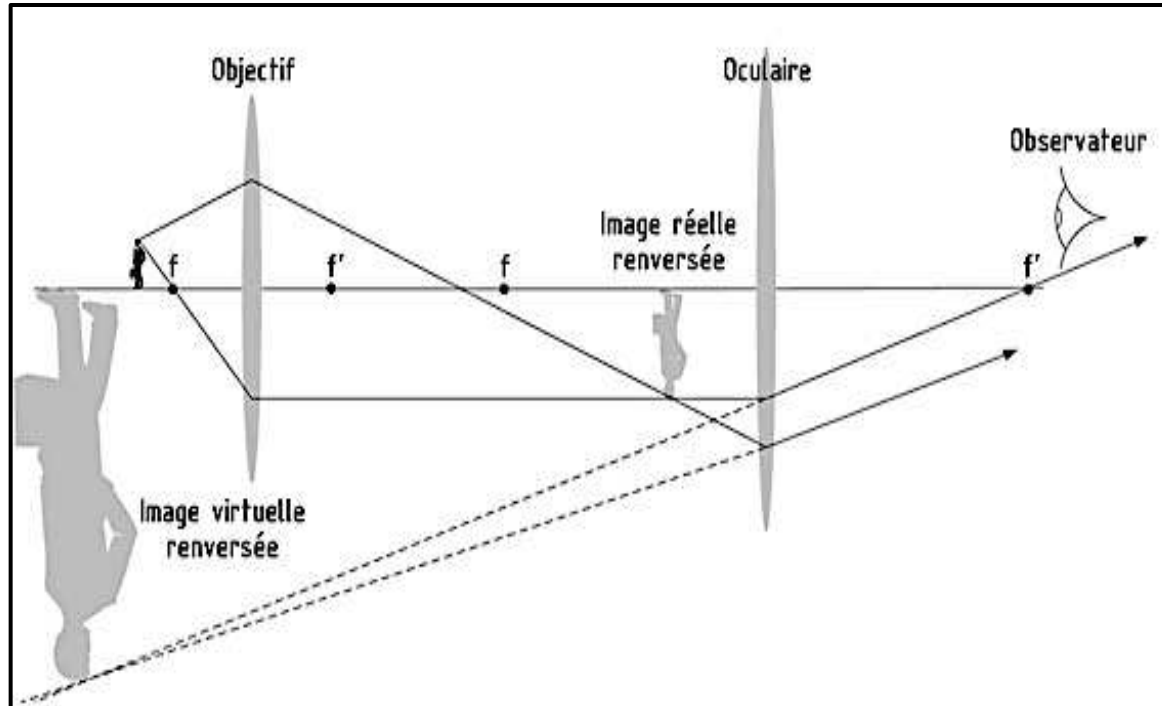


# **Travaux pratiques**

## **La cellule : structure et ultrastructure**

# 1) Les techniques de microscopie

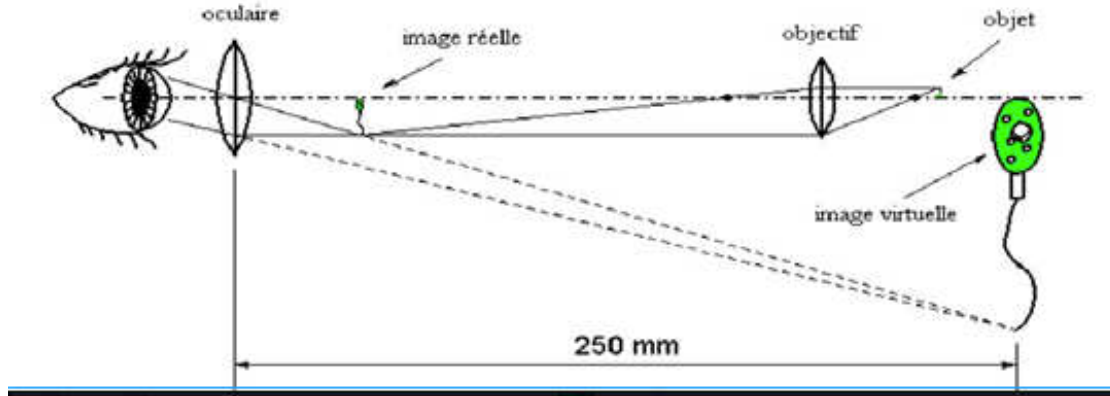


# Les outils d'observation : les microscopes

## Principe

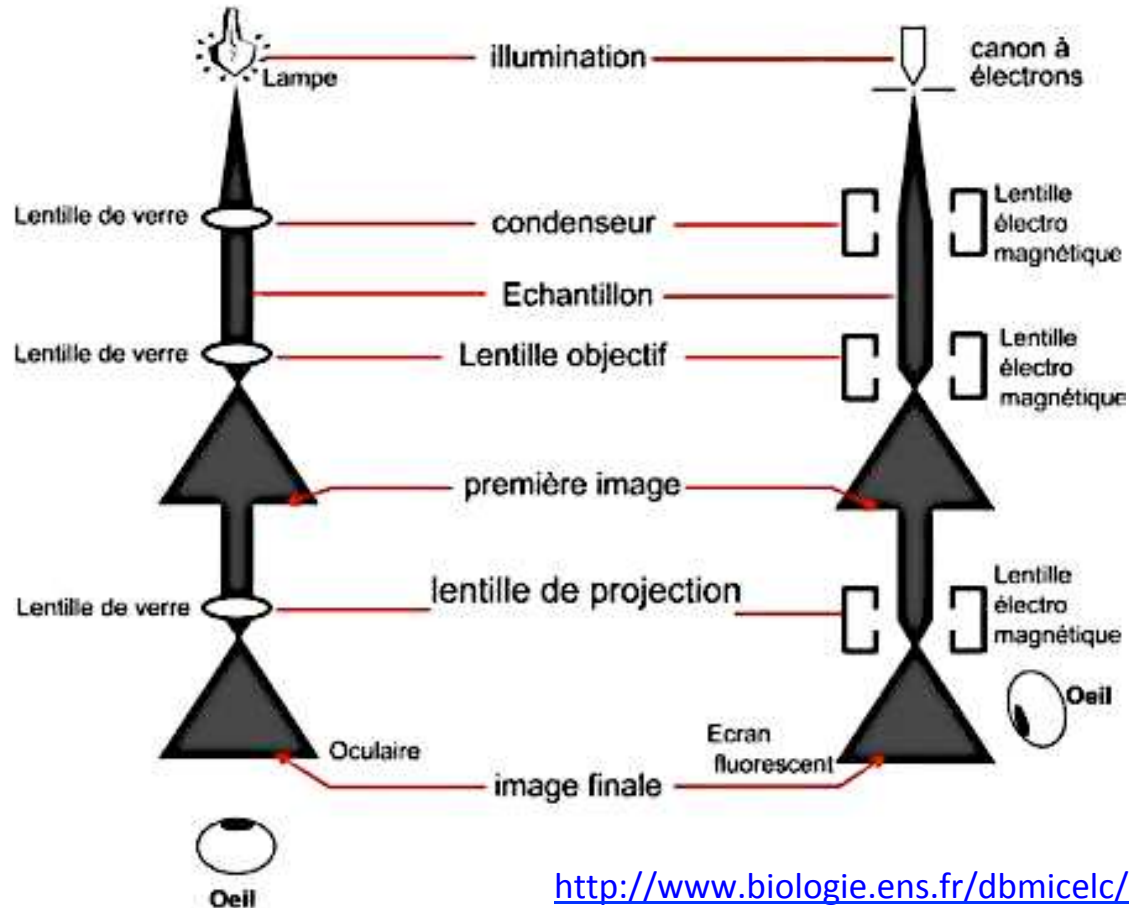


**Grandissement** =  $\frac{\text{Taille de l'image}}{\text{Taille de l'objet}}$



**Grossissement** = rapport des angles des rayons lumineux, lié à l'optique utilisé. Au microscope, c'est le produit des grossissements des deux lentilles, objectif et oculaire.

# Principe



# Les microscopes photoniques

- À fond clair

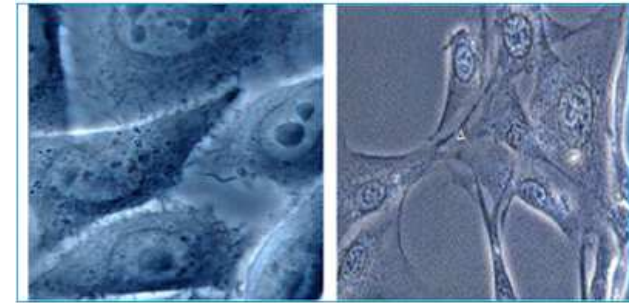


- À fond noir

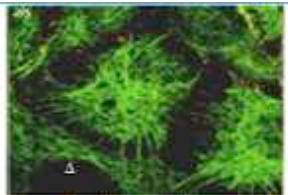


Puce d'eau douce

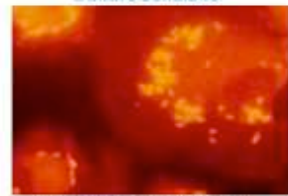
- À contraste de phase



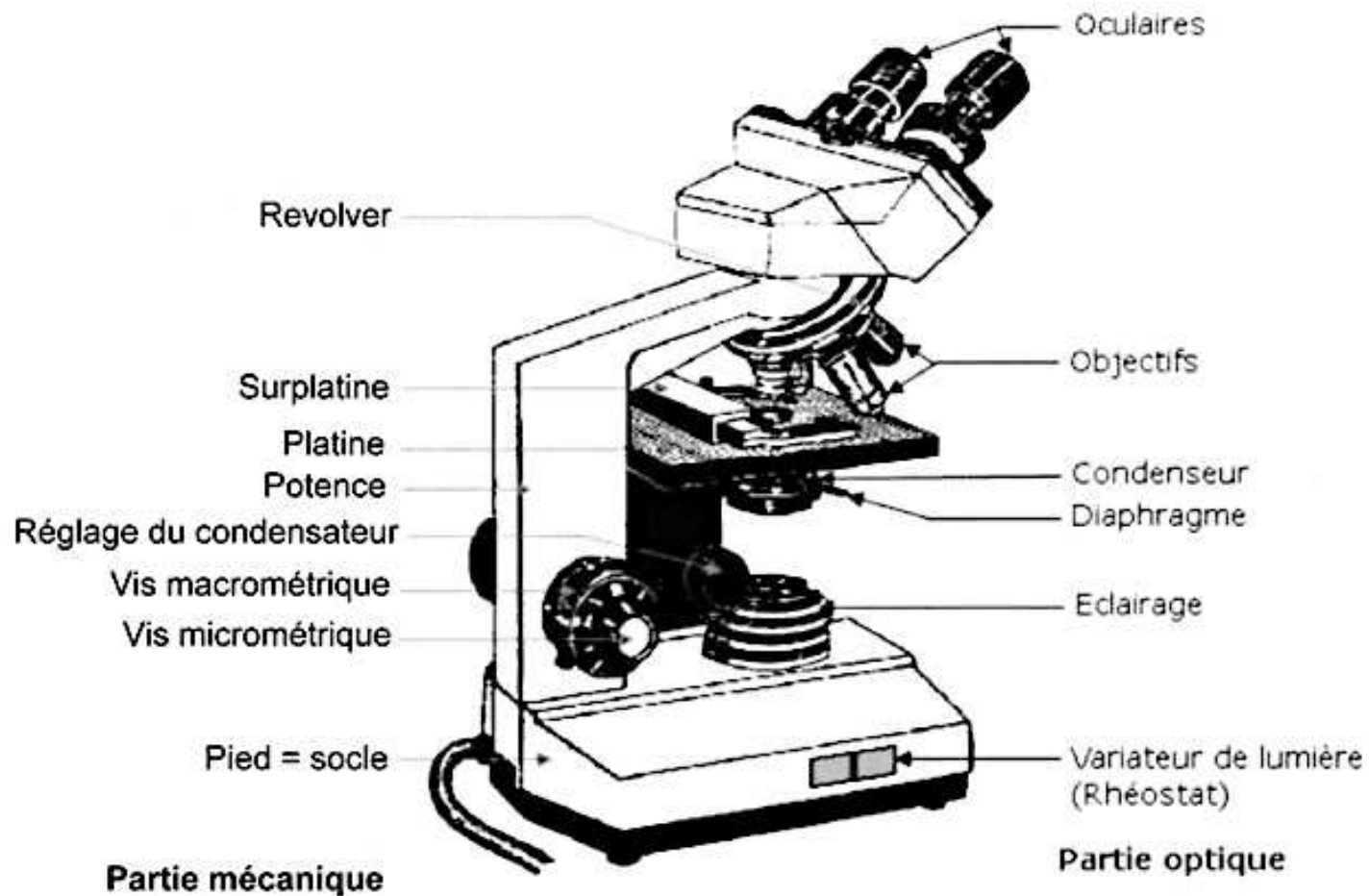
- À fluorescence



Culture cellulaire



Legionella pneumophila

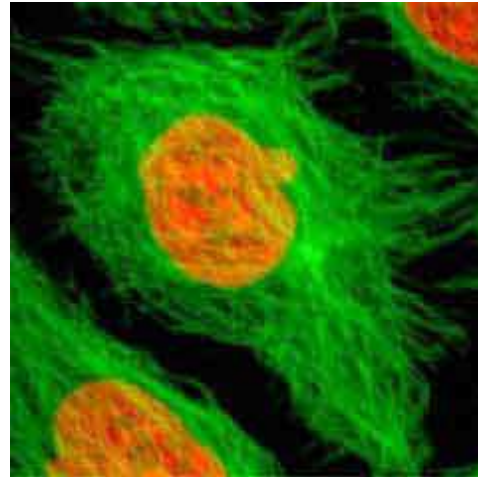


LES PARTIES D'UN MICROSCOPE PHOTONIQUE

# Le microscope à (épi)fluorescence

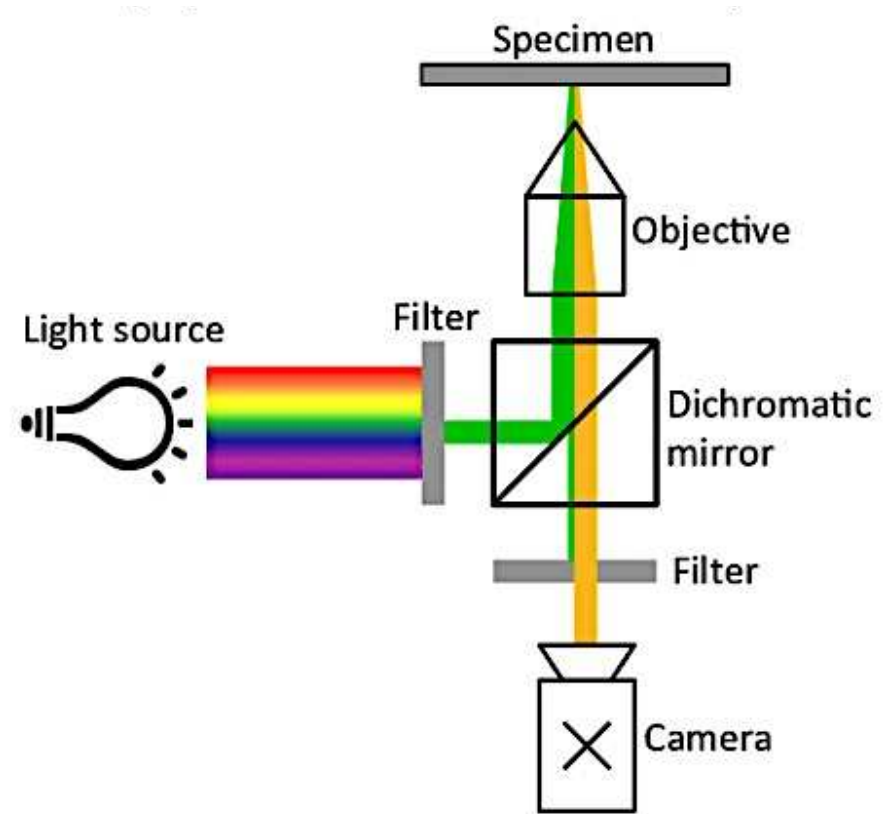
Marquage d'une molécule avec un fluorochrome puis observation avec la longueur d'onde qui excite le fluorochrome.

On peut superposer plusieurs images.

