

**TP SV
C1**
LA CELLULE : MICROSCOPIE OPTIQUE - MICROBIOLOGIE (1)

COURS : SV-C-1, SV-C-2 TP : SV-A4 (SOURIS), SV-A5 (HISTOLOGIE ANIMALE), SV-B (HISTOLOGIE VEGETALE)



La **biologie cellulaire** a pour objectif l'étude de la structure et du fonctionnement des cellules. Ceci nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, débutant toutes par l'obtention d'échantillons : soit par **biopsie** (prélèvement sur un végétal ou un animal, vivant ou sacrifié), soit à partir de **cultures** de cellules.

Plusieurs types d'étude peuvent être menées sur les échantillons :

Morphologiques	Etude de la forme et de la structure externe d'une cellule, d'un organe ou d'un être vivant
Anatomiques	Etude de l'organisation interne d'une cellule, d'un organe ou d'un être vivant
Histologiques	Etude des tissus : cellules les composant, structure, formation
Physiologiques	Etude du fonctionnement normal d'une cellule, d'un organe, de tissus, etc.

Le but de cette séance de TP est l'**observation de cellules en microscopie optique**.

La petite taille (en général) des cellules vivantes impose l'utilisation de matériel grossissant, la plupart n'étant pas observables à l'œil nu (une cellule humaine mesure en général, par exemple, de l'ordre de 10 à 20 μm). L'œil humain possède en effet un **pouvoir séparateur** (= distance minimale entre deux points vus comme distincts) de 0,1 μm .

Il est donc nécessaire d'utiliser diverses techniques de microscopie (photonique et électronique). La **microscopie photonique** (= **optique**) permet un premier niveau d'observation, qui sera complété par des observations en microscopie électronique dans le TP C2

Les échantillons peuvent être observés :

- Directement après prélèvement et montage → **observation vitale**.
- Après traitement par un **colorant vital** : il permet de mettre en évidence certaines structures intracellulaires (ou extracellulaires, comme la paroi squelettique des cellules végétales), sans tuer les cellules observées. Les colorants vitaux sont intégrés de manière active par les cellules : ils n'agissent que sur des cellules vivantes.
- Après fixation puis coloration : c'est le cas des **préparations du commerce**. La fixation permet de figer les structures, et prépare la coloration. En fonction des protocoles de coloration, différentes structures cellulaires peuvent être mises en évidence.

L'objectif de ce TP est l'observation d'éléments cellulaires et d'associations de cellules au sein de tissus, à travers diverses observations au microscope optique

Programme officiel :

Evaluer les dimensions d'une structure observée à partir de la connaissance de l'ordre de grandeur de quelques objets biologiques courants (divers types cellulaires)
Exploiter une coupe d'intestin de Mammifère et une coupe transversale de feuille d'Angiosperme pour identifier les principaux types de tissus et préciser les relations structure-fonction
Réaliser des colorations afin de mettre en évidence différentes structures cellulaires au microscope optique

Compétences :

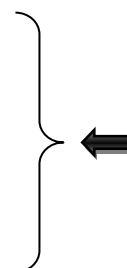
Réaliser une préparation de microscopie optique, y compris des coupes à main levée, avec ou sans coloration
Mettre en œuvre un protocole de coloration adaptée à la problématique biologique
Utiliser le colorant adapté pour mettre en évidence un tissu ou des molécules
Réaliser une observation en microscopie optique : objectifs et grossissement, intensité lumineuse, diaphragme, mise au point, utilisation de l'huile à immersion
Déterminer un ordre de grandeur ou la taille d'un objet à partir d'une échelle ou d'un grossissement
Identifier une technique de microscopie
Exploiter des clichés de microscopie (optique, électronique, à fluorescence)
Réaliser un dessin d'observation avec les conventions usuelles : fidélité, sélection des structures pertinentes, légendes, titre, échelle, orientations

Plan du TP :
1. Méthodes d'observation des cellules (1) : la microscopie photonique

- 1.1. Principes généraux de microscopie
- 1.2. Microscopie à fluorescence (épifluorescence)
- 1.3. Autres microscopies optiques

2. Utiliser le microscope photonique et réaliser un dessin d'observation

- 2.1. Utilisation du microscope photonique (rappels et compléments)
- 2.2. Réalisation d'un dessin d'observation



2.3. Détermination de dimensions / ordres de grandeur

3. Observations de cellules

3.1. Observation de cellules isolées

3.2. Observation d'organites végétaux

3.3. Observation de cellules au sein d'un organisme pluricellulaire

3.4. Une observation d'association de cellules de différents organismes

Travail préparatoire :

1. Méthodes d'observation des cellules (1) : la microscopie photonique

1.1. Principes généraux de microscopie

La **microscopie** est basée sur l'utilisation d'un faisceau d'ondes, amplifié afin de distinguer des éléments très proches les uns des autres, non discernables à l'œil nu. Une technique de microscopie se caractérise par un **pouvoir séparateur**, c'est-à-dire la distance minimale séparant deux points pour qu'ils soient vus distinctement l'un de l'autre.

