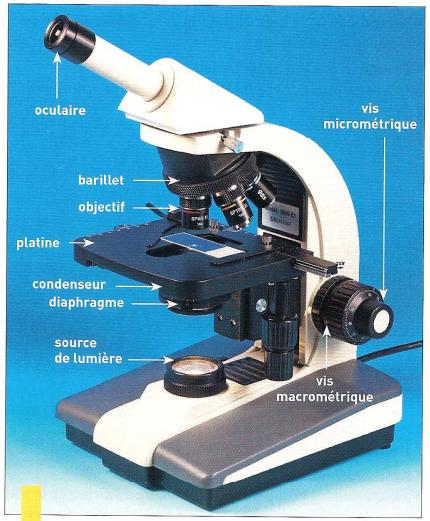
1 Principe de fonctionnement.

Matériel utilisé

Les microscopes optiques ont des capacités de grossissement variables : grossissement = grossissement de l'objectif × grossissement de l'oculaire.

Les plus performants ont un grossissement de l'ordre de 2 500 fois. La dimension du plus petit objet observable (résolution) est alors de 0,1 µm.

En lycée, les microscopes utilisés permettent des grossissements de l'ordre de 400 à 900 fois.



2 Un microscope optique.

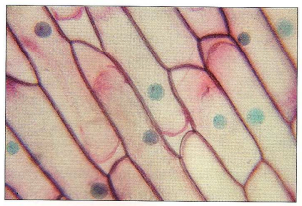
Mise en œuvre

- Disposer correctement le microscope sur la table.
- Le brancher.
- Abaisser la platine au maximum et choisir le plus petit objectif.
- Placer la préparation microscopique sur la platine, lamelle sur le dessus, et centrer l'objet à observer.
- Faire une première mise au point à l'aide de la vis macrométrique.
- Régler l'ouverture du diaphragme et le niveau du condenseur.
- Affiner la mise au point à l'aide de la vis micrométrique.
- Explorer l'ensemble de la préparation pour rechercher une zone pertinente.
- Pour changer d'objectif, tourner le barillet ; la mise au point s'ajuste à l'aide de la vis micrométrique.

Un exemple de résultat

L'objet observé doit être net, correctement éclairé et placé au centre du champ.

Le grossissement utilisé doit être adapté à l'objet que vous observez.



RÉSOUDRE DES PROBLÈMES

Tout est noir :
- vérifier que la lumière est allumée ;
- vérifier que le diaphragme est ouvert ;
- vérifier que le barillet est tourné correctement ;
- vérifier que les objectifs ne sont pas encrassés (attention, le nettoyage doit se faire avec des produits spéciaux).

L'objet observé est flou :
- vérifier que la lamelle est placée sur le dessus ;
- recommencer la mise au point en partant du plus petit objectif.

D'après le manuel de SVT de Première S (Nathan, 2007)

Précisions

Variabilité du nombre d'oculaires

➢ Le **microscope optique** peut être **mono-**, **bino-** ou **trinoculaire** (quand il s'agit d'y ajouter un dispositif d'acquisition, appareil photo ou caméra par exemple).

➢ ***Dans le cas d'un microscope optique binoculaire***, vous devez ***d'abord faire la mise au point avec l'objectif sans œilleton*** (en fermant l'autre œil), ***puis*** quand l'image est nette, ***faites la mise au point avec l'œilleton*** de l'objectif qui en dispose (en fermant le premier œil) de manière à obtenir la ***même netteté***. On peut ensuite ***observer avec les deux yeux*** sans revenir au réglage de l'œilleton. *Il arrive aussi que les deux oculaires soient munis d'un œilleton.*

Réglage de l'éclairage

➢ Les **microscopes optiques** présentent **trois aspects de réglage de la lumière** :

- La **hauteur du condensateur** qui joue sur la ***quantité de lumière concentrée sur la préparation*** (plus il est haut, plus il y a de lumière).
- Le **degré d'ouverture du diaphragme** qui joue également sur la ***quantité de lumière*** mais aussi sur les ***contrastes***.
- L'**intensité lumineuse** de l'ampoule émettrice qui joue évidemment sur la ***quantité de lumière émise***.

Pensez absolument à jouer sur les trois tableaux, au quotidien comme au concours !

Vis macrométrique et vis micrométrique

➢ ***La vis macrométrique n'est utilisée pour le premier grossissement***. Tous les **autres réglages** se font à l'aide de la **vis micrométrique**.

➢ *Si le réglage est impossible, il faut* ***revenir au premier grossissement***.

➢ **Attention 1** : *si la vis micrométrique* ***tourne dans le vide****, revenez au gros grossissement et regardez la platine : la préparation est probablement* ***à l'envers*** *!*

➢ **Attention 2** : *les observations aux* ***forts grossissements*** *nécessitent d'être réalisées* ***la main sur la vis micrométrique*** *en faisant de* ***petits aller-et-vient*** *de manière à observer la préparation dans toute son* ***épaisseur****.*

Utilisation d'huile à immersion à l'objectif 100×

➢ L'utilisation du microscope à cet objectif nécessite d'***ajouter une goutte d'huile*** sur la préparation ***lors du passage de l'avant-dernier au dernier grossissement***. On veillera à ***nettoyer*** à l'alcool très soigneusement les objectifs et la préparation… ainsi que ses mains.

2. Le microscope optique à fluorescence

- Le **microscope à fluorescence** émet un ou plusieurs **rayonnements lumineux** dans des **longueurs d'ondes précises** qui ont la capacité d'exciter un **fluorochrome** qui ***émet alors une fluorescence après excitation***, ce qui permet le **repérage des molécules** ainsi mises en évidence.
- Il existe de multiples techniques pour **fixer le fluorochrome**. Une des plus communes est l'**immunocytochimie** qui aboutit à une observation dite par **immunofluorescence**. Il s'agit de soumettre la préparation à un ***anticorps anti-molécule d'intérêt*** (**anticorps primaire**). Celui-ci est parfois directement couplé au fluorochrome mais on utilise souvent un ***anticorps anti-fonction constante de l'anticorps primaire*** (**anticorps secondaire**) ***couplé au fluorochrome*** (figures 3-4).

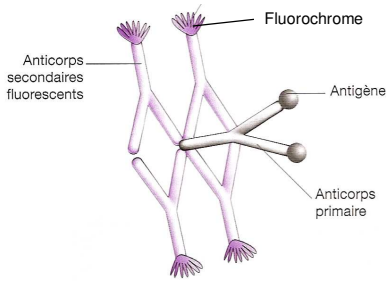


FIGURE 3. Principe de l'immunofluorescence. D'après BREUIL (2007).