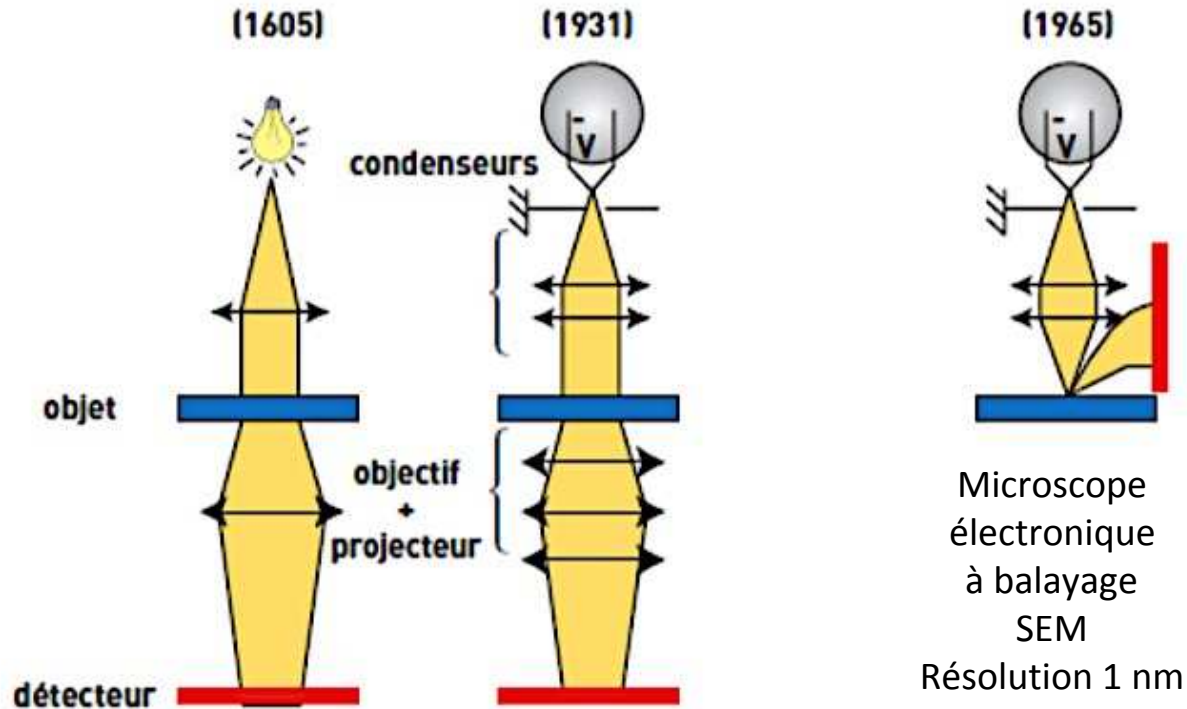


**Cellules en interphase :**  
- microtubules marqués par des anticorps couplés au FITC  
- chromatine traitée par un colorant qui fluoresce en orange.

Source : snv-jussieu



Source : thèse de Feindenans'l, 2013



Microscope  
photonique  
= optique  
résolution 0,1  $\mu\text{m}$

Microscope  
électronique  
à transmission  
TEM  
résolution 0,1 nm

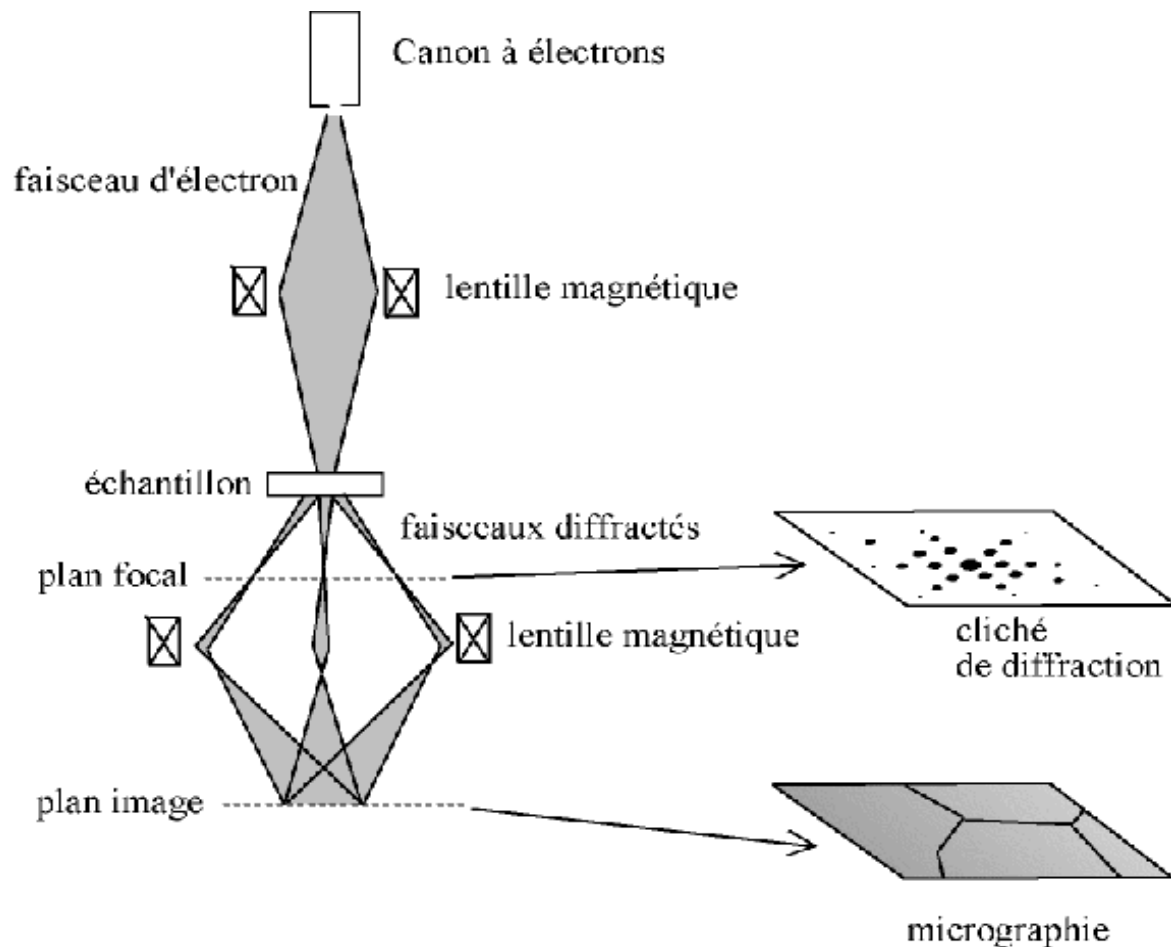
Microscope  
électronique  
à balayage  
SEM  
Résolution 1 nm



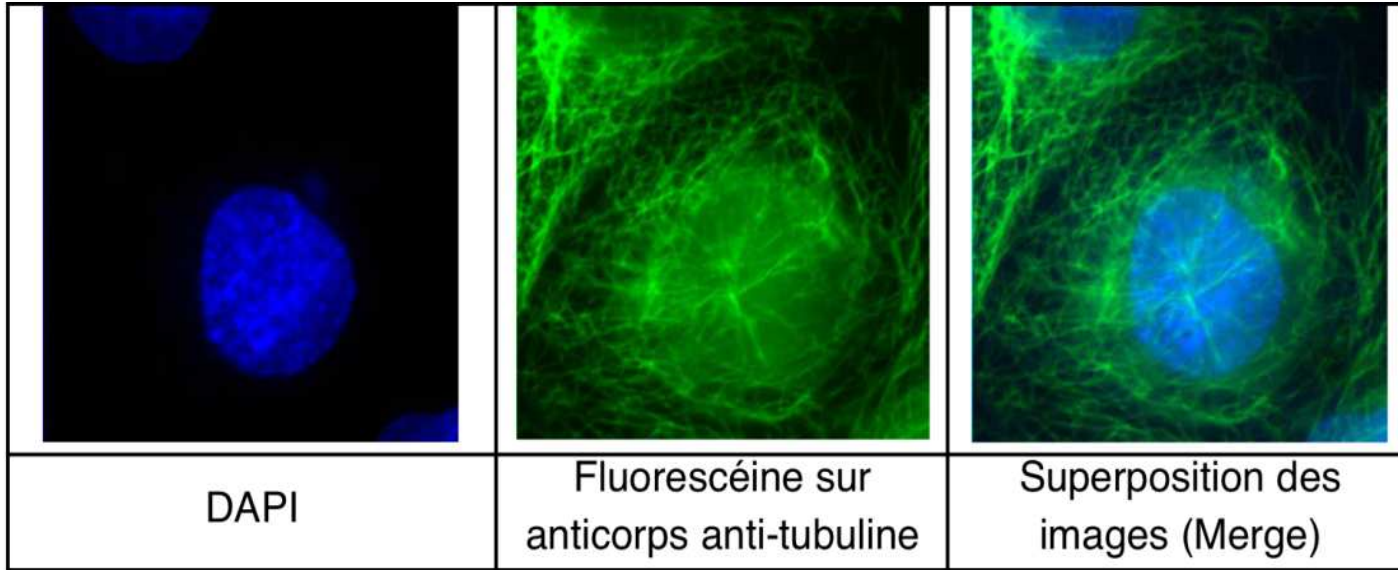
# Microscope électronique



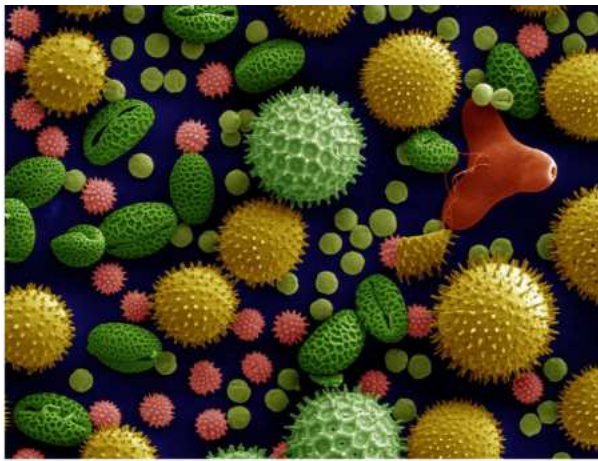
# Microscope électronique



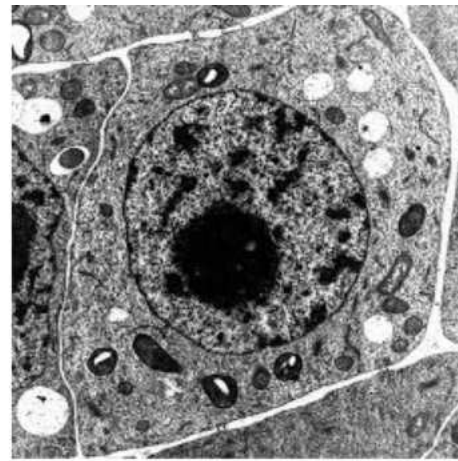
On peut superposer plusieurs images.



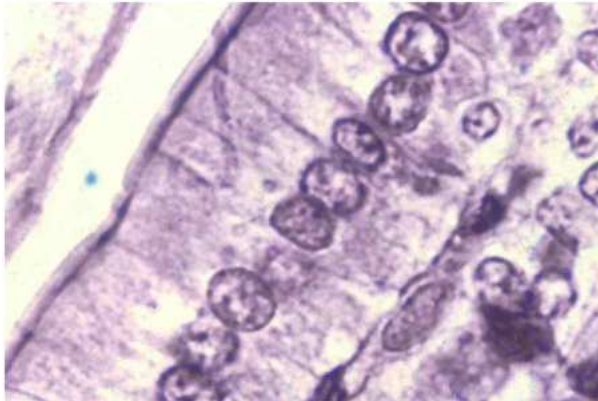
*(clichés : P. Guillaud)*



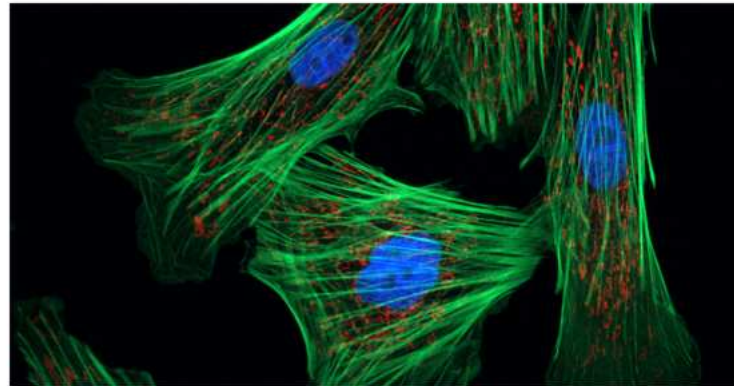
Mélange de pollen (x 500)



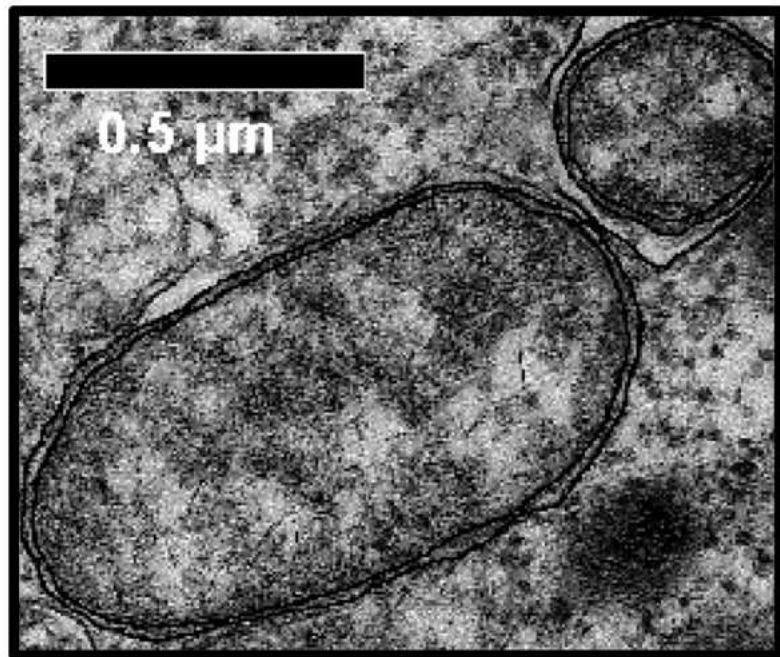
Cellule méristématique végétale (x 7000)



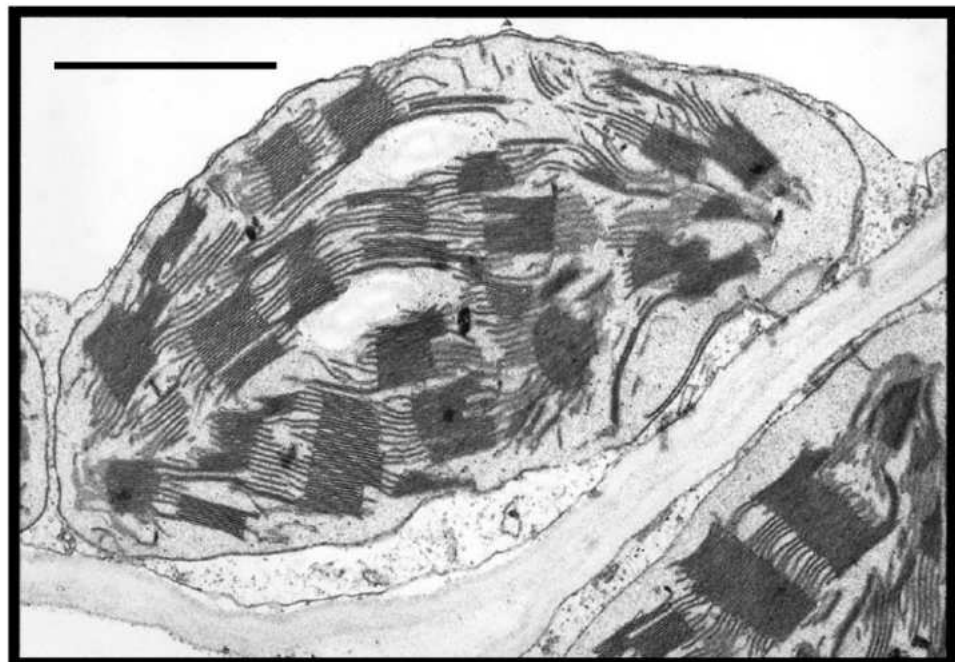
Cellules intestinales (x 100)



Fibroblastes (x 500)



Bactérie  
Grandissement x .....



