

**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 :

|                       |                                                                                                    |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Morphologiques</b> | Etude de la forme et de la structure <b>externe</b> d'une cellule, d'un organe ou d'un être vivant |
| <b>Anatomiques</b>    | Etude de l'organisation <b>interne</b> d'une cellule, d'un organe ou d'un être vivant              |
| <b>Histologiques</b>  | Etude des <b>tissus</b> : cellules les composant, structure, formation                             |
| <b>Physiologiques</b> | Etude du <b>fonctionnement</b> 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  $\mu\text{m}$ ). L'œil humain possède en effet un **pouvoir séparateur** (= distance minimale entre deux points vus comme distincts) de 0,1  $\mu\text{m}$ .

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

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

*Voir poly 1 - préparation*

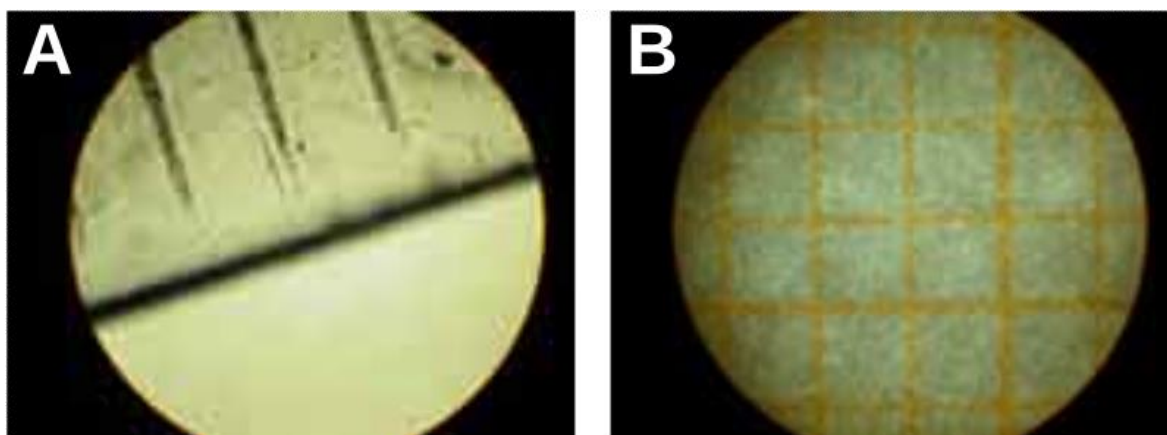
## 2. Utiliser le microscope photonique et réaliser un dessin d'observation

*Voir poly 1 - préparation*

### 2.3. Détermination de dimensions / ordres de grandeur

### ⇒ Détermination simple d'une dimension au microscope par référence à la taille du champ de vision

Une méthode simple pour évaluer la dimension d'un objet part de la connaissance de la taille du champ de vision. Pour cela, on procède au faible grossissement, en mesurant le diamètre du champ de vision, à l'aide d'un papier millimétré (ou à défaut d'une règle) placé sous l'objectif :



Une règle (à gauche) et un papier millimétré (à droite) observés à faible grossissement.

Une fois le diamètre connu au faible grossissement, il est possible de déterminer le diamètre aux autres grossissements, par calcul.

Exemple :

Diamètre mesuré à grossissement X40 : 5 mm

A grossissement X100 : le grossissement est 2,5 fois plus important (car  $100/40 = 2,5$ )

Le champ de vision est donc 2,5 fois plus petit

Diamètre à X100 = diamètre à X40 / 2,5

= 5 mm / 2,5 = 2 mm

En connaissant le diamètre du champ de vision, on peut estimer la taille d'un objet biologique.

Par exemple, une cellule dont la taille est d'environ  $1/10^{\text{ème}}$  du champ de vision au grossissement X100 (dans l'exemple ci-dessus) aura une taille de  $2/10 = 0,2 \text{ mm} = 200 \mu\text{m}$ .

