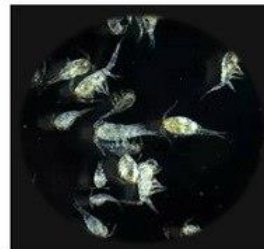
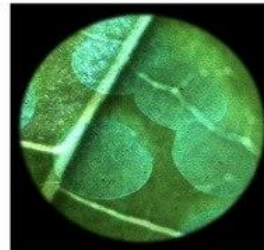
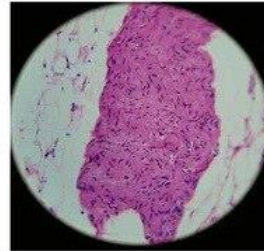


Module : Biologie Cellulaire



Manuel des travaux pratiques

Filière : DUT Agro-Industrie

**Réalisé par :
Dr. Khalid BOUTOIAL & Dr. Malika OURIBANE et
Dr. L. Hasna ZINELABIDINE**

Année Universitaire : 2020-2021

Conseils généraux

Les TP sont obligatoires : l'élément de Biologie Cellulaire ne pourra pas être validé sans note de TP.

Aucun étudiant(e) ne pourra changer de groupe de TP.

La séance de TP devra être préparée à l'avance.

Le port de la blouse est obligatoire en TP.

Chaque étudiant(e) doit nettoyer son paillasse avant d'abandonner la salle de TP.

Un travail mal présenté, qui manque de soin ou de rigueur est sanctionné par le responsable de TP.

SOMMAIRE

TP N° 1. INITIATION A LA MICROSCOPIE.....	2
TP N° 2 : ETUDE DE LA CELLULE ANIMALE ET VEGETALE.....	9
TP N° 3. ETUDE DES PLASTES.....	14
TP N°4. ECHANGES CELLULAIRES.....	19

TP N^o 1. INITIATION A LA MICROSCOPIE

I. Introduction :

L'œil humain ne peut distinguer des objets mesurant moins de 0,2 mm. Le microscope devient donc nécessaire pour l'observation de certains éléments biologiques et organismes dont les dimensions sont de l'ordre de micron (μm). Les connaissances sur les cellules ont progressés avec la mise au point d'instruments d'observation (microscopes), de plus en plus perfectionnés, ainsi qu'avec l'élaboration de techniques appropriées. Le développement de la cytologie est donc lié aux progrès des techniques accomplis dans le domaine de l'optique. En effet, si les loupes étaient déjà connues du temps des Grecs, les premiers microscopes, composés des deux lentilles, n'ont été mis au point qu'à la fin du 16^{ème} siècle.

Le microscope est un appareil optique muni de lentilles qui permet de grossir l'image et voir des petits détails. Il est surtout utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus.

II. But du TP :

Le but de ce TP est de mettre l'étudiant devant un instrument optique pour l'étude des cellules et de se familiariser à cet outil de travail.

Pour cela, il est indispensable de lui faire une présentation des différentes pièces dont il est composé ainsi que les réglages nécessaires pour obtenir une bonne mise au point.

III. Définition du microscope:

Le mot microscope est composé de 2 racines étymologiques différentes, du Grec (micro= petit et scopein= voir). Le microscope est un instrument optique permettant d'observer des objets très minces en les grossissant (32 à 1000 fois).

Il existe d'autres microscopes, dits microscopes électroniques, qui permettent des grossissements plus importants.

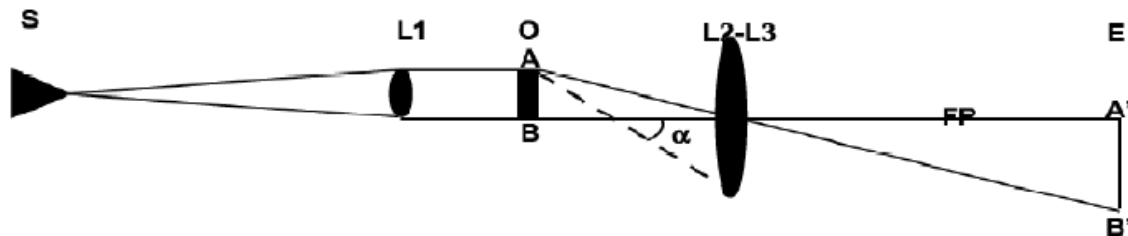
IV. Principe physique du microscope optique :

Cet instrument rapproche les objets de notre œil en nous permettant de les observer.

Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

- soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Le microscope photonique utilise un flux ondulatoire de particules (FP) non chargées, les photons, au travers d'un système de lentilles (L1, L2 et L3) de manière à former d'un objet (O) à étudier (AB) une image agrandie (A'B') sur un écran E



S : source de lumière

L1 : lentille condensatrice

O : objet à étudier de dimension AB

α : Demi-angle d'ouverture de l'objectif

L2, L3 : respectivement l'objectif et l'oculaire

FP : faisceau de particule

E : écran permettant de voir l'image A'B' obtenue de l'objet O à étudier.

IV.1. Fonctionnement du microscope :

La plupart des cellules sont très petites pour être observées à l'œil nu. Le microscope optique permet d'obtenir des grossissements de l'ordre de 1000.

Dans le cadre de la microscopie optique classique, la préparation à observer est déposée sur la latine du microscope. Posée sur une plaquette de verre appelée porte objet ou lame et couverte

d'un couvre objet de verre ou lamelle, la préparation est maintenue en place par deux pinces ou valets.

La lumière fournie par une lampe ou miroir, est concentrée par le condensateur avant de traverser l'objet. La lumière transmise est captée par l'un des objectifs du microscope. Ces objectifs sont montés sur une pièce tournante appelée tourelle revolver.

Finalement l'image agrandie par l'objectif parcourt le tube porte oculaire et est encore magnifiée par l'oculaire sur lequel l'observateur pose son œil. Le grossissement de l'oculaire multiplié par celui de l'objectif fournit le grandissement total de l'image par le microscope.