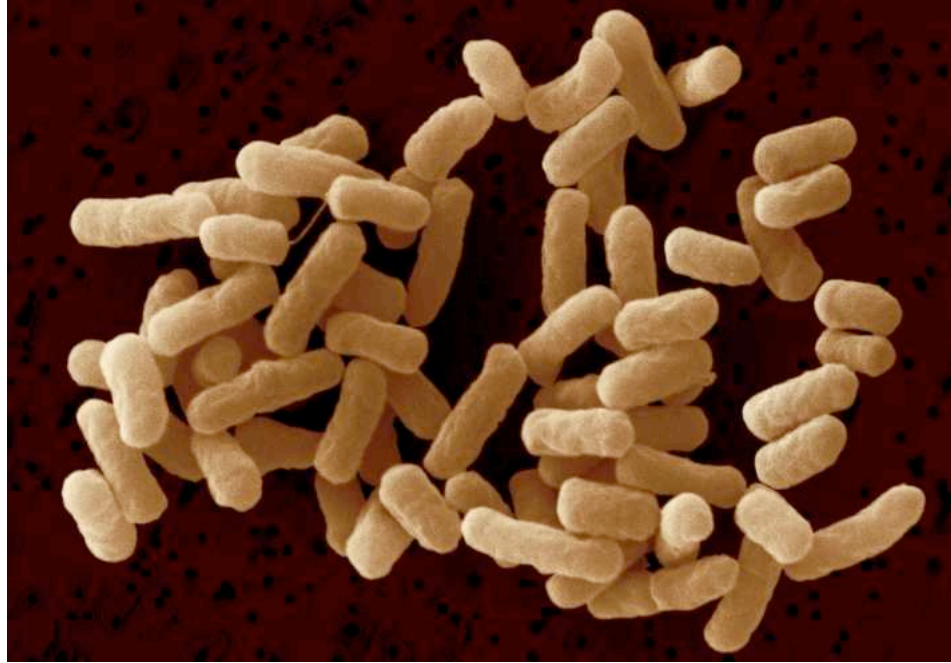
Détail de cellule végétale  
Grandissement x 12 500

# Comparaison des microscopies

Type de microscopie	Type d'objet	Résolution	Champ d'application
Photonique = optique	Tissu en coupe fine, culture de cellules	0,1 $\mu\text{m}$	Observation de cellules vivantes ou colorées
Photonique à épifluorescence	Cellules marquées	0,2 $\mu\text{m}$	Localisation de molécule marquée
Électronique à transmission MET	Tissu à grosse molécule	0,1 nm	Détails cellulaires, marquage possible (radioactif ou par grain d'or)
Électronique à balayage MEB	Organisme à assemblage de molécules	1 nm	Effet de relief

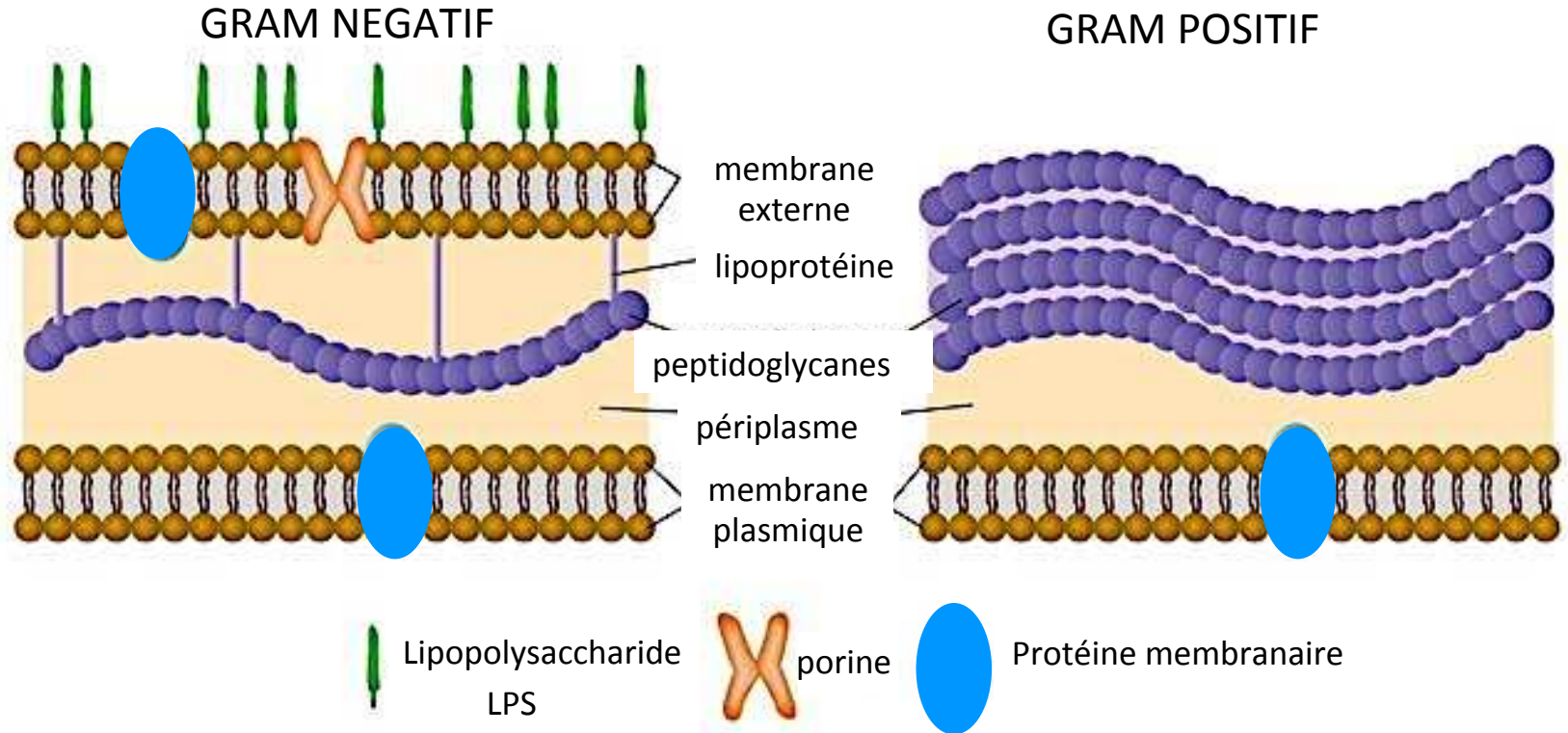


## 2) Les bactéries et leur ultrastructure



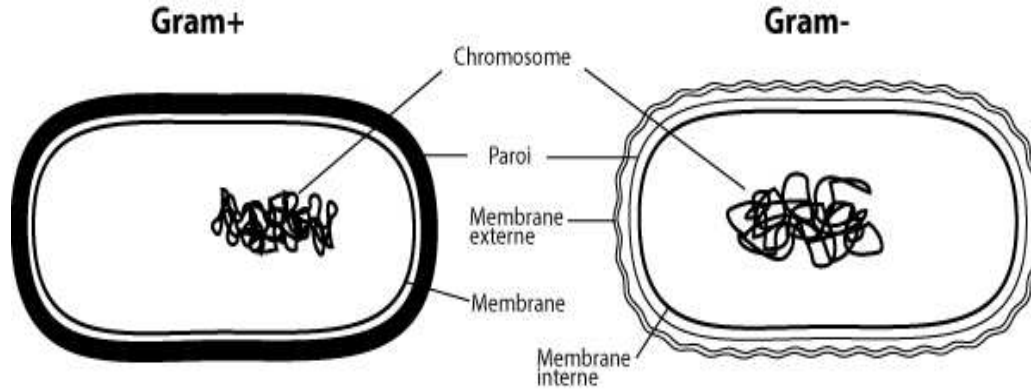
*Micrographie (MEB) de bactéries Escherichia coli. La largeur totale de l'image représente 12,8  $\mu\text{m}$ .  
(source : Science Photo Library)*

# Les parois bactériennes





# Coloration de Gram

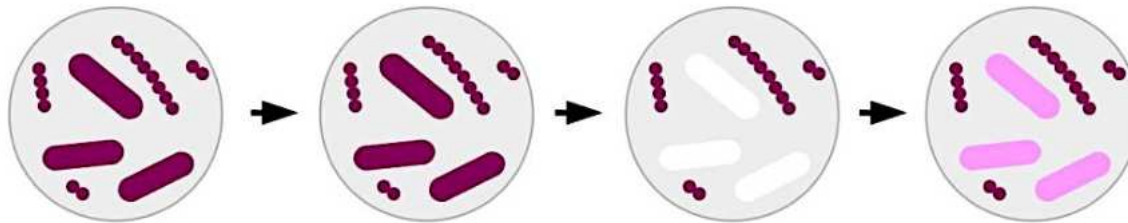


Coloration primaire  
Cristal violet

Mordantage  
Lugol

Décoloration  
Éthanol

Coloration secondaire  
Fuschine

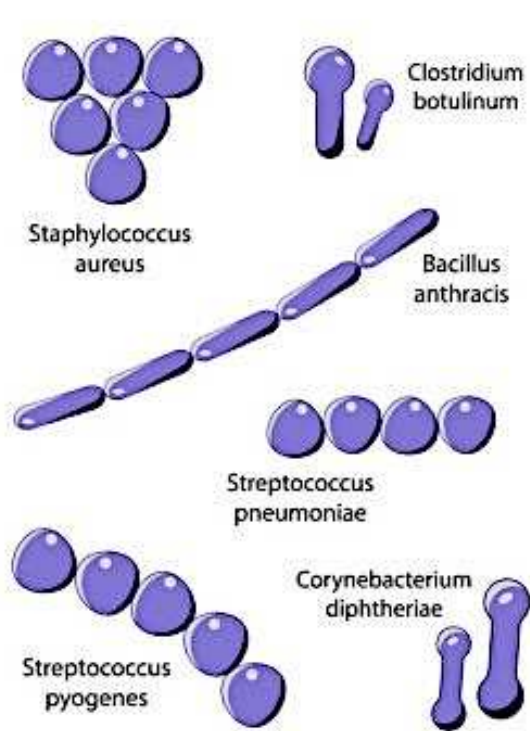


# Reconnaître les bactéries

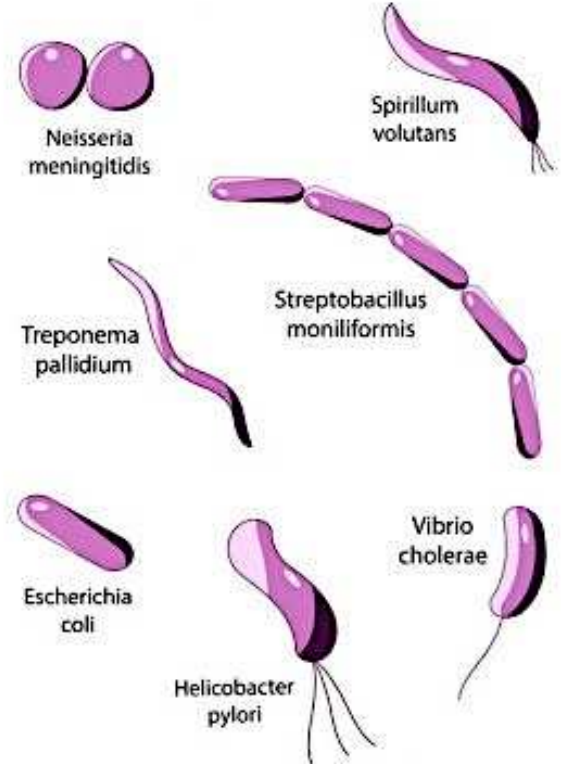
Critères de

- Forme
- Taille
- Coloration
- Assemblages possibles

## Gram positive bacteria



## Gram negative bacteria

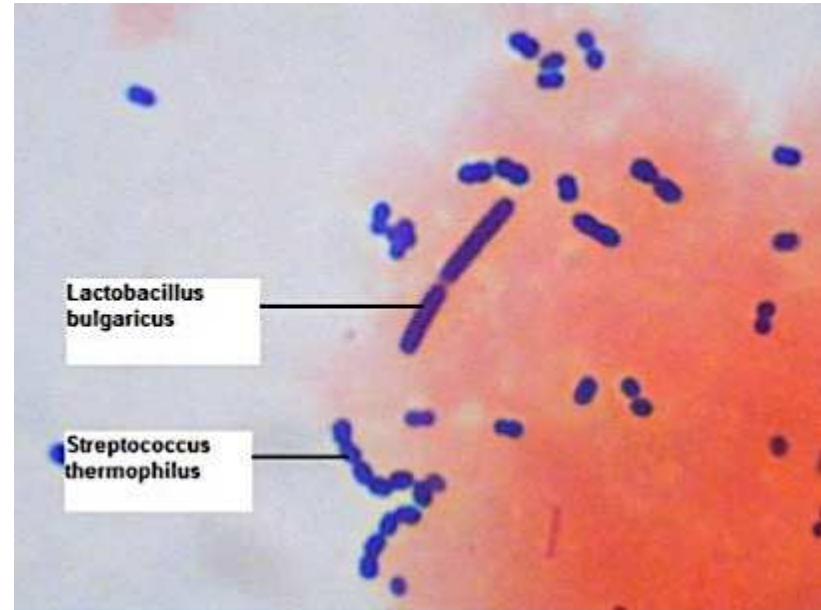
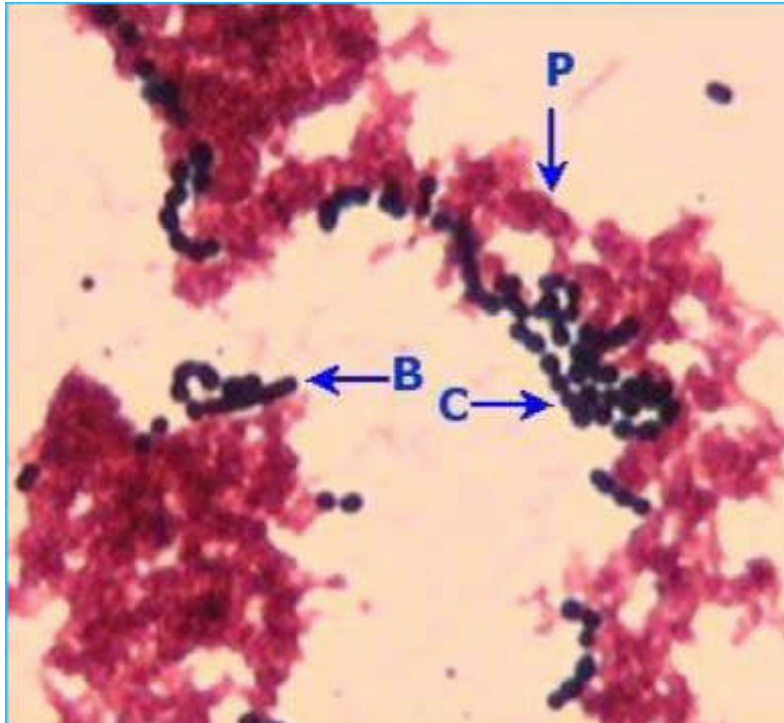


# Les bactéries du yaourt

P = protéines du lait

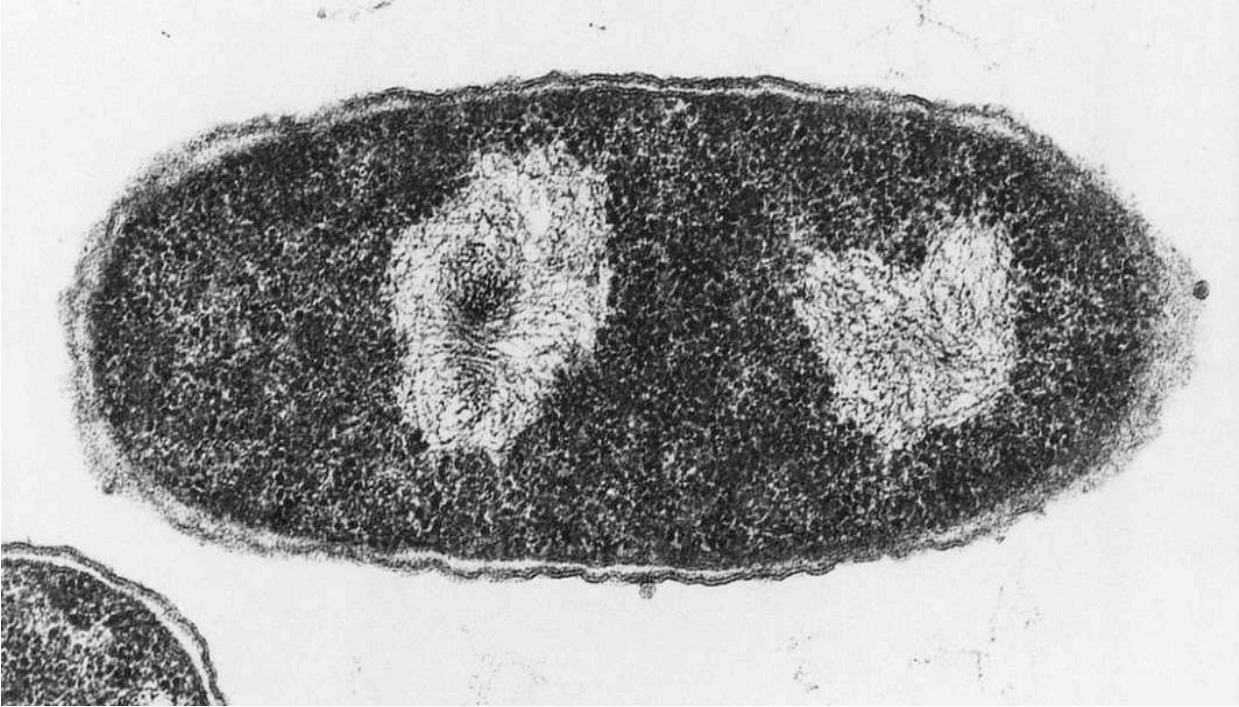
B = Bacilles

C = coques



Source : JL Domec

# *Escherichia coli* au MET

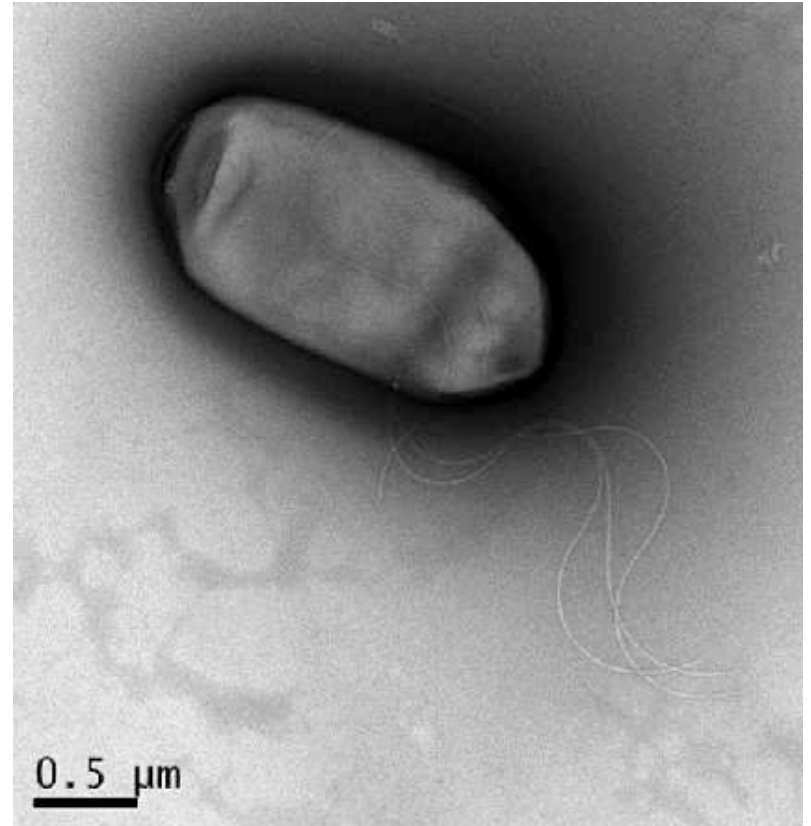


*Bactérie Escherichia coli x 150 000. (source : Science Photo Library, Menge et Wurtz)*