Une petite page Internet qui reprend ces notions de grossissement et agrandissement :

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-svt/echelles-grossissements-agrandissements>

### ⇒ Détermination par comparaison avec un objet d'ordre de grandeur connu

Il est aussi possible de comparer la taille d'un objet biologique à celle d'un autre objet, dont l'ordre de grandeur de la taille est connu. Ceci nécessite de connaître l'ordre de grandeur de quelques tailles : (tableau à compléter au fil des TP...)

| Objet cellulaire | Ordre de grandeur                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------|
| Cellule animale  | 25 à 50 $\mu\text{m}$                               |
| Cellule végétale | 50 à 200 $\mu\text{m}$                              |
| Bactérie         | 2 $\mu\text{m}$ en moyenne<br>(1-10 $\mu\text{m}$ ) |
|                  |                                                     |
|                  |                                                     |
|                  |                                                     |
|                  |                                                     |
|                  |                                                     |

| Objet intracellulaire | Ordre de grandeur    |
|-----------------------|----------------------|
| Noyau                 | 10 $\mu\text{m}$     |
| Mitochondrie          | 1 à 2 $\mu\text{m}$  |
| Chloroplaste          | 5 à 10 $\mu\text{m}$ |
| Membrane              | Epaisseur 7 à 10 nm  |
|                       |                      |
|                       |                      |
|                       |                      |
|                       |                      |
|                       |                      |

## 3. Observations de cellules

Les observations mettent en jeu différentes méthodes de coloration. Voir en Annexe 1 le rappel des colorants usuels, ainsi que les protocoles de coloration.

### 3.1. Observation de cellules isolées

On se propose d'observer deux types cellulaires isolés afin de pouvoir les comparer, tout en cherchant à mettre en évidence certaines structures : des levures *Saccharomyces cerevisiae* (un champignon unicellulaire) et des cellules hépatiques de Bœuf *Bos taurus*.

L'observation de ces cellules implique l'utilisation de colorants vitaux, qui en étant activement intégrés par les cellules permettent de réaliser un contraste facilitant leur observation.

#### ⇒ Observation avec colorants vitaux

- Réaliser un montage entre lame et lamelle de levures, et de cellules hépatiques, en utilisant les milieux suivants :  
Cellules **hépatiques** (prélevées en raclant la surface latérale d'un fragment de foie) : **bleu de méthylène**  
**Levures** (prélever une goutte de suspension de levure) : **bleu coton**
- Déterminer la taille des deux cellules et comparer.

#### ⇒ Observation de structures cellulaires

- Réaliser un nouveau montage des deux types cellulaires dans du **rouge neutre**. Ce colorant vital permet une coloration des lysosomes (organites spécialisés dans les hydrolyses) et des vacuoles (compartiments liquidiens des cellules végétales et fongiques).
- Réaliser un montage de ces cellules dans du vert de méthyle (qui colore l'ADN) – pyronine (qui colore les ARN).
- Conclure de manière comparative entre les deux cellules en complétant le tableau :

|                          | Hépatocyte de Boeuf       | Levure du boulanger        |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Taille                   |                           |                            |
| Noyau ?                  |                           |                            |
| Paroi extra-cellulaire ? |                           |                            |
| Lysosomes ?              |                           |                            |
| Vacuole ?                |                           |                            |
|                          | Cellule eucaryote animale | Cellule eucaryote fongique |

### 3.2. Observation d'organites végétaux

Un **organite** est une structure intracellulaire délimité par une membrane, présentant une fonction définie dans la cellule. Les organites des cellules eucaryotes seront détaillés dans le TP SV-C2.

#### ⇒ Amyloplastes

Les **amyloplastes** sont des organites à double membrane des cellules végétales. Ce sont des plastes, donc dérivés des chloroplastes ou des plastes indifférenciés. Ces organites permettent un stockage à moyen ou long terme de l'amidon (polymère glucidique de réserve). On en trouve dans les racines, les tiges, les graines, les grains de pollen, la coiffe de l'extrémité des racines, nombre de tubercules (dont la pomme de terre).

Les amyloplastes peuvent être mis en évidence grâce à une coloration violette par le Lugol (= eau iodée).