La mise au point s'effectue à l'aide d'une ou plusieurs vis de réglages : vis macro métrique pour le réglage grossier et la vis micrométrique pour le réglage fin.

Il est à signaler que l'examen des échantillons biologiques au microscope optique doit répondre à deux exigences :

- Les objets à examiner doivent être minces
- Leurs différents éléments doivent présenter un certain contraste.

Il est à noter qu'un bon éclairage est essentiel si on veut faire de bonnes observations.

Selon un principe d'optique on obtient une meilleure résolution quand le condensateur et l'objectif sont couplés, c'est à dire quand ils ont la même ouverture numérique.

Pour y arriver il suffit :

- de faire la mise au point sur le spécimen à observer.
- de fermer le diaphragme et de l'ouvrir lentement jusqu'à ce que la lentille postérieure de l'objectif soit remplie de lumière.

IV.2. Présentation du microscope optique :

Le microscope optique classique se compose de deux parties essentielles :

- **Un système optique**
- **Une partie mécanique**

a) Système optique :

Il comporte l'oculaire, l'objectif et le système d'éclairage (source lumineuse).

L'oculaire : c'est la lentille supérieure au niveau de laquelle nous plaçons notre œil lors de l'observation.

L'objectif : c'est la lentille inférieure qui nous rapproche de la préparation à examiner, il y a habituellement 3 objectifs correspondant aux grossissements 10X, 40X, 100X, ils sont interchangeables par simple rotation de leur base commune.

Système d'éclairage : il se compose d'une source lumineuse (lampe ou miroir). L'objet à examiner est éclairé par transparence du condensateur qui est menu à sa base par un diaphragme qui permet de varier l'ouverture du faisceau éclairant.

b) Partie mécanique :

La partie mécanique comporte les éléments suivants : un pied, une potence, une platine une crémaillère et la vis macro et micrométrique.

Le pied : il permet d'assurer la stabilité du microscope.

La potence : c'est le bras de l'appareil qui supporte le tube optique et la platine.

La platine : c'est le plateau où l'on fixe la lame à examiner au moyen des valets. La platine est équipée d'une ouverture permettant le passage des rayons lumineux.

La crémaillère : commandée par un ou deux boutons (vis macro et micrométrique).

La vis macro et micrométrique : permet des mouvements rapides et de grande amplitude du tube optique tandis que la vis micrométrique communique au tube optique un mouvement lent et de faible amplitude

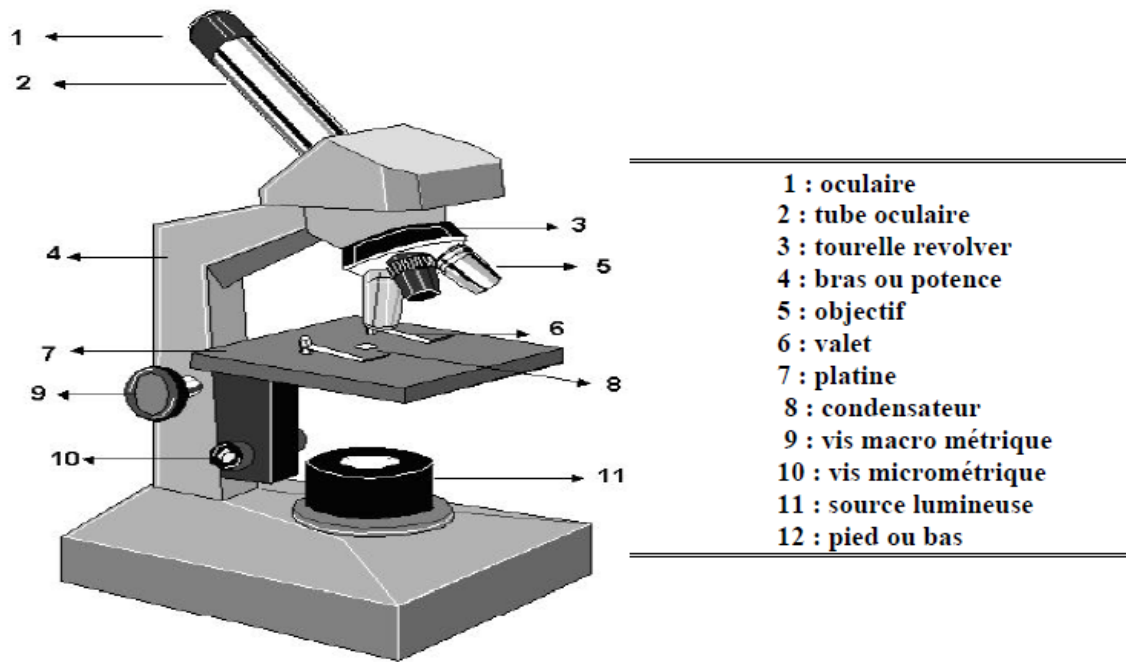


Schéma d'un microscope optique monoculaire

V. Mode opératoire :

Disposer sur la platine une lame portant un objet suffisamment contrasté (lame déjà préparée).

Cette lame montée de façon permanente, constitue un bon test chaque fois que l'on aura complètement déréglé son éclairage ou que l'on utilisera un nouveau microscope.

- Ouvrir les diaphragmes à moitié.

- Positionner le condenseur à mi-course

- Mettre en place l'objectif le plus faible (par exemple celui qui est marqué 10 X) en faisant attention à ce que le clipe soit bien enclenché dans le cas d'un objectif monté sur revolver.

Chaque objectif de microscope à sa propre distance de mise au point, d'autant plus courte que l'objectif est puissant.

- A l'aide du mouvement rapide, et en tenant la tête sur le côté du microscope, les yeux à hauteur de la platine, positionner l'objectif à une distance de la préparation éclairée, légèrement inférieure à la distance focale de l'objectif.