# *Rhizobium* dans le sol au MO et MET



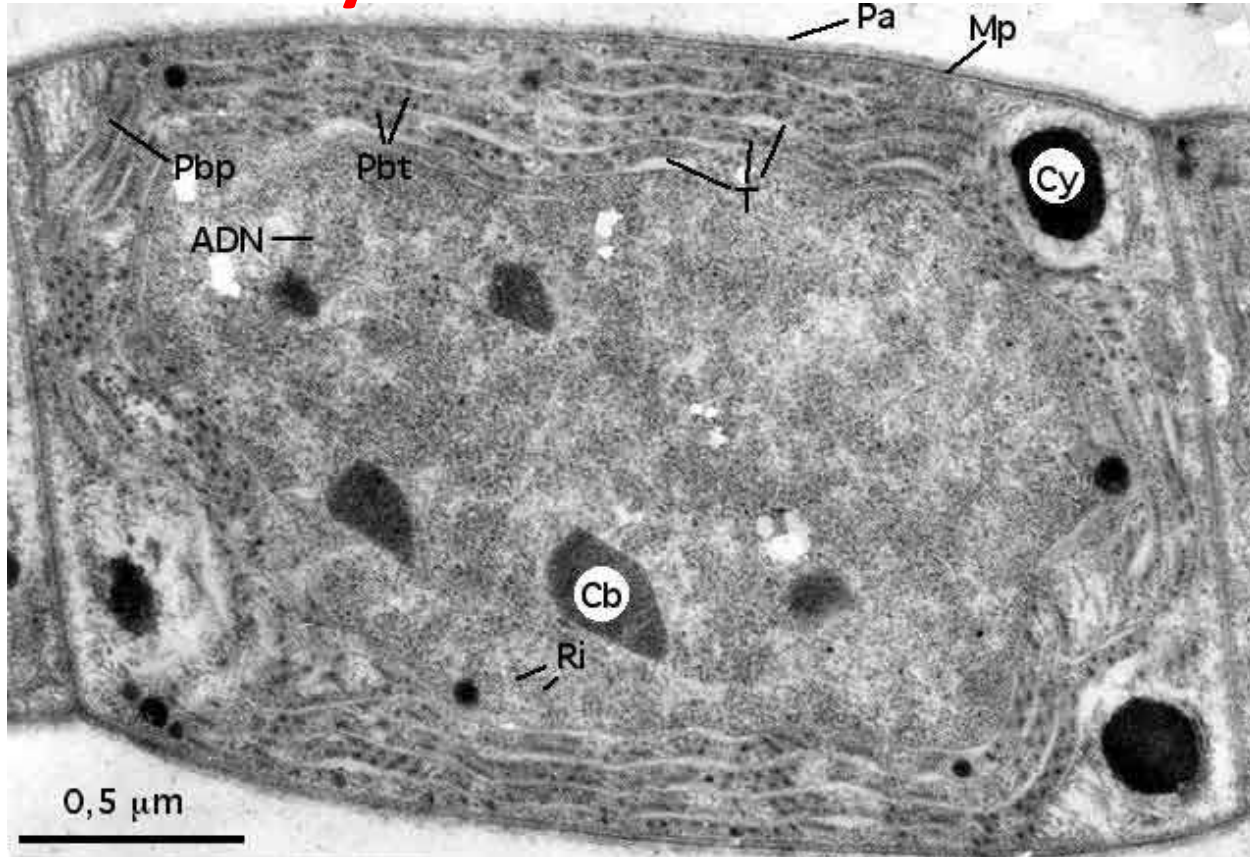
*Observation de bactéries Rhizobium du sol après coloration de Gram. (Source : thèse de A. Dekak)*



*Rhizobium souche RH84 (source : Jang et al, Journal of Applied Biological Chemistry, 2013)*



# Les Cyanobactéries au MET



*Micrographie de la bactérie filamenteuse Oscillatoria splendida (source : snv-jussieu)*

# **3) Les cellules eucaryotes et leurs organites**

# Cellules d'élodée





# Cellules d'épiderme d'oignon

dans de l'eau distillée

**TURGESCENTE**

*photo C. Escuyer*

x100

*photo C. Escuyer*

x100

**PLASMOLYSE**

dans une solution de  $[NaCl]$  2M

# Amyloplastes isolés de parenchyme de tubercule

x 40

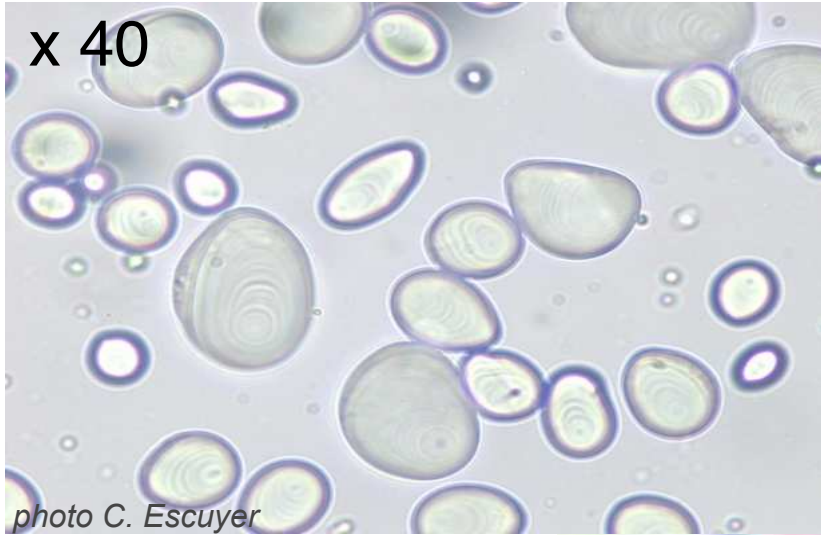
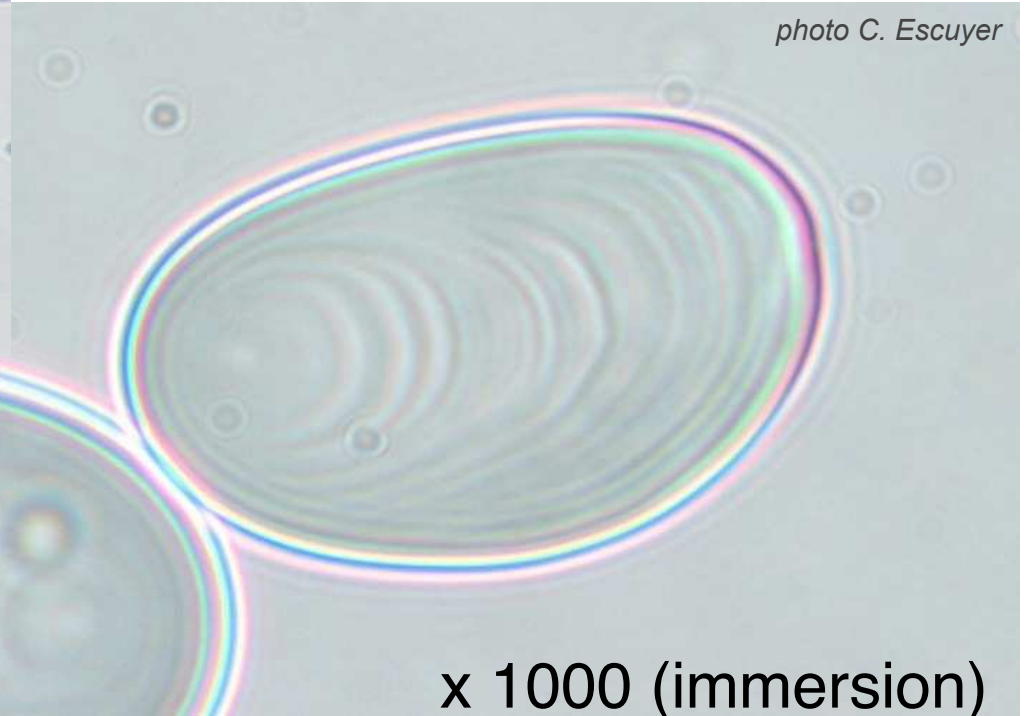


photo C. Escuyer

avec lugol dilué

photo C. Escuyer



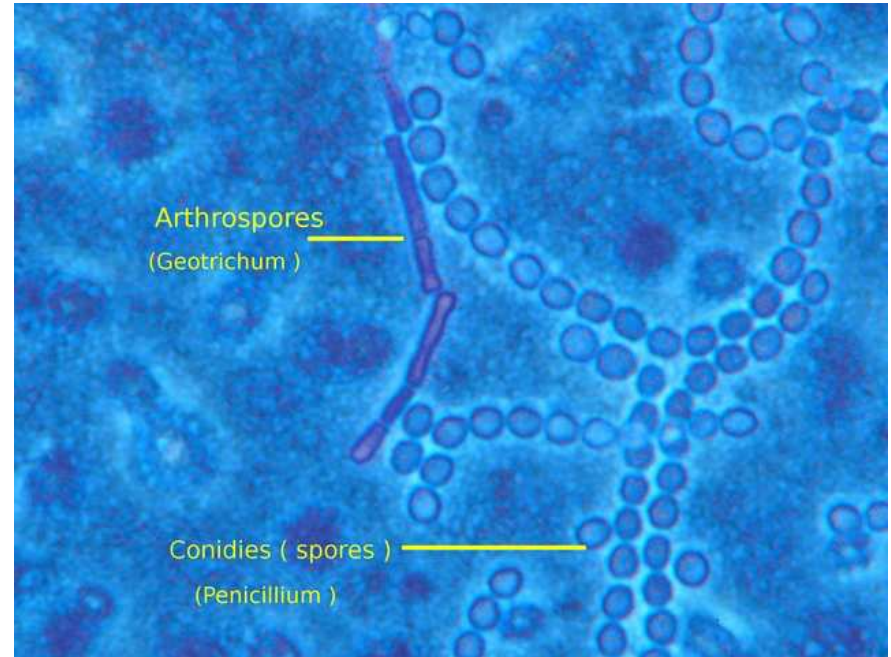
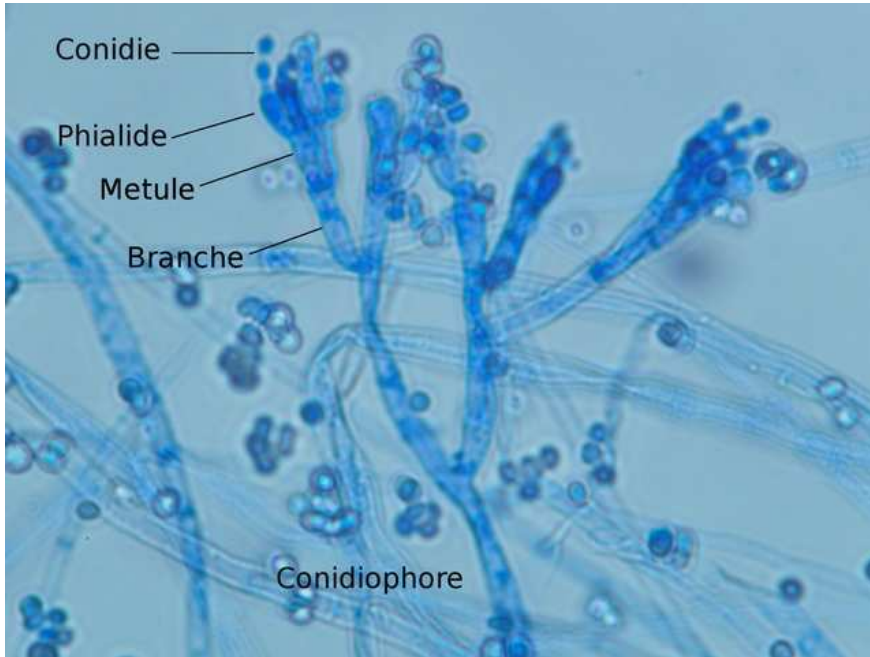
amyloplastes

x 1000 (immersion)