- Couper la pomme de terre en deux. Avec un scalpel ou une pointe lancéolée, gratter la surface de la « chair » et déposer les fragments obtenus sur une lame propre.

- Monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau iodée (= Lugol).
- Observer en ajustant le réglage (luminosité, diaphragme) de manière à observer les stries de croissance de l'amidon.
- Réaliser un dessin d'observation de deux amyloplastes, avec échelle.

### ⇒ Chromoplastes

Certains tissus végétaux possèdent dans leurs cellules des **chromoplastes** : il s'agit de plastes chargés de pigments **non** photosynthétiques, permettant une coloration du tissu. Du fait de leur coloration, on peut les observer sans ajout de colorant. On se propose ici de les observer dans un fruit de Tomate (*Solanum lycopersicum*).

- Avec un scalpel ou une pointe lancéolée, gratter la surface de la « chair » d'une demi-tomate, et déposer les fragments obtenus sur une lame propre.
- Monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée ; observer.

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

Chez de nombreux Eucaryotes, les organismes sont constitués de l'association de nombreuses cellules. Ces cellules forment des tissus, caractérisés par une unité de structure et de fonction entre différentes cellules.

On se propose aujourd'hui d'observer deux organes, d'un Métazoaire (intestin de Mammifère) et d'un Angiosperme (feuille de Dicotylédone).

### ⇒ Coupe d'intestin de Mammifère

Voir **Annexe 2** : figures et photographies.

L'intestin est un segment du tube digestif, au sein duquel se réalisent des étapes de digestion enzymatique et d'absorption des nutriments.

Le tube digestif possède 4 couches fonctionnelles distinctes. De la lumière vers la périphérie :

- La **muqueuse** : elle correspond aux cellules épithéliales (épithélium = couche de cellules jointives reposants sur une lame basale) et d'un chorion (tissu conjonctif, sécréteur de matrice extracellulaire) C'est au niveau de l'épithélium intestinal que se réalise l'absorption des nutriments.
- La **sous-muqueuse** : tissu riche en collagène, lâche. Il permet la circulation des nutriments : c'est à ce niveau que se trouve les vaisseaux sanguins.
- La **musculaire** : muscle lisse – circulaire interne et longitudinale externe – responsable du péristaltisme (= mouvements de contractions permettant la progression du chyme intestinal).
- **L'adventice**, assimilée à une **séreuse** (tissu conjonctif + épithélium simple) dans la cavité abdominale. Tissu de soutien entourant l'ensemble du tube digestif. (Attention : pas toujours visible sur les coupes)

Au niveau de l'intestin grêle, la **muqueuse** est spécialisée dans l'absorption. On observe une forme typique avec des villosités (augmentation de la surface) : les cellules la constituant sont les **entérocytes**.

On peut aussi y observer des **cellules caliciformes**, sécrétrices de mucus.

- Observer la coupe du commerce à différents grossissements, et repérer les différentes couches présentes et leur développement (épaisseur) comparatif (utiliser pour cela les documents de l'Annexe 2 !).
- Observer l'épithélium digestif au plus fort grossissement possible, afin de repérer les entérocytes.
- Evaluer la taille des entérocytes.
- Réaliser un dessin d'observation au niveau d'une villosité de la muqueuse. Les légendes doivent indiquer en quoi la structure de la muqueuse lui permet de remplir son rôle d'absorption des nutriments.