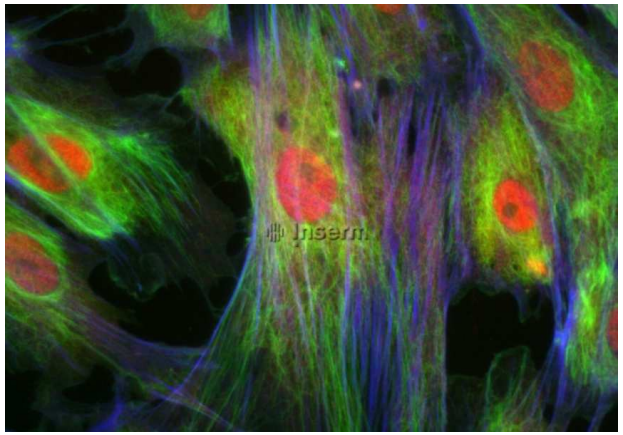


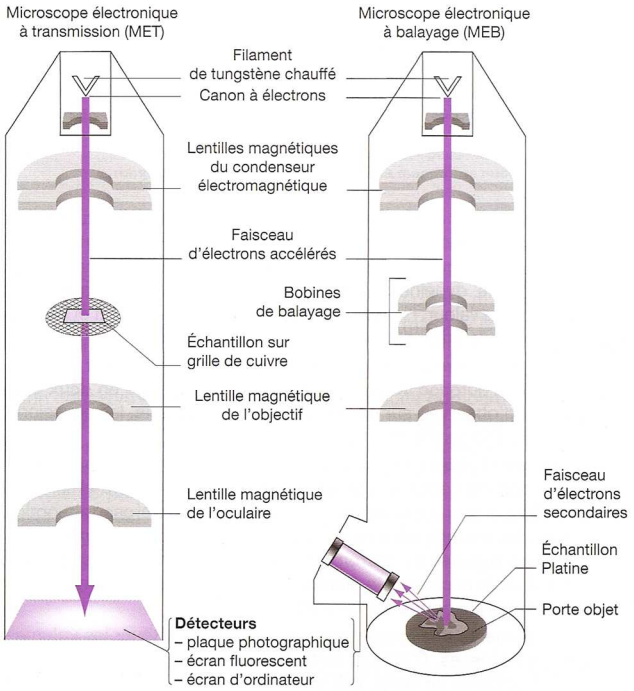
FIGURE 4. Fibroblastes en immunofluorescence.
Actine en bleu, microtubules en vert et protéines nucléaires en rouge. Inserm (septembre 2015).
http://www.serimedis.inserm.fr/fr/asset/fullTextSearch/searchedValue/Fibroblastes/page/1

3. Le microscope électronique

- La **microscopie électronique** permet d'observer des ***structures plus petites que la microscopie optique*** (voir 5). Elle repose sur la ***traversée de l'échantillon par un faisceau d'électrons*** (**microscope électronique à transmission** ou **MET**) ou la ***réflexion d'un faisceau d'électrons par l'échantillon*** (**microscope électronique à balayage** ou **MEB**), le tout terminant sur un **dispositif photographique** ou un **écran** (figure 5).
- Les clichés (**électronographies**) au **MET** sont en ***deux dimensions*** (*même si des techniques d'ombrage peuvent parfois donner une impression de 3D*) et les clichés au **MEB** sont en ***trois dimensions***. Dans tous les cas, les électronographies sont en ***noir et blanc***, sauf coloriage artificiellement ajouté.

4. Le microscope optique confoncal

- Un **microscope confocal** est un ***microscope qui fonctionne avec une arrivée de fins rais de lumière, prenant des images à différents niveaux de l'échantillon, ce qui permet (en combinant ces images) de produire des images en 3D***.
- *Aujourd'hui,* ***la plupart des microscopes à fluorescence*** *sont confocaux.*



Comparaison du principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission (MET) et du microscope électronique à balayage (MEB)

FIGURE 5. Microscopie électronique. D'après BREUIL (2007).

5. Comparaison des résolutions

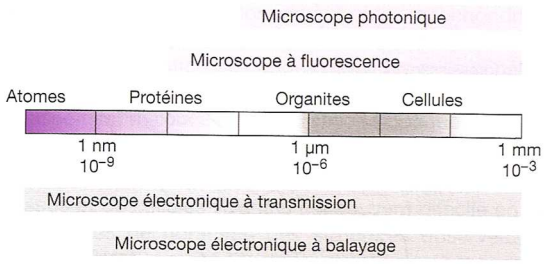


FIGURE 6. Résolution des techniques microscopiques. D'après BREUIL (2007).

- La résolution des **microscopes optiques** ***va rarement au-dessous de 0,1 µm*** (1 µm étant déjà une belle résolution).
- La résolution des **microscopes électroniques** ***va jusqu'à 1 nm***, voire jusqu'à l'échelle des **atomes** (0,1 nm) pour le **MET**.

C. Séparation des constituants cellulaires : ultracentrifugation

- L'étude des **constituants cellulaires** nécessite :
  - Le **broyage cellulaire**, réalisé **mécaniquement** ou par **sonication** (utilisation d'ultrasons) ;
  - L'**ultracentrifugation** (***centrifugation à très haute vitesse***, plus de 15000 tours/min) du mélange ;
  - La **sédimentation** des éléments recherchés ; la **vitesse de sédimentation** s'exprime en Svedberg (S) (1 S = 10^{-13} s). On peut ***soit appliquer des vitesses de rotation différentes pour récupérer successivement les éléments d'intérêt dans le culot*** (**centrifugation différentielle**) (figure 7), ***soit appliquer une seule vitesse de sédimentation et récupérer à différentes hauteurs les éléments d'intérêt*** (**centrifugation par gradients de densité**) (figure 8).

Pour information, les **ARNr 18S, 16S, 28S, 5S**… *etc.* sont différenciés justement par leur **vitesse de sédimentation exprimée en svedbergs** d'où leur nom.

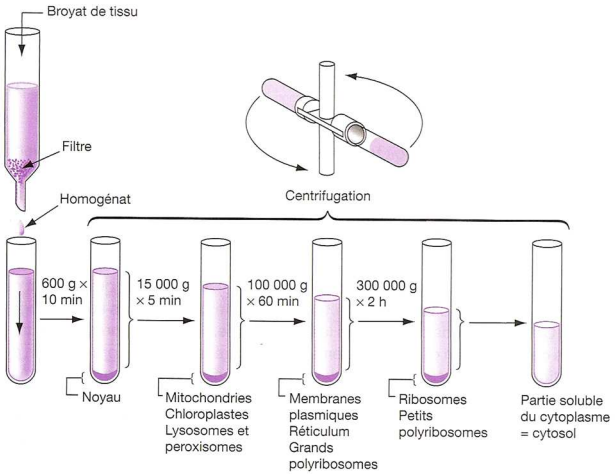


FIGURE 7. Centrifugation différentielle. D'après BREUIL (2007).