Le pouvoir séparateur est donné par la formule :

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

λ = longueur d'onde

α = angle d'ouverture du rayon lumineux

n = indice de réfraction du milieu transparent séparant l'objet de l'objectif

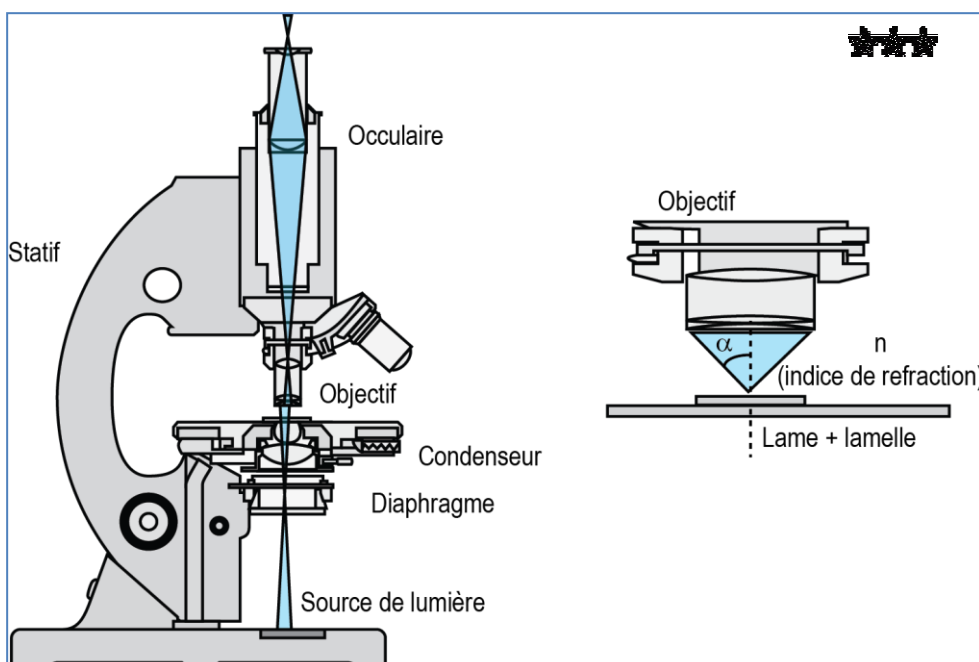
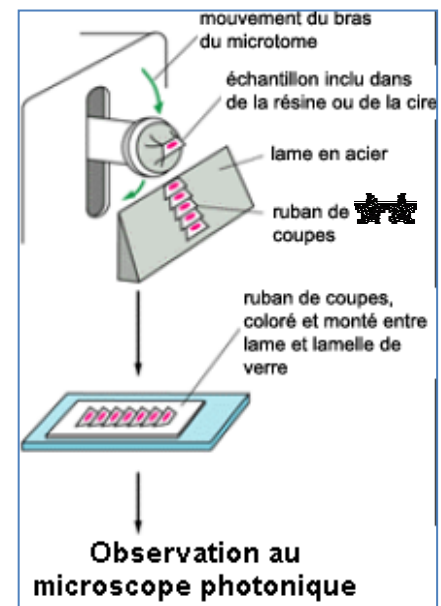
La limite extrême de résolution d'un microscope optique est donc essentiellement fixée par la longueur d'onde de la lumière. **Les microscopes photoniques les plus performants ont ainsi un pouvoir séparateur de l'ordre de 0,25 μm .** Pour atteindre de meilleurs pouvoirs séparateurs, il est nécessaire d'utiliser des longueurs d'ondes plus petites : c'est le principe des microscopes électroniques (voir TP BC2).

Les échantillons observés au microscope doivent être **fixés**, **inclus** et débités en **coupes** fines.

⇒ **Fixation** : l'utilisation d'un fixateur permet de consolider les structures cellulaires en créant des liaisons intermoléculaires entre les macromolécules. Les structures sont figées en gardant leur configuration initiale, en général par utilisation du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde.

