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

Lycée Valentine LABBÉ
41 rue Paul DOUMER – BP 20226
59563 LA MADELEINE CEDEX
CLASSE PRÉPARATOIRE TB
(Technologie & Biologie)

ENSEIGNEMENT DE SCIENCES DE LE VIE ET DE LA TERRE (SVT)
FICHE TECHNIQUE

Techniques d'observation et d'étude des cellules

I. Préparations microscopiques : lames et coloration

A. 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** (de manière naturelle ou artificielle)… 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 à connaître**. *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).

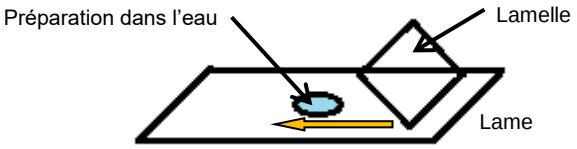
Ce que vous voulez mettre en évidence	Colorants à utiliser	Coloration obtenue
Les cellules de façon non sélective	Bleu de méthylène	Cellule en bleu
	Rouge neutre	Cellule en rouge
Noyau (ADN, ARN) ou chromosomes	Carmin acétique	ADN en rose
	Vert de méthyle acétique en présence de pyronine	ADN en vert 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

B. Préparations simples

- **Certaines préparations** ne nécessitent **pas de coupe** mais supposent un **frottis** ou une simple **mise en suspension** de l'échantillon. La coupe peut aussi être réalisée avec une **lame de rasoir**, même si le résultat artisanal obtenu est souvent décevant (voir les TP de biologie végétale).
- Dans les TP réalisés en classe préparatoire, les **préparations** seront en **milieu aqueux** (point technique). On peut y ajouter un peu de **glycérine** pour limiter l'évaporation (mais un effet « graissant » est alors à déplorer).

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

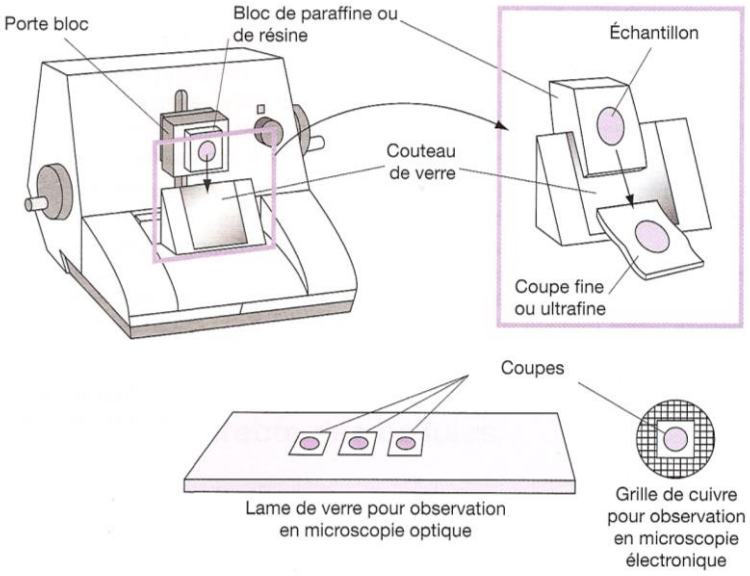
➢ Pour *réaliser un montage entre lame et lamelle en milieu aqueux*, **respectez** le protocole suivant :
- **mettez** une petite goutte d'eau (ce peut être de l'eau glycérinée si l'on veut limiter un peu l'évaporation) sur la lame ;
- **prélevez** l'élément à monter de la façon adéquate (utilisation 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.*

C. Réalisation de coupes par microtome



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 classiquement la **paraffine** mais il existe des matériaux composites plus modernes.
- 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** quand elles sont destinées à être **conservées**.

*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**.*

*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**.*

II. 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***.

A. Le microscope optique (MO) (= microscope photonique MP)

- 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** par des **lentilles** 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 et vocabulaire associé : voir point technique page 3 + figure 2.