### ⇒ Coupe à main levée de feuille d'Angiosperme Dicotylédone : Pour information (voir TP B1 + B2)

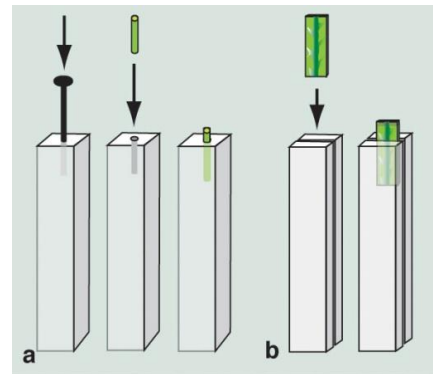
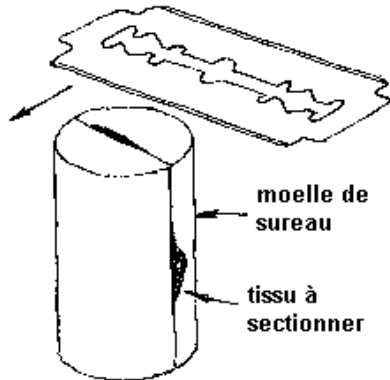
La diversité des tissus végétaux est caractérisée, en particulier, par des formes précises des cellules, et par des parois différenciées. Cette différenciation pariétale peut être mise en évidence par une coloration spécifique, la double coloration carmin – vert d'iode (ou carmin – vert de mirande)(voir protocole en Annexe) :

- Coloration par défaut de toutes les parois pectocellulosiques en **rouge**
- Coloration des parois **lignifiées** (= avec inclusion d'un polymère lipidique conférant imperméabilité et résistance, la lignine) en **vert**

La première étape est la réalisation de **coupes fines**.

Le but est de réaliser des coupes **les plus fines possibles** (dans l'idéal entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ ), soit transversales à l'organe étudié soit longitudinales. Les coupes sont réalisées avec une lame de rasoir, et doivent être parfaitement **perpendiculaires** à l'axe ou au plan de symétrie de l'organe étudié ; les coupes ne doivent pas être obliques.

Pour plus de commodité, on inclut en général l'échantillon dans de la moelle de sureau pour le couper ; on réalise pour cela une petite loge au préalable dans la moelle de sureau.



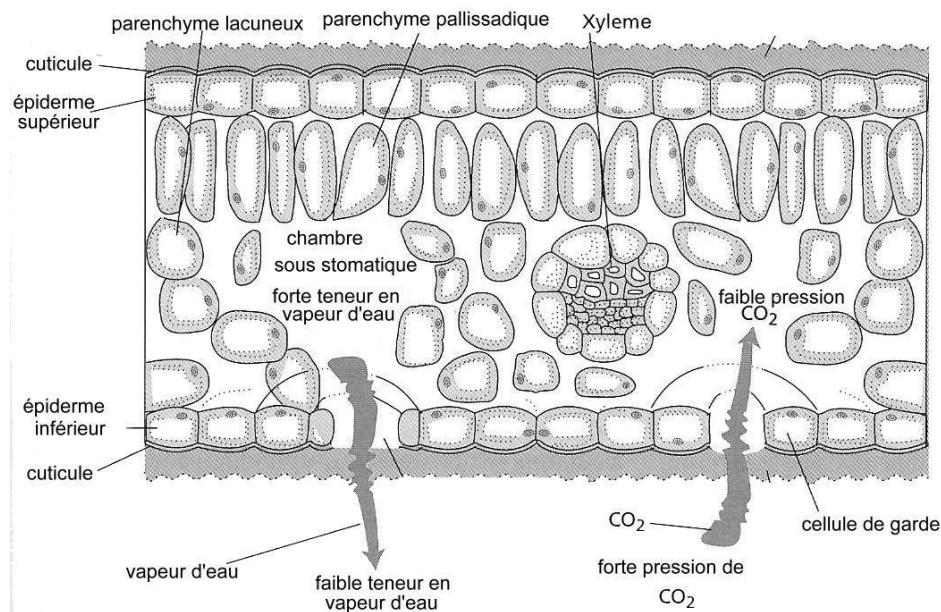
*Inclusion dans de la moelle de sureau*

Les coupes réalisées sont alors colorées : voir en annexe 1 le protocole de double coloration en histologie végétale.