- Mettre l'œil à l'oculaire sans toucher à la mise au point, améliorer l'éclairage puis toujours l'œil à l'oculaire, à l'aide du mouvement rapide, éloigner l'objectif de la préparation d'une petite quantité ne s'éloignant pas trop de la distance théorique de mise au point.
- Des ombres sombres de plus en plus nettes doivent apparaître, puis l'image. En cas d'échec recommencer la série d'opération de mise au point.

VI. Mesures à prendre lors de l'emploi du microscope :

- S'assurer de la propreté des parties optiques (oculaires, objectifs, lentille frontale du condenseur...)
- Si nécessaire les essuyer avec du papier Joseph.
- Abaisser la platine pour y déposer la lame (après avoir nettoyé à l'alcool, la partie inférieure de la lame)
- Choisir une intensité lumineuse moyenne
- Utiliser les objectifs en ordre croissant de grossissement x 4, x 10, x 60, x 100
- Régler l'éclairage à l'aide des diaphragmes et du condenseur
- Remonter la platine en regardant latéralement afin d'amener la lame à quelques mm de l'objectif choisi.
- Descendre doucement la platine à l'aide de la vis micrométrique jusqu'à la vue de l'objet à observer
- Pour utiliser des objectifs plus forts que celui choisi précédemment, centrer la zone à observer, changer d'objectif, régler l'éclairage.

➤ Précaution d'installation du microscope :

Le microscope doit être installé :

- Sur une surface non glissante
- A une hauteur permettant les observations prolongées sans fatigue
- A contre-jour pour éviter la fatigue des yeux

VI. Entretien du microscope :

Il est généralement recommandé de le soulever par sa potence et non par le tube optique ou la platine ce qui pourrait endommager les mécanismes délicats.

La saleté sous toutes ses formes est le pire ennemi du microscope. Un microscope sale reflète un mauvais entretien. Pour enlever la poussière sur les pièces optiques sales, utiliser un pinceau. Si les lentilles sont couvertes de saletés tenaces (huile à immersion, empreintes digitales séchées.....), utiliser du papier à lentille.

La platine ainsi que les autres pièces mécaniques à leur tour doivent être toujours propres, pour cela, on recommande qu'après usage de bien recouvrir le microscope avec un cache poussière approprié.

TP N°2 : ETUDE DE LA CELLULE ANIMALE ET VEGETALE

INTRODUCTION :

La cellule (du latin *cellula* petite chambre) est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant tout ou partie d'un être vivant (à l'exception des virus). Chaque cellule est une entité vivante, en d'autres termes c'est la plus petite unité capable de manifester les propriétés d'un être vivant : se nourrir, croître et se développer.

Dans le cas d'organismes multicellulaires, fonctionne de manière autonome, mais coordonnée avec les autres. Les cellules de même type sont réunies en tissus, eux-mêmes réunis en organes.

Il existe 2 grands types des cellules :

- **Eucaryote et Procaryote**

Tableau 1: Caractéristiques structurales des cellules eucaryotes et procaryotes

Cellules procaryotes	Cellules eucaryotes
Absence d'enveloppe nucléaire	Présence d'enveloppe nucléaire
Possède une membrane plasmique	Possède une membrane plasmique
Organites: ribosomes	Organites: nombreux et diversifiés, incluant les ribosomes
Présence d'une paroi faite de peptidoglycane (sauf chez les Archéobactéries)	Certaines cellules présentent une paroi faite de cellulose ou de chitine

- Toutes les cellules sont composées de quatre éléments principaux (éléments universels), à savoir :

- Le noyau.
- Le cytoplasme.
- La membrane plasmique.
- Les ribosomes

- Toutes les cellules obéissent aux mêmes règles physiologiques telle que :

- La division

- La synthèse des protéines
- Le métabolisme

II. PRESENTATION DE LA CELLULE ANIMALE ET LA CELLULE VEGETALE

Les cellules eucaryotes sont elles aussi classées dans deux catégories: les cellules animales et les cellules végétales.

II.1. La cellule végétale

La cellule végétale représente le sommet de l'évolution cellulaire. Elle est capable de synthétiser toutes les substances organiques qui lui sont nécessaire et ce uniquement à partir de matière inorganique et de lumière, ce que même les bactéries ne peuvent pas faire. Elle est responsable du fonctionnement de la biosphère. La photosynthèse qui fournit les glucides nécessaires à son alimentation énergétique, absorbe le gaz carbonique et rejette l'oxygène qui permet aux animaux et à la plupart des procaryotes de respirer.

Une cellule végétale est une cellule eucaryote, elle comporte donc un noyau qui contient le matériel génétique, le réticulum endoplasmique et des mitochondries, centrales énergétiques de la cellule. La membrane plasmique est entourée d'une paroi de cellulose qui donne sa forme à la cellule. En l'absence de cette paroi, la cellule prend une forme sphérique en raison des forces osmotiques qui s'exercent sur les membranes.

La plus grande partie du cytoplasme est occupé par une vacuole, organe limité par une membrane et contenant principalement de l'eau. Mais la principale caractéristique des cellules végétale est la présence de chloroplastes, organites spécialisés dans la photosynthèse.