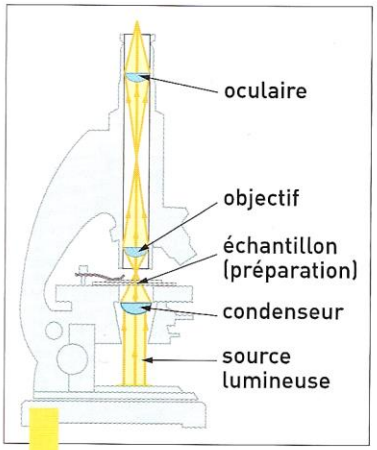
Utiliser un microscope optique

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.



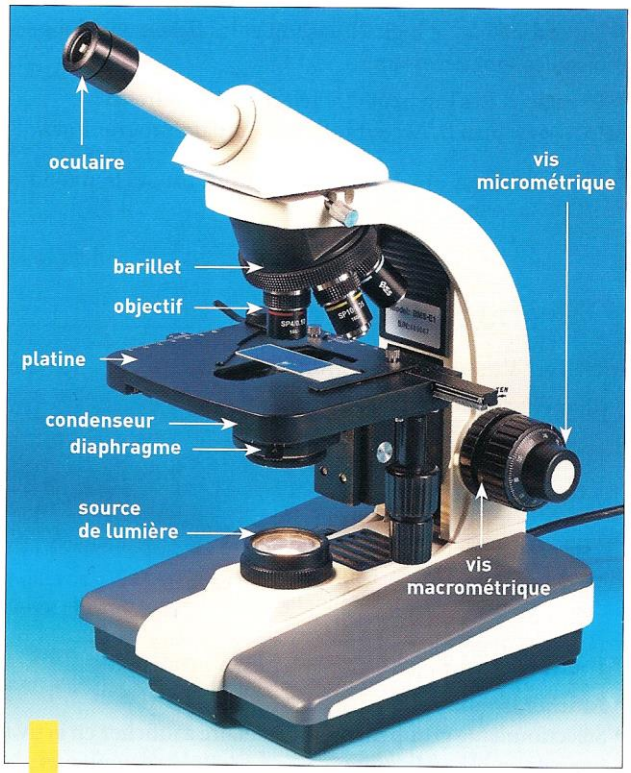
1 Principe de fonctionnement.

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.

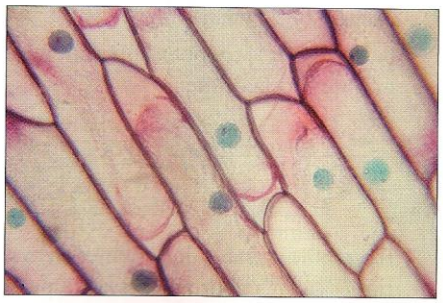
Mise en œuvre

- 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 (ou condenseur)** 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 que pour le premier grossissement*. Tous les **autres réglages** se font à l'aide de la **vis micrométrique**.

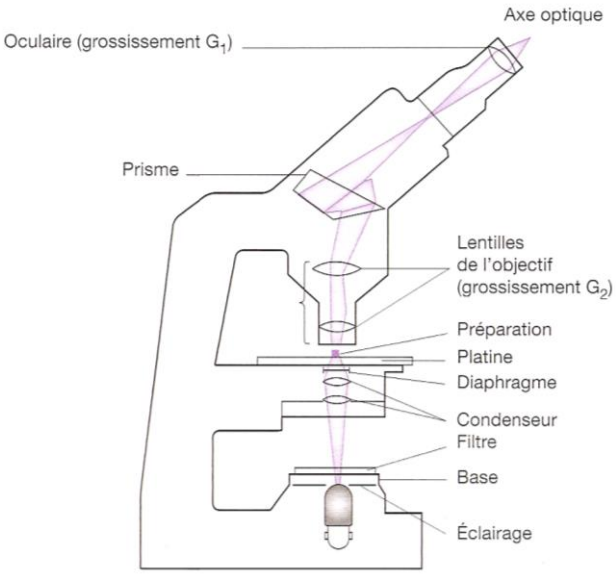
➢ *Si le réglage est impossible, il faut revenir au premier grossissement*.

➢ 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.



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).

B. Le microscope optique à fluorescence et à immunofluorescence

- Le **microscope à fluorescence** émet un ou plusieurs **rayonnements lumineux** dans des **longueurs d'ondes précises** qui ont la capacité d'exciter un **fluorochrome** ; celui-ci ***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).