# Cellules buccales



# Cellules de *Penicillium*

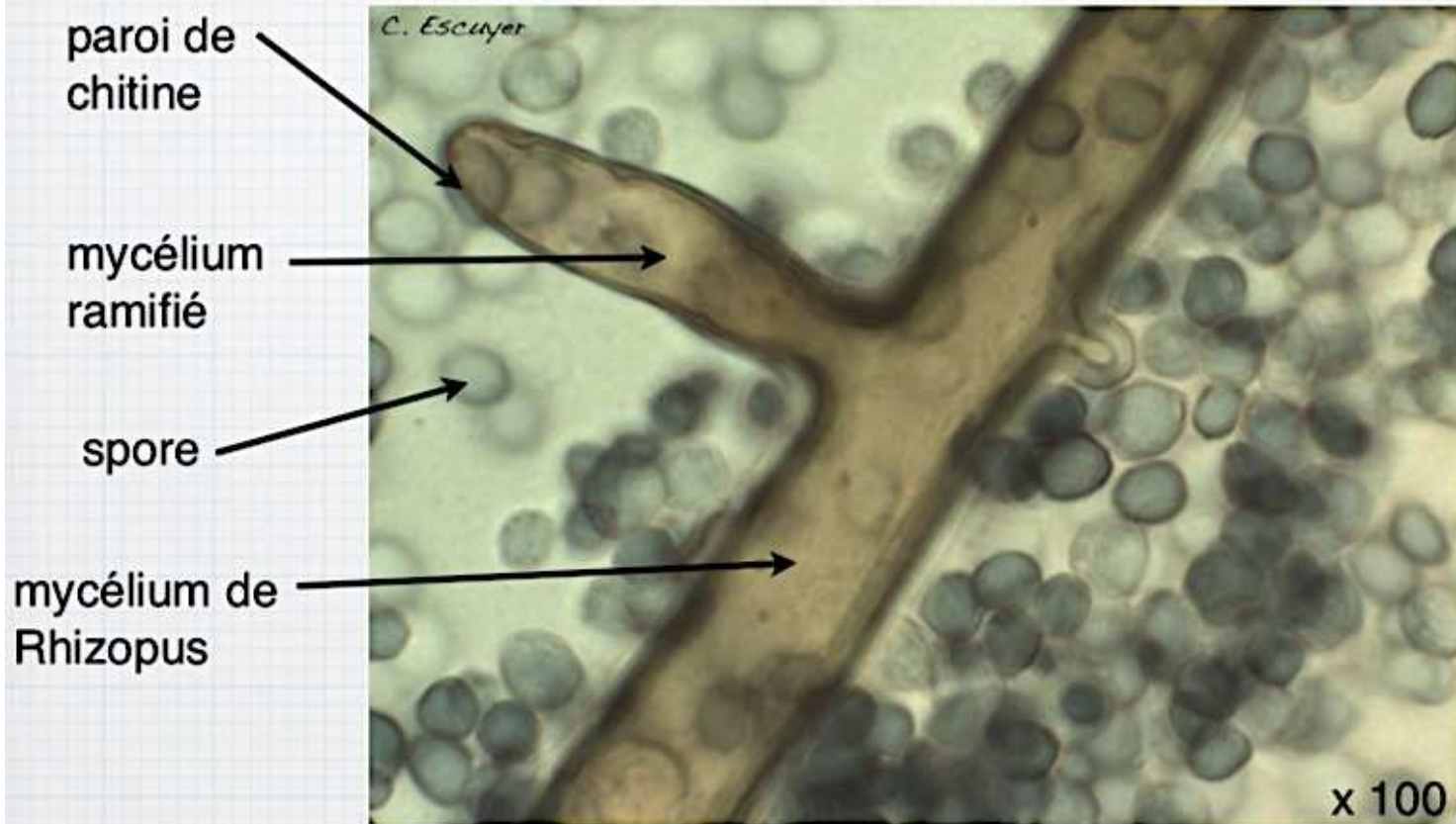


MO x 600

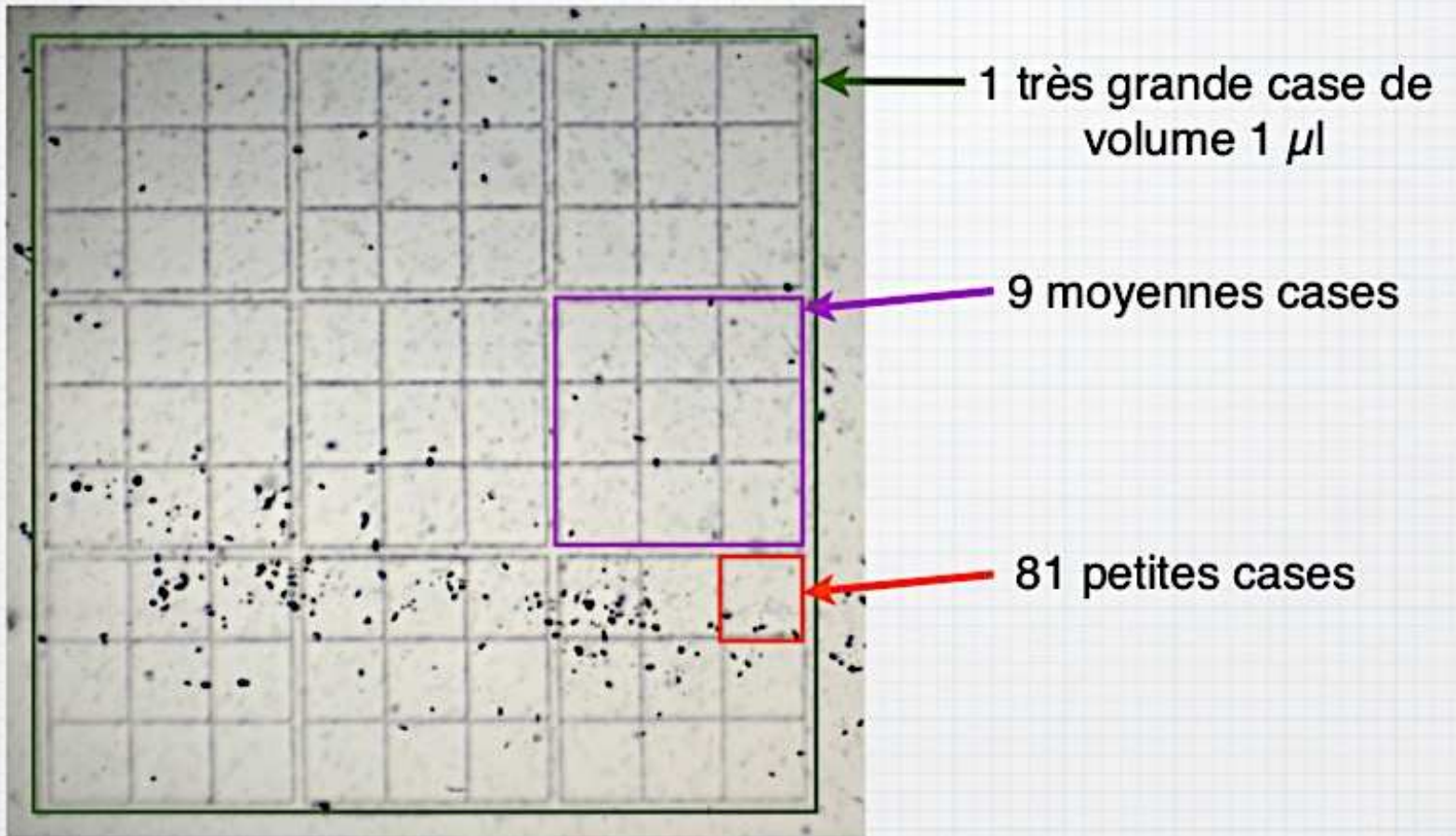


# Cellules de moisissure de pain

coloration au bleu de coton lactique



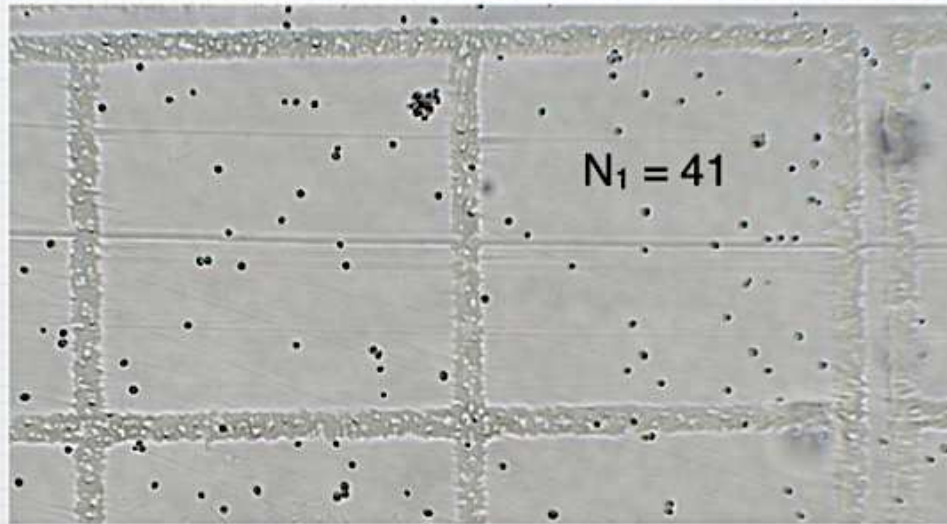
# Comptage de Levures et lame Kova



# Comptage de Levures et lame Kova

## Comptage de Levures

- on ne compte pas les levures sur les lignes ou entre les cases => on perd 10% du nombre : on multipliera par 1,1;
- on compte les levures dans une petite case ou une moyenne case.



Comptage dans une **petite** case de  $N_1$  levures

concentration en levures =  $N_1 \times 81 \times 1,1$  en nombre de levures par  $\mu\text{l}$

ici estimation de  $41 \times 81 \times 1,1 = 3\,653$  levures. $\mu\text{l}^{-1} = 3,6 \cdot 10^6$  levures. $\text{ml}^{-1}$

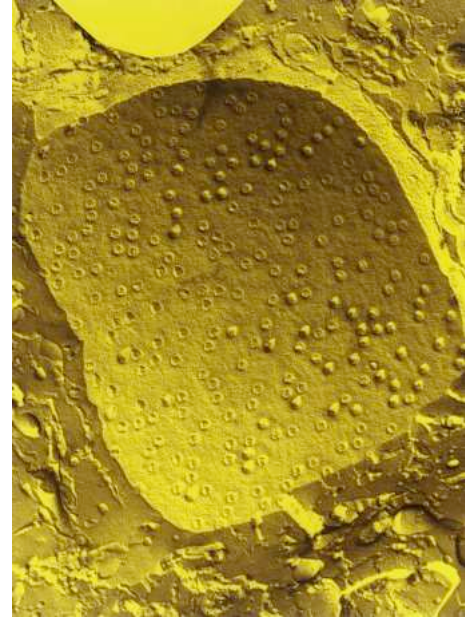
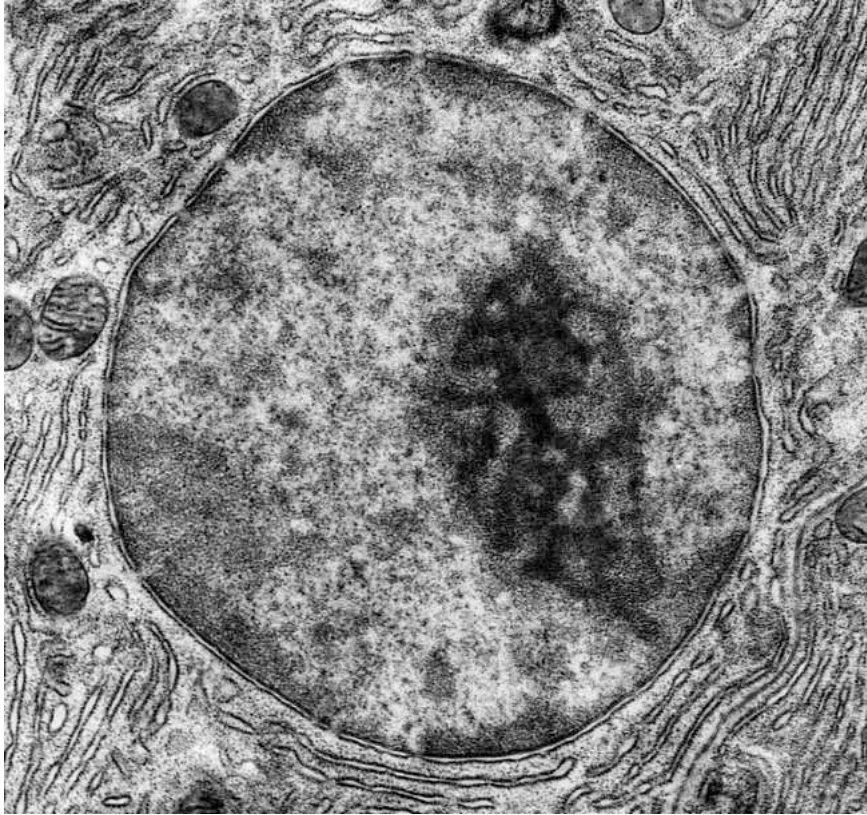
# La coloration

Colorant	Couleur	Constituant rendu visible
Hématoxyline	bleu violacé	noyau, ribosome, REG
Éosine	rougeâtre à rose vif	cytoplasme, parois et fibres extracellulaires
Bleu de méthylène	bleu	toute la cellule mais noyau plus sombre
Rouge neutre	rouge	toute la cellule, surtout la vacuole
Carmin acétique	rose	ADN
Vert de méthyle acétique + pyronine	vert et rose	ADN en vert et ARN en rose (test de Brachet)
Carmin ou rouge Congo	rose	cellulose
Vert d'iode	vert	lignine
Lugol = eau iodée	violet à brun	amidon, glycogène
Rouge soudan III	lipides	

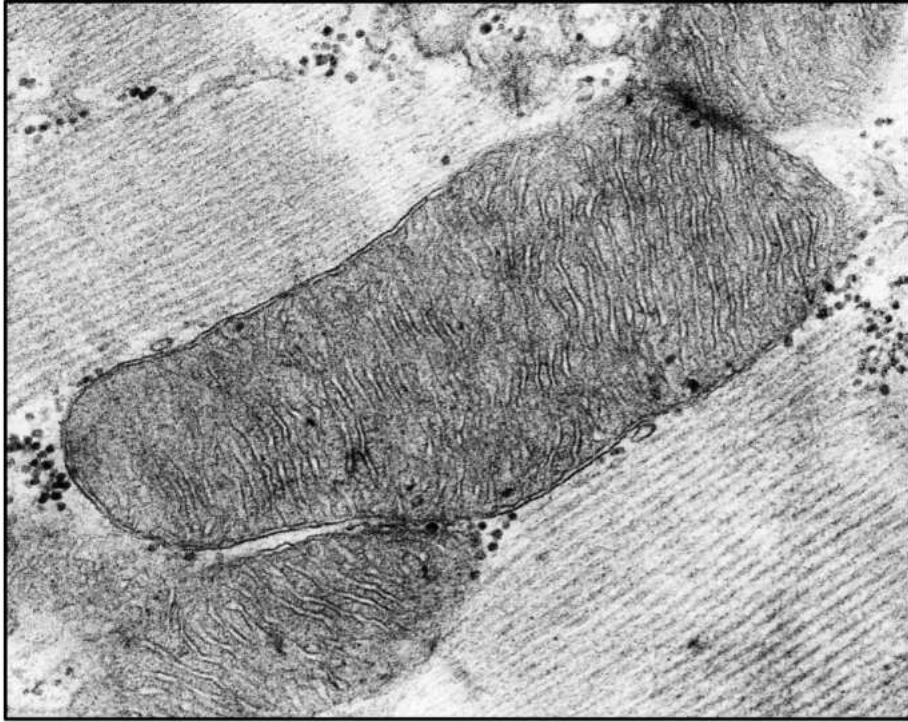


# **Ultrastructure des cellules eucaryotes au microscope électronique**

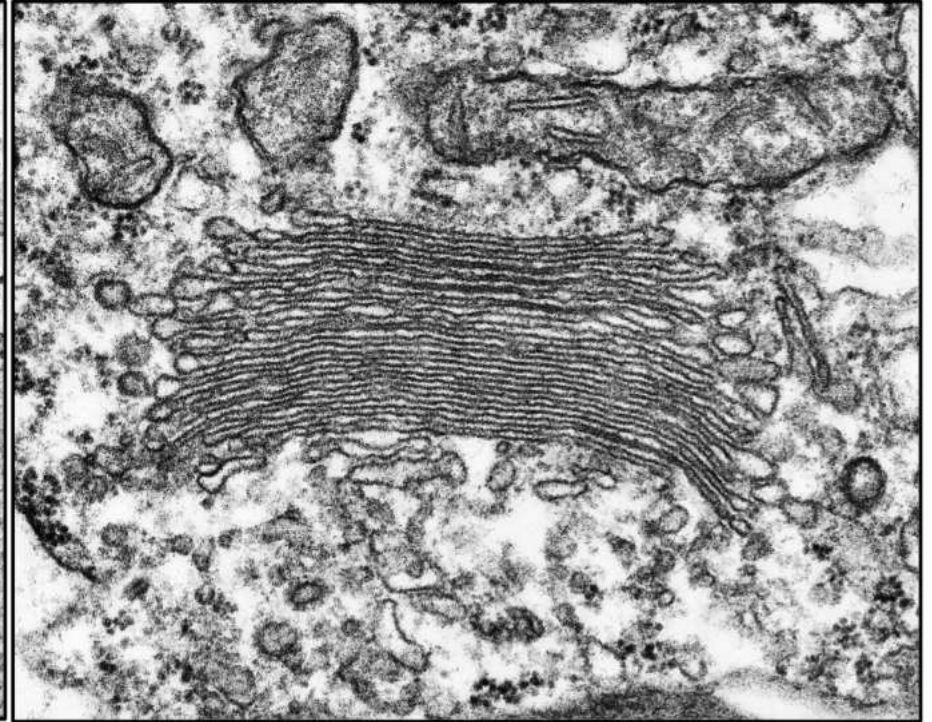
# Le noyau eucaryote



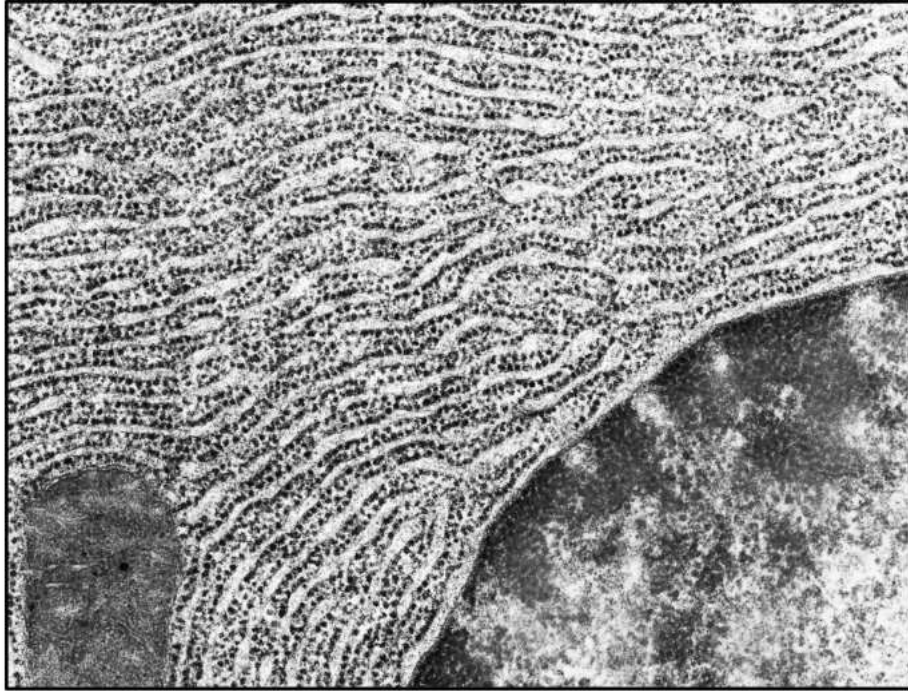
*Noyau de cellule pancréatique MET x 11 000 (Source : Don W Fawcett) et cryofracture et MEB x 20 000 (Source : Kari Lounatmaa)*



