

Techniques d'histologie et de cytologie



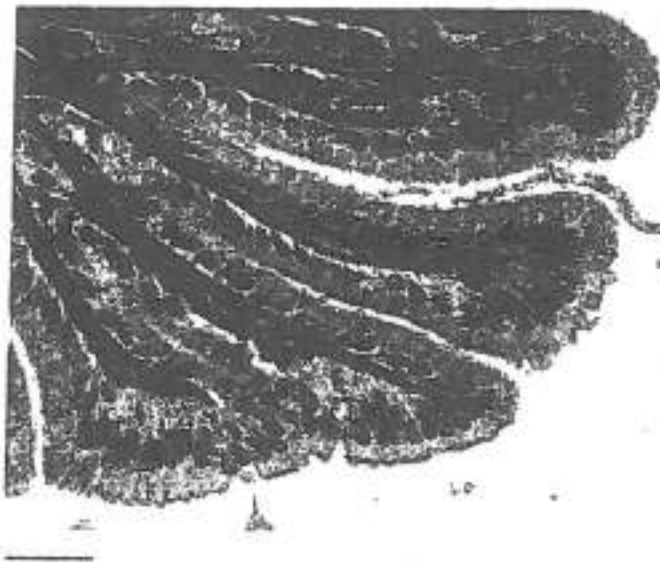
Numéro d'anonymat :

L'usage des téléphones portables est interdit pendant toute la durée de l'épreuve. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme chronomètre ou calculatrice. Aucun document, ni aucune calculatrice ne sont autorisés pendant toute la durée de l'épreuve.

REPONDRE SUR LE SUJET

Question 1 (5 points)

Annotez la photo ci-dessous et donnez le nom des tissus.



Question 2 (1 point):

La barre sous l'image ci-dessus précise l'échelle. Sa longueur correspond à :
100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM (entourer la bonne réponse)?

Question 3 (1 point) :

Cette image est obtenue avec (entourer la bonne réponse) :
un microscope électronique à balayage un microscope électronique à transmission
un microscope à fluorescence un microscope optique

Question 4 (3 points):

Quels sont les ordres de grandeurs des grossissements maximums possibles avec :

Un microscope optique ?

Un microscope électronique à transmission ?

Comment s'explique cette différence de pouvoir de résolution entre les deux types de microscopes?

Nom

Prénom

Groupe

L'usage des téléphones portables est interdit pendant toute la durée de l'épreuve. Ils ne peuvent donc pas être utilisés comme chronomètre ou calculatrice. Aucun document, ni aucune calculatrice ne sont autorisés pendant toute la durée de l'épreuve.

Question 1 (9 points)

Comment étudier de façon spatiotemporelle la synthèse du suc pancréatique en microscopie électronique? Préciser les différentes structures mises en jeu et leur rôle. Établissez un protocole détaillé : préciser le matériel utilisé (animaux, ...) et la technique employée.

Question 2 (1.5 points)

Qu'est-ce que la diapédèse ? Peut-elle être bidirectionnelle ? Justifier.

Questions 3 (3.5 points)

Vous venez de vous enfoncer une écharde dans la main. Quelles sont les différents types cellulaires qui interviennent ? À quel type de tissu appartiennent-ils ?

Question 4 (2 points)

Qu'est-ce qu'un acrosome. Quel est son rôle ?

Question 5 (14 points)

Faites un dessin schématique du document distribué et annotez-le. Que représente cette coupe ? Identifier les tissus et justifier de façon détaillée et constructive votre identification. Votre dessin doit comporter tous les éléments de justification.
Ne rien inscrire sur le document lui-même merci.

Biologie cellulaire 2 / L1S2 / SV05 09/02/2012 CORRECTION

Evaluation 1 (30 min) : Techniques de microscopie et méthodes de coloration

1/ Indiquer pour chaque image le type de microscope et la méthode de coloration (ou de contraste) employé. (2pts/image)

A



Microscope optique (à fond clair)
Coloration à l'hématoxyline (noyau acide rouge-violet ;
Cytoplasme basique bleu)

B



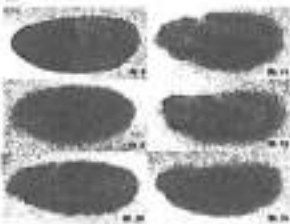
Microscope électronique à transmission
Post-fixation (ou coloration) au tétr oxyde d'osmium (ou acide osmique)
(contraste les structures membranaires)