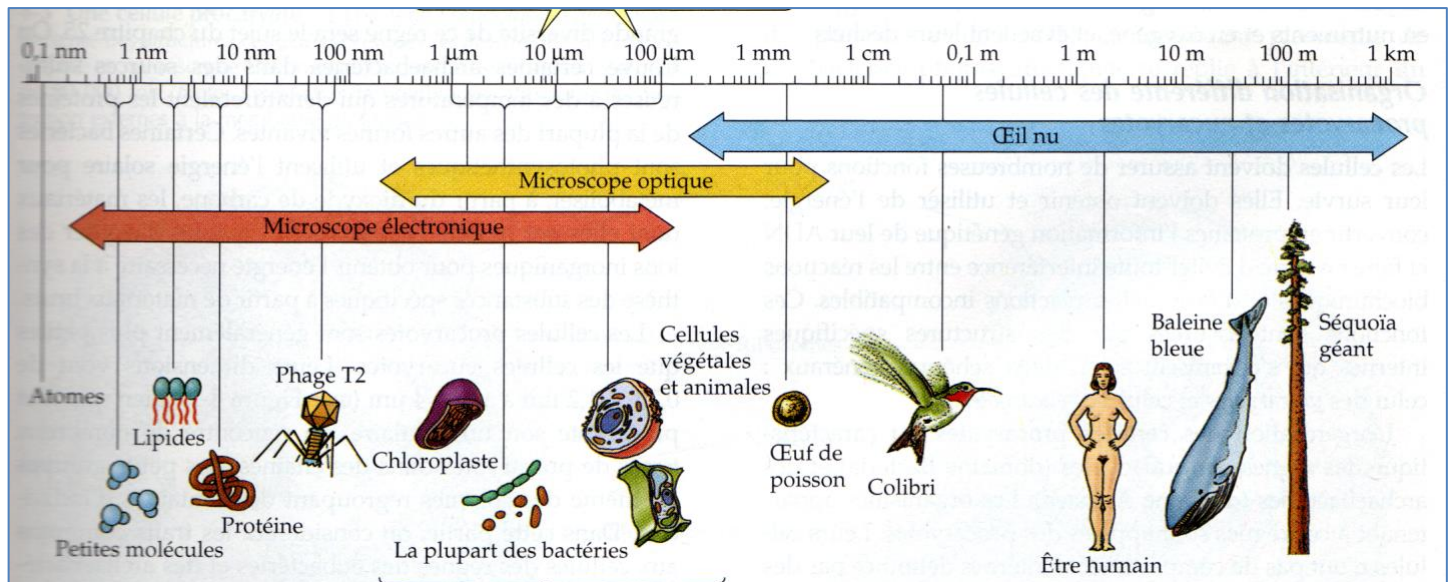
⇒ **Inclusion** : même après fixation, les tissus sont en général mous et fragiles. On utilise donc un milieu liquide qui va imprégner et entourer le tissu fixé et déshydraté. Après solidification par refroidissement (on utilise des résines ou des cires), on obtient un bloc, qui pourra être débité.

⇒ **Coupes** : on utilise un microtome muni d'une lame en acier ou en verre. Les coupes sont ensuite déparaffinées puis colorées, et enfin montés avec de la colle.



Grossissement :