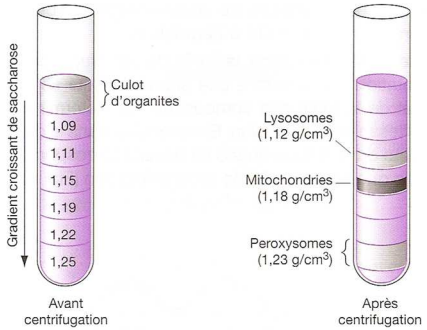


FIGURE 8. Centrifugation par gradient de densité. D'après BREUIL (2007).

D. Suivis de molécules dans la cellule

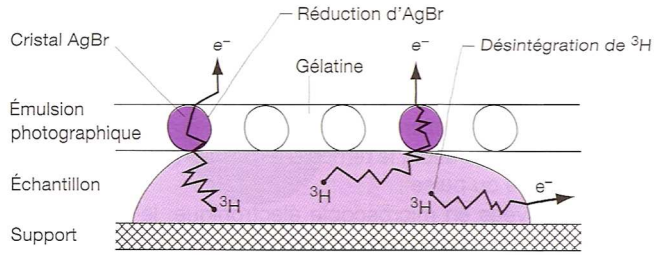
1. Marquage par isotopes radioactifs et autoradiographie

- L'utilisation d'**isotopes radioactifs** permet de ***localiser des substances dans la cellule***. On utilise par exemple des molécules avec du carbone 14 ^{14}C, du phosphore 12 ^{12}P ou encore du tritium ^{3}H (hydrogène 3)…

Souvent, ***on soumet brièvement un support biologique à des éléments radioactifs*** (**pulse**) puis ***on suit le déplacement et le devenir de ces éléments au cours du temps*** (**chase**) ; c'est la technique du **pulse-chase**.

- Les molécules sont ensuite ***révélées sur des clichés (électronographies)*** par **autoradiographie** : ***au sein d'une émulsion photographique placée sur l'échantillon, le rayonnement produit par les éléments radioactifs imprime le film photographique*** (figure 9).

Voir **chapitre 1**



Principe de l'autoradiographie

Les particules β (e⁻) émises par la désintégration d'un radio isotope n'ont pas toutes la même énergie. Celles produites par le ^{32}P impressionnent un film argentique sur 1 cm alors que celles émises par ^{3}H ne parcourent que 0,5 µm, ce qui permet de localiser la molécule radioactive dans un cercle de ce rayon. Au ME, le cheminement de la particule apparaît sous la forme d'un tortillon.

FIGURE 9. Autoradiographie. D'après BREUIL (2007).

- On peut aussi **séparer les constituants cellulaires** par **centrifugation** et ***doser leur radioactivité***.

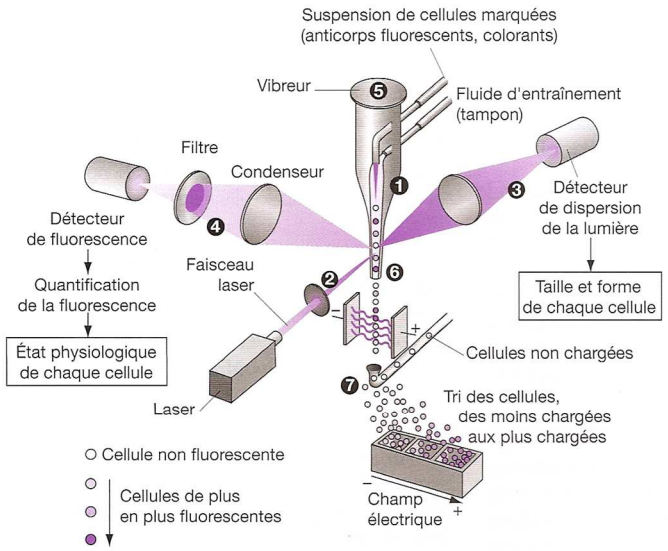
Voir **chapitre 1**

2. Marquage par anticorps fluorescents

Cette technique a déjà été exposée plus haut avec la microscopie à fluorescence.

E. Cytométrie de flux et tri des cellules

- La **cytométrie de flux** est une ***technique permettant de faire défiler en milieu généralement aqueux des éléments (en l'occurrence des cellules) à très haute vitesse devant un faisceau laser, ce qui permet le comptage des cellules ou leur caractérisation***, par exemple en mesurant leur ***degré de fluorescence*** (mais ce peut être leur coloration naturelle). Un cytomètre de flux peut faire défiler ***plusieurs millions de cellules à l'heure***.
- Le **principe de fonctionnement** est résumé à la figure 10.



Technique de la cytométrie de flux

1. *La suspension de cellules colorées différentiellement selon leur état passe dans un fluide d'entraînement.* ***2.*** *Les cellules disposées les unes à la suite des autres passent devant un faisceau laser.* ***3.*** *La lumière dispersée par chaque cellule est analysée ce qui permet de déterminer sa taille et sa forme.* ***4.*** *En même temps, la fluorescence de chaque cellule est mesurée par un détecteur qui la quantifie par rapport à son intensité de coloration.* ***5.*** *Le vibreur brise la colonne de liquide et génère des gouttelettes qui ne contiennent en général qu'une cellule.* ***6.*** *En passant entre deux plaques polarisées, chaque cellule (gouttelette) reçoit une charge électrique proportionnelle à l'intensité de la fluorescence.* ***7.*** *Les cellules (gouttelettes) non chargées sont aspirées, les cellules (gouttelettes) chargées passent au travers d'un champ électrique qui les trient en fonction de leurs charges et donc de l'intensité du colorant qu'elles ont fixé. Un cytomètre de flux sépare plusieurs millions de cellules à l'heure.*

FIGURE 10. Cytométrie de flux. D'après BREUIL (2007).

II. Observation de cellules au microscope optique

A. Observation de cellules procaryotes

1. Morphologie des bactéries : coques ou bacilles

- Les ***bactéries dont les cellules sont rondes*** sont nommées **coques** et ***celles en bâtonnets*** sont nommées **bacilles**.

Il existe un vocabulaire plus spécialisé qui permet de proposer des nuances descriptives plus précises.

2. Étude de Bactéries lactiques

- Les **Bactéries lactiques** sont des **Eubactéries** (surtout **Protéobactéries**) capables d'assurer la *fermentation* du lait et à l'origine des yaourts. On y trouve principalement des **Lactobacilles** (*Lactobacillus* sp.) et des **Streptocoques** (*Streptococcus* sp.).
- La **coloration de GRAM** (point technique) permet de mettre en évidence le type de paroi possédé par les bactéries (figure 11) :
  - Les **bactéries Gram+**, colorées en **violet**, présentent une ***paroi épaisse (20 à 80 nm d'épaisseur)*** essentiellement composée de **peptidoglycanes**.
  - Les **bactéries Gram–**, colorées en **rose**, sont délimitées par ***deux membranes (interne et externe)*** encadrant une ***mince paroi de peptidoglycanes (1-3 nm)***.