C



Microscope optique (à fond clair)
Coloration à la thymidine tritiée après autoradiographie (grains
d'argents précipités au niveau des noyaux de cellules en cours
de réplication)

D



Microscope optique (à fond clair)
Coloration par histo-enzymologie sur une hybridation in situ
(sonde anti-sens fixée à un substrat ou une enzyme provoquant
la formation d'un précipité violet)

E



Microscope électronique à transmission
Coloration négative (application d'une solution d'acide
tungstique sur une suspension moléculaire, ici virale)

2/ Définir les termes suivants (1,5pt/définition) :

- Résolution :

C'est la plus petite distance qui sépare deux points que l'on peut distinguer (sur une image).

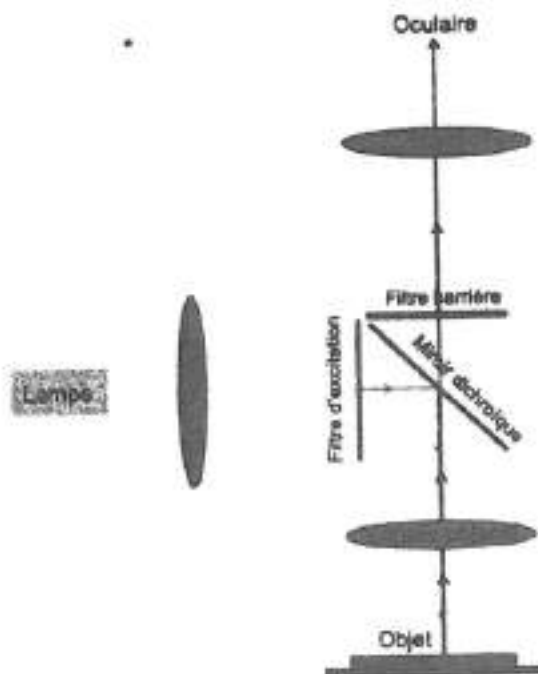
- Tissu :

Ensemble coopératif de cellules différenciées qui partagent une triple association : fonctionnelle, territoriale et biologique.

3/ Schématiser le fonctionnement d'un microscope optique à fluorescence (7pts) :

Eléments importants à indiquer (dans l'ordre) sur votre schéma :

- Source de lumière polychromatique (ex : à vapeur de mercure)
- Filtre d'excitation (ne laisse passer que certaines longueurs d'onde, si possible, celles qui rendent l'excitation du fluorochrome possible)
- Miroir dichroïque (réfléchit à la longueur d'onde d'excitation, laisse passer à la longueur d'onde d'émission)
- Objet à visualiser contenant le fluorochrome
- Filtre d'émission (ne laisse passer que certaines longueurs d'onde, si possible, celles qui sont émises par le fluorochrome)
- Oculaire/Caméra pour l'observation



Question 1 – La résolution. (A) Définir la résolution. (B) Indiquer l'ordre de grandeur de la résolution obtenue en microscopie optique (r^{MO}) et en microscopie électronique (r^{ME}). (C) Quel facteur, dans la formule de la résolution est principalement responsable de la différence entre r^{MO} et r^{ME} ? (6 pts)

(A) Distance minimale séparant deux points voisins d'une image que l'on peut distinguer comme deux points séparés

(B) r^{MO} de l'ordre du micromètre ($10^{-6}m$)

r^{ME} de l'ordre du nanomètre ($10^{-9}m$)

(C) Il s'agit de la longueur d'onde.

Question 2 – Reconnaissance d'images. Associer chaque image (A, B, C, D) avec le type de microscope et la (ou les) méthode(s) de coloration ou de contraste utilisé pour l'obtenir. (6 pts)



A : Microscope électronique à transmission / Méthode de cryofracture (suivie d'un ombrage)

B : Microscope optique à fond clair / Coloration à l'acide périodique et au réactif de Schiff (sucres sécrétés en rouge) + Coloration Hématoxyline (noyaux violets) (suivie d'une différenciation)

C : Microscope électronique à transmission / Post-fixation à l'acide osmique (ou tétroxyde d'osmium)