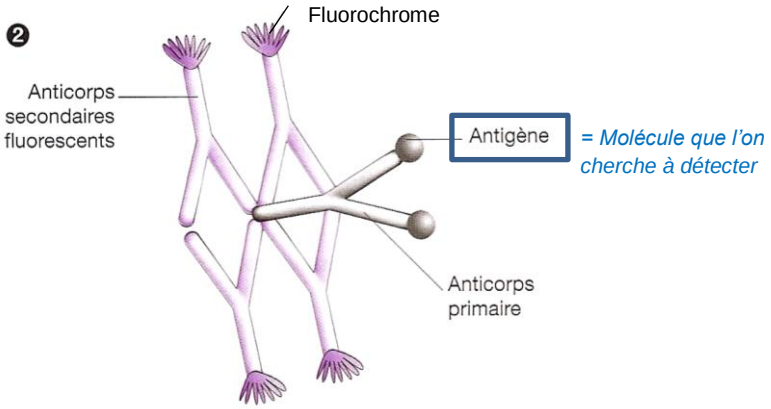


FIGURE 3. Principe de l'immunofluorescence. D'après BREUIL (2007).

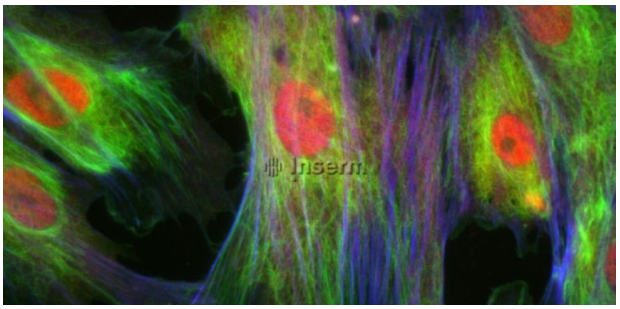
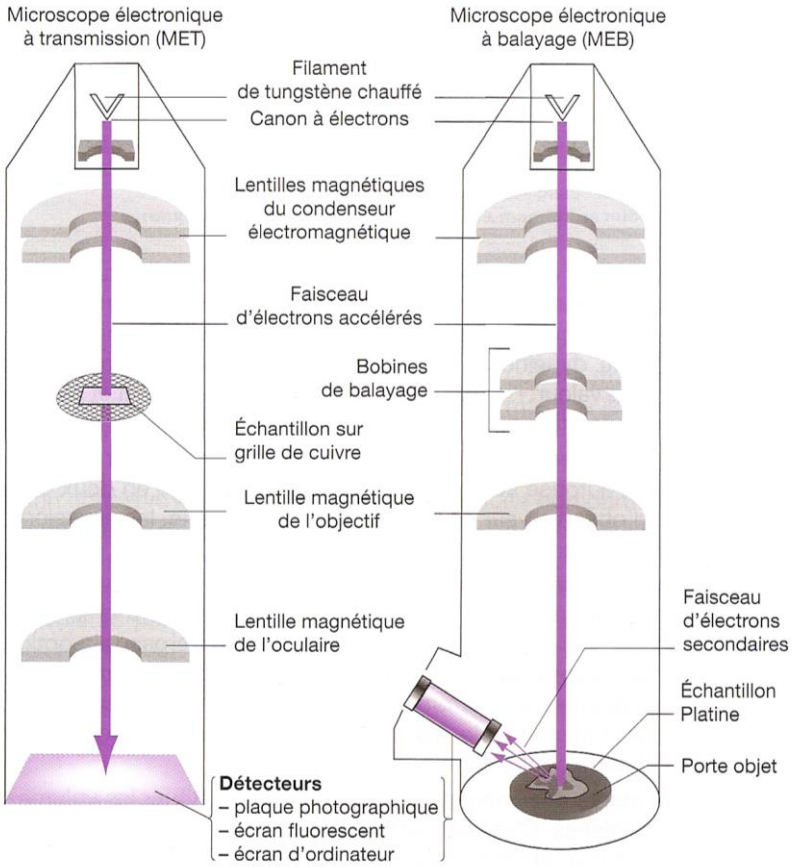


FIGURE 4. Fibroblastes en immunofluorescence.
Actine en bleu, **microtubules** en vert et **protéines nucléaires** en rouge. INSERM (septembre 2015).
http://www.serimedis.inserm.fr/fr/asset/fullTextSearch/searchedValue/Fibroblastes/page/1

C. Le microscope électronique



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).