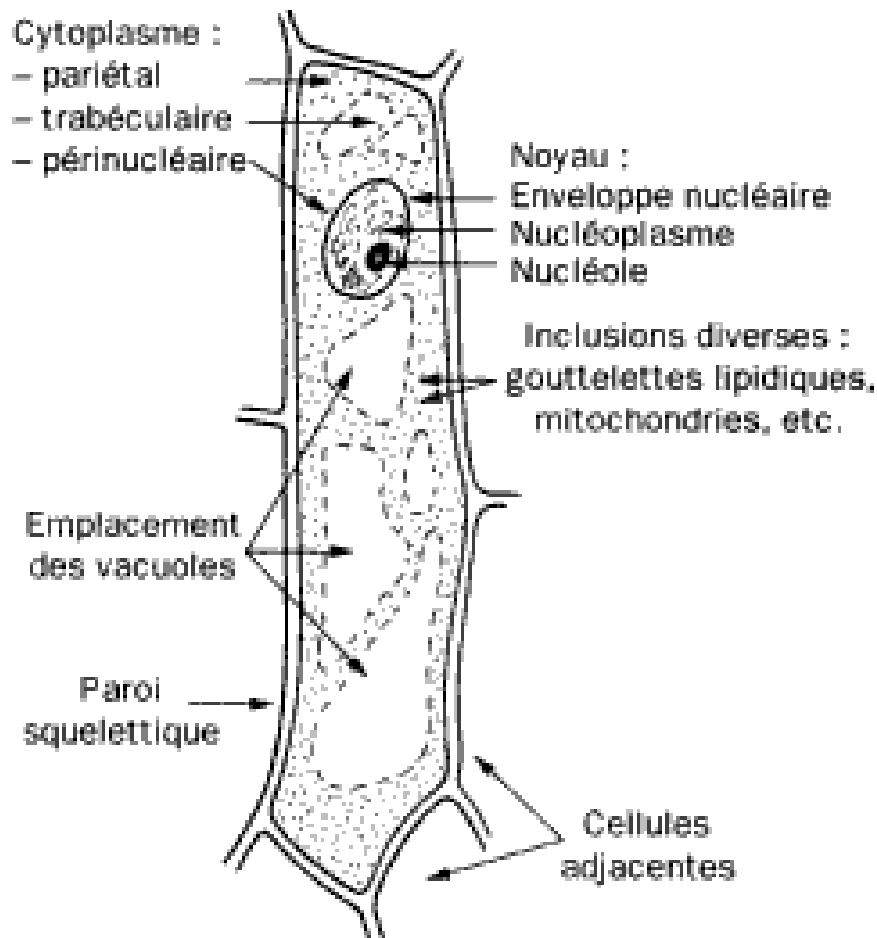


Schéma d'une cellule d'épiderme de l'oignon (*Allium cepa*) observée par microscope x 400

II.2. La cellule animale

La cellule animale est moins perfectionnée que la cellule végétale. Incapable de synthétiser l'ensemble de ses matières organiques, elle est obligée de trouver la plupart d'entre eux dans son environnement. Elles n'en sont pas moins dépourvues de qualités. Son principal atout est sa faculté à se déformer. La forme d'une cellule animale est due à une charpente intracellulaire, déformable de façon contrôlée : le cytosquelette. Cette déformabilité est rendue possible par l'absence de paroi cellulosique, remplacé par un revêtement glucidique souple, le glycocallix.

La déformabilité permet aussi la phagocytose, c'est à dire l'englobement d'une partie de leur environnement et l'absorption de leur contenu. Ainsi, le comportement de prédateur des animaux se retrouve déjà au niveau de leurs cellules.

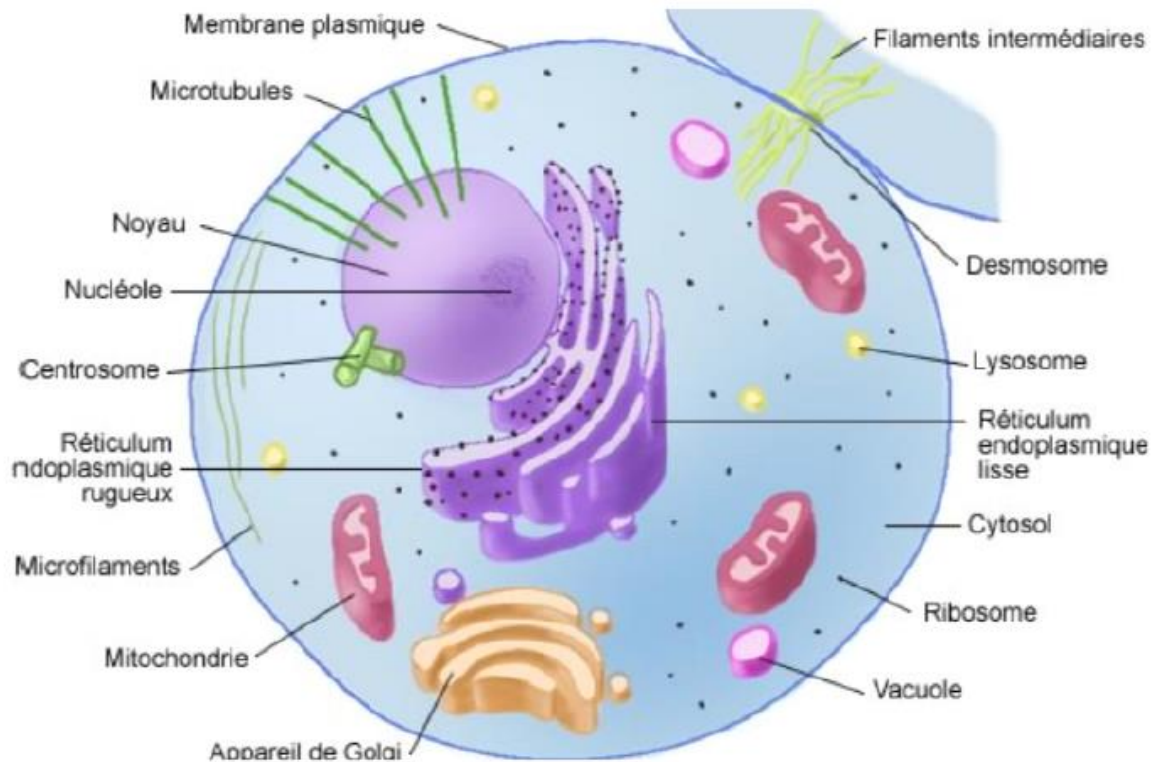


Schéma d'une cellule animale

III. Protocole expérimentale

II. 1. Observation des cellules végétales :

Couper un bulbe d'oignon avec un couteau, séparer les tuniques imbriquées puis prélever un lambeau à l'aide d'une pince. Placer par la suite ce lambeau dans un verre de montre ajouter une goutte de rouge neutre puis mettre la préparation entre lame et lamelle et passer à l'observation.