Les tissus de la feuille peuvent être différenciés grâce :

- A la forme des cellules
- A l'épaisseur des parois
- A la différenciation biochimique des parois (lignifiées ou non lignifiées)

Une telle étude peut être réalisée sur une coupe transversale de feuille d'Angiosperme :



*Coupe transversale théorique d'une feuille d'Angiosperme Dicotylédone*

Rôles et caractéristiques majeures des tissus de la feuille des Angiospermes :

- Epiderme : tissu de revêtement recouvrant la feuille ; parois pectocellulosiques
- Parenchyme palissadique : tissu chlorophyllien, photosynthétique ; parois pectocellulosiques

- Parenchyme lacunaire : tissu chlorophyllien, photosynthétique, avec des méats (= espaces entre les parois) permettant la circulation des gaz ; parois pectocellulosiques
  - Collenchyme : tissu de soutien, à parois épaisses pectocellulosiques
  - Sclérenchyme : tissu de soutien, à parois épaisses lignifiées
  - Xylème : tissu conducteur (sève brute) à parois lignifiées
  - Phloème : tissu conducteur (sève élaborée) à parois pectocellulosiques
- Sur la photographie suivante, repérer deux tissus et comparer :  
Taille et forme des cellules ? forme du tissu ? En quoi ces structures lui permettent-elles de remplir sa fonction ?



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

Le tube digestif de la Souris, comme celui de tous les Mammifères, est composé de différents segments successifs. A la transition entre l'intestin grêle et le gros intestin, on peut observer un diverticule latéral : il s'agit du **caecum** (correspondant à l'appendice, chez l'Homme).

Le caecum est très développé chez les rongeurs. Il est **colonisé** par de nombreuses **bactéries** qui participent à la digestion, en particulier de la cellulose.

La souris fait ainsi partie des animaux coecotrophes, c'est-à-dire qu'elle produit deux types de fèces : des crottes molles le matin, qu'elle ingère, et des crottes plus dures qui sont éliminées. Les crottes molles contiennent des glucides et des vitamines issues de la digestion par les bactéries caecales.

On peut mettre en évidence la présence de bactéries dans le caecum par la réalisation d'un frottis suivi d'une coloration, **soit** au bleu de méthylène, **soit** en faisant une coloration de Gram.

Pour cela, on commence par prélever le caecum en le découpant avec des petits ciseaux. On ouvre ensuite délicatement avec un scalpel, et on prélève une petite quantité de son contenu avec une paire de grosses pinces, que l'on dépose sur une lame.

- Réaliser un **frotti** de ce prélèvement :  
A l'aide d'une lamelle, étaler le prélèvement.  
Laisser sécher à l'air libre, et fixer en passant au-dessus d'une source de chaleur (modérée).
- Réaliser une **coloration de Gram** (voir Annexe 1)
- **Observer** à l'immersion dans une goutte d'huile à immersion, sans lamelle

## ANNEXE 1 : COLORANTS USUELS ET PROTOCOLES DE COLORATION

### Colorants ne nécessitant pas de protocole particulier = à connaître !

- Lugol = eau iodée : coloration violette de l'amidon  
coloration brune du glycogène
- Rouge neutre : lysosomes, vacuoles
- Vert de méthyle : ADN
- Pyronine (rouge) : ARN
- Bleu coton lactique : chitine (→ paroi des champignons), callose, collagène
- Réactif de Schiff : après chauffage à 90°C, 10 seconde : précipité rouge brique des sucres réducteurs

### Protocole de coloration = donnés, mais objectif de coloration à connaître

| Coloration de Gram | Coloration des bactéries en microbiologie |                                                      |
|--------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                    | Bactéries Gram+ : violet                  | paroi pauvre en peptidoglycanes, enveloppe lipidique |
|                    | Bactéries Gram- : rose                    | paroi épaisse et riche en peptidoglycanes            |