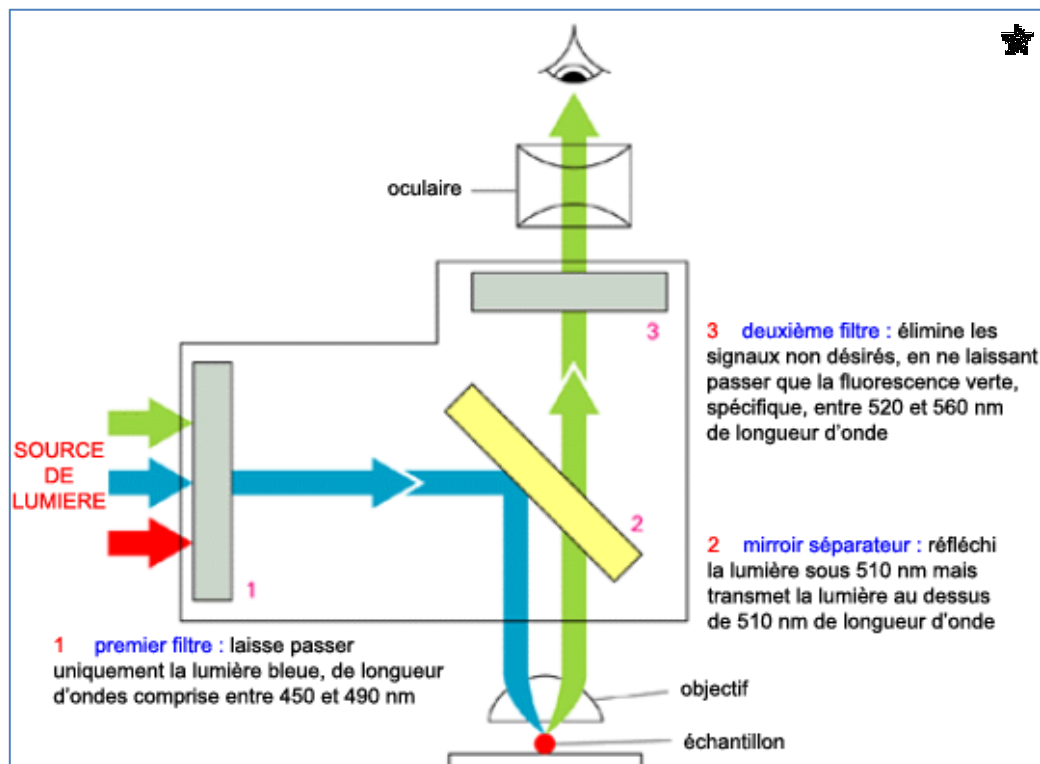
Le grossissement total est le produit du grossissement de l'oculaire et celui de l'objectif.



1.2. Microscopie à fluorescence (épifluorescence)

La microscopie à fluorescence repose en général sur un marquage spécifique, couplant une molécule fluorescente (le fluorochrome) à une molécule, structure ou ensemble de molécules définis dans la cellule.

Un faisceau excitateur de longueur d'onde λ_1 (souvent dans les ultra-violets) excite le fluorochrome, qui émet alors une fluorescence de longueur λ_2 dans le visible (la fluorescence réémise est moins énergétique que celle excitatrice, d'où une longueur d'ondes plus élevée).



1.3. Autres microscopies optiques

⇒ Microscopie à contraste de phase

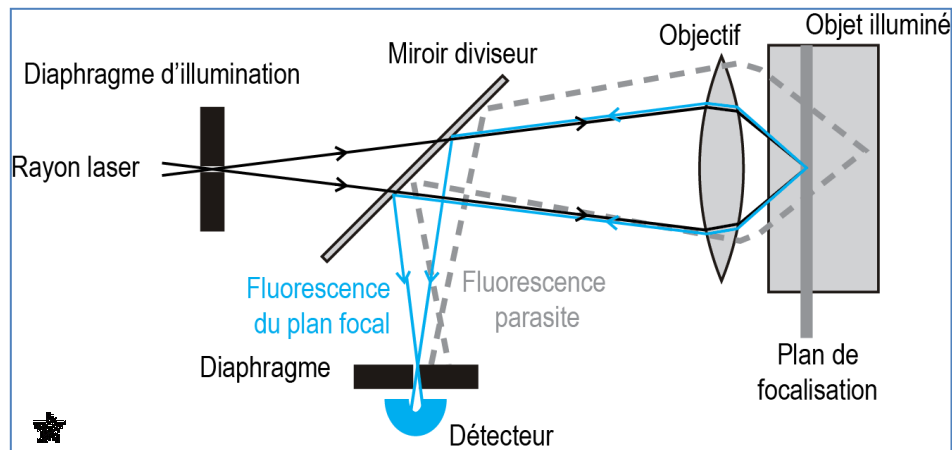
En plus de la microscopie optique classique, diverses techniques existent en microscopie photonique.

Microscopie à contraste de phase utilise la propriété de diffraction des cellules vivantes : en fonction des zones traversées (noyau ou cytoplasme, par exemple), la lumière change de phase. L'œil humain n'est pas capable de détecter ces variations de phase, mais on peut les observer de manière indirecte en utilisant les microscopes à contraste de phase et microscope Nomarski) permettent de distinguer nombre de structures intracellulaires.