D : Microscope optique à fluorescence / Marquage de l'ADN au DAPI

Question 3 – Protocole expérimental. Un biologiste cellulaire décide d'identifier les cellules exprimant l'insuline dans un pancréas de rat. Il dispose de plusieurs rats et d'un laboratoire d'histologie. (A) Décrivez synthétiquement l'ensemble des étapes qui le mèneront à l'établissement de coupes fines de pancréas. (B) Proposez et détaillez une méthode de marquage (plusieurs choix possibles) lui permettant d'identifier les cellules exprimant l'insuline sur cette coupe en microscopie optique. Vous pouvez vous aider de schémas. (8 pts)

(A)

- Fixation par injection intra-cardiaque de paraformaldéhyde dans un rat. L'animal est mort et ses tissus préservés par fixation.
- Dissection du pancréas
- Déshydratation du tissu par bains successifs : alcool 70%, 80%, 90%, 100%, Toluène (liquide intermédiaire)
- Inclusion dans un bloc de paraffine liquide (60 °C)
- Réaliser des coupes fines (1-10µm) à l'aide d'un microtome dans le bloc de paraffine → Ruban de coupe.

(B)

- Réhydrater la coupe de paraffine (Toluène, Alcool 100-70%, eau)
- Réaliser un immunomarquage contre la protéine d'intérêt (= l'insuline du rat) (autre possibilité : réaliser une hybridation In Situ contre l'ARNm codant l'insuline de rat)
 - i) Anticorps primaire (monoclonal de souris par ex) dirigé contre l'insuline
 - ii) Lavages pour minimiser les hybridations aspécifiques d'anticorps
 - iii) Anticorps secondaire (de chèvre par ex) dirigé contre le fragment constant d'anticorps (IgG) de souris, couplé à un fluorochrome (ex : GFP) (autres possibilités : couplé à une enzyme ou marqué radioactivement)
 - iii) Lavages pour minimiser les hybridations aspécifiques d'anticorps
 - iv) Montage sur lame et observation des coupes à l'aide d'un microscope optique à fluorescence : Les cellules GFP+ expriment l'insuline.

Histologie et cytologie

CC2 – Groupe SV08 (1h15) (20 + 20 pts)

Partie I (20pts) : Méthodes de marquage et Epithéliums

Question 1 – Observation par fluorescence. (A) Définir la fluorescence. (B) Schématiser le trajet optique d'une observation au microscope à fluorescence. Légènder le nom des différents éléments du microscope. (C) Citer deux méthodes de marquage (spécifique ou non) utilisant la fluorescence.

(A) La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule, généralement par l'absorption d'un photon, immédiatement suivie d'une émission spontanée d'un autre photon.

(B) Éléments à indiquer : Source lumineuse, Filtre d'excitation, Miroir dichroïque, objet contenant le fluorochrome, filtre d'émission, observation.

(C) Le marquage au DAPI (marque l'ADN double-brin), l'Immunofluorescence, l'Hybridation In Situ avec une sonde fluorescente, la révélation des catécholamines par vapeurs de formaldéhydes à 60°C, l'utilisation d'un gène rapporteur fluorescent (GFP par ex) pour révéler l'expression d'un gène.

Question 2 – Epithéliums. (A) Définir le plus précisément possible un épithélium. (B) A l'aide d'un schéma légèné, décrire l'un des modes de sécrétion exocrine (celui de votre choix) d'épithélium. Indiquer sa fonction et citer un exemple présent dans l'organisme humain.

(A) Les tissus épithéliaux ou épithélia sont formés d'une ou de plusieurs couches de cellules **jointives**, c'est-à-dire séparées les unes des autres par des espaces intercellulaires réduits, ne contenant pas de tissu conjonctif et ponctués de complexes de jonction intercellulaires. La base des épithélia repose toujours sur un **tissu conjonctif** proprement dit. Elle en est séparée par une couche dense plus ou moins épaisse, d'aspect finement fibrillaire, pas toujours observable en microscopie optique, appelé **lame basale**. Enfin, les cellules épithéliales sont **orientées** : un pôle basal et un pôle apical. Basal côté conjonctif, apical côté lumière.

(B) Sécrétion mérocrine : La protéine ne passe pas librement la membrane plasmique vers l'extérieur mais passe par un **mécanisme d'exocytose**. Elles sont prises en charge dans des vésicules de sécrétion, délimitées par une membrane plasmique. La vésicule passe par un stade d'hémifusion puis de fusion à la membrane plasmique apicale de la cellule. Le contenu libéré à l'extérieur des cellules côté apical et se dissout souvent quasiment aussitôt.