II. 2. Observation des cellules animales :

Gratter avec votre ongle après stérilisation au niveau de votre joue et enlever un frottis que vous allez placer sur une lame en verre et s'assurer qu'il bien étalé puis couvrir le avec une lamelle et passer à l'observation.

II. 3. Travail a effectué

- Observation et dessin des cellules de l'épiderme de l'oignon.
- Observation et dessin des cellules de l'épithélium buccal.

- Faire un tableau comparatif des deux cellules en se basant sur la présence ou l'absence des organites selon vos observations des cellules étudiées dans le TP.

« A la fin de la séance de TP, l'étudiant(e) doit remettre un compte rendu à son enseignant chargé de TP et l'enseignant doit s'assurer que l'étudiant(e) a bien nettoyé la paillasse de toutes salissures ».

TP N^o 3. ETUDE DES PLASTES

Introduction

Les plastes sont des organistes intracellulaires présents exclusivement chez les cellules végétales. Ils renferment selon les cas des substances comme la chlorophylle, la carotène, l'amidon ...

I. LES AMYLOPLASTES

I.1. Définition

L'amyloplaste désigne un organite spécifique des cellules végétales. C'est un plaste qui s'est spécialisé dans le stockage de l'amidon. Il est présent en particulier dans les cellules des organes de réserves, comme les tiges souterraines hypertrophiées (tubercules) de pomme de terre. Étant dépourvu de pigment, il appartient à la famille des leucoplastes.

Il est formé par des couches concentriques autour d'un point spécifique appelé hile. L'accumulation de l'amidon se fait à partir de ce point et est stocké dans des couches que l'on appelle aussi des strates. Ces strates sont délimitées par des stries qui sont visibles au microscope photonique. Les amyloplastes peuvent avoir des structures différentes selon la position et le nombre des hiles. Un amyloplaste simple ne contient qu'un seul hile. Le hile peut être en position centrale (exemple chez le blé) ou en position excentrée (exemple chez le tubercule de pomme de terre). Lorsque l'amyloplaste contient deux hiles (2 points de départ de l'accumulation) il peut être semi-composé s'il existe des stries communes aux deux hiles ou composé s'il n'existe pas de stries communes.

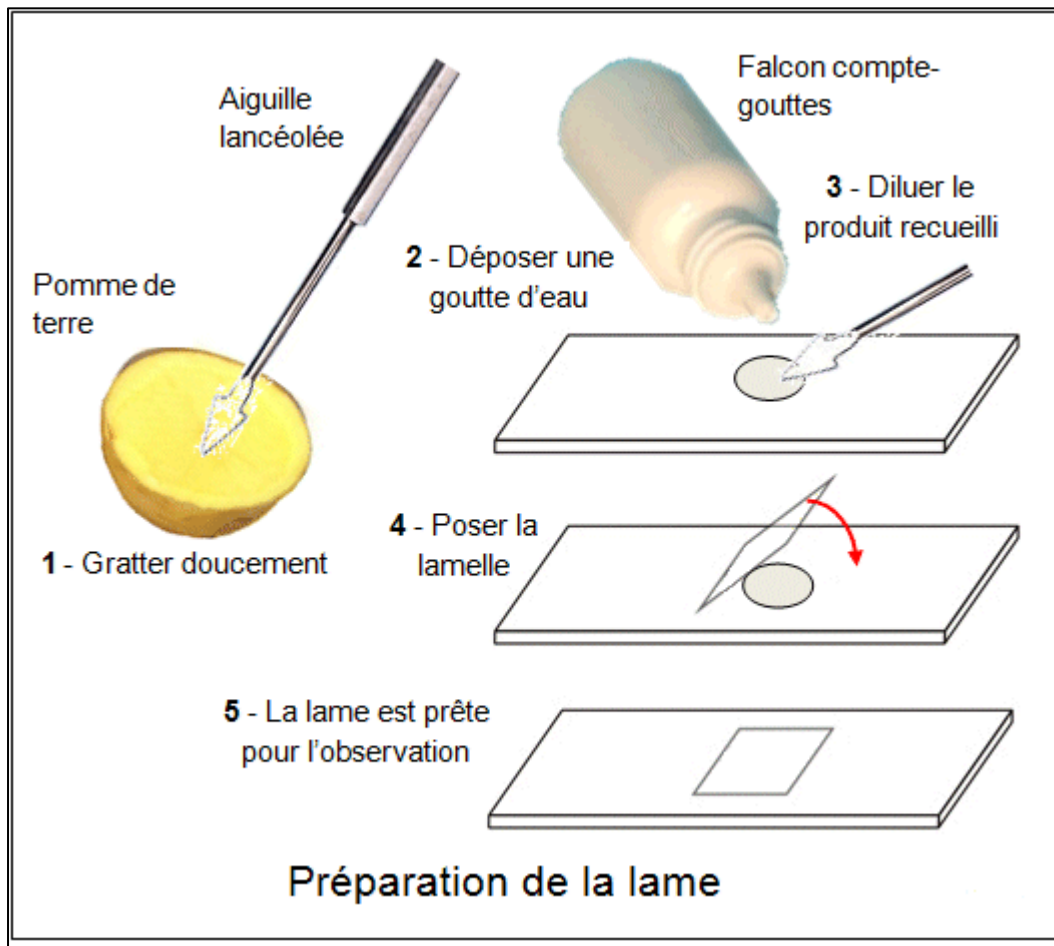
Alors que l'amyloplaste deviendra un futur grain d'amidon.