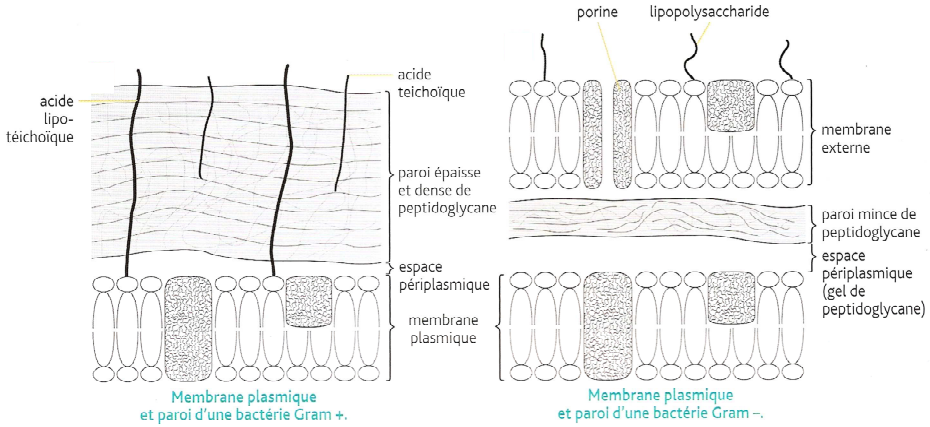


FIGURE 11. Bactéries GRAM + et –. D'après BOUTIN *et al.* (2015).

Point technique : coloration de GRAM (après fixation à l'alcool)

➢ **Couvrez** la préparation de *violet de gentiane* pendant 1 minute. **Rejetez**-le et **rincez** à l'eau distillée. [Fonction : colore le **cytoplasme** de toute les Bactéries – *et non les peptidoglycanes comme cela a longtemps été affirmé*]

➢ **Couvrez** le frottis de *lugol* pendant 1 minute et **rincez** à l'eau distillée. [Fonction : **fixateur** du violet de gentiane]

➢ **Versez** de l'*éthanol* pendant quelques secondes et **rincez** à l'eau distillée. [Fonction : **décoloration** des **bactéries Gram –** où la **paroi mince** laisse **passer l'alcool** dans le cytoplasme, alors que celle des bactéries **Gram +** ne laisse pas ou peu passer l'alcool, conservant la **coloration violette**]

➢ **Couvrez** le frottis de *fuschine* pendant 30 secondes et **rincez** à l'eau distillée. [Fonction : colore les Bactéries en rose – couleur qui sera **visible seulement sur les Gram –** car les **Gram +** gardent la **coloration violette** qui masque la rose]
➢ **Séchez** la préparation avec du papier filtre.
➢ **Observez** au microscope optique *à l'immersion*.

On veillera à bien nettoyer les objectifs et la lame (avec de l'alcool) après usage

Activité 1. Réalisation d'une coloration de GRAM sur un frottis de yaourt (MO)

Comment un frottis de yaourt peut-il illustrer la diversité bactérienne ?

Connaissances à construire	Diversité bactérienne

	Capacité ou attitude visée	**Évaluation**
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope ➢ Coloration	
	Observer/analyser + interpréter	

1. **Préparez** une suspension de yaourt (si elle n'est déjà faite) : avec une anse stérile ou un agitateur, **prélevez** un échantillon de yaourt puis **mélangez**-le avec de l'eau physiologique dans un tube à essai.
2. **Réalisez** un frottis : **Prélevez** à l'anse ou à l'agitateur quelques gouttes de la suspension du yaourt et **étalez**-la sur une lame en pratiquant des cercles concentriques.

On **sèche alors le frottis** au-dessus d'une **plaque chauffante**, puis on le **fixe à l'alcool (1min)**, avant de le **refaire sécher jusqu'à évaporation de l'alcool**.

3. **Réalisez** la *coloration de Gram* de l'échantillon (voir point technique).
4. **Observez** *à l'immersion* en respectant bien les consignes d'usage. **Décrivez** les bactéries présentes (forme, test de Gram).
5. **Complétez** (légende + titre) le cliché ci-dessous (figure 12).

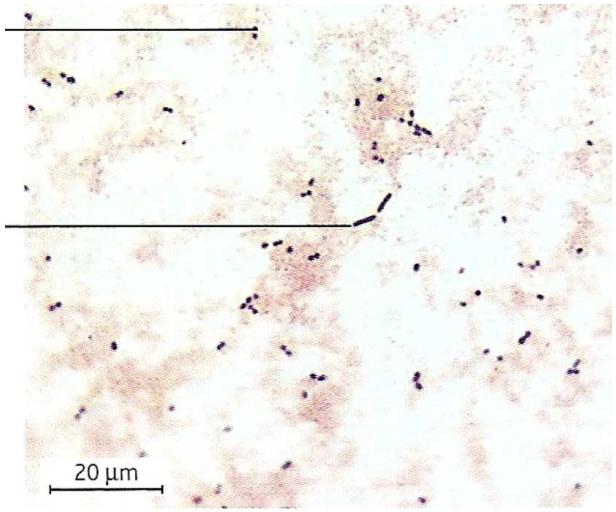


FIGURE 12. D'après BOUTIN *et al.* (2015).

3. Étude d'*Escherichia coli*

- Le **Colibacille *E. coli*** est une **Protéobactérie intestinale des Mammifères** dont **certaines souches** peuvent être **pathogènes**.

Activité 2. Typologie Gram et forme d'*E. coli* (MO)

Comment la coloration et l'observation d'E. coli nous renseignent-elles sur sa forme et sa constitution pariétale ?

Connaissances à construire	Forme et type de paroi d'*Escherichia coli*

	Capacité ou attitude visée	**Évaluation**
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope ➢ Coloration	
	Observer/analyser + interpréter	

1. **Observez** *à l'immersion* les préparations du commerce en respectant bien les consignes d'usage.

En cas de manque de lames, l'observation peut être à disposition sur la paillasse enseignant.

2. En vous aidant de votre observation, **répondez** à ces questions :
   - Quelle est la forme d'*E. coli* ?
   - Quel type de paroi présente-t-elle ?

4. Étude de Cyanobactéries

- Les **Cyanobactéries** sont des ***Eubactéries Protéobactéries capables de photosynthèse oxygénique***. Elles peuvent vivre en **colonies** au sein d'un **mucilage** commun. Chez certaines souches (*Nostoc*, *Anabaena*…), on note deux types cellulaires : des ***cellules photosynthétiques alignées en file*** (**cellules végétatives**) contrastent avec de plus rares **hétérocystes**, ***cellules spécialisées capables de fixer le diazote atmosphérique***. *Leur paroi plus épaisse limite l'entrée de dioxygène qui peut altérer la nitrogénase (enzyme fixatrice du diazote).*

Activité 3. Observation de Cyanobactéries au MO

Comment s'organise une colonie de Cyanobactéries ?