Réaliser un frottis (cf. protocole ci-dessus) non coloré.  
Recouvrir le frottis sec d'alcool, laisser agir 30 secondes. Jeter l'excès d'alcool et laisser sécher. [ **FIXATION** ]  
Recouvrir de violet de Gentiane en le versant sur une extrémité de la lame et en faisant glisser sur le frottis. Laisser agir 1 minute. [ **COLORATION PRIMAIRE** ]  
Recouvrir de Lugol. Laisser agir 3 minutes environ. [ **MORDANCAGE** ]  
Rincer à l'alcool jusqu'à ce que l'alcool soit incolore. [ **DECOLORATION** ]  
Rincer à l'eau distillée pour stopper la décoloration.  
Recouvrir de Fuschine (ou de Safranine) et laisser agir 20 seconde environ. [ **CONTRE-COLORATION** ]  
Laver à l'eau distillée, et sécher entre deux morceaux de papier filtre.  
Observer à l'immersion : mettre une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré et utiliser l'objectif X100.

| Double coloration végétale | Coloration des parois végétales en histologie végétale |                                          |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                            | Rose                                                   | Paroi pectocellulosique                  |
|                            | Vert                                                   | Paroi lignifiée (→ Xylème, Sclérenchyme) |
|                            | Marron                                                 | Paroi subérifiée (→ Suber)               |

**Préparation de la coloration**

Les coupes fines sont placées délicatement dans un panier métallique (ou autre) placé dans un verre de montre contenant de l'eau. /!\ attention à ne pas pincer ni couper les coupes ! Utiliser une aiguille lancéolée pour manipuler les coupes.

**Vidage**

Les coupes sont transportées successivement dans une série de verres de montre, à l'aide du panier :

① Hypochlorite de sodium (= eau de Javel) [la Javel détruit le contenu des cellules tout en préservant les parois]

② Eau : lavage abondant des coupes (faire des petits mouvements avec le panier pour bien éliminer toute la Javel ; remplacer l'eau de lavage entre deux séries de coloration)

**Coloration**

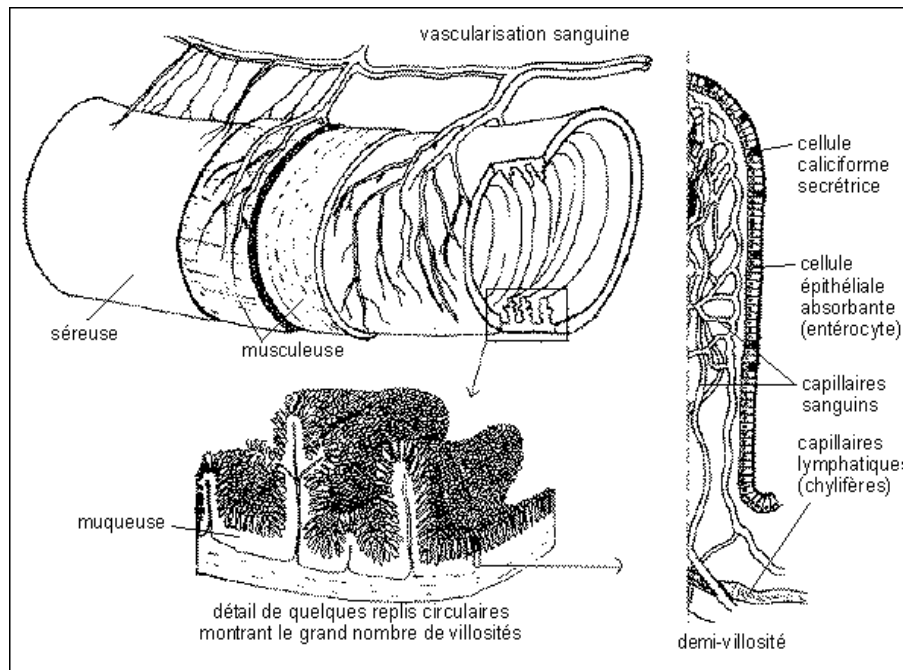
③ Acide acétique dilué (1%) pendant 5 minutes [**mordantage** : l'acide acétique détruit l'excès d'eau de Javel et facilite la fixation des colorants] ; ne pas rincer

④ Mélange des deux colorants (1 à 2 minutes) [**coloration** des parois]