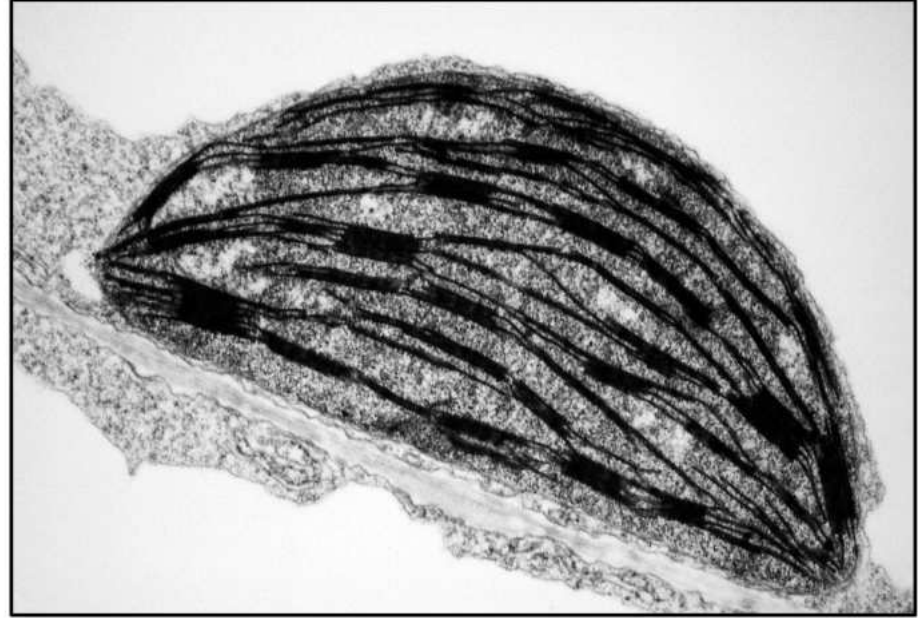
*x 48 000 (Source : Dennis Kunkel)*



*x 40 000 (Source : Dennis Kunkel)*



*x 27 000 (Source AMMRF – Science Photo Library)*

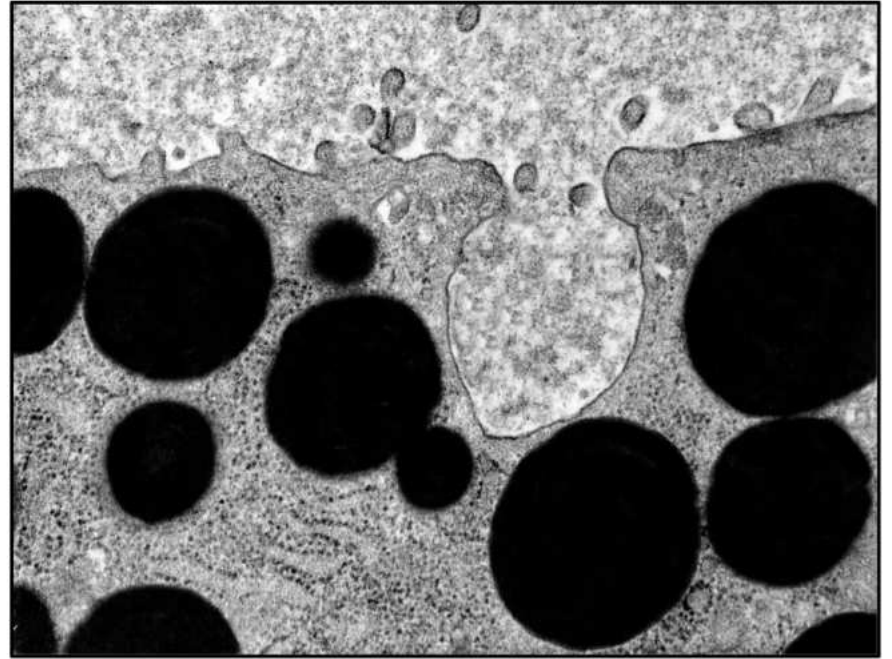


*x 12 000 (Source : Dr Burgess)*



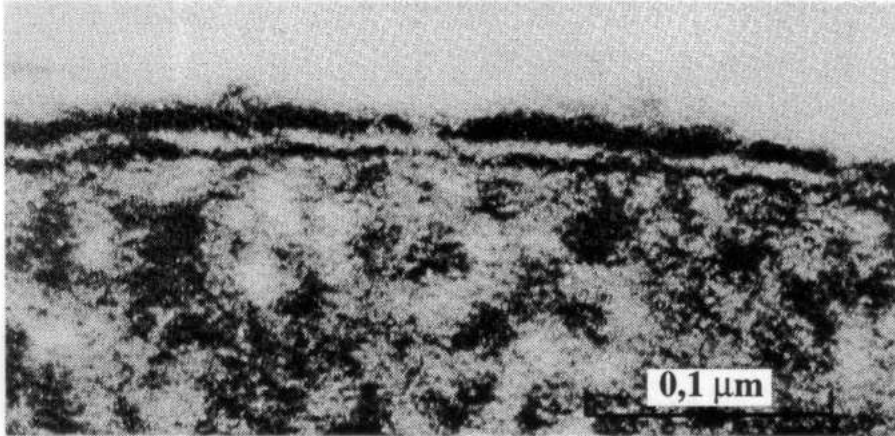


*x 10 000 (Source : Murtal Gurti)*

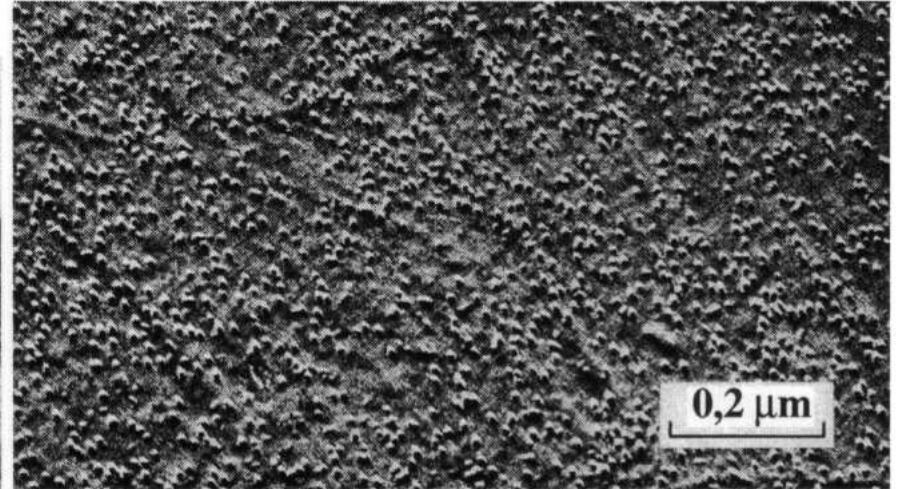


*x 50 000 (Source : Jose Calvo)*

# La membrane plasmique



*Micrographie de la membrane plasmique en coupe*

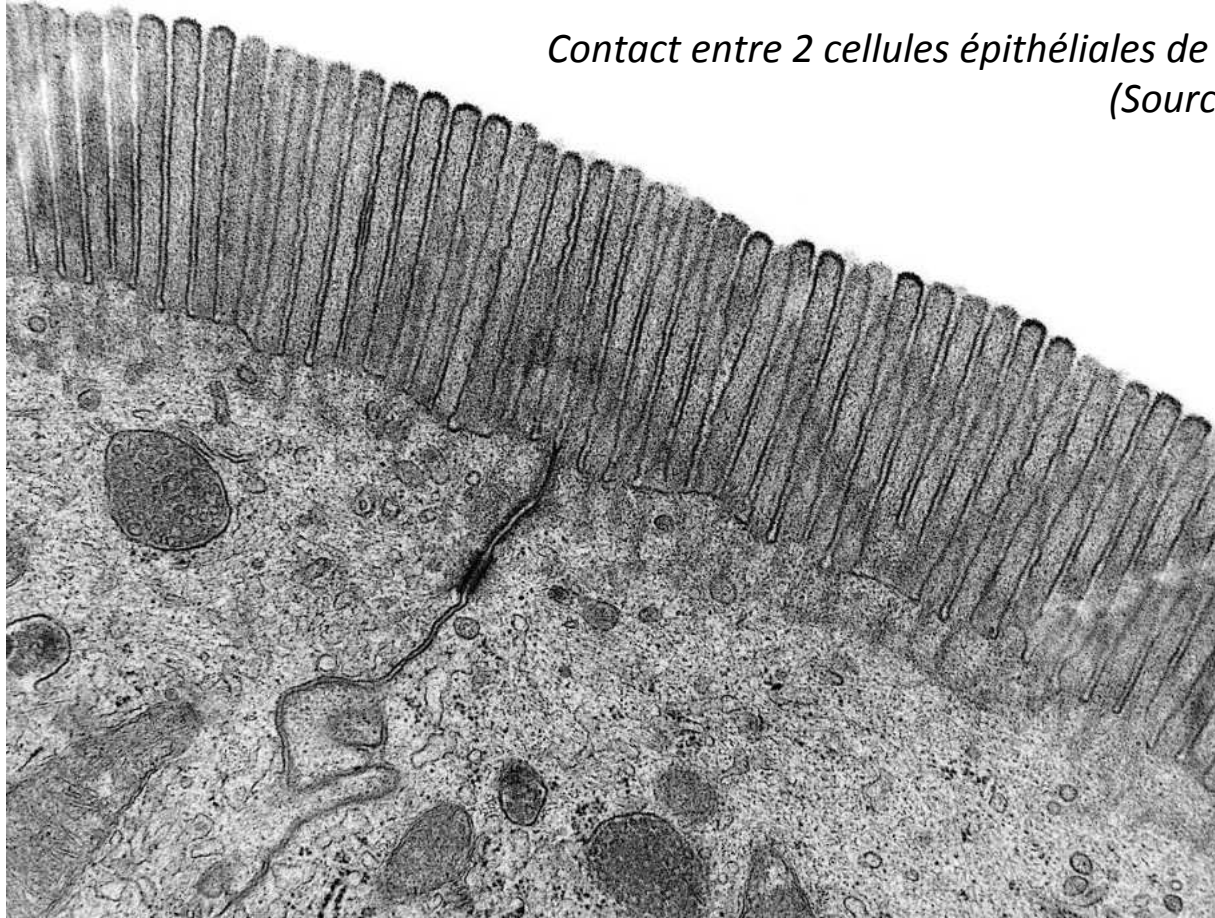


*Image de la structure particulière de la membrane (cryofracture)*

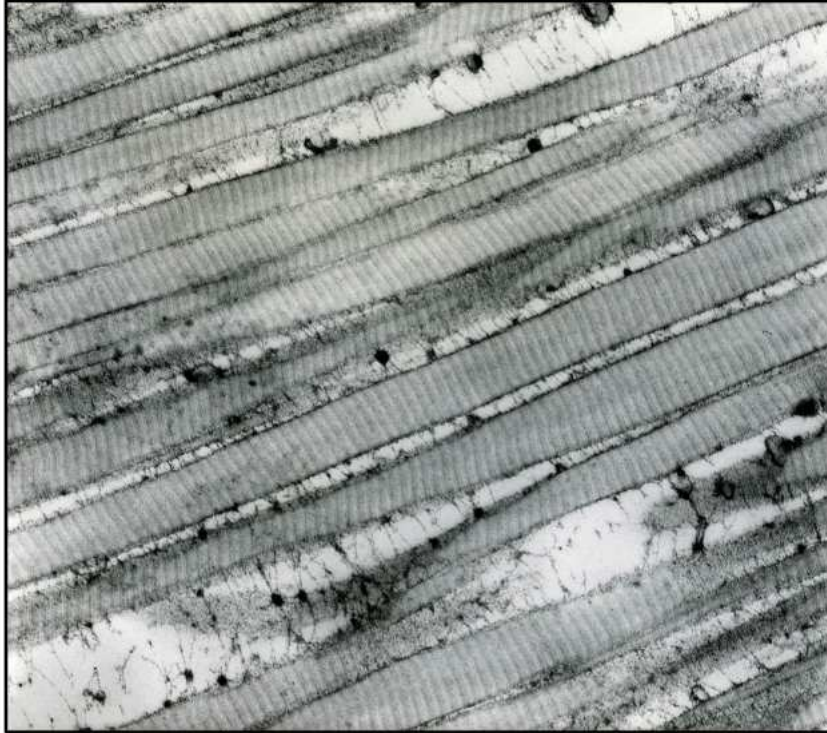


# L'épithélium intestinal et ses jonctions cellulaires

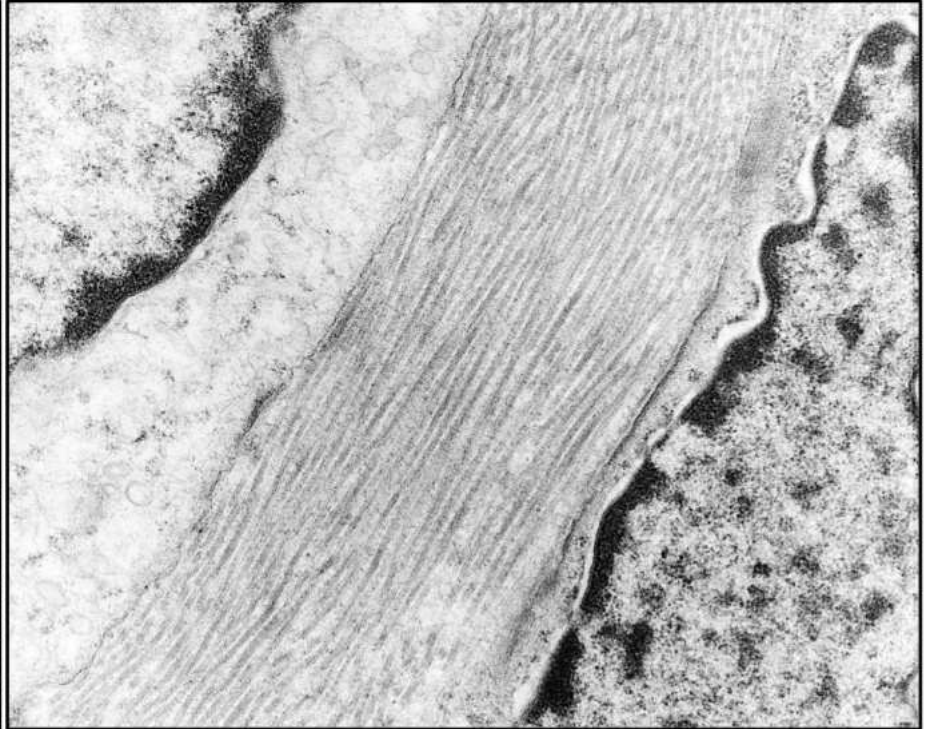
*Contact entre 2 cellules épithéliales de l'intestin x 44 200  
(Source : Dennis Kunkel)*



# La matrice extra-cellulaire animale



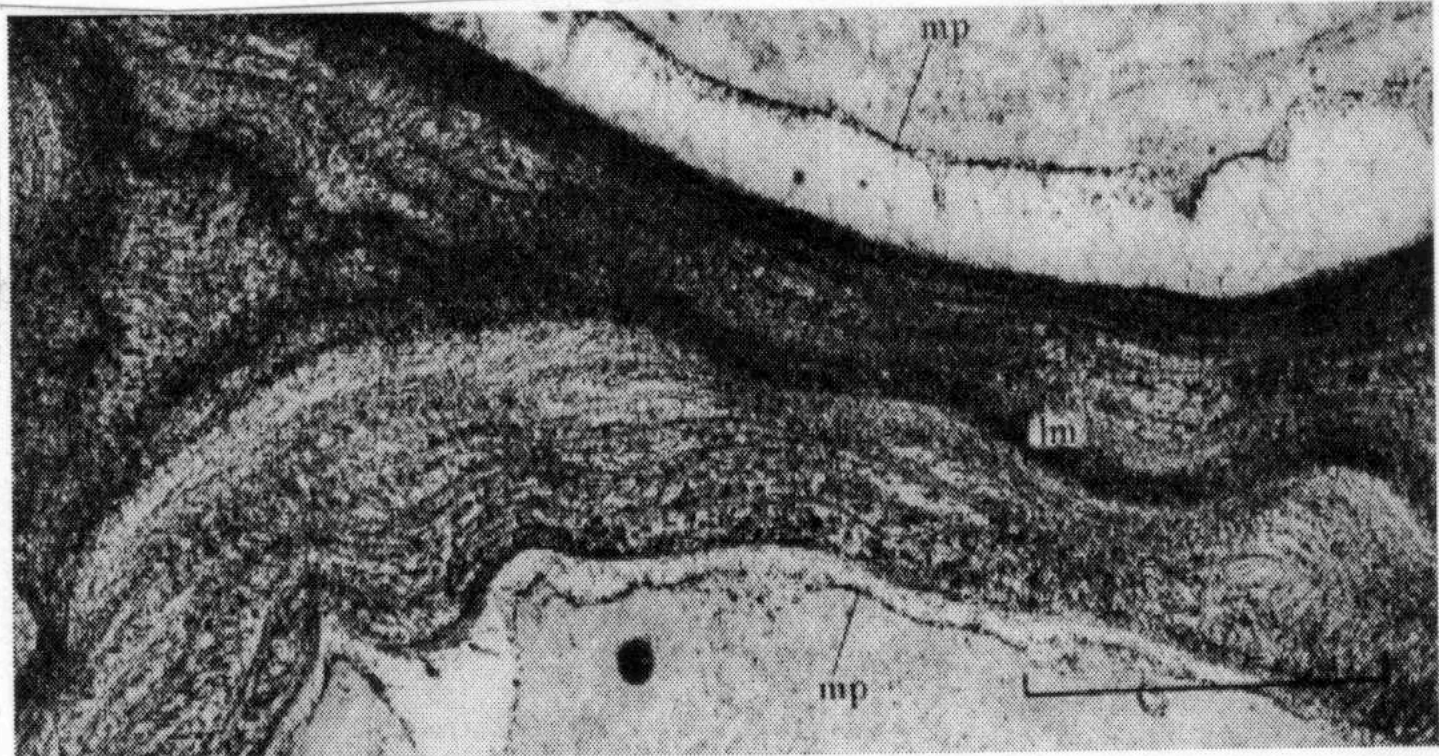
*Grosses fibres de collagène vu en MET x 18 000*  
*Source Microscape*