Connaissances à construire	Diversité bactérienne

	Capacité ou attitude visée	**Évaluation**
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope ➢ Coloration	
	Observer/analyser + interpréter	

1. **Préparez** sur une lame microscopique une petite suspension de Cyanobactéries en écrasant un petit morceau de colonie entre lame et lamelle.
2. **Observez** *si besoin à l'immersion* en respectant les consignes d'usage.
3. **Légendez** le cliché ci-dessous (figure 13). **Proposez** une échelle.

FIGURE 13. Cyanobactéries *Nostoc* sp. (MO).
Cliché R. CALENTINE (http://www.allposters.fr) (septembre 2015)

B. Observation de cellules eucaryotes

1. Une cellule animale : la cellule acineuse du pancréas de Mammifères

- Le **pancréas** est une **glande amphicrine** (à la fois **endrocrine** et **exocrine**). Sa **fonction endocrine** est assurée par des ***cellules en amas*** nommées **îlots de LANGERHANS** (1 % des cellules sécrétrices) et sa **fonction exocrine** est assurée par des ***cellules organisées en acini***.

Activité 4. Observation d'une coupe de pancréas

Comment l'étude microscopique de coupes de pancréas nous renseigne-t-elle sur l'organisation du tissu acineux ?

Connaissances à construire	Organisation histologique d'un tissu sécréteur Différenciation des types cellulaires du pancréas

	Capacité ou attitude visée	**Évaluation**
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope	
	Observer/analyser + interpréter	

1. **Réalisez** l'observation microscopique, au grossissement approprié, du tissu pancréatique.
2. **Proposez** un schéma d'interprétation où figureront au moins les éléments suivants : *noyau de cellule acineuse, îlot de LANGERHANS, lame basale, acinus, capillaire sanguin*.
3. **Légendez** de la même façon le cliché proposé (figure 14). **Proposez** une échelle.
4. Quels arguments permettent d'inférer la **nature épithéliale** et la **fonction sécrétrice** des cellules acineuses pancréatiques ?

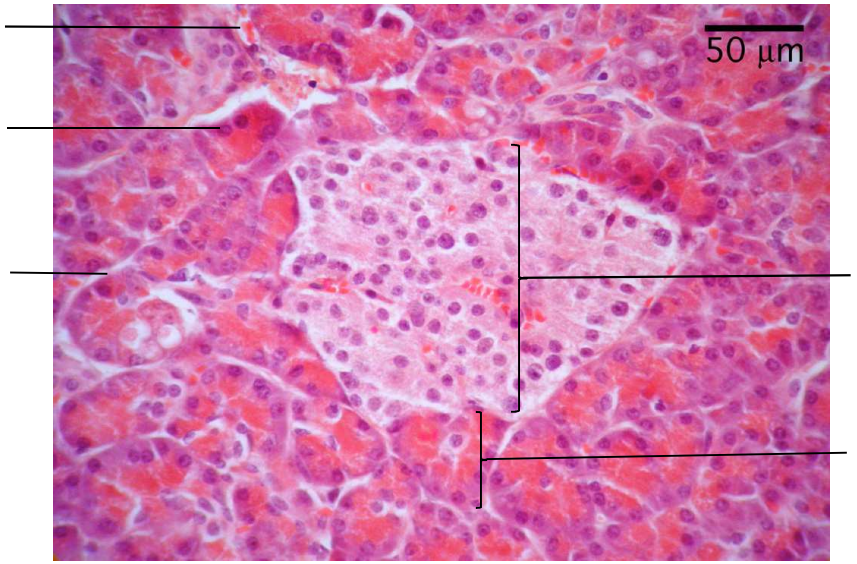


FIGURE 14. Lame de pancréas (MO). http://histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?album=18&pid=4324
(septembre 2015)

2. Des cellules végétales

- Les **cellules végétales** peuvent être de deux types : **autotrophes chlorophylliennes** ou **hétérotrophes**. Elles possèdent toutes une **vacuole** et une **paroi** mais les cellules chlorophylliennes possèdent en outre des **chloroplastes**.

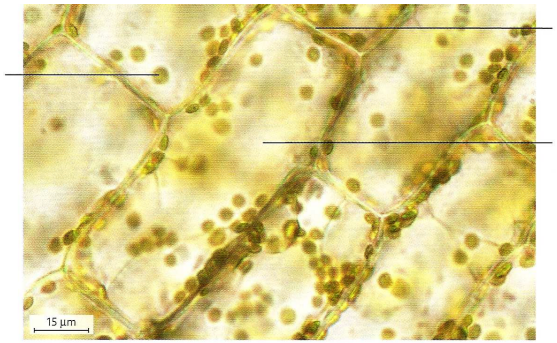
Activité 5. Observation d'une feuille d'Élodée du Canada

Comment l'étude microscopique d'une feuille d'Élodée nous montre-t-elle des particularités des cellules végétales ?

Connaissances à construire	Particularités de la cellule végétale

	Capacité ou attitude visée	**Évaluation**
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope ➢ Préparation microscopique	
	Observer/analyser + interpréter	

1. L'Élodée ne présente que deux couches de cellules. **Réalisez** un montage de morceau de feuille et son observation microscopique.
2. **Légendez** le cliché proposé (figure 15).



Cellules d'élodée du Canada (MO × 600).

FIGURE 15. Cellules d'Élodée (MO). D'après BOUTIN *et al.* (2015)

Activité 6. Observation d'épiderme d'Oignon rouge au MO

Comment l'étude microscopique d'Oignon rouge montre-t-elle la vacuole et ses capacités de plasmolyse et de turgescence ?

Connaissances à construire	Particularités de la cellule végétale Plasmolyse, turgescence

	Capacité ou attitude visée	Évaluation
Capacités sollicitées	Maîtriser un outil, un geste technique, un logiciel ➢ Microscope ➢ Préparation microscopique	
	Observer/analyser + interpréter	

1. L'Oignon rouge présente une vacuole colorée, facile à repérer. **Réalisez** un montage d'épiderme d'écaille d'Oignon rouge en le montant dans l'eau distillée puis dans l'eau salée ou sucrée (40 g/L).
2. *On admet que les échanges d'eau entre compartiments cellulaires (osmose) s'effectuent de l'endroit où les solutés sont les moins concentrés vers l'endroit où les solutés sont les plus concentrés.* Qu'observez-vous et comment l'expliquez-vous ?
3. **Légendez** la figure proposée (figure 16). **Rajoutez** le sens de déplacement de l'eau.

Cellules d'épiderme interne de tunique d'oignon blanc turgescentes (MO × 600).

Cellules d'épiderme interne de tunique d'oignon rouge plasmolysées (MO × 400).

FIGURE 16. Vacuoles et paroi (MO). D'après BOUTIN *et al.* (2015)

Activité 7. Observation d'une coupe transversale de feuille au MO

Comment s'organise une feuille d'Eudicotylédone ?