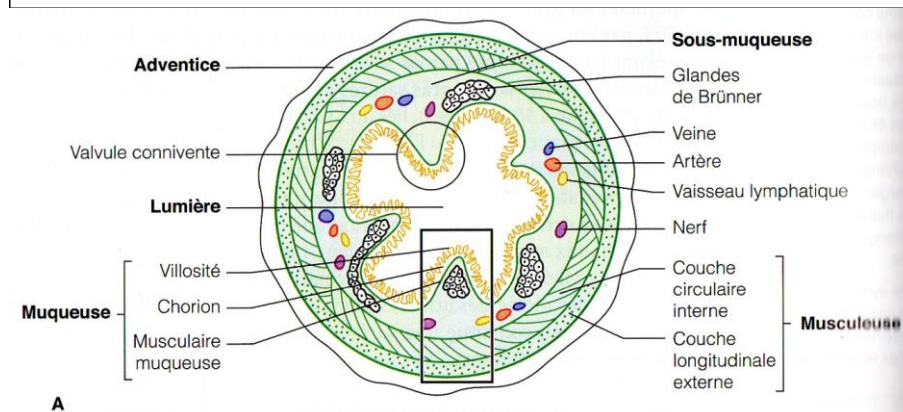
⑤ Eau [**lavage** des excès de colorant]

Puis monter entre lame et lamelle dans de l'eau distillée et observer au microscope. (Sélectionner les coupes les plus fines et -si visible à l'œil nu- celles visiblement mieux colorées)

## ANNEXE 2 : L'INTESTIN DES MAMMIFERES

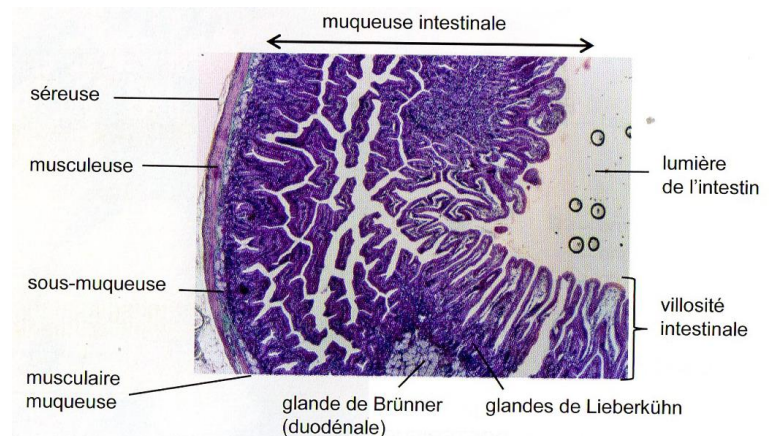
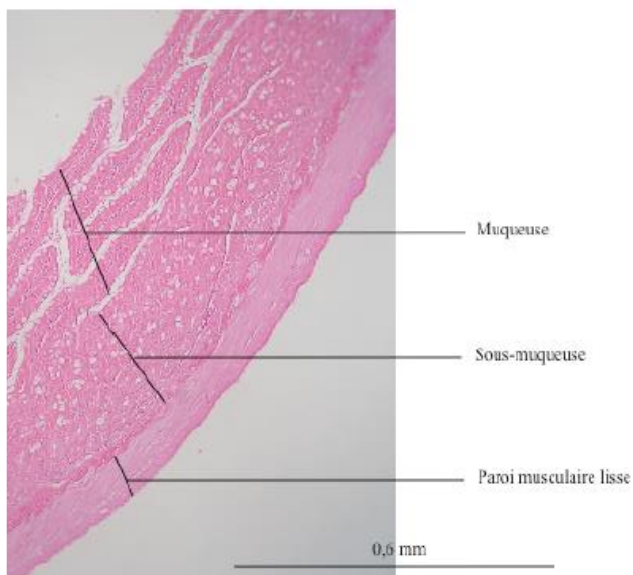


L'intestin, un organe composé de tissus



Structure générale d'une coupe d'intestin

**Intestin de Mammifère - Microscope optique (x100)**



Une villosité (X600) :