I.2. Matériel et réactifs

- Microscope, lames, lamelles, coton, un cristalliseur (avec eau de javel) pour lames et lamelles usées.
- Colorant : solution très diluée d'eau iodée
- Une aiguille lancéolée, une assiette porcelaine ou plastique, une pissette avec eau de conduite.
- Pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

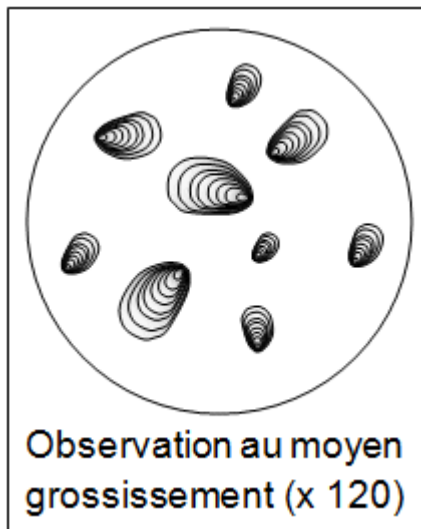
I.3. préparation de lame

- Sur un petit morceau d'une pomme de terre, on gratte doucement la pulpe avec une aiguille lancéolée.
- On place une goutte d'eau sur une lame puis on y dilue le produit recueilli.
- On recouvre ensuite d'une lamelle (en évitant la formation de bulles d'air).



I.4. Observation sans coloration

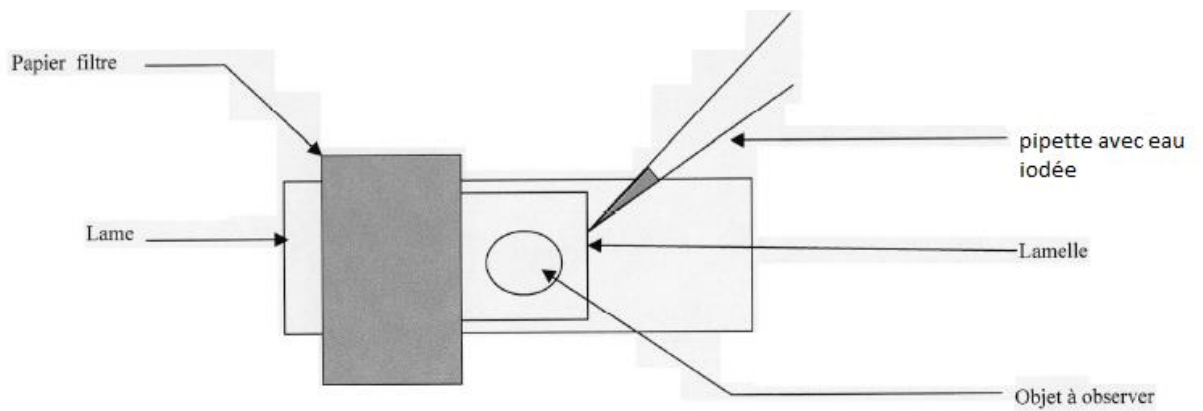
Observer les grains d'amidon et leurs stries d'accroissement autour d'un point central :
le hile



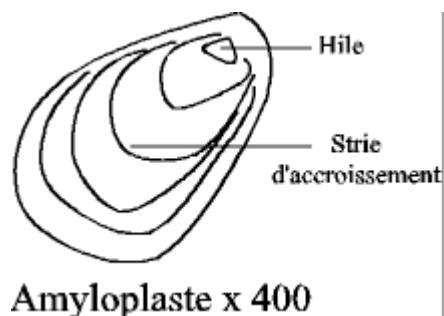
I.5. Observation avec coloration

On refait la préparation et on ajoute une goutte d'eau iodée très diluée.

Les amyloplastes se colorent en bleu violet



Méthode de préparation de lame avec un colorant



Amyloplaste observé en microscope de grossissement X 400

II. LES CHLOROPLASTES

Les chloroplastes sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes photosynthétiques (plantes, algues). Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse. Les chloroplastes jouent un rôle important dans le cycle du carbone, par la transformation du carbone atmosphérique en carbone organique. Il absorbe l'énergie lumineuse pour fixer le carbone inorganique (CO_2) sous forme de glucose. Par l'intermédiaire de la chlorophylle, ces organites sont capables de transférer l'énergie véhiculée par les photons à des molécules chimiques (eau).

II.1. Matériel

- Microscope, lames, lamelles, un cristalliseur avec eau de javel, pince fine, lame bistouri, poivron vert (*Capsicum annum*).

II.2. Préparation de la lame

Avec une pince fine, on pratique une coupe fine dans la couche externe du poivron et on la place entre lame et lamelle, avec un ajout d'une goutte d'eau.

II.3. Observation des chloroplastes

Décrire vos observations au faible, moyen et fort grossissement : aspect des cellules, les constituants cellulaires observés, la membrane plasmique, aspect du cytoplasme, forme de la vacuole, position du noyau, aspect et abondance des chloroplastes.

III. LES CHROMOPLASTES

Ce sont des organites cellulaires des pigments caroténoïdes (pigment jaune, rouge ou orange). Les tomates, les poivrons jaunes, et les carottes sont riches en chromoplastes

III.1. Matériel

- Microscope, lames lamelles, coton, un cristalliseur avec eau de javel, pince fine, lame bistouri et des tomates

III.2. préparation de lame

Avec une pince fine, on pratique une coupe fine dans la couche externe de tomate et on la place entre lame et lamelle, avec un ajout d'une goutte d'eau.