Fonction : sécrétion au pôle apical des cellules de sucres ou de protéines. Ex : glande de Harder, acini pancréatiques exocrines, cellules caliciformes de l'intestin, glande mammaire.

Partie 2 (20pts) – Dessin et reconnaissance de tissus. Dessiner, légénder et analyser l'image ci-dessous afin de déterminer le type de tissu représenté (soyez le plus précis possible). Légendez proprement les structures clés qui vous aideront à justifier votre identification dans votre raisonnement. Attention à bien organiser les légendes. Conclure en donnant un titre au document.

Technique analytique d'identification de tissu. BLEU = nécessaire à votre argumentation.

L'observation représentée n'a pu être réalisée que par un microscope électronique à transmission, en considérant la résolution de l'image permettant l'observation des organites (réticulum endoplasmique, stries des mitochondries), des délimitations des cellules (interdigitation sur les faces latérales par exemple), du cytosquelette (microtubules) ainsi que le contraste généré au niveau des membranes phospholipidiques (post-fixation à l'acide osmique).

On observe clairement deux types cellulaires s'alternant sur une même couche délimitée entre une lame basale (pôle basal) et une lumière (pôle apical). On peut en conclure qu'il s'agit d'un **tissu pseudo-bi-stratifié orienté**. Les cellules sont séparées les unes des autres d'espaces intermembranaires réduits, invisibles la plupart du temps et ponctués au pôle apical de complexes de jonctions (jonction serrée et zone adhérente peu visible, du côté le plus apical, puis desmosome bien visible au niveau des plaques de desmoplakine). En conséquence, le tissu observé est **jointif**.

On peut remarquer la présence de tissu conjonctif (principalement constitué de matrice extracellulaire peu dense aux électrons) en dessous de la lame basale sur laquelle s'assied ce tissu, au niveau du pôle basal.

Un tissu orienté, jointif et assis sur une lame basale est un **épithélium**.

Sur les faces latérales des cellules épithéliales, on peut remarquer des interdigitations, ce qui suggère que l'épithélium peut s'allonger dans le sens baso-apical. Néanmoins, on peut observer deux formes de cellule : des cellules plus hautes que larges, donc prismatiques, au cytoplasme clair, faiblement chargé en molécules polaires (type 1) ; des cellules aussi hautes que larges, donc caliciformes, au cytoplasme dense, chargé en molécules polaires (type 2).

Les cellules de type 1 possèdent une **différenciation particulière au pôle apical** : on peut observer d'une part des microvillosités à la longueur et à la fréquence relativement régulière (la coupe est néanmoins trop imprécise pour supposer un plateau strié ou une bordure en brosse) ainsi que des cils. On peut affirmer qu'il s'agit de cils par la présence d'un corpuscule basal à son origine cytoplasmique, environ au même niveau que le réseau de cytosquelette intracytoplasmique (c'est à dire à peu près au niveau de la jonction adhérente).

De plus, on peut observer sur un zoom transversal de l'axonème (zone périphérique apicale du cil) de quelques cils la présence des neufs doublets périphériques entourant la paire centrale de microtubules. Ces différenciations au pôle apical sont caractéristiques d'un épithélium de revêtement.

Les cellules de type 1 sont donc **des cellules épithéliales prismatiques de revêtement à cils vibratiles**.

Les cellules de type 2 ne possèdent aucune différenciation particulière à leur pôle basal (cellule à l'extrême droite de l'image) et on peut visualiser des vésicules de sécrétion très denses pouvant correspondre à un mode de sécrétion mérocrine. On peut également visualiser un réticulum endoplasmique rugueux très développé. Tous ensemble, ces éléments nous indiquent que les cellules de type 2 sont des **cellules épithéliales glandulaires caliciformes**.