Connaissances à construire	Localisation de la cellule foliaire du parenchyme palissadique Organisation de la feuille d'Eudicotylédone

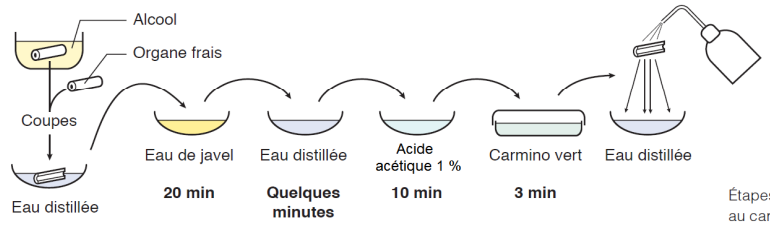
	Capacité ou attitude visée	Évaluation
Capacité sollicitée	Mobiliser ses connaissances	

Point technique : coloration au carmino-vert

D'après SEGARRA et al. (2015)

Coloration au carmino-vert de Mirande

La double coloration (carmin aluné, vert d'iode) est spécifique des parois. Le contenu cellulaire est éliminé par traitement à l'eau de Javel. Le rinçage suivant est indispensable, l'eau de Javel altérant la coloration. L'eau acétique est un mordant qui prépare l'action des colorants.



Étapes de la coloration au carmino-vert

Si les deux colorants ne sont pas mélangés au préalable, on réalise un bain de 15 minutes dans le carmin aluné, suivi de 10 secondes dans le vert d'iode sans rinçage intermédiaire.

1. **Réalisez** des coupes transversales, à l'aide de moelle de sureau, de limbe de feuille de Lierre (on peut aussi s'entraîner sur le pétiole).
2. **Observez** des coupes fraîches montées entre lame et lamelle dans l'eau.
3. **Observez** des coupes colorées au carmino-vert (point technique page 9) entre lame et lamelle dans l'eau.
4. **Légendez** la figure 17 à partir des connaissances vues en cours. **Proposez** une échelle.

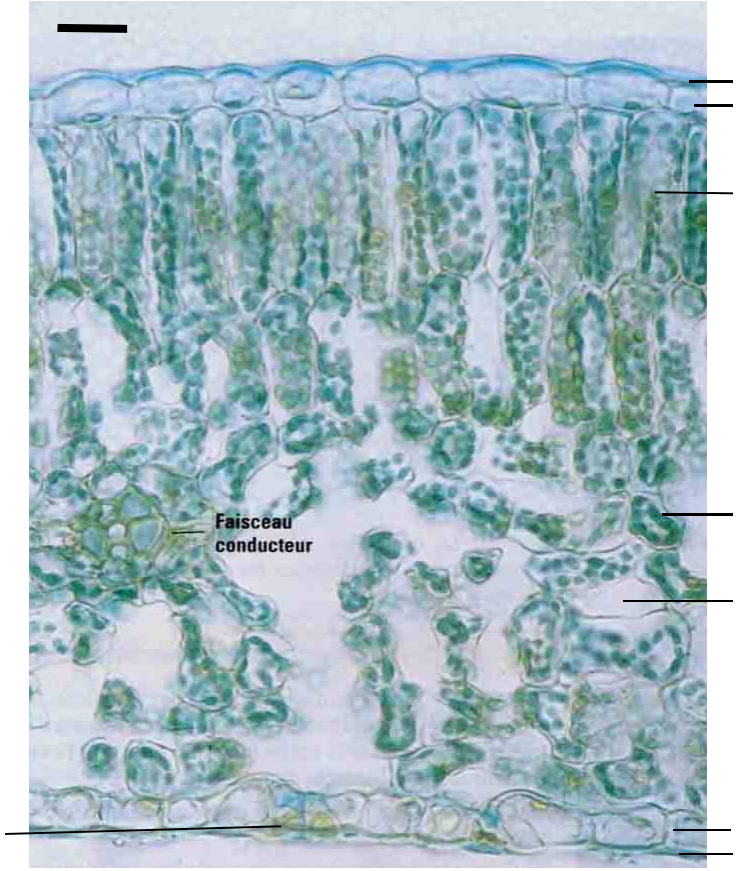


FIGURE 17. Coupe transversale d'Épine-vinette *Berberis vulgaris* (Eudicotylédone) (MO).
http://lycee.nicolas-cohen.org/index.php/ressources/images-et-photos (septembre 2015)

III. Ultrastructures cellulaires au microscope électronique

- Cette partie porte sur l'étude d'**ultrastructures cellulaires** à partir d'**électronographies**. L'activité 8 porte sur l'ensemble de la partie III.

Activité 8. Études ultrastructurales de cellules

Comment s'organisent les cellules au programme ?

Connaissances à construire	Organisation, ultrastructure et compartiments des cellules au programme : *Escherichia coli*, Cyanobactéries, cellule acineuse pancréatique de Mammifères, cellule parenchymateuse palissadique d'Angiospermes

Capacités sollicitées	**Capacité ou attitude visée**	**Évaluation**
	Mobiliser ses connaissances	
	Observer/analyser + interpréter	

À partir de vos connaissances, **réalisez** la *diagnose* et la *légende* des clichés soumis à votre étude dans la partie III de ce TP (figures 18-22).
Si vous avez le temps, vous pouvez aussi **réaliser** des *schémas d'interprétation*.

A. Étude de cellules procaryotes

1. Ultrastructure d'*Escherichia coli*

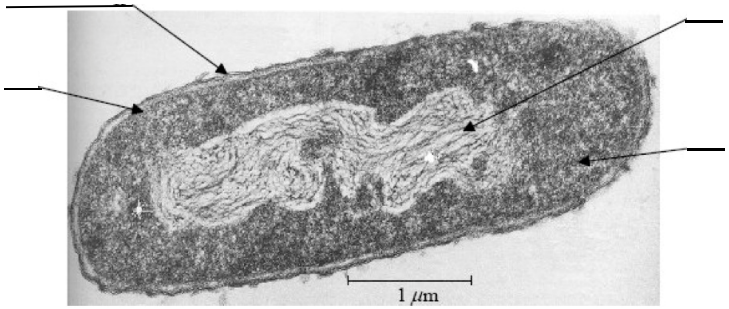


FIGURE 18. *Escherichia coli* (MET).
http://tblsbio.blogspot.fr/2009/09/prokaryotes-are-everywhere.html (septembre 2015)

2. Ultrastructure de Cyanobactéries

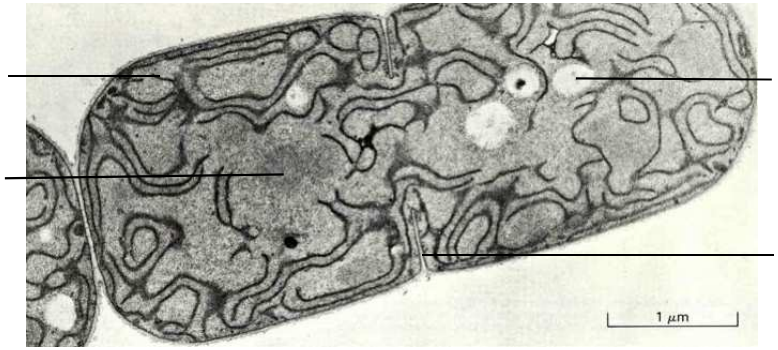


FIGURE 19. *Anabaena* sp. en division (MET).
http://chryslersebringconvertible.com/Index.php?u=cyanobacteria-definition-wikipedia (septembre 2015)