⇒ Microscopie confocale

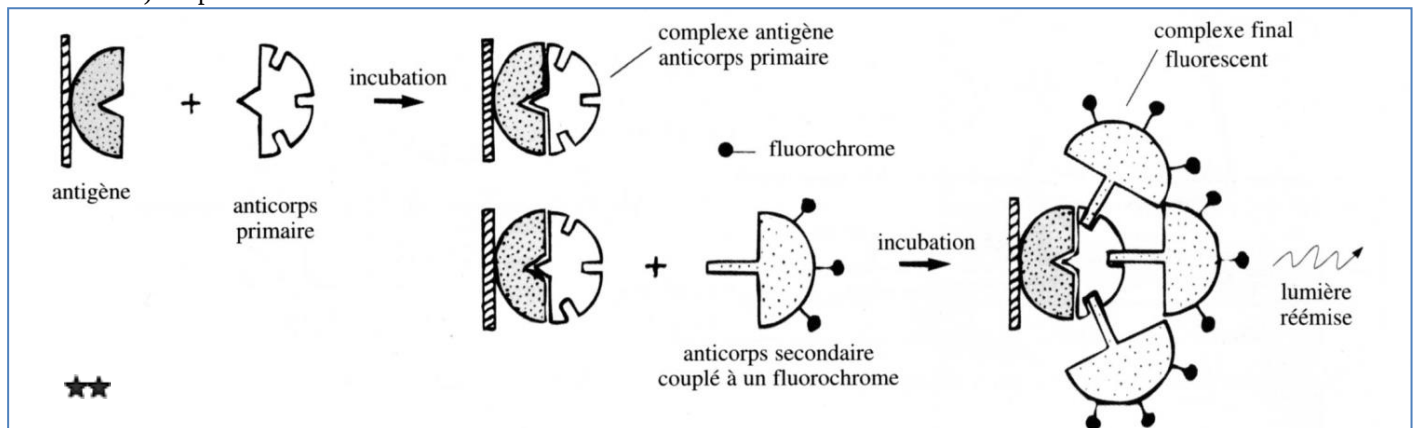
Le microscope confocale est un microscope à fluorescence particulier. On utilise un fin faisceau laser, qui n'éclaire qu'un point précis de l'échantillon dans l'espace. Le faisceau balaye un plan de l'échantillon, ce qui permet de réaliser une « coupe optique virtuelle » dans un échantillon épais. L'intérêt est double : une observation « spécifique » (car marquage fluorescent), et sur cellules vivantes.

- Observation de cellules précises et de leurs mouvements au sein d'un ensemble de cellules (organe, embryon...).
- Observation de mouvements d'organites au sein d'une cellule vivante.
- Reconstitution de structures tridimensionnelles (cf. TP BC3).



⇒ Immunocytochimie

Une technique utilisée couramment en microscopie à fluorescence (confocale ou pas) est de réaliser un marquage spécifique de molécules (le plus souvent des protéines) grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre ces molécules. Rarement, ces anticorps sont couplés à un fluorochrome, et plus couramment ces anticorps (dits « primaires ») sont révélés par un second anticorps (dit « secondaire ») couplé à un fluorochrome.



Auto-évaluation

Après avoir lu attentivement le texte et les figures, répondre aux questions suivantes.

Relier les techniques ou matériels d'observation avec les types d'observation (une technique peut conduire à plusieurs types d'observation, et un type d'observation peut être réalisé à partir de plusieurs techniques) :

- | | | |
|--------------------------------------|-----------------------|--|
| Microscope optique | ☐ | ☐ Observation en couleur |
| Microscope à épifluorescence | ☐ | ☐ Observation en noir et blanc |
| Microscope confocal | ☐ | ☐ Repérage spécifique d'une molécule/structure |
| Immunocytochimie | ☐ | ☐ Vue fluorescente |
| Utilisation de colorants | ☐ | ☐ Observation de cellules/tissus fixés (morts) |
| Utilisation de marqueurs radioactifs | ☐ | ☐ Observation de cellules/tissus vivants |

Cocher la technique et la coloration qui vous semble la plus adaptée à chaque type d'observation :

technique			coloration		
Microscope photonique	fluorescence ou confocal	Loupe binoculaire	Aucune	Colorant chimique	Immuno-cytochimie

Observer le noyau d'une cellule
 Localiser une protéine dans les cellules
 Observer une structure naturellement colorée
 Observer la forme d'une molécule
 Comparer les localisations de molécules
 Reconstituer une structure 3D
 Observer une patte d'insecte
 Observer le déplacement d'un organe

2. Utiliser le microscope photonique et réaliser un dessin d'observation

2.1. Utilisation du microscope photonique (rappels et compléments)

⇒ Rappels simples sur la microscopie photonique

- commencer toujours au faible grossissement, plateau en bas et faire une première mise au point grâce à la vis macrométrique ;
- utiliser ensuite la vis micrométrique pour parfaire la mise au point ;
- passer à un grossissement plus fort en prenant garde à ne pas toucher à la préparation ; faire la mise au point en utilisant uniquement la vis micrométrique.