*Fibres de collagène x 15 000*  
*Source : Dennis Kunkel*

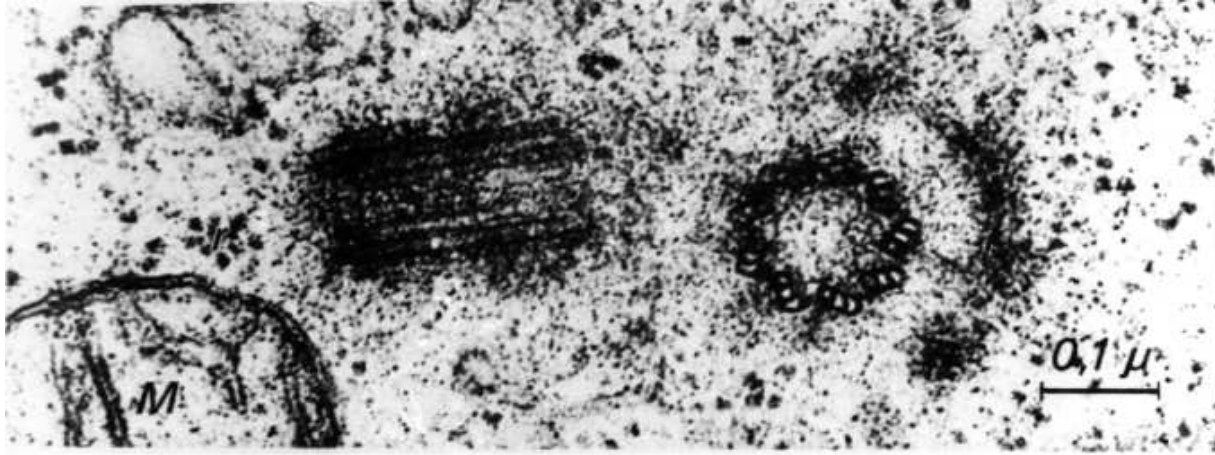


# La paroi pecto-cellulosique végétale

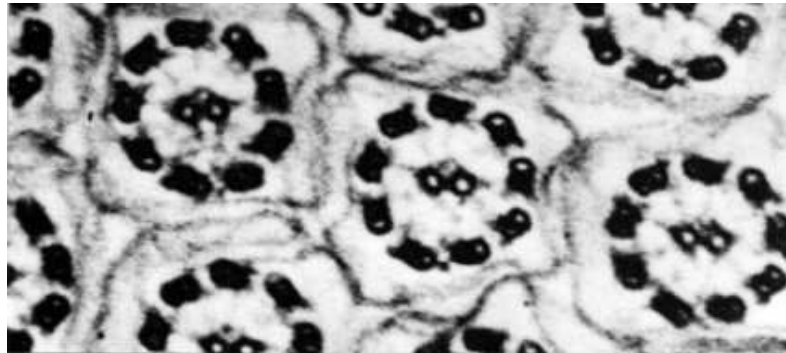


*Micrographie en MET (x 45 000) de la paroi d'une cellule végétale de racine de Pois  
mp = membrane plasmique, lm = lamelle moyenne*

# Les microtubules



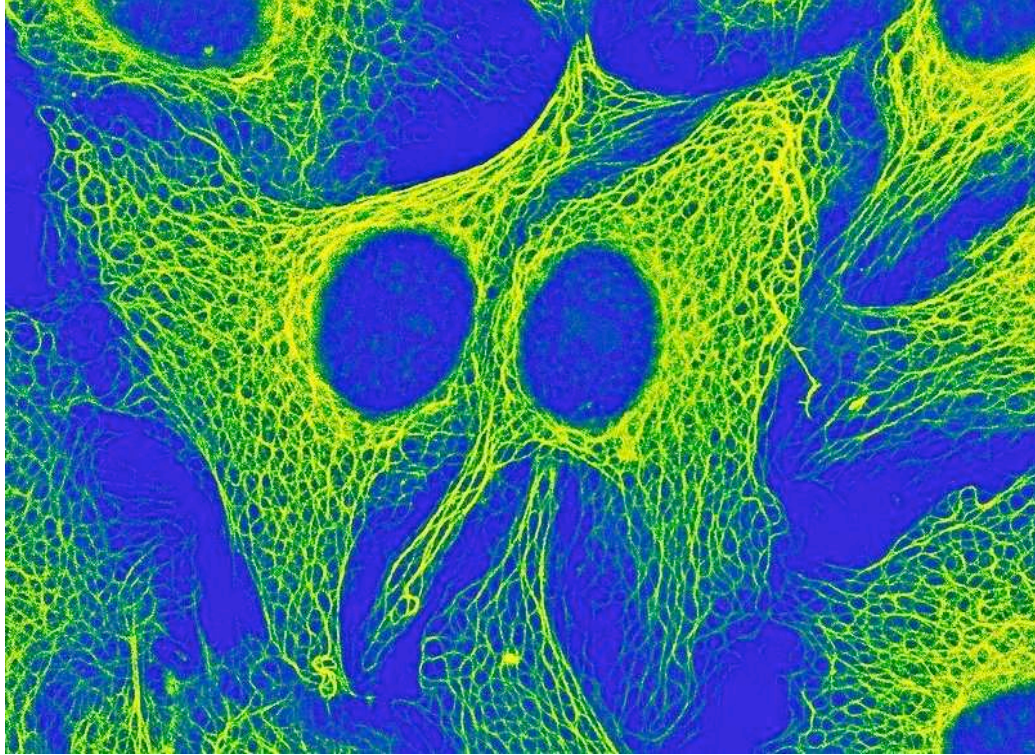
*Images en MET de centrioles*



*CT de cils (x 150 000)*

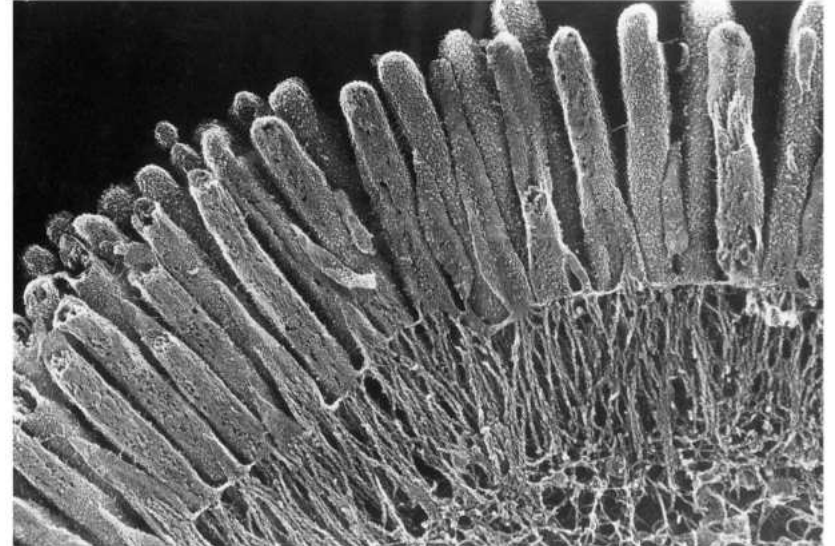
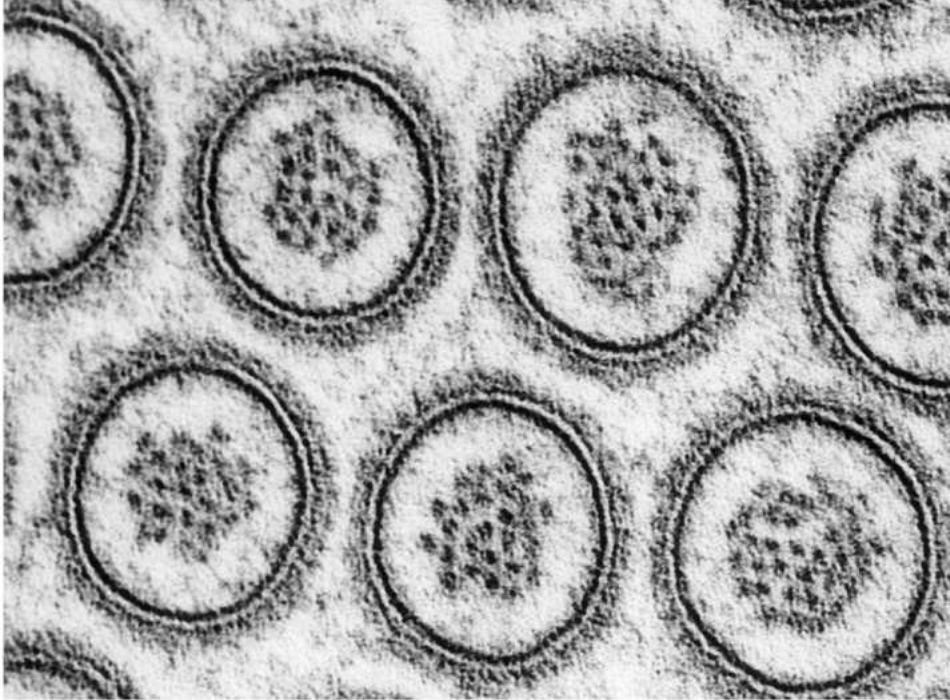


# Les filaments de kératine vus en fluorescence



*Cellules épidermiques avec anticorps fluorescents ciblés contre la kératine x 2 200*  
*Source : Science Photo Library*

# Les microfilaments d'actine



*Coupe dans des microvillosités de cellules intestinales (MET) et image de MEB  
source : Don W Fawcett*

## **4) Les tissus, assemblages de cellules spécialisées**



# Coupe de tige de Lamier

Coloration au carmin vert d'iode

*photo C. Escuyer*

épiderme

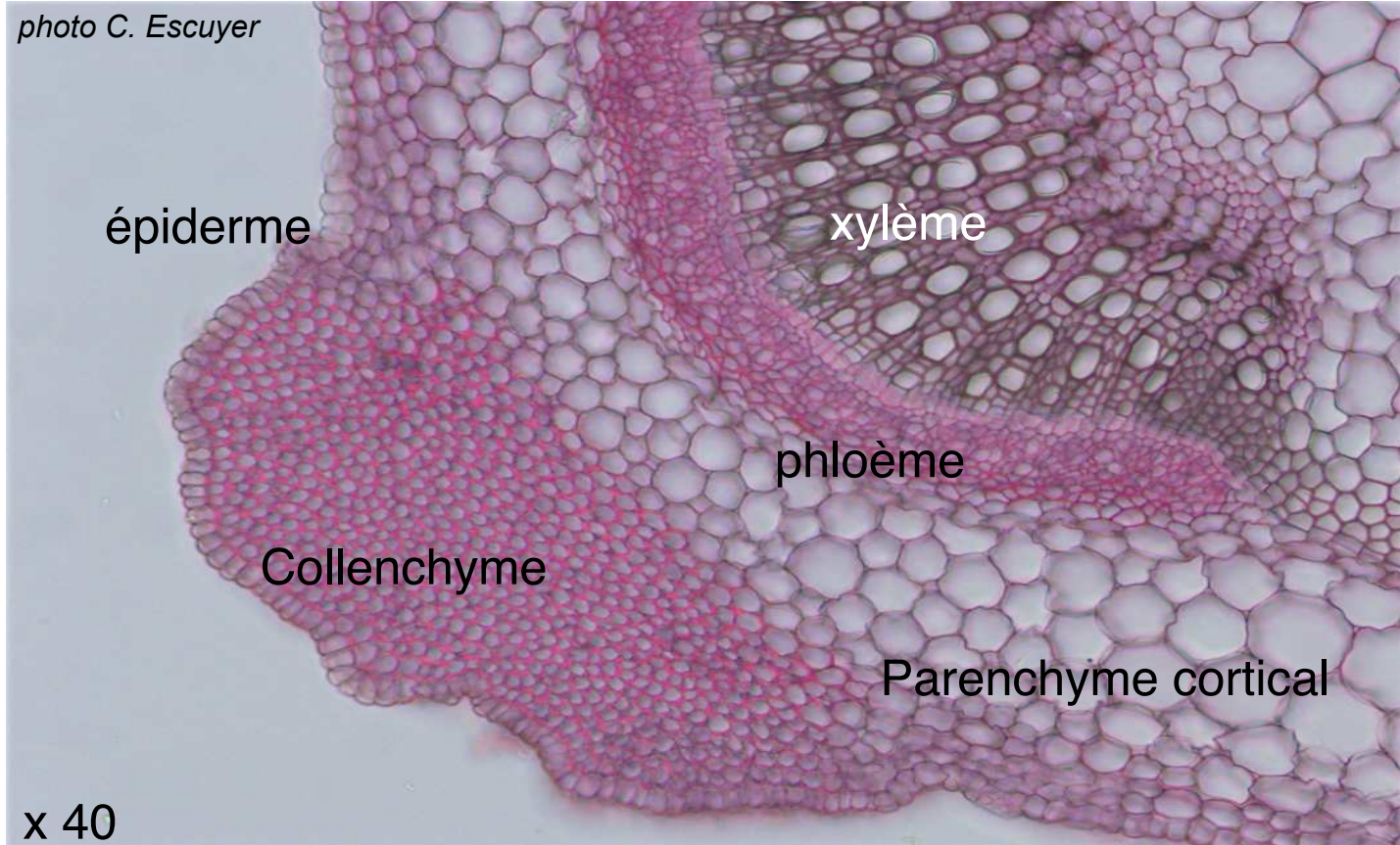
xylème

phloème

Collenchyme

Parenchyme cortical

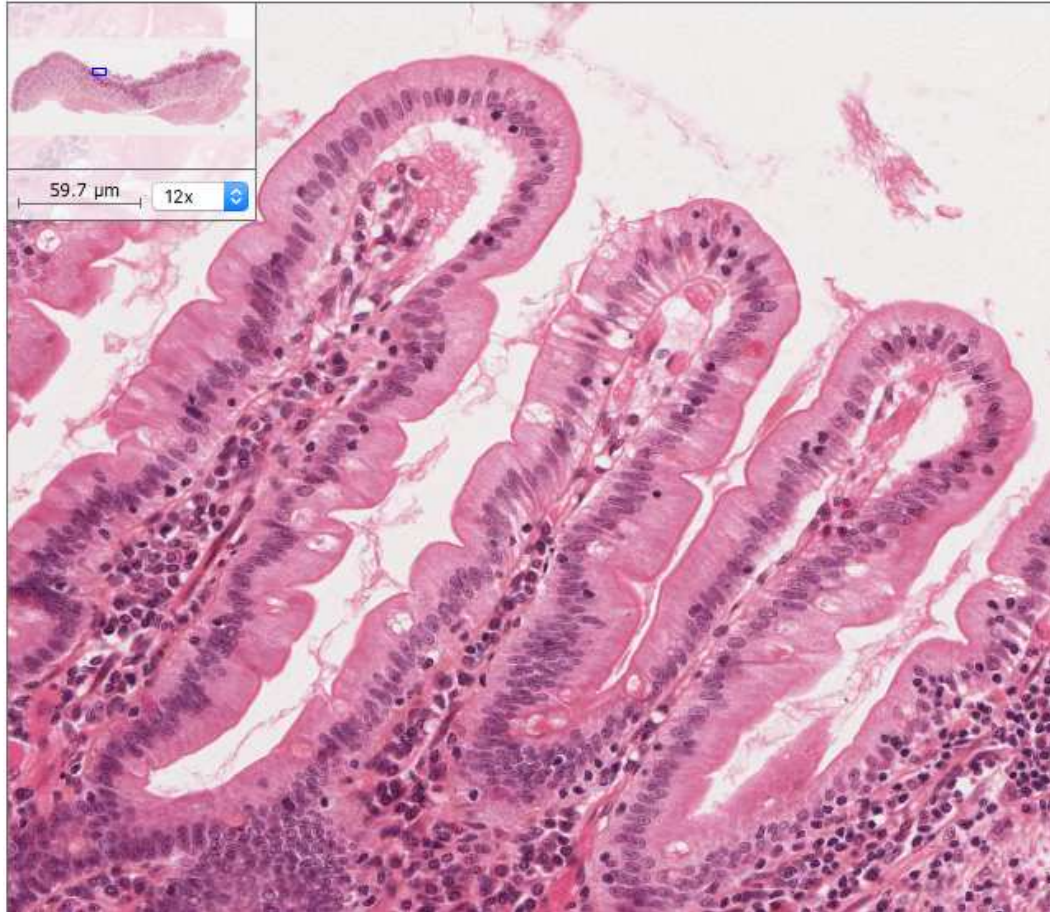
x 40

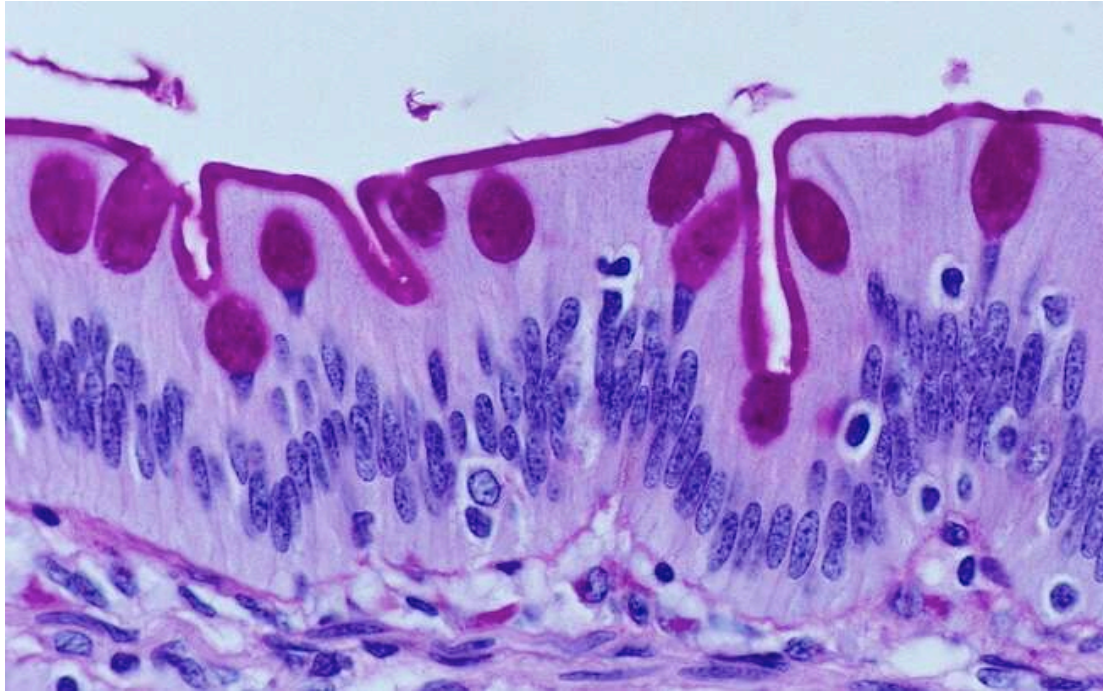


# Les tissus végétaux

Forme des cellules	Epaisseur de la paroi	Couleur de la paroi	Localisation du tissu	Nom de tissu	Catégorie du tissu
ronde	fine	rose	cœur des organes	parenchyme	remplissage +/- réserve
rectangulaire	fine	rose (+/- translucide lipidique)	surface des organes aériens	épiderme	revêtement
petites cellules	fine	rose	dans des faisceaux	phloème	tissu conducteur de sève
taille variable	un peu épaisse	vert	dans des faisceaux	xylème	
petites cellules	très épaisse	rose	variée	collenchyme	tissu de soutien
petites cellules	très épaisse	vert	variée	sclérenchyme	