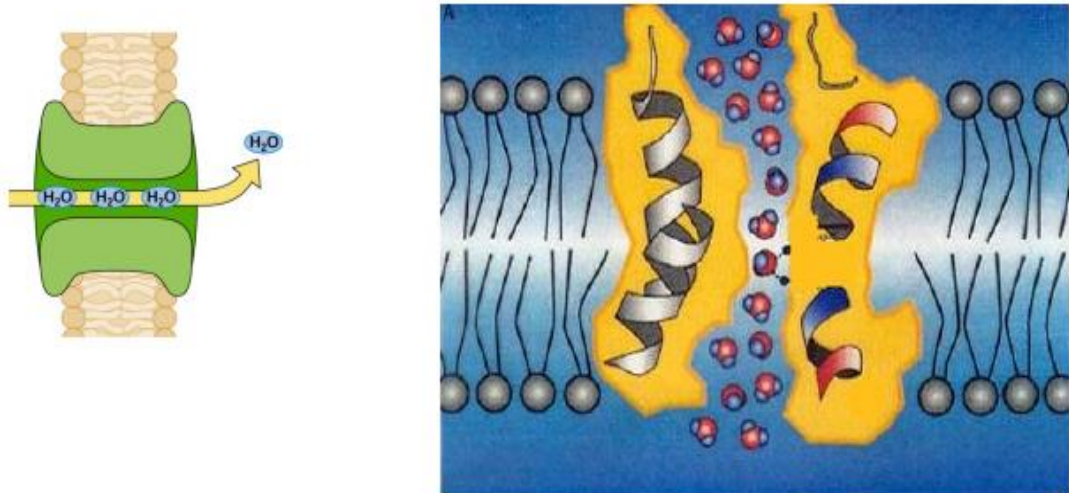
II.3. Observation des chromoplastes

Décrire vos observations au faible, moyen et fort grossissement : aspect des cellules, les constituants cellulaires observés, la membrane plasmique, aspect du cytoplasme, forme de la vacuole, position du noyau, aspect et abondance des chromoplastes.

TP N^o4. ECHANGE CELLULAIRES

I. INTRODUCTION

La membrane cellulaire qui entoure la cellule joue un rôle très important dans les échanges cellulaires. Grâce à ses nombreux pores et ses transporteurs membranaires, elle est responsable de l'entrée et de la sortie de toutes sortes de molécules, peu importe leur taille et leur nature. En général, le milieu interne d'une cellule a une composition différente de celle du milieu externe. La diffusion et l'osmose sont deux des mécanismes passifs (pas besoin d'énergie pour qu'ils se produisent) grâce auxquels la cellule peut effectuer des échanges avec son environnement.

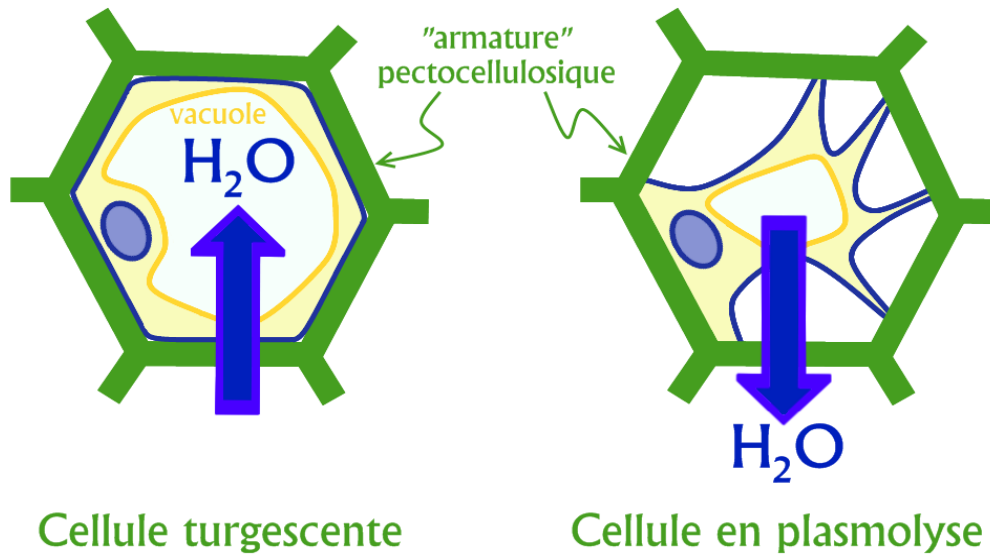


Schémas du passage de l'eau (H₂O) à travers la membrane cytoplasmique (constituée d'une bicouche de lipides) grâce aux aquaporines

- Plasmolyse et turgescence de la cellule végétale.

Lorsque la cellule est placée dans un milieu très concentré, elle entre en plasmolyse. Elle perd de l'eau par diffusion libre au travers des membranes, la vacuole se "dégonfle". La membrane plasmique se décolle de la paroi pectocellulosique beaucoup plus rigide qui, elle, reste en place, sauf au niveau des plasmodesmes. À l'échelle de l'organisme, la plante devient molle. Si cet état dure trop longtemps, les cellules meurent.

La turgescence est l'état cellulaire associé à l'élongation de la cellule végétale dont les vacuoles sont en pleine expansion causée par une entrée d'eau dans cette même cellule.



II. BUT DE TP :

C'est de mettre en évidence les échanges cellulaires chez les cellules végétales (de l'épiderme d'oignon) en observant les phénomènes d'endosmose et d'exosmose par le biais des états physiologiques cellulaires : turgescence et plasmolyse.