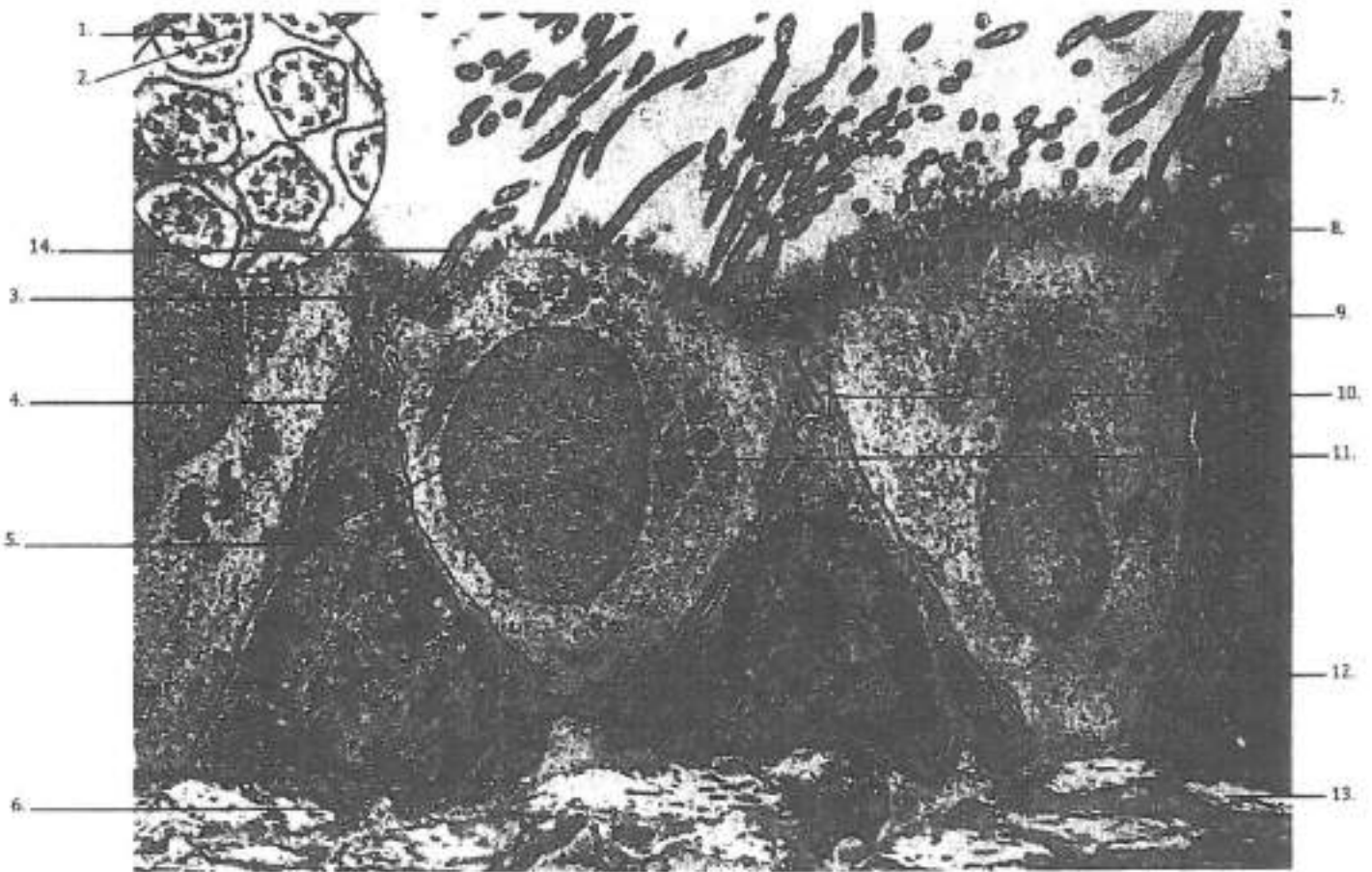
Le tissu observé sur cette image est donc un tissu épithélial mixte constitué d'une alternance de cellules prismatiques de revêtement à cils vibratiles et de cellules glandulaires caliciformes.

Légendes : 8pts Développement (ci-dessus) = 8pts Dessin : 4 pts

- 1 : Paire de microtubules centrale
- 2 : Doublet périphérique de microtubules
- 3 : Complexe de jonction
- 4 : Corpuscule basal d'un cil
- 5 : Noyaux
- 6 : Lame basal (Pôle basal)

- 7 : Lumière (Pôle apical)
- 8 : Vésicule de sécrétion
- 9 : Cytoplasme
- 10 : Interdigitations
- 11 : Mitochondrie
- 12 : RER

- 13 : Tissu conjonctif (Ppt dit)
- 14 : Axonème d'un cil vibratile



Observation d'une coupe transversale d'un tissu épithélial (de trachée) alternant cellules prismatiques de revêtement à cils vibratiles et cellules glandulaires caliciformes en microscopie électronique à transmission après post-fixation au tétr oxyde d'osmium

Mathématiques

Des problèmes en MATHS ?