# Coupe d'intestin grêle





*Épithélium intestinal en coupe vue au microscope photonique après coloration du mucus en pourpre x 600  
source : Innerspace Imagine*



# Quelques tissus animaux

Type cellulaire ou tissu	Caractéristiques, indices de reconnaissance
épithélium	Tissu fait de cellules souvent polarisées <b>très jointives</b> , pouvant présenter des cils ou microvillosités
cellule sécrétrice	Cellule montrant des vésicules de sécrétion, le plus souvent polarisée et groupée en acini
cellule musculaire lisse	Cellule allongée à noyau central, liées aux autres, souvent colorée en rose foncé
conjonctif non minéralisé	Tissu de fibroblastes (cellules allongées à très gros noyau) dans une matrice fibreuse (collagène, fibres élastiques...) souvent colorée en bleu
capillaire	Ensemble de cellules endothéliales repliées sur elles-mêmes, formant un tube fin (diamètre : 2 à 15 $\mu\text{m}$ ), pouvant abriter des hématies (cellules orangées anucléées chez les Mammifères)

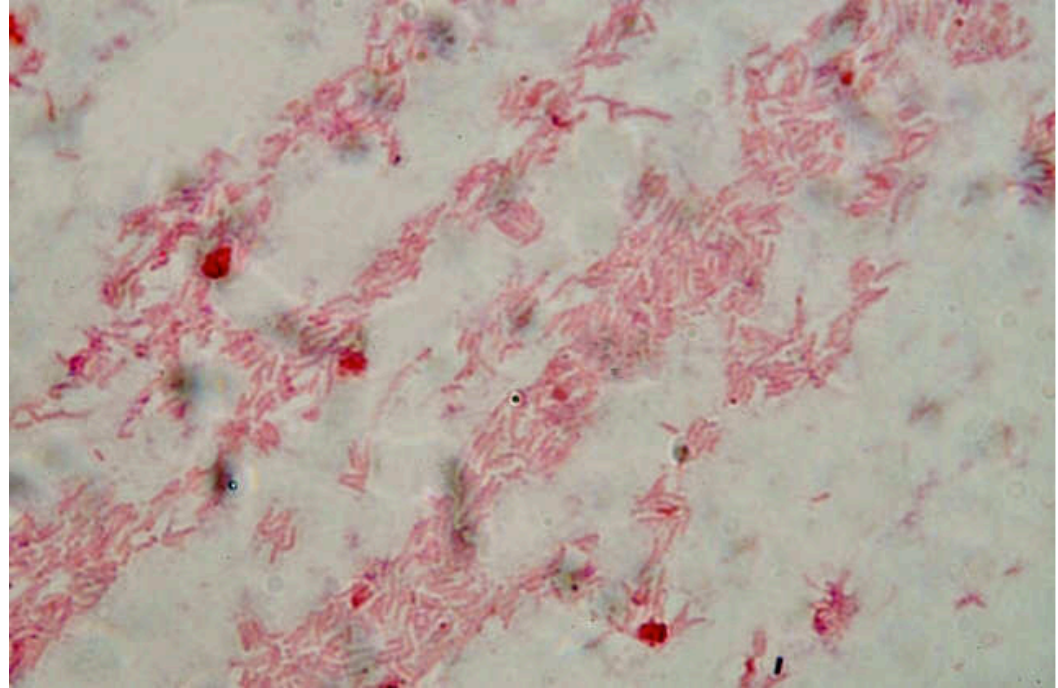


## **5) Les associations symbiotiques**

# Les nodosités

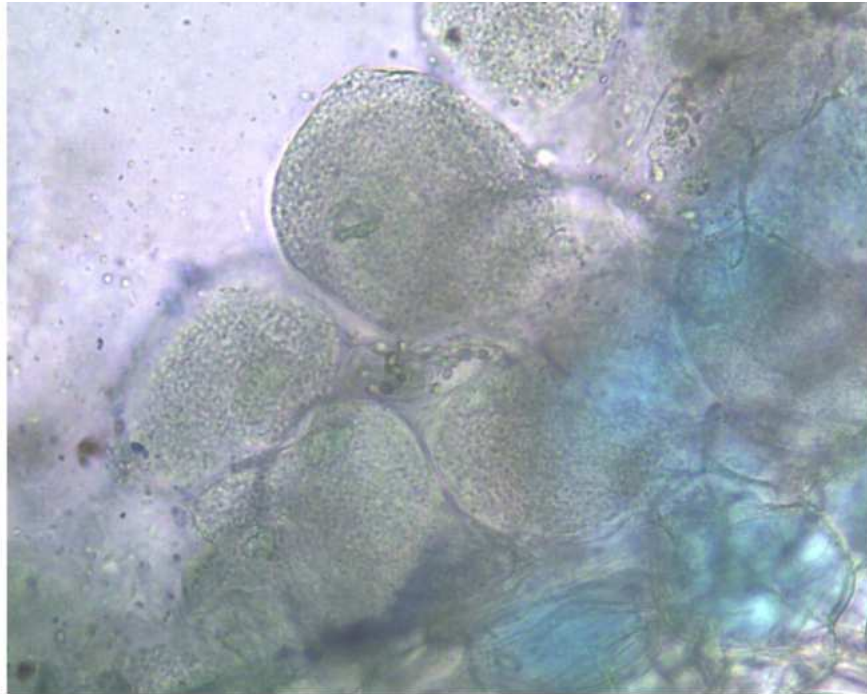


*Nodosités de Haricot (Science Photo Library)*



*Frottis de nodule de Haricot et coloration de Gram puis observation au microscope photonique (x 1000)*

# Les nodosités

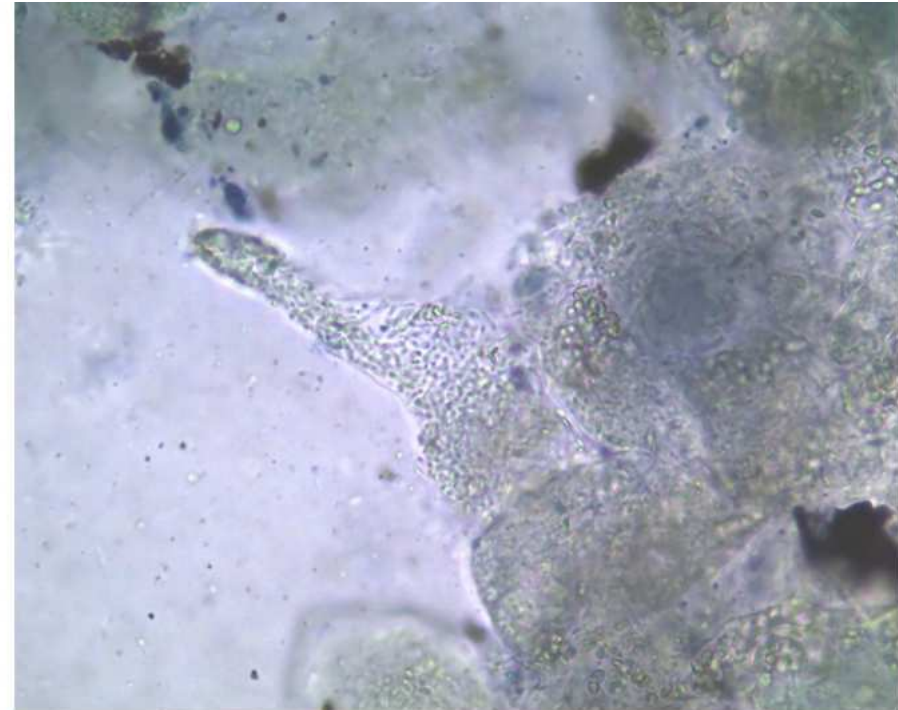


20 µm obj. x40 R = 1:1,7

Micro / Bino : paralux L3000 - Photo : microcular3MP

**Rhizobium du trèfle**

Fond clair - Prép : Eau - Colo : Bleu de méthylène  
Olivier BARTH - 06/10/2012



20 µm obj. x40 R = 1:1,7

Micro / Bino : paralux L3000 - Photo : microcular3MP

**Rhizobium du trèfle**

Fond clair - Prép : Eau - Colo : Bleu de méthylène  
Olivier BARTH - 06/10/2012

*Frottis de nodosité de Trèfle et coloration au bleu de méthylène  
puis observation au microscope photonique (x 1000)*

Source : Olivier Barth, [lenaturaliste.net](http://lenaturaliste.net)

# Rhizobium et nodosités



*Frottis de nodosité de Trèfle et coloration au bleu de méthylène puis observation au microscope photonique (x 1000)*

20 µm obj. x100 R = 1:1,7

Micro / Bino : paralux L3000 - Photo : microcular3MP

**Rhizobium du trèfle**

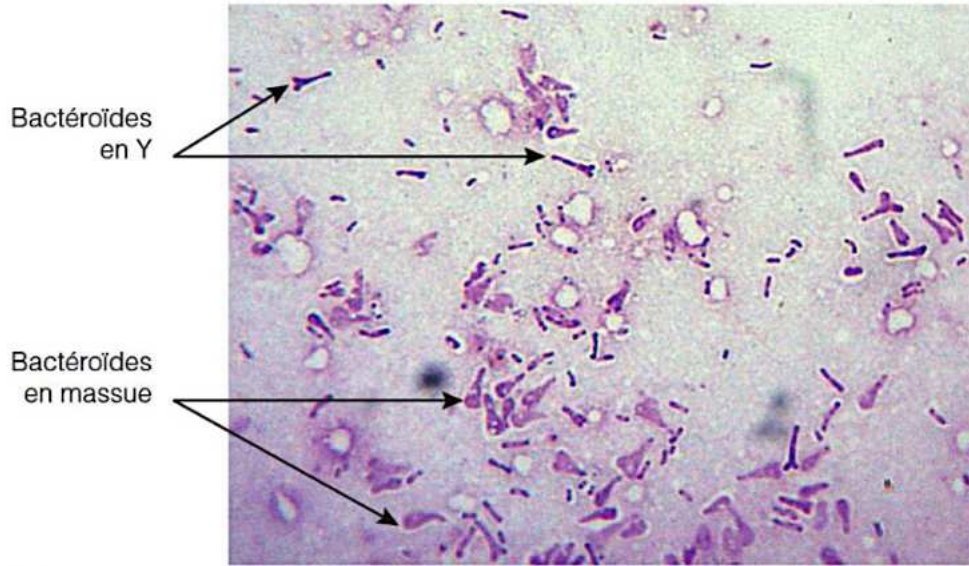
Fond clair - Prép : Eau - Colo : Bleu de méthylène

Olivier BARTH - 06/10/2012

Source : Olivier Barth, [lenaturaliste.net](http://lenaturaliste.net)



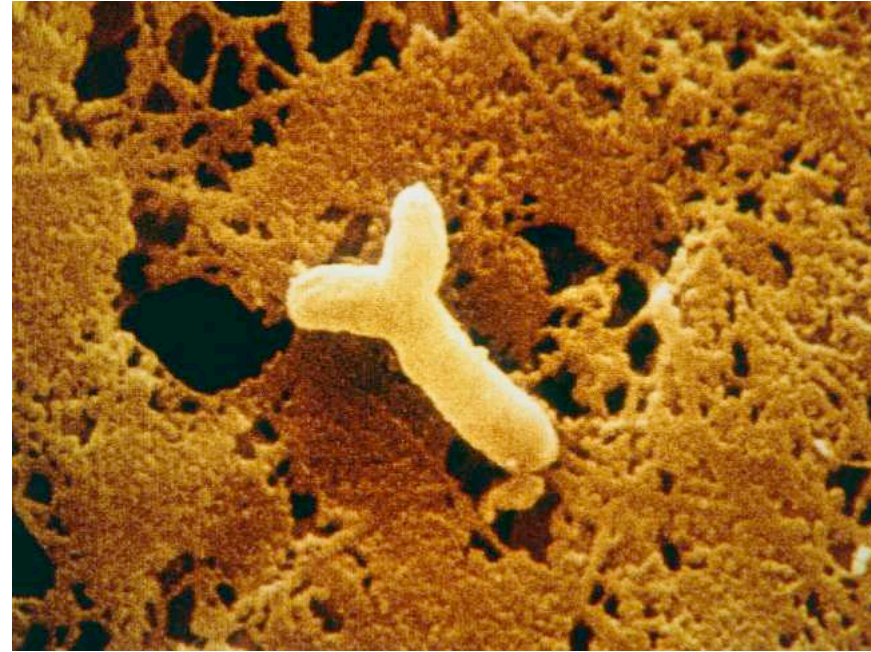
# Les nodosités



## Figure

Bactéries du genre *Rhizobium* colorées par un test de Gram après dissociation d'une nodosité et étalement de son contenu (frottis)

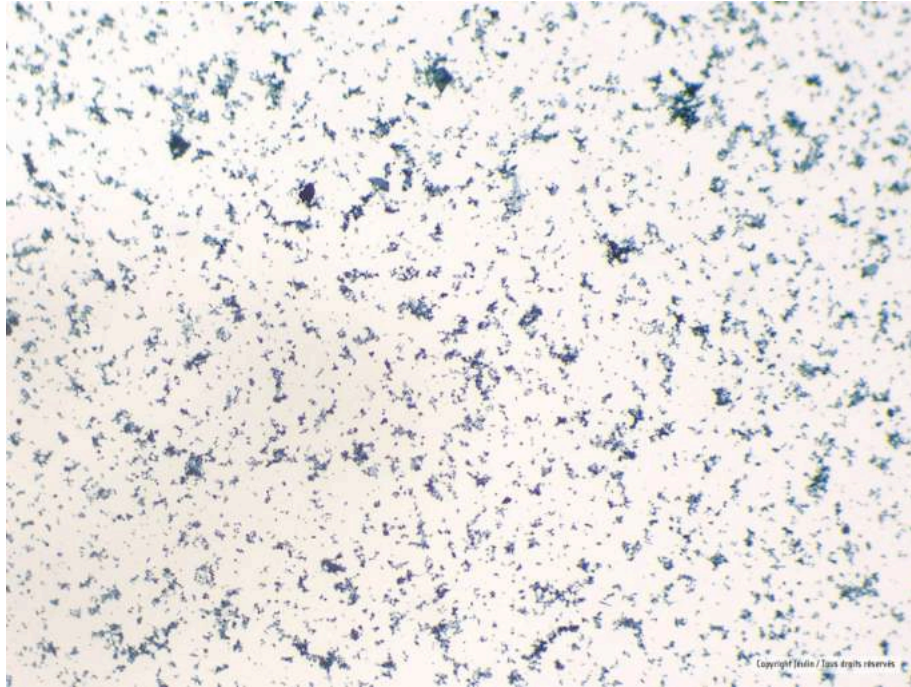
10 µm



*Bactéroïde intracellulaire de Rhizobium leguminosarum.*  
*L'image est agrandie 6500 fois si la hauteur de la photo mesure 4 cm (source : Science Photo Library).*



# Le microbiote intestinal



*Bactéries de l'intestin après frottis du contenu intestinal et coloration de Gram (Source : Jeulin).*

# Bilan sur les cellules

Noyau visible		Organites et caractères spécifiques	Taille des cellules	
non	Procaryote	absence d'organites, paroi	1 à 2 $\mu\text{m}$	Eubactérie
oui	Eucaryote	ni paroi, ni vacuole, ni plaste	10 à 20 $\mu\text{m}$	Cellule animale
		paroi pecto-cellulosique, vacuole, plastes, forme souvent géométrique	50 à 250 $\mu\text{m}$	Cellule végétale
		paroi de chitine, vacuole, pas de plaste, cellules en filaments	50 à 200 $\mu\text{m}$ de long	Champignon