- 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.

D. 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.*

E. Comparaison des résolutions

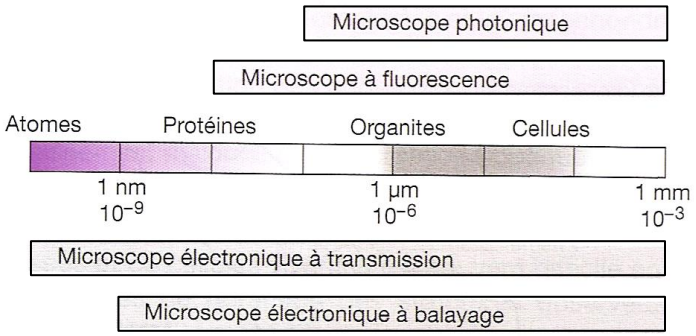


FIGURE 6. Résolution des techniques microscopiques. D'après BREUIL (2007).

- 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**.

III. 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.

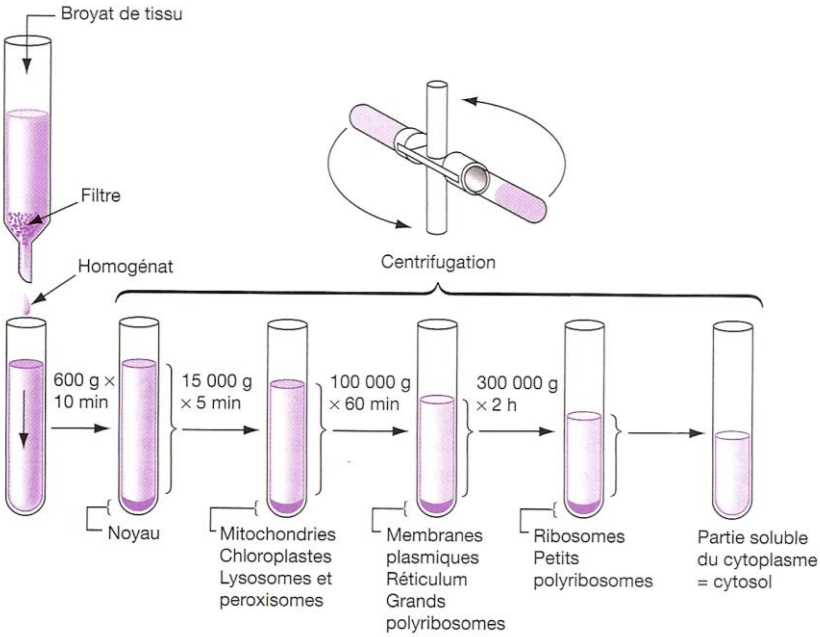


FIGURE 7. Centrifugation différentielle. D'après BREUIL (2007).

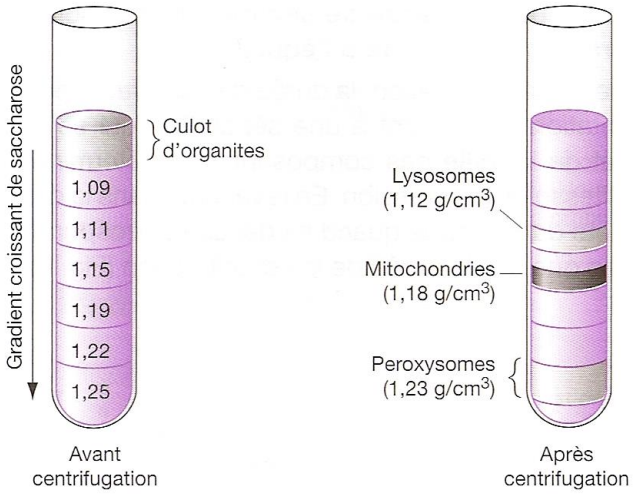


FIGURE 8. Centrifugation par gradient de densité. D'après BREUIL (2007).