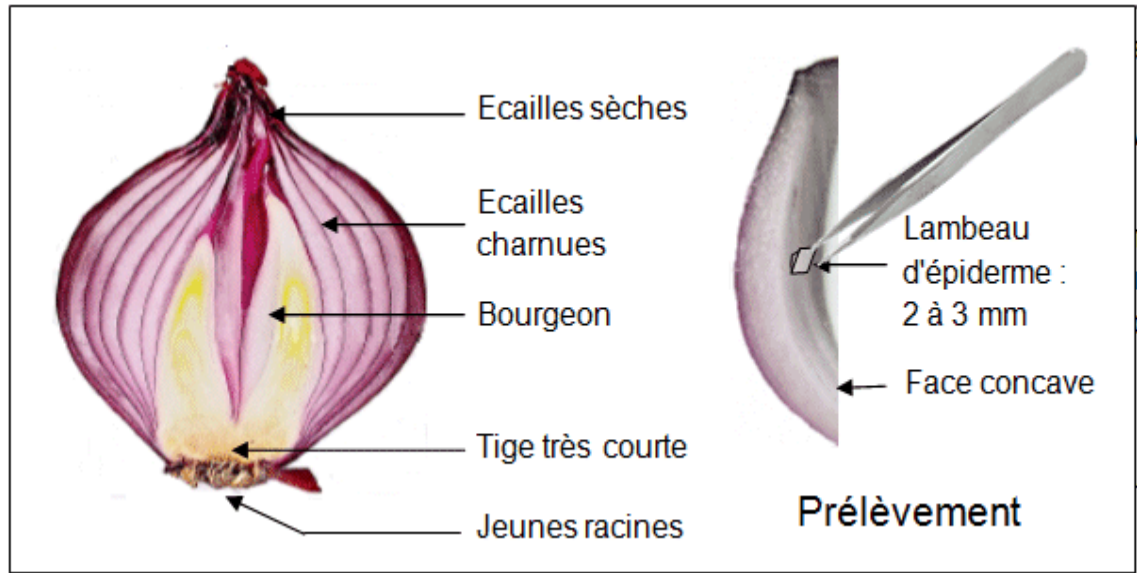
III. Matériel à utiliser

- Microscope optique
- bulbe d'oignon
- eau distillée
- sel de table (NaCl) ou sucre (saccharose)
- rouge neutre
- lames et lamelles
- pince fine

- **Mode opératoire**

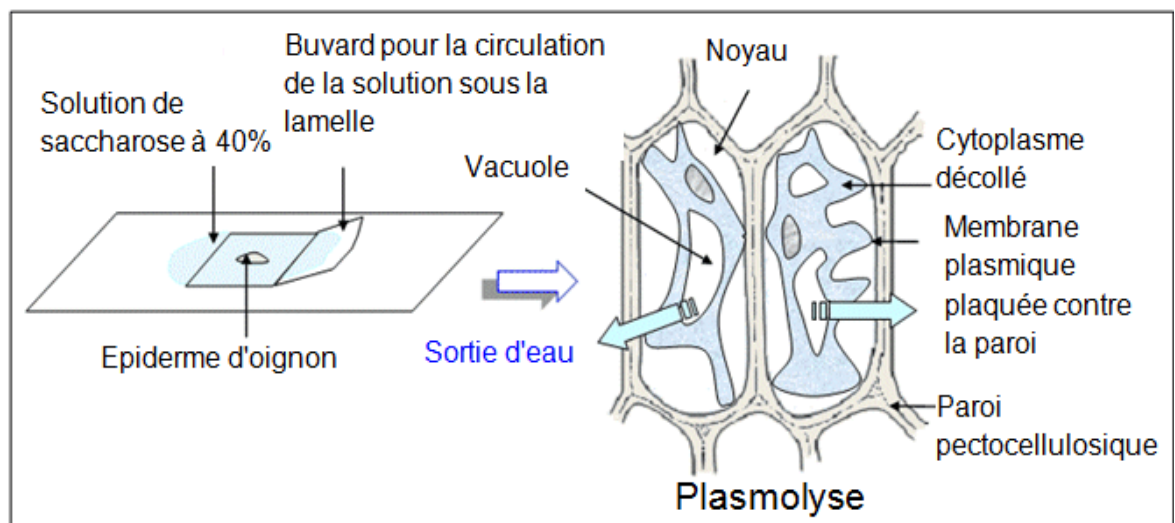
a) Manipulation 1 :

- déposer un fragment d'épiderme d'oignon sur une lame, ajouter une goutte de rouge neutre
- observer le montage au grossissement X 40, puis dessiner les cellules observées.



b) Manipulation 2 :

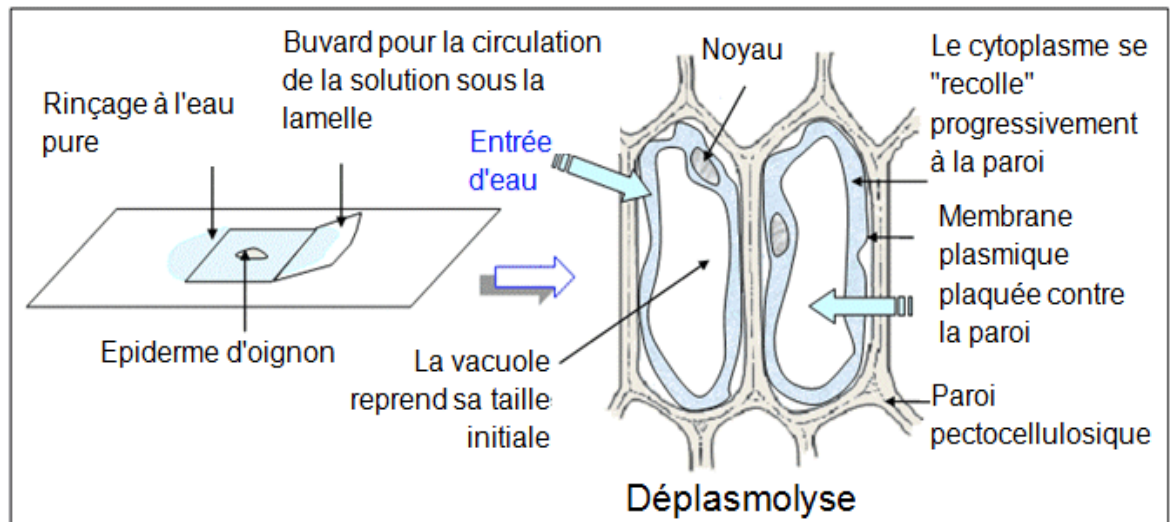
- déposer un fragment d'épiderme d'oignon sur une lame, ajouter à cet épiderme quelques gouttes de NaCl (6%).
- observer le montage au grossissement X 40, puis dessiner quelques cellules en interprétant le phénomène.



c) Manipulation 3

Sur le montage précédent ajouter quelques gouttes d'eau distillée

- observer le montage au grossissement X 40, puis dessiner quelques cellules en interprétant le phénomène.



IV. TRAVAIL A EFFECTUER

- Observation et dessin d'une cellule végétale à l'état normal
- Observation et dessin d'une cellule végétale à l'état de turgescence
- Observation et dessin d'une cellule végétale à l'état de plasmolyse