B. Étude de cellules eucaryotes

1. Ultrastructure de la cellule acineuse pancréatique (Mammifères)

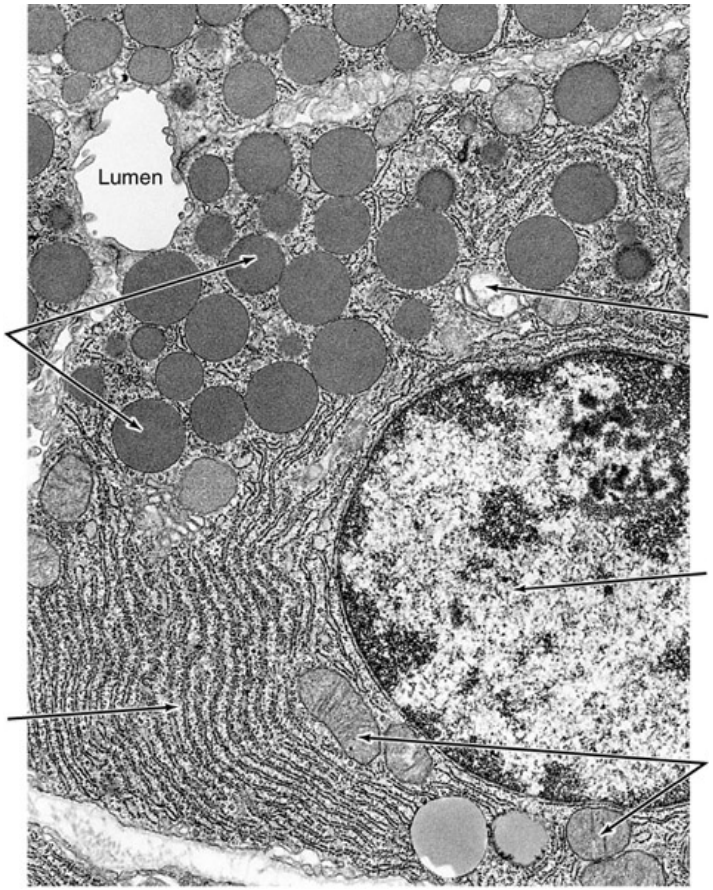


FIGURE 20. Cellule acineuse pancréatique de Mammifères (MET).
Source à préciser (septembre 2015)

2. Ultrastructure de la cellule foliaire parenchymateuse (Angiospermes)

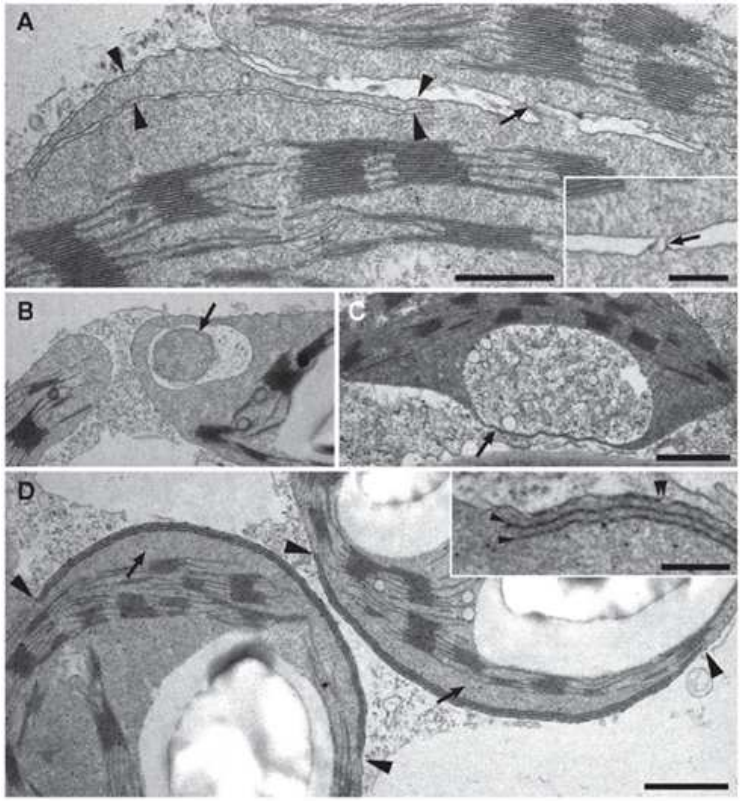
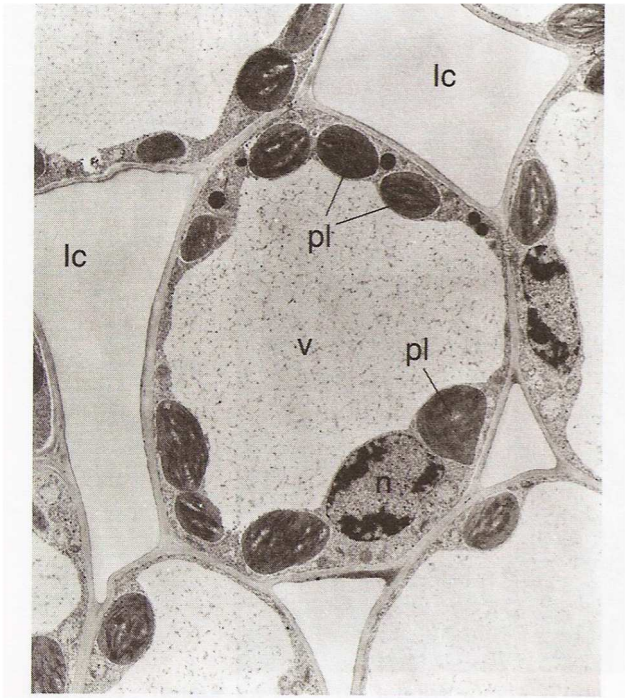


FIGURE 21. Cellule du parenchyme foliaire palissadique d'Angiospermes Eudicotylédones (MET).
Source à préciser (septembre 2015)



Parenchyme lacuneux.
Tige de Bryone. Cellules chlorophylliennes corticales.
Coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine, vue en microscopie photonique (Gr. x 400).

FIGURE 22. Cellule du parenchyme foliaire lacuneux d'Angiosperme Eudicotylédone (MET).
D'après ROBERT & ROLAND (1998)

Références

ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER (2004). *Biologie moléculaire de la cellule. Quatrième édition.* Flammarion, Paris. Traduction de la quatrième édition américaine (2002) par F. LE SUEUR-ALMOSNI. Première édition américaine 1983 (1986 1e édition française).