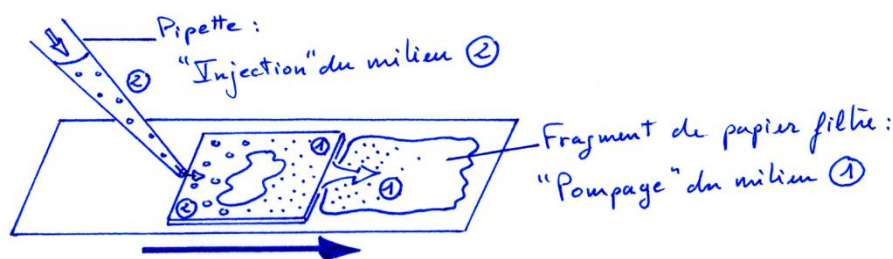
⇒ Utilisation avancée du microscope

- régler la luminosité au mieux (suffisamment pour voir les structures, pas trop pour garder un bon contraste) ;
- utiliser le condensateur pour concentrer le faisceau lumineux si besoin ;
- utiliser le diaphragme pour augmenter (fermeture du diaphragme) ou réduire (ouverture du diaphragme) le contraste.

⇒ Montage entre lame et lamelle

- préparer à l'avance le milieu de montage : une goutte d'eau ou d'une autre solution (ne pas mettre trop de solution !) ;
- déposer délicatement la préparation sur la goutte, bien à plat ;
- recouvrir d'une lamelle approchée en biais de manière à chasser les bulles d'air ;
- absorber les éventuels excédents de liquide.

⇒ Une technique « sioux » : Remplacement du milieu de montage



2.2. Réalisation d'un dessin d'observation

Les représentations graphiques permettent de rendre compte d'une observation : c'est donc un **outil de communication** important en biologie comme en géologie. On distingue deux types de représentation : le dessin et le schéma.

Schéma	Dessin
➤ Permet de dégager les grandes structures, les principales unités observables. ➤ Objectif : indiquer les principales caractéristiques de l'objet observé. ➤ Représentation : les contours sont exacts et traduisent donc la réalité de l'observation, mais il n'y a pas de détails précis. Les légendes restent succinctes mais peuvent être fonctionnelles dès que possible.	➤ Permet d'exposer les détails de l'observation indispensables à l'identification précise des éléments caractéristiques. ➤ Objectif : un croquis représentatif de la réalité. ➤ Représentation : représentation la plus précise possible, la plus proche de la réalité. Les légendes sont précises.

⇒ Règles générales de réalisation d'un dessin ou d'un schéma :

➤ **Centré** sur la page ; on utilise une feuille A4 blanche (1 par dessin sauf cas particulier)

➤ Représentation **soignée**, réalisée au **crayon de papier** (HB conseillé), **sans** utilisation de couleur ni de figurés (hachures...). Le crayon doit toujours être impeccablement **taillé** ! Le plus important est la clarté de l'ensemble, ainsi que le **respect des proportions** (ce n'est PAS une œuvre « esthétique » !).

Il est recommandé de :

- Commencer par choisir **l'orientation** (portrait ou paysage) en fonction de l'observation réalisée ;
- Débuter par les **grandes lignes** du dessin, en occupant un espace maximum, mais en gardant dans le même temps assez de place pour le titre (de préférence en haut) et les légendes (qui peuvent être sur les deux côtés du dessin) **puis compléter** par les détails ;
- Mettre ensuite en place les **légendes**; les traits de légendes sont impérativement horizontaux et tracés à la règle ! Dans l'idéal, on essaye de regrouper les légendes de structures similaires dans une même zone, et il ne faut pas hésiter à donner des indications fonctionnelles (en fonction de ce qui est recherché lors de l'observation).
- Finir avec le **titre** complet et **l'échelle ou le grossissement** (voir ci-dessous), et figurer le dessin si assez de temps disponible...

⇒ Le titre du dessin :

Le titre doit être complet et encadré (ou au minimum souligné), et être de la forme :

« représentation + objet étudié + technique de préparation + mode d'observation + coloration »

Représentation : dessin ou schéma

Objet étudié : cellule acineuse pancréatique de rat, bourgeon d'un sycamore, etc.

Technique de préparation : montage *in toto* (préciser l'orientation de la vue : vue de dessous, dessus, de droite, gauche, ventrale...), coupe (longitudinale, transversale, etc.), coupe ultrafine.

Coloration : eau iodée, rouge neutre, etc.