Appelez le :

$$06. e^4 \pi. \sqrt{7} \sin \pi. \phi \int_{-2}^4 x dx. e^{-1} \ln e$$

(Prix d'un appel local depuis un poste fixe)

Modélisation, Optimisation, Équations différentielles

Session 1, 1ère épreuve – durée : 1h

Responsable : M. Gutnic

N°d'anonymat : B _ _ _ _ _

Avertissement : Les réponses doivent être effectuées sur l'énoncé et doivent être justifiées. Tous les calculs intermédiaires nécessaires à la compréhension doivent notamment être reportés. Toute réponse non justifiée ne sera pas considérée par le correcteur. Les deux exercices sont indépendants. Aucun document ni calculatrice ni portable n'est autorisé.

Exercice 1 Modélisation et cours

Les scientifiques ont étudié la modélisation de l'évolution d'une population de bactéries. On note $y(t)$ la fonction qui correspond au nombre de bactéries exprimé en millions à un instant t exprimé en heures.

1) Les différentes expériences menées ont montré que dans les premiers instants de la mise en culture des bactéries, la vitesse d'accroissement de leur population est proportionnelle au nombre de bactéries, avec un coefficient de proportionnalité $a > 0$ qui dépend du type de bactérie et du milieu.

Écrire l'équation différentielle satisfaite par y ? Comment s'appelle le modèle de croissance dans cette situation?

2) Au bout d'un certain temps, les conditions naturelles d'environnement des bactéries (volume du milieu, quantité d'éléments nutritifs, ...) limitent la croissance des bactéries. Les expériences ont montré qu'alors, en plus de la croissance naturelle modélisée au 1), un certain nombre de bactéries disparaissent et ce, proportionnellement au carré du nombre de bactéries avec un coefficient de proportionnalité $b > 0$.

a) Écrire la nouvelle équation différentielle satisfaite par y ? Comment s'appelle le modèle de croissance dans cette situation? Comment s'appelle le coefficient a ?

b) Effectuer un tracé sommaire (mais soigné) des solutions de cette équation différentielle, en précisant sur le graphique les valeurs importantes pour la compréhension de leur comportement qualitatif (il n'est pas utile ici de faire l'étude qualitative de cette équation différentielle bien connue et déjà vue à plusieurs reprises).

c) Si on considère un type de bactéries pour lequel $a = b = 1$, que se passe-t-il au bout d'un temps très long?

Exercice 2 Étude qualitative (Attention : dernière question en page 4)

2) Pour un type de bactéries très agressives tel que $a = 4$, les scientifiques ont mis au point un traitement permettant d'augmenter la disparition du nombre de bactéries de deux manières : d'une part, cette disparition se fait désormais par rapport à y^3 ; d'autre part, les scientifiques peuvent désormais augmenter le coefficient de proportionnalité b . Ainsi l'équation différentielle est la suivante :

$$y'(t) = 4y(t) - by^3(t).$$

a) Justifier l'existence et l'unicité de la solution passant par n'importe quel point du plan (t_0, y_0) .

b) En précisant soigneusement chaque étape, effectuer l'étude qualitative de cette équation différentielle.

c) En justifiant votre réponse, expliquer pour quelle(s) valeur(s) du coefficient b la population n'excédera pas $1/4$ de million de bactéries au bout d'un temps très long.

Modélisation, Optimisation, Équations différentielles

Séssion 1, 2ème épreuve – durée : 1h

Responsable : M. Gutnic

N°d'anonymat : B _ _ _ _ _

Avertissement : Les réponses doivent être effectuées sur l'énoncé et doivent être justifiées. Tous les calculs intermédiaires nécessaires à la compréhension doivent notamment être reportés. Toute réponse non justifiée ne sera pas considérée par le correcteur. Les deux exercices sont indépendants.

Aucun document ni calculatrice ni portable n'est autorisé.