BERTHET, J. (2006). *Dictionnaire de Biologie.* De Boeck Université, Bruxelles (Belgique).

BOUTIN, V., J.-F. FOGELGESANG, J.-F. BEAUX & F. RIBOLA (2010). *Atlas de Biologie végétale BCPST 1re et 2e années.* Dunod, Paris.

BOUTIN, V., L. GERAY, Y. KRAUSS & C. VILBERT (2015). *Atlas de biologie BCPST 1re et 2e années.* Dunod, Paris

BREUIL, M. (2007). *Biologie 1re année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

BREUIL, M. (2009). *Biologie 2e année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

CAMPBELL, N. A. & J. B. REECE (2004). *Biologie.* De Boeck Université, Bruxelles, 2e édition (1e édition 1995).

[CAMPBELL, N. A.], J. B. REECE, L. A. URY, M. L. CAIN, S. A. WASSERAMN, P. V. MINORSKY, R. B. JACKSON (2012). *Campbell Biologie.* Adaptation française J. FAUCHER & R. LACHAÎNE. Pearson, Paris (4e edition).

DENŒUD, J., T. FERROIR, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2011). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2013). *Biologie-Géologie BCPST-véto 1e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

DENŒUD, J., C. GODINOT, O. GUIPPONI, H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON, M.-L. PONS & F. TEJEDOR (2014). *Biologie-Géologie BCPST-véto 2e année.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GODINOT, C., H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2010). *Biologie-Géologie 1re année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GRÉCIAS, P. & J.-P. MIGEON (2003). *Chimie 1re année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GRÉCIAS, P. & J.-P. MIGEON (2004). *Chimie 2de année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

LAFON, C. (2003). *La biologie autrement. 100 questions de synthèse.* Ellipses, Paris.

MORÈRE, J.-L., R. PUJOL (coord.), J.-C. CALLEN, L. CHESNOY, J.-P. DUPONT, A.-M. GIBERT-TANGAPREGASSOM, G. RICOU, N. TOUZET (dir.) et colloborateurs (2003). *Dictionnaire raisonné de Biologie.* Frison-Roche, Paris.

PEYCRU, P. (dir.), J.-F. FOGELGESANG, D. GRANDPERRIN, B. AUGÈRE, J.-C. BAEHR, C. PERRIER, J.-M. DUPIN & C. VAN DER REST (2010*a*). *Biologie tout-en-un BCPST 1re année.* Dunod, Paris, 2e édition (2009), réimpression corrigée (2010) (1e édition 2006).

PEYCRU, P. (dir.), J.-C. BAEHR, F. CARIOU, D. GRANDPERRIN, C. PERRIER, J.-F. FOGELGESANG & J.-M. DUPIN (2010*b*). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 2e édition (1e édition 2007).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER J.-F. FOGELGESANG, & C. VAN DER REST (2013). *Biologie tout-en-un BCPST 1re année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2006).

PEYCRU, P., D. GRANDPERRIN, C. PERRIER (dir.), B. AUGÈRE, J.-F. BEAUX, F. CARIOU, P. CARRÈRE, T. DARRIBÈRE, J.-M. DUPIN, C. ESCUYER, J.-F. FOGELGESANG, S. MAURY, É. QUÉINNEC, E. SALGUEIRO & C. VAN DER REST (2014). *Biologie tout-en-un BCPST 2e année.* Dunod, Paris, 3e édition (1e édition 2007).

RAVEN, P. H., G. B. JOHNSON, J. B. LOSOS, S. S. SINGER (2007). *Biologie.* De Boeck, Bruxelles.

RICHARD, D. (dir.), P. CHEVALET, S. FOURNEL, N. GIRAUD, F. GROS, P. LAURENTI, F. PRADÈRE & T. SOUBAYA (2012). *Biologie. Tout le cours en fiches. Licence. CAPES. Prépas.* Dunod, Paris, 2e édition (1e édition 2010).

SEGARRA, J. (dir.), É. CHAUVET, C. COLSON-PROCH, M. HUILLE, M. LABROUSSE, F. LOUET, F. METZ & E. PIÈTRE (2014). *Biologie BCPST 1re année.* Ellipses, Paris.

SEGARRA, J., E. PIÈTRE (dir.), G. BAILLY, O. CHASSAING, D. FAVRE, T. JEAN, F. METZ & C. MEUNIER (2015). *Biologie BCPST 2e année.* Ellipses, Paris.

VOET, D. & J. G. VOET (2005). *Biochimie.* De Boeck, Bruxelles (B), 2e édition française [3e édition américaine, John Wiley and sons, New York, USA, 2004. Traduction G. ROUSSEAU & L. DOMENJOUD].

Plan du TP

Objectifs : extraits du programme **1**
Introduction **1**

I. Techniques d'observation et d'étude des cellules **1**
A. Préparations microscopiques : lames **1**
1. Principes généraux 1
2. Préparations simples 1
3. Réalisation de coupes par microtome 2
B. Observation directe par microscopie **2**
1. Le microscope optique 2
2. Le microscope optique à fluorescence 3
3. Le microscope électronique 4
4. Le microscope optique confoncal 4
5. Comparaison des résolutions 4
C. Séparation des constituants cellulaires : ultracentrifugation **5**
D. Suivis de molécules dans la cellule **5**
1. Marquage par isotopes radioactifs et autoradiographie 5
2. Marquage par anticorps fluorescents 5
E. Cytométrie de flux et tri des cellules **5**

II. Observation de cellules au microscope optique **6**
A. Observation de cellules procaryotes **6**
1. Morphologie des bactéries : coques ou bacilles 6
2. Étude de Bactéries lactiques 6
3. Étude d'Escherichia coli 7
4. Étude de Cyanobactéries 7
B. Observation de cellules eucaryotes **8**
1. Une cellule animale : la cellule acineuse du pancréas de Mammifères 8
2. Des cellules végétales 8

III. Ultrastructures cellulaires au microscope électronique **10**
A. Étude de cellules procaryotes **10**
1. Ultrastructure d'Escherichia coli 10
2. Ultrastructure de Cyanobactéries 11
B. Étude de cellules eucaryotes **11**
1. Ultrastructure de la cellule acineuse pancréatique (Mammifères) 11
2. Ultrastructure de la cellule foliaire parenchymateuse (Angiospermes) 12

Références **13**
Plan du TP **13**

© Tanguy JEAN. Les textes et les figures originales sont la propriété de l'auteur. Les figures extraites d'autres sources restent évidemment la propriété des auteurs ou éditeurs originaux.

Document produit en septembre 2015 • Dernière actualisation : janvier 2019.

Contact : Tanguy.Jean4@gmail.com

Adresse de téléchargement : http://tanguyjean.businesscatalyst.com/

Ces données sont placées sous licence *Creative Commons Attribution – Pas d'Utilisation commerciale 4.0 CC BY NC* qui autorise la reproduction et la diffusion du document, à condition d'en citer explicitement la source et de ne pas en faire d'utilisation commerciale.