Mode d'observation : loupe binoculaire, microscope optique (photonique), électronique à transmission, à balayage

⇒ Echelle et/ou grossissement :

Le croquis n'est pas à taille réelle. Il faut donc donner une indication sur la taille réelle de l'objet observé et/ou le niveau de précision atteint dans l'observation.

Agrandissement : il s'agit du rapport entre la taille de l'objet dessiné et sa taille réelle. Cette mention est obligatoire dans le cas d'une observation à l'œil nu ou à la loupe binoculaire, et seulement recommandée dans le cas d'une observation microscopique.

Dans ce dernier cas, on peut procéder à partir d'une détermination approximative de la taille du champ de vision.

A préciser de manière claire (« agrandissement X7,5 » etc.), de préférence à proximité du titre. On peut remplacer cette mention par un trait d'échelle (= trait représentant une grandeur réelle indiquée, comme « 1 cm » par exemple).

Grossissement : il s'agit du grossissement utilisé lors de l'observation avec un matériel grossissant. Cette mention est obligatoire dans le cas d'une observation au microscope ou à la loupe binoculaire. On l'obtient en multipliant le grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif. A préciser entre parenthèses, dans le titre, à la suite du mode d'observation. Exemple : « cellule XYZ observée au microscope optique (X 40) »

⇒ Qualité du trait :

(cf. tableau ci-dessous)

La qualité du trait est un élément majeur de réussite d'un dessin d'observation ! (l'importance est moindre pour un schéma, qui accepte un peu plus « d'approximation »).

Il est donc important :

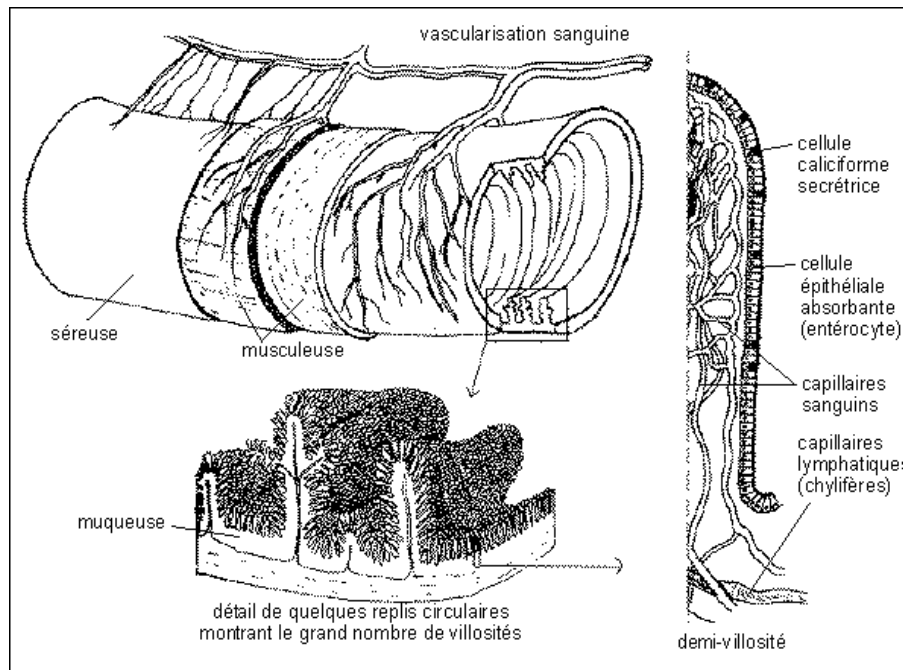
➤ De représenter **tout** ce qui est observable, même si cela prend du temps ;

➤ De ne **pas** représenter (ou alors en pointillés) ce qui n'est **pas** observable. A signaler : on peut **user des légendes** pour indiquer la présence d'un élément connu mais non observable de manière directement. (de même pour les indication de couleurs)

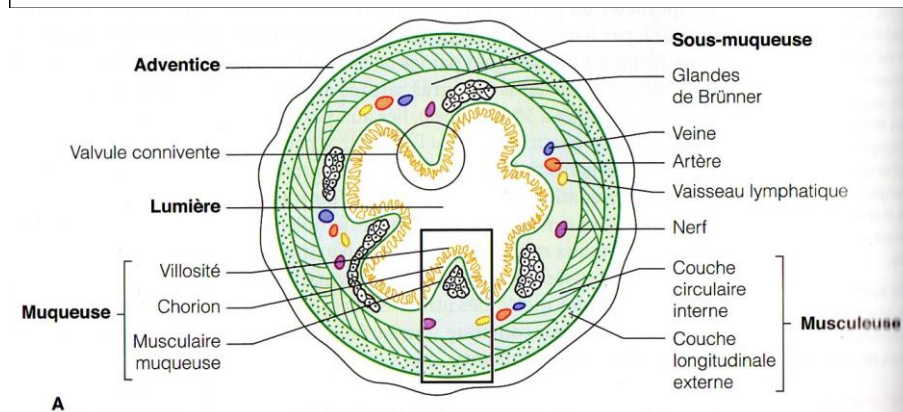
➤ D'avoir un **tracé fin et continu** !