Formulaire :

$$\bullet \left(\sqrt{u(x)}\right)' = \frac{u'(x)}{2\sqrt{u(x)}}$$

$$\bullet \exp(1) = e \simeq 2,718 \quad ; \quad \exp(2) \simeq 7,389$$

Exercice 1 Équations différentielles

On s'intéresse à l'équation différentielle suivante :

$$xy' - 2\sqrt{y} = 0. \tag{1}$$

a) L'équation différentielle (1) est-elle à variables séparables ?

b) L'équation différentielle (1) est-elle linéaire ?

c) L'équation différentielle (1) admet-elle une ou des solutions constantes, et si oui lesquelles ?

d) Résoudre l'équation différentielle (1) en précisant dans quel(s) intervalle(s) de \mathbb{R} ses solutions sont définies.

e) Déterminer la solution passant par le point $(x = e; y = 1)$.

Exercice 2 Équations différentielles

1) On s'intéresse à l'équation différentielle suivante :

$$x y' - 3y = 0. \quad (2)$$

a) Comment s'appelle cette équation différentielle ?

b) La résoudre en précisant dans quel(s) intervalle(s) de \mathbb{R} ses solutions sont définies.

2) On s'intéresse à l'équation différentielle suivante :

$$x y' - 3y = 4x. \quad (3)$$

a) Après avoir recherché une solution particulière de cette sous la forme $y = a x + b$ (on déterminera a et b), donner la solution générale de l'équation différentielle (3).

b) Déterminer la solution passant par le point $(x = \pi; y = 1)$.

3) On s'intéresse enfin à l'équation différentielle suivante :

$$x y' - 3y = x^4 \cos(x). \quad (4)$$

Résoudre cette équation différentielle en précisant dans quel(s) intervalle(s) de \mathbb{R} ses solutions sont définies. On fera notamment attention au signe de x et on pourra utiliser une intégration par parties.

Modélisation, Optimisation, Équations différentielles
4ème épreuve - durée : 1h
Responsable : M. Gutnic

N°d'anonymat : B _ _ _ _ _

Avertissement : Les réponses doivent être effectuées sur l'énoncé et doivent être justifiées. Tous les calculs intermédiaires nécessaires à la compréhension doivent notamment être reportés. Toute réponse non justifiée ne sera pas considérée par le correcteur. Les deux exercices sont indépendants.

Aucun document ni calculatrice ni portable n'est autorisé.

Exercice 1 Quelques définitions

On considère la matrice :

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 2 \\ 0 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -2 \end{pmatrix}.$$

- 1) Quelle est la notation usuelle de l'élément de A qui vaut 0 ci-dessus ?
- 2) Pour ce même élément, que représente, comment note-t-on et quelle est la valeur du déterminant :

$$\begin{vmatrix} 1 & 2 \\ -1 & -2 \end{vmatrix}.$$

- 3) Comment note-t-on et que vaut le cofacteur de l'élément $a_{3,2} = -1$?

- 4) Que vaut le déterminant de A ?

5) On rappelle qu'une matrice M est nilpotente d'indice de nilpotence n lorsque M^n est la matrice nulle. Montrer que la matrice A est nilpotente et donner son indice de nilpotence.

Exercice 2 Algèbre

Pour produire une certaine substance, une entreprise d'industrie chimique utilise trois ingrédients différents A, B, et C. Les trois ingrédients doivent être dissous dans l'eau séparément avant qu'ils agissent l'un sur l'autre pour former la substance chimique.

Lorsqu'on combine 3 solutions contenant respectivement 1g/cm^3 de A, 4g/cm^3 de B et 5g/cm^3 de C, on obtient 25g de la substance recherchée. Pour des volumes de solution identiques, si les concentrations respectives en A, B et C sont respectivement de 2, 4 et 2g/cm^3 , on obtient 23g de la substance et si elles sont respectivement 2, 5 et 3g/cm^3 , on obtient 28g de la substance. On résume ces données dans le tableau suivant :

Concentrations (en g/cm^3)			Quantité de substance (en g)
A	B	C	
1	4	5	25
2	4	2	23
2	5	3	28

1) On note x , y et z les volumes (en cm^3) des solutions contenant respectivement les ingrédients A, B, et C. Donner le système linéaire satisfait par x , y et z .

2) Mettre ce système sous la forme matricielle $AX = B$, en précisant A , X et B .

3) Calculer le déterminant de la matrice A .

4) La matrice A est-elle inversible ? Si oui, calculer son inverse et en déduire la valeur des coûts journaliers x , y et z . (De façon alternative, on pourra utiliser la méthode de Cramer pour déterminer x , y et z .)