IV. Suivis de molécules dans la cellule

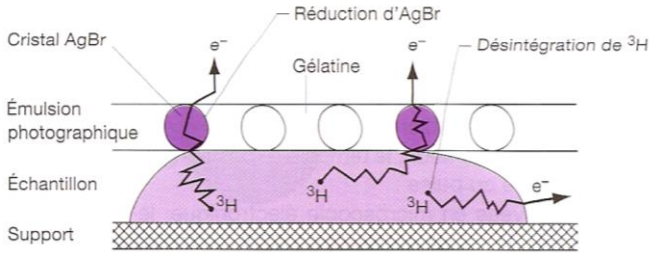
A. Marquage par isotopes radioactifs et autoradiographie

- L'utilisation d'**isotopes radioactifs** permet de ***localiser des substances dans la cellule***. On utilise par exemple des molécules contenant 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 (expérience de PALLADE)**



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 (expériences de PALLADE)**

B. Marquage par anticorps fluorescents

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

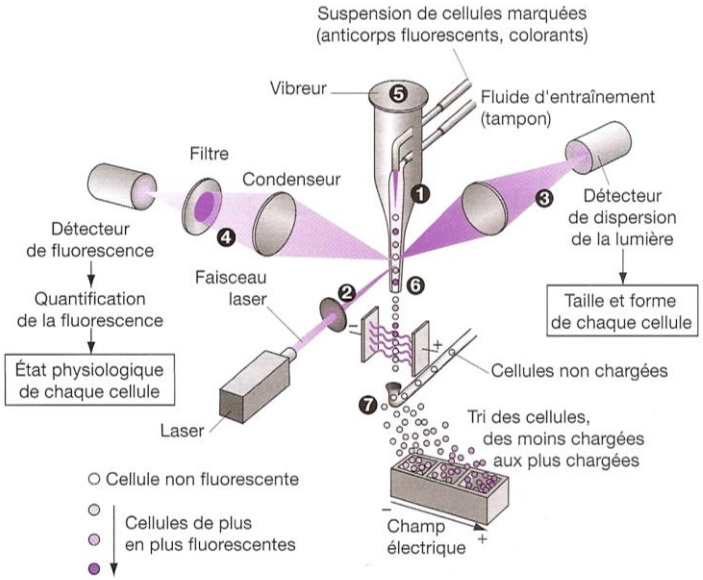
V. Tri et comptage des cellules

A. Comptage au microscope optique

- On peut compter humainement un nombre de **cellules** en suspension grâce au **microscope optique**, en effectuant des dépôts de solution sur des ***lames avec un carroyage dessiné dans le verre*** (lames de MALASSEZ, THOMA…). On pourra alors **extrapoler le comptage** au **volume cellulaire initial**.
- Beaucoup de ces lames carroyées sont appelées **hématimètres** car elles servaient historiquement au **dénombrement des cellules sanguines**.

B. Comptage et tri automatisés : la cytométrie de flux

- 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 aussi 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).

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.

ROBERT, D. & J.-C. ROLAND (1998). *Biologie végétale. Caractéristiques et stratégie évolutive des plantes. **1**. Organisation cellulaire.* Doin, Paris, 2e édition (1e édition 1989).

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 de la fiche

I. Préparations microscopiques : lames **1**
- A. Principes généraux 1
- B. Préparations simples 1
- C. Réalisation de coupes par microtome 2

II. Observation directe par microscopie **2**
- A. Le microscope optique (MO) (= microscope photonique MP) 2
- B. Le microscope optique à fluorescence et à immunofluorescence 4
- C. Le microscope électronique 5
- D. Le microscope optique confoncal 6
- E. Comparaison des résolutions 6

III. Séparation des constituants cellulaires : ultracentrifugation **6**

IV. Suivis de molécules dans la cellule **7**
- A. Marquage par isotopes radioactifs et autoradiographie 7
- B. Marquage par anticorps fluorescents 7

V. Tri et comptage des cellules **8**
- A. Comptage au microscope optique 8
- B. Comptage et tri automatisés : la cytométrie de flux 8

Références **9**
Plan de la fiche **9**

© 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 adapté et modifié d'un TP produit en ATS Bio (septembre 2015) • Dernière actualisation : octobre 2019.

Contact : Tanguy.Jean4@gmail.com

Adresse de téléchargement : https://www.svt-tanguy-jean.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.