Faire comme ceci...		...pour ne pas faire comme cela
	Qualité du trait : pour éviter les "barbules", fixer son attention sur le point vers lequel se dirige le crayon	
	Représentation d'un conduit : délimiter toujours la représentation d'un conduit par deux traits parallèles ; symboliser une section par un figuré rond ou de la forme de la section	
	Croisement de conduits ou superposition de structures : pour que l'on puisse comprendre quelle est l'ordre de superposition des structures, éviter les superpositions de traits ; représenter éventuellement la structure cachée par un pointillé	
	Sinuosité d'un conduit : même si le contours d'un conduit sinueux vous semble complexe, persévérez dans une représentation symbolisée par deux traits parallèles. Eviter les "tortillons" qui ne portent aucune information.	
	Départ et arrivée d'un conduit : trouver un symbole qui permette de comprendre comment débute ou s'achève un conduit.	
	Forme d'une structure : le contour de la structure doit être exact. Des reliefs ou des ornements doivent être convenablement symbolisés à l'aide de traits. Eviter les ombrages.	
	Répétition de structures : lorsque des structures se répètent, éviter de répéter approximativement les formes de ces structures ; il vaut mieux représenter soigneusement la structure exacte, quitte à ne le faire que sur une portion de la surface considérée.	
	Comment représenter une structure en lobes : trouver un symbole qui évoque, par un effet de perspective, la dimension particulière des lobes	

ANNEXE 2 : L'INTESTIN DES MAMMIFERES

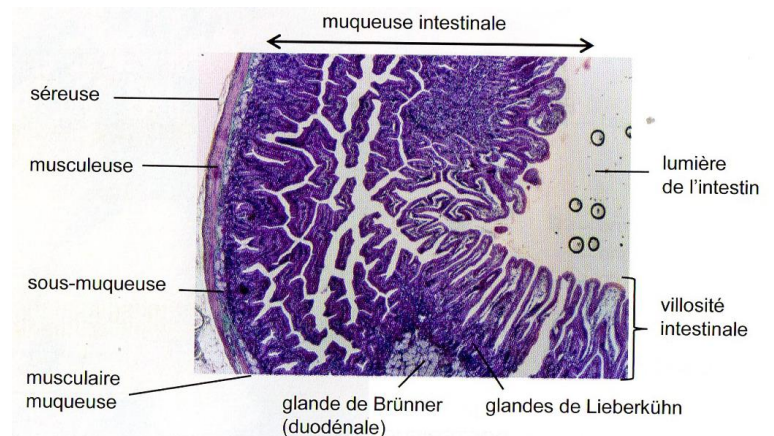
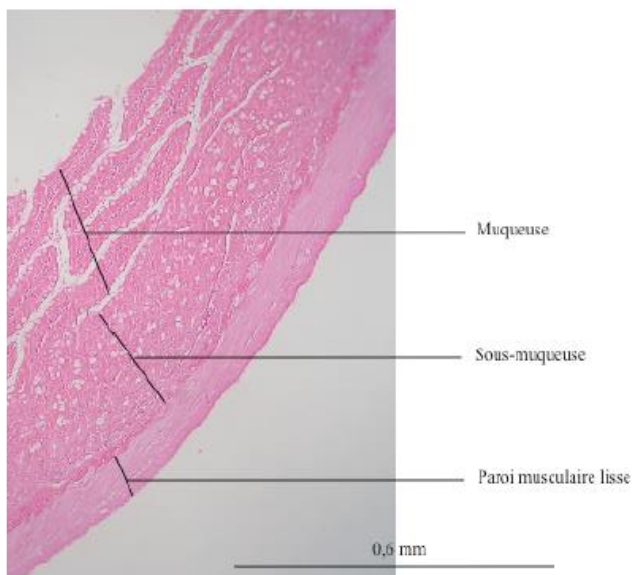


L'intestin, un organe composé de tissus



Structure générale d'une coupe d'intestin

Intestin de Mammifère - Microscope optique (x100)



Une villosité (X600) :

